

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou (IRR) – Fiocruz Minas
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS BRUTOS E
SUBSTÂNCIAS, OBTIDOS DE PLANTAS E DE FUNGOS, CONTRA OS VÍRUS
DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA**

Por

Emerson de Castro Barbosa

Belo Horizonte - MG

2019

Tese – DCS- IRR	E.C. BARBOSA	2019
------------------------	---------------------	-------------

EMERSON DE CASTRO BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS BRUTOS E
SUBSTÂNCIAS, OBTIDOS DE PLANTAS E DE FUNGOS, CONTRA OS VÍRUS
DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou –
Fiocruz Minas, como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientação: Dra. Jaqueline Germano de Oliveira
Dr. Carlos Leomar Zani

Belo Horizonte - MG

2019

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

B238a
2019

Barbosa, Emerson de Castro.

Avaliação da atividade antiviral de extratos brutos e substâncias, obtidos de plantas e de fungos, contra os vírus Dengue, Zika e Chikungunya / Emerson de Castro Barbosa. Belo Horizonte, MG), 2019

XX , 218 f.: il.: 210 x 297mm.

Bibliografia: 159-182

Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Antivirais/uso terapeutico 2. Dengue. 3. Zika 3. Produtos naturais. I. Título. II. De Oliveira, Jaqueline Germano (Orientação). III. Zani, Carlos Leomar (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.918

EMERSON DE CASTRO BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS BRUTOS E
SUBSTÂNCIAS, OBTIDOS DE PLANTAS E DE FUNGOS, CONTRA OS VÍRUS
DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Banca examinadora:

Dra. Jaqueline Germano de Oliveira (IRR - Orientadora)
Dr. Carlos Leomar Zani (IRR- Orientador)
Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (UFMG)
Dr. Geraldo Célio Brandão (UFOP)
Dr. Pedro Augusto Alves (IRR)
Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado (IRR)
Dr. Marco Antônio Silva Campos (IRR- suplente)

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 03/12/2019

Dedico este trabalho aos meus pais e aos meus irmãos Shirlei, Sheila, Michele, Glauber e Micaele.

AGRADECIMENTOS

Obrigado,

À Natureza, que de tão repleta de mistérios e perfeição, é a mais bela expressão de Deus;

Aos meus pais por me presentear com os primeiros estímulos ao estudo: Eu ainda muito criança e choramingando para não ir para a lavoura de milho, escutava do meu pai: “Esse daí não gosta da roça, nasceu foi pra estudar”. Eis que a vida acadêmica é o efeito dessa frase! Gratidão!

À Prof. Dra. Jaqueline Germano de Oliveira, idealizadora deste trabalho, orientadora, amiga, e o maior exemplo de positividade que já conheci. Sua dedicação e carinho aos estudantes, com mimos, doces e sorvetes, preencheu a minha fase de pós-graduando com saudosas lembranças. Obrigado imensamente pelos ensinamentos, por me apresentar à Virologia, pelas discussões ricas, pela confiança e empenho na minha formação como pesquisador. Que alegria em ter realizado essa etapa tendo você como mentora!

Ao Prof. Dr. Carlos Leomar Zani pelos ensinamentos, paciência, dedicação e orientação inestimável;

À Dra. Tânia Maria de A. Alves pelas valiosas discussões, dedicação e também por exercer um papel essencial na minha formação;

À Prof. Dra. Jacqueline Takahashi, pelas valiosas contribuições e orientações como banca examinadora no exame de qualificação;

Aos professores, Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (UFMG),
Dr. Geraldo Célio Brandão (UFOP),
Dr. Pedro Augusto Alves (IRR),
Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado (IRR) e ao
Dr. Marco Antônio Silva Campos (IRR),
Por gentilmente aceitarem o convite para compor a banca avaliadora e pelas preciosas contribuições para o enriquecimento deste trabalho;

Aos pesquisadores do ICM, Dr. Rodrigo C. Oliveira, Dr. Carlos Eduardo Calzavara, Dra. Érica Alves, Dra. Soraya Gaze, Dra. Jacqueline Fiuza e Dra. Adriana Bozzi, pelos ensinamentos, discussões e convívio agradável;

Ao corpo técnico do ICM, em especial à Lu (Luciana Lisboa), obrigado pela dedicação constante;

Ao QPNB pela disponibilização do espaço e aos pesquisadores, Dra. Betânia B. Cota, Markus Kohlhoff, Alisson Samuel P. Caldeira e Ezequias P. Siqueira pelo auxílio inestimável e discussões esclarecedoras;

À Fátima Marques, a qual se dedicou e contribuiu consideravelmente para a realização deste trabalho;

À Dani (Daniela Nabak) pelo auxílio constante durante os ensaios, dedicação e amizade e à Mariana C. Ferreira, sempre solícita e receptiva;

Agradecimentos especiais ao Danilo Gontijo pelo auxílio nas planilhas desde os meus primeiros passos, no início deste estudo como aluno de Iniciação Científica;

Ao Laboratório de Vírus da UFMG, em especial à Dra. Erna G. Kroon, pelo apoio e influência positiva durante toda a minha formação, pela dedicação a este trabalho e pelos inúmeros ensinamentos que direta ou indiretamente me foram passados;

Ao Dr. Luiz Rosa e toda sua equipe, principalmente à Camila Carvalho, Eldon Gomes, Vívian Gonçalves, Valéria Godinho e Lara Santiago, pelas colaborações e contribuições;

Às estudantes de Iniciação Científica que contribuíram para o desenvolvimento desse projeto, Marcele, Gabriele, Juliana, Ana Carolina e atualmente a Tamíris Vanessa;

Agradecimento especial à Prof. Dra. Ana Thereza Chaves da qual veio a oportunidade para os meus primeiros passos na pesquisa no IRR;

Aos meus irmãos Shirlei, Sheila, Michele, Glauber e Micaele, pelo carinho, presença constante e apoio incondicional;

A minha querida avó Alicinha e amada tia Nena (ambas em memória);

À Doinha (Sidnária) e à Di (Diana Mota), pelo carinho, apoio e dedicação, essenciais nesse período;

À família Vilani, especialmente à tia Maria (Maria Duarte) e à Fê (Fernanda Vilani). Que sorte tive eu de encontrá-los e desfrutar de um ambiente familiar tão sereno e rico de estímulos à vida acadêmica! Vocês foram meu alicerce para esta conquista. Meu mais profundo obrigado!

À Karinovski (Karina Paula), a qual foi a responsável por despertar o meu primeiro desejo para o doutorado;

Aos queridos amigos: Sarah Carolline, Shirlei Carla, Kelly Lopes e à família Coelis, pelo apoio e incentivo ao longo de todo o caminho;

A querida Clari pelo carinho constante (com mimos, doces, lanches) e de uma atenção e cuidado maternos. O seu carinho e alegria tornaram essa etapa muito mais gratificante;

A todos os estudantes e colegas do ICM, em especial aqueles que a convivência permitiu que nos tornássemos amigos por toda a vida. Entre eles a Anninha (Anna Carolina Cançado), a Bella (Izabella Andrade), o Goulart (Jorge Goulart), a Stellinha (Stella Colombaroli), a Eneidinha (Eneida Oliveira), a Camila Sales, a Pri (Priscila de

Cássia) e o Vitinho (Vítor Simões). Levarei comigo as lembranças mais engraçadas dos nossos momentos de descontração;

A todos os professores que tive ao longo da Pós-Graduação no IRR;

À Secretaria de Ensino da Pós-graduação, sempre solícitos;

À Coordenação do Curso de Pós-graduação pelo apoio constante e pela política de incentivo à produção acadêmica;

À FIOCRUZ, ao IRR, à Plataforma RPT10A, à CAPES, FAPEMIG e ao CNPq;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“A natureza reservou para si tanta liberdade que não a podemos nunca penetrar completamente com o nosso saber e a nossa ciência.”

Johann Wolfgang von Goethe

RESUMO

O *Dengue virus* (DENV), *Zika virus* (ZIKV) e o *Chikungunya virus* (CHIKV) são arbovírus amplamente distribuídos em países tropicais e subtropicais e são as principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A febre hemorrágica causada pelo DENV, a microcefalia e anormalidades neurológicas em recém nascidos causadas pelo ZIKV e cronificação de artralgia grave causada pelo CHIKV, despertaram a urgência para a busca de vacinas e drogas antivirais efetivas para a prevenção e tratamento de infecções causadas por esses vírus. Visto que natureza fornece um vasto reservatório de entidades químicas complexas, neste trabalho foi feito o fracionamento biomonitorado de extratos brutos de vegetais e de fungos com atividade antiviral contra pelo menos um dos vírus aqui estudados para identificação e isolamento de substâncias antivirais. Para tal foram utilizadas técnicas como UPLC/HPLC acoplada à espectrometria de massas. Mais de 6.000 frações obtidas no fracionamento foram testadas contra DENV-2 e ZIKV. Paralelamente foram testados novos extratos brutos contra DENV-2, ZIKV e CHIKV, a saber: (i) 4.000 extratos testados contra DENV-2, dentre os quais identificamos 61 extratos vegetais e 129 extratos fúngicos ativos; (ii) 1.107 extratos testados contra ZIKV, identificando-se como ativos, 28 vegetais e 20 fúngicos; (iii) 565 contra o CHIKV, resultando em 20 extratos vegetais e 13 extratos fúngicos ativos. A atividade antiviral *in vitro* de extratos/frações foi feita pelo método do MTT, visualização do efeito citopático (ECP) viral por microscopia óptica e por ensaios virucidas. Onze extratos de fungos endofíticos foram ativos contra os 3 vírus. Oitenta e nove extratos fúngicos apresentaram valores de índice de seletividade (IS) de 1 a > 500, sendo que, dentre os 51 extratos testados, 49 apresentam atividade virucida contra o DENV-2. Onze extratos fúngicos demonstraram IS de > 1,0 a 4,0 contra o ZIKV. O fracionamento de 20 extratos fúngicos sugeriu a presença de 12 substâncias em frações ativas contra DENV-2. Uma substância clorada ativa contra DENV-2 e ZIKV (C₁₉H₁₇ClN₂O₇) está em processo de isolamento. Extratos vegetais obtidos de plantas de 39 famílias foram ativos contra DENV-2, sendo que extratos de espécies pertencentes às famílias Amaryllidaceae, Begoniaceae, Calophyllaceae, Fabaceae, Lythraceae, Malpighiaceae, Rubiaceae e Sapindaceae foram ativos contra DENV-2, ZIKV e CHIKV. Quarenta e cinco extratos vegetais demonstraram valores de IS de 1,1 a 61,8 contra DENV-2 e IS de > 1,0 a 5,2 contra ZIKV. Extratos obtidos de espécies de Amaryllidaceae, Fabaceae e Orchidaceae geraram extratos não virucidas contra DENV-2 e ZIKV. O fracionamento de 15 extratos de espécies de Amaryllidaceae, Fabaceae e Orchidaceae permitiu a identificação de 25 substâncias em frações ativas contra DENV-2 e/ou ZIKV. Entre elas, a licorina, pretazetina, narciclasina e a narciclasina-4-O-β-D-xilopiranosídeo, cuja identidade foi confirmada de forma inequívoca por ressonância magnética, mostraram atividade antiviral não virucida, com IS de 3,7 a 8,6 contra DENV-2 e ZIKV. Derivados mono- e di- acetilados de licorina, obtidos por síntese química, foram menos citotóxicos, porém inativos contra DENV-2, ZIKV e CHIKV. Quando combinadas em diversas concentrações, a licorina e a pretazetina não apresentaram potenciação da atividade antiviral. A predição *in silico*, pela plataforma pkCSM, dos perfis de farmacocinética e de toxicidade (ADMET) mostrou que a licorina, pretazetina, narciclasina e narciclasina-4-O-β-D-xilopiranosídeo têm boa metabolização e não possuem toxicidade mutagênica; A licorina e a pretazetina foram preditas com melhor absorção oral, distribuição e excreção, sugerindo que ambas podem ser candidatas para testes em modelo animal. Em suma, neste trabalho foram identificadas 37 substâncias derivadas de plantas e de fungos como possíveis antivirais. Vale ressaltar que nenhuma delas já foi descrita com atividade contra o ZIKV.

Palavras chave: Antivirais, Dengue, Zika, Produtos naturais

ABSTRACT

Dengue virus (DENV), *Zika virus* (ZIKV) and *Chikungunya virus* (CHIKV) are arboviruses widely distributed in tropical and subtropical countries and are the leading causes of morbidity and mortality worldwide. DENV hemorrhagic fever, microcephaly and neurological abnormalities in newborns caused by ZIKV, and severe chronic arthralgia caused by CHIKV, have called for urgent search for effective vaccines and antiviral drugs for the prevention and treatment of infections caused by these viruses. Since nature provides a vast reservoir of complex chemical entities, in our study, to identify and isolate antiviral substances against DENV-2; ZIKV and CHIKV, we performed the bioguided fractionation of crude extracts of plants and fungi with antiviral activity against at least one of the viruses studied here, by using UPLC/HPLC coupled to mass spectrometry. The *in vitro* antiviral activity of extracts/fractions was done by the MTT method, visualization of viral cytopathic effect (ECP) by optical microscopy and virucidal assays. More than 6,000 extract fractions were tested against DENV-2 and ZIKV. In addition, new crude extracts against the three viruses, namely: (i) 4,000 extracts against DENV-2, among which we identified 61 plant extracts and 129 active fungal extracts; (ii) 1,107 against ZIKV, identifying 28 plant extracts and 20 active fungal and; (iii) 565 against CHIKV, resulting in 20 plant extracts and 13 active fungal. Eleven extracts from endophytic fungi were active against the 3 viruses. Eighty-nine fungal extracts showed selectivity index (IS) values ranging from 1 to > 500, and among the 51 extracts tested 49 showed virucidal activity against DENV-2. Eleven fungal extracts showed IS of > 1.0 to 4.0 against ZIKV. The fractionation of 20 fungal extracts suggested the presence of 12 substances in active fractions against DENV-2. A chlorinated substance active against DENV-2 and ZIKV ($C_{19}H_{17}ClN_2O_7$) is being isolated. Plant extracts obtained from plants of 39 families were active against DENV-2, and extracts from species of Amaryllidaceae, Begoniaceae, Calophyllaceae, Fabaceae, Lythraceae, Malpighiaceae, Rubiaceae and Sapindaceae were active against DENV-2, ZIKV and CHIKV. Forty-five plant extracts showed IS values from 1.1 to 61.8 against DENV-2; and IS from > 1.0 to 5.2 against ZIKV. Extracts obtained from species of Amaryllidaceae, Fabaceae and Orchidaceae were non-virucidal extracts against DENV-2 and ZIKV. The fractionation of 15 extracts of Amaryllidaceae, Fabaceae, Orchidaceae species allowed the identification of 25 substances in active fractions against DENV-2 and / or ZIKV. Among them, lycorine, pretazettine, narciclasine and narciclasine-4-*O*- β -D-xylopyranoside, whose identity was unequivocally confirmed by nuclear magnetic resonance, showed non-virucidal antiviral activity, with IS = 3.7 to 8.6 against DENV-2 and ZIKV. Mono- and di-acetylated lycorine derivatives obtained by chemical synthesis were less cytotoxic but inactive against DENV-2, ZIKV and CHIKV. When combined in various concentrations, lycorin and pretazettine did not show potentiation of antiviral activity. The pkCSM platform for *in silico* of pharmacokinetic and toxicity profiles (ADMET) suggested (i) lycorine, pretazettine, narciclasine and narciclasine-4-*O*- β -D-xylopyranoside with good metabolism and no mutagenic toxicity; (ii) lycorine and pretazettine with better oral absorption, distribution and excretion suggesting that both may be candidates for animal model testing. In summary, 37 substances derived from plants and fungi were identified as possible antivirals. It is noteworthy that none of them have been described with activity against ZIKV.

Keywords: Antivirals, Dengue, Zika, Natural products

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CICLO DE VIDA DOS FLAVIVÍRUS.....	25
FIGURA 2 - CICLO DE REPLICAÇÃO DO CHIKV.....	27
FIGURA 3 - LOCAIS DE COLETA DE AMOSTRAS DE FUNGOS, VEGETAIS E BACTÉRIAS DEPOSITADAS NA EXTRATOTECA DO IRR.....	61
FIGURA 4 - TRIAGENS DE EXTRATOS VEGETAIS E FÚNGICOS CONTRA DENV-2, ZIKV E CHIKV.....	64
FIGURA 5 - CLASSIFICAÇÃO DO ECP DO DENV-2 EM CÉLULAS BHK-21.	67
FIGURA 6 - TRIAGEM DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE 4.000 EXTRATOS DE PLANTAS E DE FUNGOS CONTRA DENV-2.	78
FIGURA 7 - TRIAGEM DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIVIRAL CONTRA ZIKV DE 1.107 EXTRATOS DE PLANTAS E DE FUNGOS.	81
FIGURA 8 - TRIAGEM DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTIVIRAL CONTRA CHIKV DE 565 EXTRATOS DE PLANTAS E DE FUNGOS.	83
FIGURA 9 - ATIVIDADE CONTRA ZIKV E CHIKV DE FAMÍLIAS DE PLANTAS DOS EXTRATOS VEGETAIS ATIVOS CONTRA DENV-2... ..	86
FIGURA 10 - ATIVIDADE CONTRA ZIKV E CHIKV DE EXTRATOS FÚNGICOS ATIVOS CONTRA DENV-2.	87
FIGURA 11 - EXTRATOS VEGETAIS E FÚNGICOS FRACIONADOS E TESTADOS CONTRA DENV-2 E ZIKV	113
FIGURA 12 - CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO AQUOSA DA PARTIÇÃO DO EXTRATO DO FUNGO UFMGCB5797	118
FIGURA 13 - FRACIONAMENTO BIOMONITORADO DO EXTRATO EX11596, OBTIDO FUNGO <i>PENICILLIUM CHRYSOGENUM</i>	120
FIGURA 14 - IDENTIFICAÇÃO DA MELEAGRINA EM EXTRATOS DE <i>P. CHRYSOGENUM</i>	122
FIGURA 15 - CROMATOGRAMAS DE ÍONS COM M/z 282 DE EXTRATOS DE RECLTIVO DO FUNGO <i>P. CHRYSOGENUM</i>	123
FIGURA 16 - CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DO FRACIONAMENTO BIOMONITORADO DO EXTRATO DE <i>PSEUDOGYMNOASCUS</i> SP.	124
FIGURA 17 - POSSIBILIDADES DE FÓRMULA ESTRUTURAL PARA O COMPOSTO $C_{19}H_{17}ClN_2O_7$	125
FIGURA 18 - CROMATOGRAMA OBTIDO NO FRACIONAMENTO DO EXTRATO OBTIDO DE FLORES (EX13356) DE <i>H. GLAUDESCENS</i>	134
FIGURA 19 - PROPOSTA DE IDENTIFICAÇÃO DO COMPONENTE ELUINDO AOS 20,1MIN COMO PANCRATINA	135
FIGURA 20 - IDENTIFICAÇÃO DA PRETAZETINA	136
FIGURA 21 - IDENTIFICAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DA RUTINA.	137
FIGURA 22 - CROMATOGRAMAS DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO EX13358, OBTIDO DE BULBOS DE <i>H. GLAUDESCENS</i>	138
FIGURA 23 - IDENTIFICAÇÃO DA LICORINA.	139
FIGURA 24 - CROMATOGRAMA DO FRACIONAMENTO DO EXTRATO DE FLOR DO <i>H. PUNICEUM</i>	143
FIGURA 25 - EFEITO CRUZADO ENTRE AÇÃO ANTIVIRAL CONTRA ZIKV E TOXICIDADE EM CÉLULAS VERO.	146
FIGURA 26 – ISOBOLOGRAMAS: ATIVIDADE ANTIVIRAL E CITOTOXICIDADE DA LICORINA:PRETAZETINA COMBINADAS.	153

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EXTRATOS DE PLANTAS: DETERMINAÇÃO DA CC ₅₀ , CE ₅₀ , IS E ATIVIDADE VIRUCIDA CONTRA DENV-2 E ZIKV	92
TABELA 2 - EXTRATOS DE FUNGOS: DETERMINAÇÃO DE CC ₅₀ , CE ₅₀ , IS E ATIVIDADE VIRUCIDA CONTRA DENV-2 E ZIKV	103
TABELA 3 - CC ₅₀ , CE ₅₀ , IS E ATIVIDADE VIRUCIDA DE SUBSTÂNCIAS CONTRA DENV-2, ZIKV E CHIKV.....	149
TABELA 4 - PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i> DO PERFIL ADMET DE SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS	156

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN – Acetonitrila

ADE – Infectividade aumentada por anticorpos (Antibody-Dependent Enhancement)

ADMET - Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity)

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Acquired Immunodeficiency Syndrome)

bar - Unidade de pressão

BBB – Barreira hematoencefálica (Blood–Brain Barrier)

BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro

BDA – Batata Dextrose-Ágar

BHK-21 – Linhagem celular de rim de hamster recém-nascido (Baby Hamster Kidney)

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio (Biochemical Oxygen Demand)

Caco2 - Linhagem de adenocarcinoma de cólon humano que mimetiza o epitélio gastrointestinal

CC₅₀ – Concentração Citotóxica 50

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos. (Centers for Disease Control and Prevention)

CE₅₀ - Concentração Efetiva 50

CHIKV – *Chikungunya virus*

CHIKF – Febre do Chikungunya

CHX – Cicloheximida

CMV - Citomegalovírus

CMC - Carboximetilcelulose

CPqAM - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

CYP1A2 - Citocromo P450 1A2 (Cytochrome P450 1A2)

CYP2C19 - Citocromo P450 2C19 (Cytochrome P450 2C19)

CYP2C9 - Citocromo P450 2C9 (Cytochrome P450 2C9)

CYP2D6 - Citocromo P450 2D6 (Cytochrome P450 2D6)

CYP2D6 – Citocromo P450 2D6 (Cytochrome P450 2D6)

CYP3A4 - Citocromo P450 3A4 (Cytochrome P450 3A4)

CYP3A4 - Citocromo P450 3A4 (Cytochrome P450 3A4)

DAD - Detector de rede de diodos (Diode Array detector)

DCM - Diclorometano

DENV - *Dengue virus*

DENV-2 – *Dengue virus* tipo 2

DMEM - Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DMSO - Dimetilsufóxido

DO – Densidade Óptica

DQ-UFMG - Departamento de Química da UFMG

DTMR – Doses Terapêuticas Máximas Recomendadas (Maximum Recommended Therapeutic Dose)

EEEV – Vírus da encefalite equina Ocidental (*Eastern equine encephalitis virus*)

ECP – Efeito Citopático

ELISA - Ensaio enzimático de Imunoabsorção (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

ELSD - Detector Evaporativo com Espalhamento De Luz (Evaporative Light Scattering Detector)

ESI-IonTrap - Ionização por Electrospray do tipo Armadilha de Íons (Electrospray Ionization Ion Trap)

ESI-qToF – Ionização por Electrospray do tipo Quadrupolo-Tempo de Voo (Electrospray Quadrupole Time-Of-Flight)

FA – Febre amarela

FDA - Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (Food and Drug Administration)

FIC – Concentração Inibitória Fracionada (Fractional Inhibitory Concentration)

FICI - Índice das Concentrações Inibitórias Fracionadas (Fractional Inhibitory Concentration Index)

hERG - Gene humano ether-a-go-go (human Ether-à-Go-Go Related Gene)

HIV - Vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency virus*)

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Pressão (High Pressure Liquid Chromatography)

HHV-1 – Herpesvirus humano tipo 1 (*Human herpesvirus 1*)

HHV-2 – Herpesvirus humano tipo 2 (*Human herpesvirus 2*)

HTS – Triagem de Alto Desempenho (High Throughput Screening)

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

ICM – Laboratório de Imunologia Celular e Molecular

IDV – Imunologia de doenças virais

IFN – Interferon

IFN- α - Interferon alfa

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IL-6 – Interleucina 6

IRR – Instituto René Rachou

IS – Índice de seletividade

JEV – Vírus da encefalite Japonesa (*Japanese encephalitis virus*)

KBCL – Kalbreclasina

L-15 - Meio Leibowitz L-15

LIC - Licorina

LOAEL - Nível mais baixo de efeito adverso observado (lowest observed adverse effect level)

MAC-ELISA - Ensaio Enzimático de Imunoabsorção para Captura de Anticorpos IgM (IgM antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay)

MAYV – *Mayaro virus*

MEM - Meio Mínimo Essencial de Eagle (Minimum Essential Medium Eagle)

MeOH – Metanol

MS - Espectrometria de Massas (Mass spectrometry)

MS² - Espectrometria de Massa em tandem (também conhecida como MS/MS)

MTT - Brometo de 3-(4,5- dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NaCl – Cloreto de sódio

NCL - Narciclasina

NCLXP - Narciclasina-4-O-β-D-xilopiranosídeo

NIH - Instituto Nacional da Saúde dos Estados Unidos (National Institutes of Health of the United States of America)

nm – Nanômetro

NOAEL - Nível Sem Efeitos Adversos Observáveis (No Observed Adverse Effect Level)

NS1 – Não estrutural 1 (Non Structural)

NS2A – Não estrutural 2A

NS2B – Não estrutural 2B

NS3 – Não estrutural 3

NS4A – Não estrutural 4A

NS4B – Não estrutural 4B

NS5 – Não estrutural 5

OCT2 renal - Transportador de cátions orgânicos 2 renal (Organic cation transporter 2 renal)

ODS - Octadecilsilano

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde

PFU – Unidades Formadoras de Placa (Plaque-Forming Unit)

pkCSM - Predição de Propriedades Farmacocinéticas de Pequenas Moléculas (Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic Properties)

PN – Produtos Naturais

PRNT - Teste de Neutralização por Redução de Placas (Plaque Reduction Neutralization Test)

PTZ - Pretazetina

QPNB – Química de Produtos Naturais Bioativos

QqQ - Triplo Quadrupolo QqLIT - “Quadrupole/Linear Ion Trap”, Quadrupolo/Armadilha de Íons Linear

QqToF - Quadrupolo/Tempo de Voo (Quadrupole/Time-of-Flight)

RdRp – RNA polimerase dependente de RNA (RNA-dependent RNA polymerase)

RE – Retículo Endoplasmático

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RNA - Ácido Ribonucleico (Ribonucleic acid)

RPT10A - Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz 10A

RT-PCR - Reação em Cadeira da Polimerase com Transcriptase Reversa (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

SFB – Soro Fetal Bovino

SISGEN - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

SLEV - Vírus da Encefalite de St. Louis (*St. Louis encephalitis virus*)

SMILES – Sistema de Entrada de Linha de Dados Moleculares Simplificado (Simplified molecular-input line-entry system)

SNC – Sistema Nervoso Central

SPE - Extração em Fase Sólida (Solid Phase Extraction)

TBEV - vírus da encefalite transmitida por carrapatos (*Tick-Borne Encephalitis virus*)

TMS – Tetrametilsilano

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa (Tumor necrosis factor alpha)

UHPLC - Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência (Ultra High Performance Liquid Chromatography)

UI – Unidades Internacionais

UPLC - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (Ultra Performance/Pressure Liquid Chromatography)

UPLC-HRMSMS - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas e esta acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução

UPLC-UV-ESI-HRMS – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência com detecção no Ultravioleta e acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução com Ionização por Electrospray

UV-vis – Ultravioleta visível

VDss - Volume de distribuição no estado estacionário (Volume of Distribution at steady-state)

VEEV - Vírus da encefalite equina Venezuelana (*Venezuelan equine encephalitis virus*)

VSR - Vírus sincicial respiratório (*Respiratory syncytial virus*)

VSV - Vírus da Estomatite Vesicular (*Vesicular stomatitis virus*)

WHO – Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)

WNV – Vírus do Oeste do Nilo (*West Nile virus*)

YFV – Vírus da febre amarela (*Yellow fever virus*)

ZIKV - *Zika virus*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	PREFÁCIO	21
1.2	CARACTERÍSTICAS E CICLO DE REPLICAÇÃO DA FAMÍLIA <i>FLAVIVIRIDAE</i>	24
1.3	CARACTERÍSTICAS DO CICLO DE REPLICAÇÃO DOS <i>ALPHAVIRUS</i>	26
1.4	A DENGUE	28
1.5	A FEBRE DO ZIKA E A SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA	31
1.6	A FEBRE DO CHIKUNGUNYA	34
1.7	PRODUTOS NATURAIS E A BIODIVERSIDADE COMO FONTE DE DROGAS ANTIVIRAIS	35
1.8	SUBSTÂNCIAS ANTIVIRAIS CONTRA DENV, ZIKV E CHIKV	41
1.9	ALVOS PARA DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE ANTIVIRAIS	47
2	JUSTIFICATIVA	51
3	OBJETIVOS	53
3.1	OBJETIVO GERAL	53
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4	FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA DE TRABALHO	54
5	MATERIAIS E MÉTODOS	55
5.1	VÍRUS E LINHAGENS CELULARES	55
5.2	MULTIPLICAÇÃO DO DENV-2 PARA OBTENÇÃO DE ESTOQUE VIRAL (<i>POOL</i> TRABALHO)	56
5.3	MULTIPLICAÇÃO DO ZIKV PARA OBTENÇÃO DE ESTOQUE VIRAL (<i>POOL</i> TRABALHO)	57
5.4	MULTIPLICAÇÃO DO CHIKV PARA OBTENÇÃO DE ESTOQUE VIRAL (<i>POOL</i> TRABALHO)	58
5.5	TITULAÇÃO DE DENV-2	58
5.6	TITULAÇÃO DO ZIKV E DO CHIKV	60
5.7	EXTRATOTECA DA PLATAFORMA RPT10A – COLEÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS E DE FUNGOS DA FIOCRUZ	61
5.8	PRODUÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS E DE FUNGOS EM MAIOR ESCALA	62
5.9	PREPARO DE MICROPLACAS COM OS EXTRATOS PARA OS ENSAIOS DE TRIAGEM DA ATIVIDADE ANTIVIRAL	63
5.10	TRIAGEM DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS E FRAÇÕES CONTRA DENV-2, ZIKV E CHIKV	65
5.11	AValiação DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS CONTRA DENV-2 PELO EFEITO CITOPÁTICO (ECP) VIRAL	66
5.12	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA 50 (CE ₅₀) DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE ANTIVIRAL CONTRA DENV-2 E ZIKV	67
5.13	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CITOTÓXICA 50 (CC ₅₀) DE EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS EM CÉLULAS BHK-21 E EM CÉLULAS VERO	68
5.14	ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS) DE EXTRATOS/FRAÇÕES/SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE ANTIVIRAL	69
5.15	ENSAIO VIRUCIDA DE EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ATIVAS CONTRA DENV-2 E ZIKV	69

5.16	FRACIONAMENTO BIOMONITORADO DE EXTRATOS	71
5.17	CROMATOGRAFIA ANALÍTICA EM HPLC E UPLC COM COLETA DE FRAÇÕES PARA BIOENSAIO	72
5.18	CROMATOGRAFIA SEMIPREPARATIVA COM COLETA DE FRAÇÕES PARA BIOENSAIO	72
5.19	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SUBSTÂNCIAS SUGERIDAS PELAS PLATAFORMAS DE ANÁLISE	73
5.20	ANÁLISES POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	74
5.21	PREPARAÇÃO DOS ACETATOS DE LICORINA	74
5.22	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIVIRAL E DA CITOTOXICIDADE DE COMBINAÇÕES DA LICORINA COM A PRETAZETINA	75
5.23	PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i> DE PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS E TOXICOLÓGICOS (ADMET) DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS ...	76
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
6.1	BREVE HISTÓRICO DA BUSCA POR ANTIVIRAIS CONTRA ARBOVÍRUS PELO NOSSO GRUPO DE PESQUISA.....	77
6.2	TRIAGEM DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS DE PLANTAS E DE FUNGOS CONTRA DENV-2, ZIKV E CHIKV	78
6.2.1	<i>Triagem de extratos contra DENV-2</i>	78
6.2.2	<i>Triagem da atividade antiviral de extratos de plantas e de fungos contra ZIKV</i>	80
6.2.3	<i>Triagem da atividade antiviral de extratos contra CHIKV</i>	82
6.2.4	<i>Extratos ativos contra DENV-2, ZIKV e/ou CHIKV</i>	84
6.3	CC ₅₀ , CE ₅₀ , IS E ATIVIDADE VIRUCIDA DE EXTRATOS VEGETAIS.....	90
6.4	CC ₅₀ , CE ₅₀ , IS E ATIVIDADE VIRUCIDA DE EXTRATOS FÚNGICOS.....	101
6.5	IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIVIRAIS PELO FRACIONAMENTO BIOMONITORADO DE EXTRATOS ATIVOS POR UPLC- HRMS/MS.....	111
6.5.1	<i>Extratos fúngicos fracionados</i>	113
6.5.1.1	Extratos dos fungos endofíticos UFMGCB5797 e UFMGCB5779	116
6.5.1.2	Extratos do <i>Penicillium chrysogenum</i>	120
6.5.1.3	Extratos do <i>Pseudogymnoascus</i> sp.....	123
6.5.2	<i>Fracionamento biomonitorado de extratos vegetais</i>	127
6.5.2.1	Extratos de <i>Chamaecrista</i> sp. (Fabaceae).....	129
6.5.2.2	Extratos de <i>Habenaria petalodes</i> (Orchidaceae)	130
6.5.2.3	Extratos de <i>Hippeastrum glaucescens</i> (Amaryllidaceae).....	133
6.5.2.4	Extratos de <i>Hippeastrum puniceum</i> (Amaryllidaceae)	142
6.5.3	<i>Identificação e isolamento de substâncias de extratos vegetais</i>	148
6.6	ATIVIDADE ANTIVIRAL DE ACETATOS DE LICORINA CONTRA DENV-2, ZIKV E CHIKV	150
6.7	COMBINAÇÃO DA LICORINA COM A PRETAZETINA: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL EM CÉLULAS INFECTADAS COM DENV-2 E ZIKV E TOXICIDADE EM CÉLULAS BHK-21 E VERO	151
6.8	PREDIÇÃO DE PERFIS FARMACOCINÉTICOS E DE TOXICIDADE DAS SUBSTÂNCIAS COM ESTRUTURA CONFIRMADA	154
7	CONCLUSÕES	157
8	PERSPECTIVAS	158

9	REFERÊNCIAS	159
10	APÊNDICES.....	183
10.1	APÊNDICE A – EXTRATOS VEGETAIS ATIVOS CONTRA DENV-2 NA TRIAGEM DE 2013 A 2015	185
10.2	APÊNDICE B – EXTRATOS FÚNGICOS ATIVOS CONTRA DENV-2 NA TRIAGEM DE 2013 A 2015	187
10.3	APÊNDICE C - EXTRATOS VEGETAIS ATIVOS CONTRA DENV-2 NA TRIAGEM DE 2015 A 2019	189
10.4	APÊNDICE D - EXTRATOS FÚNGICOS ATIVOS CONTRA DENV-2 NA TRIAGEM DE 2015 A 2019	191
10.5	APÊNDICE E - EXTRATOS VEGETAIS ATIVOS CONTRA ZIKV NA TRIAGEM DE 2015 A 2019	196
10.6	APÊNDICE F - EXTRATOS FÚNGICOS ATIVOS CONTRA ZIKV NA TRIAGEM DE 2015 A 2019	197
10.7	APÊNDICE G - EXTRATOS VEGETAIS ATIVOS CONTRA CHIKV NA TRIAGEM DE 2015 A 2019	198
10.8	APÊNDICE H - EXTRATOS FÚNGICOS ATIVOS CONTRA CHIKV NA TRIAGEM DE 2015 A 2019	199
10.9	APÊNDICE I – PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE ENSAIOS COM DENV-2 E ZIKV	200
10.9.1	<i>Padronização para os ensaios antivirais contra ZIKV</i>	<i>200</i>
10.9.2	<i>Validação dos ensaios de triagem contra ZIKV e DENV-2.....</i>	<i>204</i>
10.10	APÊNDICE J – COMPARAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DA ESTRUTURA DA PRETAZETINA	216
10.11	APÊNDICE L – DETERMINAÇÃO DE FIC DE COMBINAÇÕES DA LICORINA:PRETAZETINA TESTADAS CONTRA DENV-2, ZIKV, E TOXICIDADE EM CÉLULAS BHK-21 E VERO.	217

1 INTRODUÇÃO

1.1 Prefácio

Nos últimos 30 anos, assim como visto para outros vírus, a emergência e re-emergência de arbovírus têm se tornado uma ameaça global. Os arbovírus são um grupo diversificado de vírus transmitidos por uma variedade de vetores artrópodes que incluem mosquitos, carrapatos, entre outros. O termo arbovírus deriva não somente pela sua veiculação por artrópodes, mas porque parte do ciclo replicativo desses vírus ocorre em artrópodes. Existem cerca de de 550 espécies de arbovírus, dentre as quais, mais de 150 estão relacionadas com doenças em seres humanos (WHO, 1985; YOUNG, 2014).

Os arbovírus pertencentes às famílias *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*) como o vírus da febre amarela ou *Yellow fever virus* (YFV), *Dengue virus* (DENV) e *Zika virus* (ZIKV) e *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*), como o *Chikungunya virus* (CHIKV) e *Mayaro virus* (MAYV) são responsáveis por infecções que causam um alto impacto social e econômico, devido à alta morbidade e mortalidade associadas.

O MAYV foi responsável por surtos de doença febril aguda e síndrome de artralgia na Região Amazônica e no Planalto Central do Brasil, bem como em outros países da América do Sul (FIGUEIREDO, 2007; MOTA et al., 2015; ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018).

O primeiro caso de transmissão local de CHIKV fora da África, Ásia e Europa foi reportado na Guiana Francesa em 2013. Além disso, em pouco mais de um ano após essa dispersão a infecção de mais de 1 milhão de pessoas foi reportada (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014). Desde então, 47 países e territórios nas Américas do Norte, Central e do Sul têm reportado surtos ou epidemias causadas por CHIKV (CDC, 2019). No Brasil, em 2019, foram notificados mais de 123 mil casos e 75 óbitos por infecções pelo CHIKV, sendo as maiores taxas de incidência nas regiões Sudeste e Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Assim como os alphavírus, vários flavivírus são agentes etiológicos de doenças de alto impacto à saúde pública mundial, tais como o YFV, o ZIKV, os sorotipos 1-4 do DENV e o vírus do Oeste do Nilo (*West Nile virus* - WNV) (GUZMAN; HARRIS, 2015; MAYER, 2017; WHO, 2019). Outros flavivírus ainda são restritos a algumas

regiões como o vírus da encefalite Japonesa (*Japanese encephalitis virus* - JEV), o vírus da encefalite transmitida por carrapatos (*Tick-borne encephalitis virus* - TBEV), o vírus da encefalite equina Venezuelana (*Venezuelan equine encephalitis virus* - VEEV) e o vírus da encefalite de St. Louis (*Saint Louis encephalitis virus* - SLEV).

Mesmo existindo há décadas uma vacina eficaz contra a febre amarela, no período 2016/2017 foi registrada uma epidemia de febre amarela no Brasil, sobretudo na região Sudeste, com 779 casos humanos confirmados e 262 óbitos, caracterizada como a maior deste século no Brasil. Nos meses de janeiro a maio de 2019, foram registrados 1281 casos notificados e 14 óbitos por febre amarela (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; 2019).

A infecção pelo DENV ocorre em pelo menos 128 países, com quase 4 bilhões de pessoas em risco (BHATT et al., 2013; STANAWAY et al., 2016). No Brasil, somente em 2019, foram notificados cerca de 1,5 milhão de casos prováveis, sendo que 62 % desses estão concentrados nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás. Além disso, mais de 1.300 casos foram confirmados como dengue grave e cerca de 17.000 casos como dengue com sinais de alarme, contabilizando 683 óbitos até outubro de 2019 (Ministério da Saúde, 2019).

O ZIKV, anteriormente restrito à África, invadiu outros continentes causando grande preocupação mundial (HAYES, 2009), principalmente devido a sua associação com a microcefalia e com patologias neurológicas graves (SAIZ; MARTIN-ACEBES, 2016; 2017; CALVET et al., 2016; DRIGGERS et al., 2016; JOHANSSON et al., 2016; MLAKAR et al., 2016; BAUD et al., 2017). No Brasil, somente em 2019, foram mais de 10.400 casos notificados e 3 óbitos confirmados por ZIKV (Ministério da Saúde, 2019).

A contínua expansão geográfica do DENV, CHIKV e ZIKV e, mais recentemente, do YFV é um alerta de que novas epidemias podem surgir a qualquer momento. Uma variada fauna de mosquitos vetores, a mudança de clima e vegetação global, o aumento de tráfego de pessoas e a urbanização não planejada produzem condições para uma maior proliferação de mosquitos, o que acarreta em um enorme aumento das infecções por arbovírus, sobretudo em países com climas tropicais e subtropicais (GUBLER, 2002; GUZMAN; HARRIS, 2015). Além disso, as infecções por esses vírus causam um amplo espectro de doenças, variando de infecção

assintomática a doença grave, o que pode levar a erros de classificação no relato de casos, especialmente com a co-circulação de tantos vírus em determinadas áreas (FRITZELL et al., 2018).

Apesar do grande esforço mundial no combate a vários arbovírus, ainda não há drogas antivirais específicas aprovadas para o tratamento dos doentes infectados por tais vírus (MENENDEZ-ARIAS; RICHMAN, 2014). Atualmente, os tratamentos disponíveis para DENV, ZIKV e CHIKV são limitados à administração de anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos.

A inexistência de tratamentos ou vacinas eficazes contra CHIKV, ZIKV e DENV reforça a necessidade de terapias com medicamentos com alvos virais inovadores. Portanto, pesquisadores têm voltado sua atenção para a natureza, tentando identificar compostos que podem ser usados como antivirais. De fato, muitos estudos têm mostrado que a natureza representa um vasto reservatório de substâncias com potencial antiviral. Vários grupos de pesquisa ao redor do mundo buscam a descoberta de novas substâncias que poderão ser usadas como produtos farmacêuticos ou servir como estruturas protótipos e otimizadas para o desenvolvimento de novos agentes antivirais (TEIXEIRA et al., 2014).

Diferentes abordagens e metodologias têm sido utilizadas na busca e desenvolvimento de drogas antivirais tais como testes de compostos específicos com atividade antiviral conhecida contra outros vírus, reposicionamento de drogas utilizadas para tratamento de outras doenças, rastreamento de bibliotecas com centenas de milhares de moléculas bioativas assim como o estudo computacional baseado em estruturas para a descoberta de novas substâncias antivirais ou otimização de moléculas já conhecidas.

Neste trabalho, foi feita a prospecção/identificação/isolamento de substâncias bioativas contra DENV, ZIKV e CHIKV derivadas de milhares de extratos vegetais e fúngicos depositados na Extratoteca do Instituto René Rachou - Fiocruz Minas.

1.2 Características e ciclo de replicação da família *Flaviviridae* (FIELDS et al., 2013)

Os vírus da família *Flaviviridae* compartilham semelhanças na morfologia do vírion, organização do genoma e estratégia de replicação, no entanto, exibem propriedades biológicas diversas. Tais vírus possuem um envelope composto por uma bicamada lipídica e uma glicoproteína (E). O envelope viral envolve o nucleocapsídeo que consiste de uma fita simples de RNA de senso positivo complexado com múltiplas cópias de proteínas do capsídeo (C).

Após a entrada na célula alvo por endocitose mediada por receptores celulares, o baixo pH do endossomo induz a fusão do envelope viral às membranas celulares para o desnudamento do genoma de RNA que é liberado no citoplasma onde acontece todo o processo de replicação viral. O genoma dos vírus da família *Flaviviridae* funcionam como RNA mensageiro (mRNA) e codifica uma única poliproteína que é clivada por uma combinação de proteases virais e do hospedeiro em 3 proteínas estruturais, C (capsídeo), prM (precursor da membrana), E (proteína do envelope); e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NoB e NS5).

As proteínas estruturais são localizadas na porção N-terminal da poliproteína seguidas das proteínas não estruturais (NS). A replicação do RNA viral ocorre inteiramente no citoplasma em estreita associação com membranas intracelulares. A síntese de um RNA de cadeia única fita negativa fornece o intermediário replicativo para síntese de várias cópias do genoma viral que será empacotado nas partículas virais em formação. Os novos vírus se juntam por brotamento em um compartimento intracelular de membrana, muito provavelmente no retículo endoplasmático, em seguida, pelas vias secretórias celulares (complexo de Golgi) sendo os novos vírions liberados na superfície celular (Figura 1).

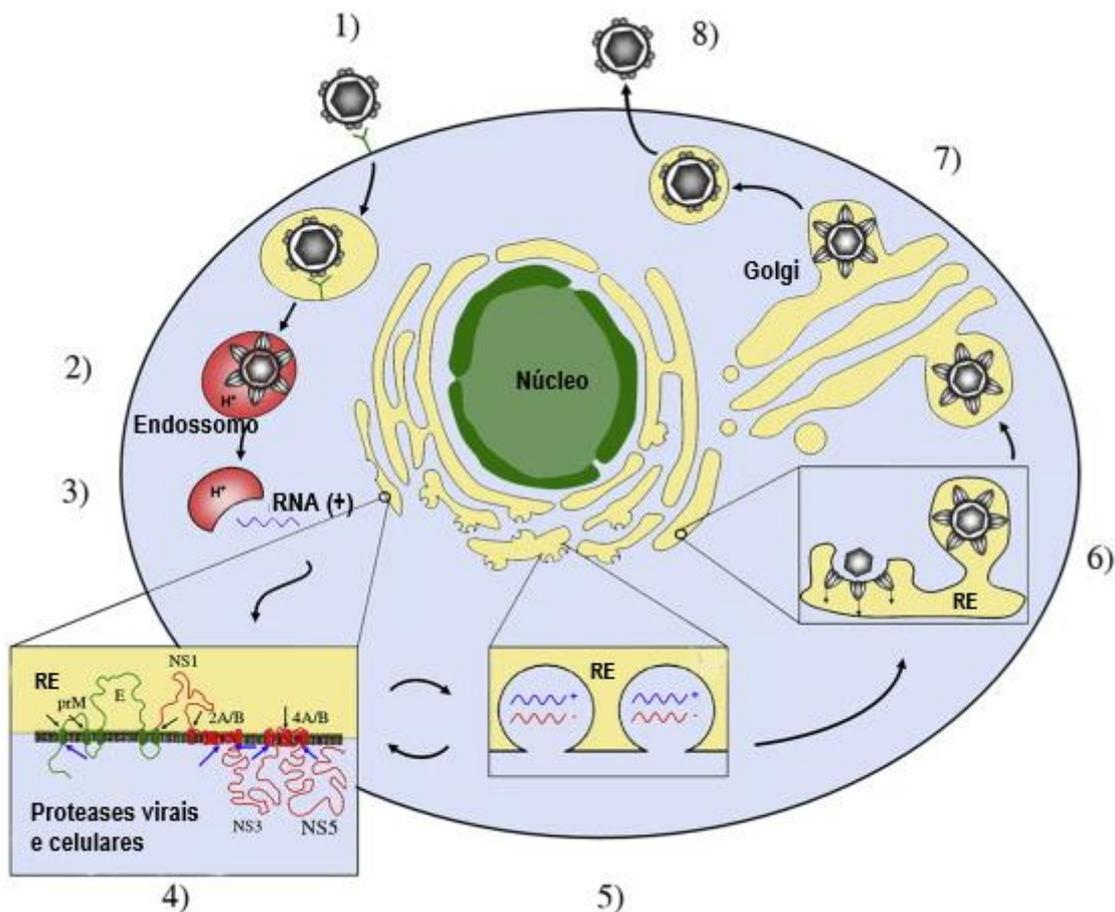


Figura 1 - Ciclo de multiplicação dos Flavivírus. Os flavivírus são internalizados por endocitose mediada por receptor (1) e direcionados para endossomos iniciais, onde o ambiente ácido induz a fusão (2) entre o vírus e a membrana endossomal o que resulta na liberação do genoma (3). A tradução do RNA viral é seguida pelo processamento da poliproteína resultante por proteínas celulares e proteínas codificadas pelo vírus (4). Os locais de clivagem e a topologia das proteínas estruturais (em verde) e não estruturais (NS) (em vermelho) na membrana do retículo endoplasmático (RE) são ilustrados esquematicamente (4). Após a tradução, um complexo de replicação é montado e associado a membranas induzidas por vírus, onde ocorre a replicação viral (5). O complexo de replicação começa a transcrever o RNA (+) para o RNA (-), que serve como modelo para nova síntese de RNA (+). As cadeias progênicas de RNA (+) podem iniciar um novo ciclo de tradução ou serem montadas em vírions (6). O empacotamento ocorre na superfície do RE, seguido pelo brotamento das proteínas estruturais e do RNA recém-sintetizado no lúmen do RE. Os vírions imaturos resultantes são transportados para o complexo de Golgi, onde a clivagem da proteína prM à M mediada por furina geram partículas infecciosas maduras (7) que são liberadas por exocitose (8). Retirada de GARCIA et al., 2009.

1.3 Características do ciclo de replicação dos *Alphavirus*

O CHIKV, membro do gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae* penetra nas células hospedeiras por endocitose mediada por receptor. O ambiente acidofílico do endossoma culmina na formação de poros de fusão e liberação do nucleocapsídeo no citosol (KIELIAN, 2006) (Figura 2).

A glicoproteína E2 do CHIKV é a principal responsável pelas interações com receptores celulares e a E1 promove a fusão do vírus nos endossomos da célula alvo. Após a tradução, o precursor E2 forma heterodímeros no retículo endoplasmático com a E1 que transita pela via secretora para a membrana plasmática, onde interagem com nucleocapsídeos e então, ocorre o brotamento dos vírions.

O CHIKV possui um genoma de RNA fita simples de senso positivo que codifica duas *Open Reading Frame* (ORF), cercada por regiões não traduzidas 5' e 3'. A ORF 5' é traduzida do RNA genômico por um mecanismo dependente de cap, o qual resulta na formação de 4 proteínas não estruturais (nsP1-4) responsável pela replicação do RNA citoplasmático e modulação das respostas antivirais celulares (FROS et al., 2010). A ORF 3' é traduzida de um RNA subgenômico, que também é capeado, para originar as principais proteínas estruturais do vírus, o capsídeo e as glicoproteínas E1 e E2 do envelope (KHAN et al., 2002).

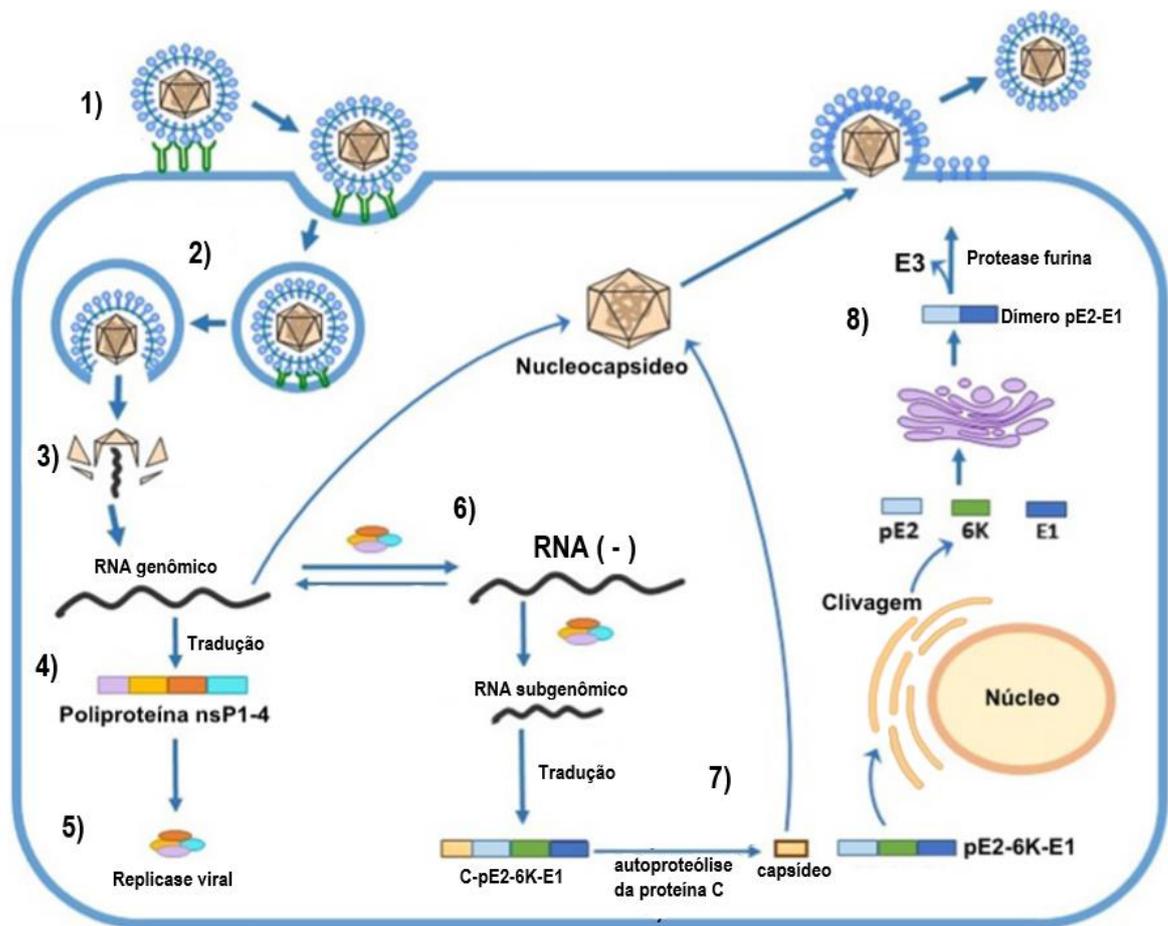


Figura 2 - Ciclo de replicação do CHIKV. A partícula viral é internalizada via receptores na membrana plasmática por endocitose (1) e direcionada para os endossomos primários (2) onde o ambiente ácido induz a fusão do envelope com a membrana endossomal levando à liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. O nucleocapsídeo é desmontado para liberação do genoma viral (3), o qual é traduzido nas proteínas não estruturais (4). Após o processamento, o complexo de proteínas não estruturais formam a replicase viral, a qual catalisa a síntese do RNA (-) e que serve como um template para síntese da fita completa de RNA (+) e do RNA subgenômico (6). O RNA subgenômico é traduzido na poliproteína estrutural que é então clivada para originar as proteínas estruturais individuais (7) e em seguida, a montagem dos componentes virais. As partículas de vírus formadas são liberadas por brotamento pela membrana plasmática, onde adquire o envelope com as glicoproteínas virais incorporadas (8). Fonte: Adaptado de Abdelnabi et al., 2015.

1.4 A Dengue

A dengue, causada pelo DENV, é considerada a principal causa de morbidade e mortalidade em países tropicais e subtropicais (GUZMAN et al., 2010). O DENV possui 4 sorotipos antígenicamente distintos, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. A maioria dos países endêmicos tem reportado a circulação dos 4 sorotipos nos últimos anos (MESSINA et al., 2014).

Após a inoculação no homem por mosquitos vetores do gênero *Aedes*, o DENV se replica em células dendríticas da pele, células da linhagem mieloide, incluindo macrófagos e monócitos. Há evidências de infecção de hepatócitos e células endoteliais. Em humanos, o mecanismo provável pelo qual o vírus se propaga para os órgãos periféricos é a propagação hematogênica, sendo a infecção do sistema nervoso central ocasionalmente relatada (PUCCIONI-SOHLER et al., 2017).

A maioria das infecções por DENV é assintomática, entretanto, sua manifestação clínica pode variar das formas brandas denominadas dengue com ou sem sinais de alarme às formas graves da doença que podem eventualmente levar à morte (HALSTEAD; COHEN, 2015; WHO, 2012; BÄCK; LUNDKVIST, 2013). O período de incubação é geralmente de 4 a 7 dias, podendo variar entre 3 e 14 dias. A apresentação mais comum da dengue é o aparecimento súbito de febre acompanhada de dor de cabeça, dor retro-orbital, mialgia e artralgia generalizadas, rubor de face, anorexia, dor abdominal e náuseas. Erupções cutâneas são frequentemente observadas no tronco, braços, coxas e palmas das mãos. As anormalidades detectadas no laboratório podem incluir leucopenia e trombocitopenia. Não existe uma infecção crônica com DENV pois uma vez infectados, os indivíduos adquirem imunidade para aquele sorotipo. No entanto, os indivíduos podem experimentar múltiplos episódios clínicos se infectados com os demais sorotipos do DENV (HALSTEAD; COHEN, 2015).

A presença de sinais de alerta de dengue grave está associada a dor abdominal, fraqueza, vômitos persistentes, hemorragia em mucosas, inquietação, aumento do fígado (> 2 cm), ou aumento do hematócrito concomitante à diminuição do número de plaquetas. Os critérios para diagnóstico de dengue grave incluem qualquer sinal de extravasamento de plasma que leve ao choque ou a acumulação de

fluidos no pulmão causando dificuldade respiratória, sangramento grave e comprometimento grave dos órgãos (WHO, 2012).

Hipotetiza-se que as formas graves da dengue estão associadas com infecções subsequentes ou secundárias por sorotipos heterotípicos, independentemente do intervalo de tempo entre a infecção primária e secundária (RODRIGUEZ-ROCHE; GOULD, 2013), e podem ser causadas por um fenômeno imunológico chamado infectividade aumentada por anticorpos ou ADE, sigla em inglês do termo *Antibody-Dependent Enhancement* (HALSTEAD, 1988; GUSMAN; ALVAREZ; HALSTEAD, 2013; BÄCK; LUNDKVIST, 2013).

Indivíduos infectados por qualquer um dos sorotipos de DENV desenvolvem imunidade monotípica protetora evidenciada pela geração de anticorpos do tipo imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG). Os anticorpos IgG podem ser encontrados no soro no final do período de convalescença (9-10 dias) em infecções primárias e também podem ser detectados precocemente no caso de infecções secundárias. A IgG é encontrada em altos títulos de 30-40 dias após a infecção, mas pode permanecer detectável por décadas, o que permite a identificação de indivíduos que estiveram em contato com o vírus (HALSTEAD; COHEN, 2015). Ademais, pode haver proteção cruzada entre os diferentes sorotipos de DENV por um período limitado. Recentemente, altos títulos preexistentes de anticorpos do vírus da dengue foram associados ao risco reduzido de infecção e sintomas por ZIKV (RODRIGUEZ-BARRAQUER et al., 2019).

O diagnóstico da dengue é feito por confirmação laboratorial da infecção pelo vírus. Geralmente, é realizado por sorologia utilizando-se vários métodos tais como: ensaio de imunoabsorção enzimática para captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA), ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA), para identificação de IgG, teste de neutralização por redução de placas (PRNT) e também por detecção da proteína viral não estrutural NS1. O diagnóstico da dengue também pode ser feito por métodos moleculares, tais como, reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) e pelo isolamento do vírus, este último menos utilizado. Vale ressaltar que o diagnóstico por sorologia não permite a sorotipagem do vírus infectante, exceto pelo PRNT. A sensibilidade dos testes é variável em decorrência ao tempo de coleta das amostras e pela necessidade de múltiplas amostras, como para pesquisa de IgG na fase aguda e fase convalescente. Os testes de RT-PCR e detecção da NS1 são considerados prova da infecção com DENV pois oferecem um diagnóstico mais

precoce e mais específico com sensibilidade de 80 a 90 % se utilizados de 1 a 3 dias após o início da doença (HUNSPERGER et al., 2016).

Como ainda não há tratamento específico para combater o DENV, usualmente é feito apenas o tratamento de suporte ao paciente para amenizar os sintomas da doença. As condutas terapêuticas iniciam-se com o gerenciamento da febre, cuidados de enfermagem, equilíbrio de fluidos, eletrólitos e parâmetros de coagulação do sangue (WHO, 2012; BEAUTÉ; VONG, 2010). Pacientes com dengue podem ser tratados com acetaminofeno (AHMAD et al., 2011) seguido de repouso e terapia de hidratação oral. Caso ocorram sinais de desidratação ou sangramento, os pacientes devem ser hospitalizados. Medicamentos a base de ácido acetilsalicílico não devem ser utilizados, pois possuem efeito anticoagulante e aumentam o risco de hemorragias (OISHI et al., 2007). Melhorias no gerenciamento dos casos de dengue reduziram a taxa de letalidade dos pacientes hospitalizados pela doença a menos de 1 %, enquanto historicamente essa taxa chegava a 20 % (MONATH, 1994; SIMMONS et al., 2015).

Alguns avanços têm surgido no combate à dengue, entre eles o desenvolvimento da vacina Dengvaxia, que foi desenvolvida pela empresa francesa Sanofi Pasteur. A vacina é tetravalente, recombinante e atenuada e é produzida em células Vero sem soro. Cada um dos quatro sorotipos do DENV contidos nesta vacina foi obtido separadamente por tecnologia de DNA recombinante, combinando o vírus atenuado da vacina da febre amarela (17D204) e os quatro sorotipos dos vírus selvagens da dengue (GUY et al., 2015; PITISUTTITHUM; BOUCKENOOGHE, 2016). A eficácia da Dengvaxia varia segundo o sorotipo viral, sendo maior nos tipos 3 e 4 e tendo uma menor eficácia principalmente contra o DENV-2. A eficácia da vacina também é superior em crianças acima dos 9 anos de idade, e depende da situação sorológica, sendo maior nos voluntários expostos previamente ao DENV (CAPEADING, et al., 2014; VILLAR, et al., 2015). No entanto, há uma contraindicação da vacina para pessoas que nunca tiveram dengue (ANVISA, 2019). Até 2019, a Dengvaxia foi licenciada em 19 países, entre eles: o Brasil, a Argentina, a Austrália, o México, o Paraguai, o Peru, entre outros.

1.5 A febre do Zika e a síndrome congênita do Zika

A febre do Zika, causada pelo ZIKV, é uma doença exantemática transmitida principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo que os sintomas podem durar até uma semana. Sua apresentação clínica é semelhante a de outras infecções causadas por arbovírus, principalmente a dengue. Os sintomas incluem febre baixa, erupção cutânea, artralgia, artrite, mialgia, dor de cabeça, conjuntivite e edema. Os casos graves envolvendo hospitalização são incomuns e as mortes são raras (AHMAD; AMIN; USTIANOWSKI, 2016).

Nos últimos anos, a febre do Zika expandiu-se geograficamente mudando de uma doença endêmica transmitida por mosquitos na Ásia equatorial e África para uma doença epidêmica em diversas regiões do mundo, principalmente nas Américas (HAYES, 2009; KINDHAUSER et al., 2016). O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 a partir do soro de um macaco sentinela (*Macaca mulatta*) na floresta Zika perto de Entebbe, em Uganda, e logo em seguida, de homogeneizados dos mosquitos *Aedes africanus* em janeiro de 1948. Ambos os isolamentos foram feitos por inoculação intracerebral das amostras em camundongos albinos suíços (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952).

Até o início dos anos 2000, o ZIKV recebeu pouca atenção na literatura médica, pois foi relatado que estaria associado a apenas uma dúzia de casos de doenças febris autolimitantes em áreas endêmicas da África e da Ásia (HAYES, 2009), como Indonésia, Nigéria e Uganda (YUN; LEE, 2017). Na última década, o ZIKV ganhou atenção global, já que em abril de 2007 ocorreu o primeiro grande surto fora da África e Ásia. Tal surto surgiu na Ilha Yap nos Estados Federados da Micronésia, localizado no noroeste do Oceano Pacífico. As infecções por ZIKV foram associadas aos sintomas de febre, erupções cutâneas, artralgia e conjuntivite (LANCIOTTI et al., 2008; DUFFY et al., 2009; KINDHAUSER et al., 2016). Em outubro de 2013, o segundo grande surto da Zika começou na Polinésia Francesa no Oceano Pacífico Sul-Central. A Polinésia Francesa é constituída por 118 ilhas agrupadas em cinco arquipélagos, das quais 67 estão habitadas com uma população total de cerca de 280 mil pessoas (CAO-LORMEAU et al., 2014; CAO-LORMEAU; MUSSO, 2014). Esse surto levou cerca de 30 mil pessoas a procurarem tratamento médico por suspeita de infecção por ZIKV (BESNARD et al., 2014; MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU,

2014). Além dos milhares de casos na Polinésia Francesa, múltiplos surtos de pequena escala também foram registrados durante 2013-2014 em um conjunto de ilhas do Pacífico Sul (CAO-LORMEAU; MUSSO, 2014) incluindo as Ilhas Cook (ROTH et al., 2014), Nova Caledônia (DUPONT-ROUZEYROL et al., 2015) e Ilha de Páscoa (TOGNARELLI et al., 2016).

No início de 2015, quatro estudos relataram a detecção de RNA de ZIKV em 19 amostras de soro de fase aguda de residentes locais e visitantes do Nordeste do Brasil que apresentaram sintomas comuns de febre, erupção cutânea, mialgia, artralgia e conjuntivite (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; CARDOSO et al., 2015; ZAMMARCHI et al., 2015; ZANLUCA et al., 2015), indicando a primeira transmissão autóctone de ZIKV no hemisfério ocidental. Em dezembro de 2015, entre 440 mil e 1,3 milhão de casos suspeitos de infecção por ZIKV foram registrados em 14 dos 26 estados brasileiros (HENNESSEY; FISCHER; STAPLES, 2016). Além do número aumentado dos casos de síndrome de Guillain-Barré, um aumento significativo na incidência de microcefalia entre recém-nascidos foi reconhecido pela primeira vez durante o surto de ZIKV no Brasil (SCHULER-FACCINI et al., 2016), sugerindo uma possível associação entre a infecção por ZIKV e a microcefalia. Embora fosse consenso a subnotificação dos casos de microcefalia no Brasil, menos de 200 casos por ano antes de 2015, mais de 4.000 casos suspeitos de microcefalia foram relatados no Brasil no período de meados de 2015 até janeiro de 2016 (VICTORA et al., 2016). A associação entre o ZIKV e a microcefalia também foi verificada em dois estudos retrospectivos, na Polinésia Francesa, realizados após o surto ocorrido em 2013-2014 (CAUCHEMEZ et al., 2016; JOUANNIC et al., 2016). Além disso, outras observações acerca do surto da Polinésia Francesa mostraram que houve um aumento de 20 vezes na incidência da síndrome de Guillain-Barré (CAO-LORMEAU et al., 2016; WATRIN et al., 2016), criando preocupações sobre a associação entre a infecção por ZIKV e essa síndrome. Desde então, são crescentes as evidências que ligam a situação epidemiológica aos vários distúrbios neurológicos, como Síndrome de Guillain-Barré e malformações neonatais, principalmente a microcefalia.

Desde a sua introdução no Brasil, o ZIKV se espalhou rapidamente em toda a América Central e nas Ilhas do Caribe. A partir de 12 de janeiro de 2017, a transmissão autóctone de ZIKV foi relatada em mais de 48 países e territórios pan-americanos, com um número acumulado de mais de 170 mil casos confirmados e mais de 500 mil casos suspeitos. A síndrome congênita associada à infecção pelo ZIKV foi

documentada em 22 países e territórios pan-americanos, com mais de 2,3 mil casos confirmados (ETIENNE; SANTOS; ESPINAL, 2017; OPAS, 2017). Como previsto, o ZIKV expandiu sua faixa geográfica para a América do Norte, emergindo primeiro no sul da Flórida em julho 2016 e com centenas de casos confirmados de transmissão local por mosquitos (BOGOCH et al., 2016; FAUCI; MORENS, 2016; LESSLER et al., 2016).

Embora tenha sido isolado em várias espécies de mosquitos do gênero *Aedes* (PAIXAO et al., 2016), os principais responsáveis pela transmissão do ZIKV, têm sido o *A. aegypti* (MARCHETTE; GARCIA; RUDNICK, 1969) e o *A. albopictus* (GRARD et al., 2014). A transmissão sexual também já foi reportada (FOY et al., 2011; MUSSO et al., 2015; MOREIRA et al., 2017). Vários estudos já reforçaram tal hipótese mostrando que o RNA viral de ZIKV pode ser detectado no sêmen, meses após a infecção, sendo possível também o isolamento da partícula infecciosa viral (MATHERON et al., 2016; NICASTRI et al., 2016). Outras formas já relatadas de transmissão não vetorial do ZIKV incluem contato não-sexual através da pele intacta de pessoa a pessoa (SWAMINATHAN et al., 2016), também já mostrada para DENV (CHEN; WILSON, 2004) e transmissão por transfusão de sangue (MOTTA et al., 2016). Ainda não se sabe se o ZIKV pode ser transmitido por meio da amamentação. No entanto, estudos mostraram que partículas infecciosas de ZIKV foram isoladas do leite materno de mãe infectada, sendo reportada também, a detecção do RNA viral em leite materno de três mães sintomáticas (BESNARD ET AL., 2014; DUPONT-ROUZEYROL et al., 2016).

Ainda não existe uma vacina licenciada contra o ZIKV. Estratégias de imunização feita com o ZIKV inativado, contendo o adjuvante alum, apresentou sucesso na proteção de camundongos suscetíveis desafiados (LAROCCA et al., 2016) e também em macacos *Rhesus* (ABBINK et al., 2016). Por outro lado, embora as vacinas vivas atenuadas tenham uso generalizado para várias infecções virais, elas são geralmente contraindicadas para gestantes, imunossuprimidos e em alguns casos, para crianças. Portanto, tais vacinas não parecem ser a melhor opção quando se trata do ZIKV.

Felizmente, até o momento, quase quarenta candidatos vacinais estão em desenvolvimento pré-clínico ativo (POLAND et al., 2018), sendo vários já aprovados pela Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (FDA) para ensaios clínicos de fase I, e um desses candidatos progrediu para

o ensaio clínico de fase II (MASLOW, 2019). Vale mencionar mais uma vez que, até o momento, não há drogas antivirais específicas aprovadas para o tratamento de pacientes infectados com ZIKV.

1.6 A febre do Chikungunya (CHIKF)

O CHIKV, assim como o DENV e ZIKV, é transmitido principalmente pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (JUPP; MCINTOSH, 1988; WEAVER, 2014; HIGGS, 2015). Clinicamente, a infecção por CHIKV tem uma fase aguda e uma fase crônica associada a uma poliartrite debilitante. A fase aguda pode durar até 15 dias sendo caracterizada por início abrupto de febre alta, quadro grave de artralgia e mialgia e erupção cutânea maculopapular eritematosa, que pode variar de leve a grave com envolvimento de mais 90 % da pele (MINER, 2015). A dor nas articulações é tipicamente simétrica e qualquer articulação pode ser afetada, sendo as articulações das extremidades as mais comumente afetadas. Outros sintomas, principalmente em crianças, idosos e imunodeprimidos, incluem complicações oculares como conjuntivite, uveíte, episclerite e retinite (MAHENDRADAS; AVADHANI; SHETTY, 2013; MEHTA et al., 2018).

O aumento da frequência de surtos de CHIKF nos últimos 15 anos parece estar associado a uma maior incidência de óbitos e outras formas mais graves da doença, com relatos de casos de envolvimento cardíaco, renal, hepático e neurológico (JOSSERAN, 2006; RAMPAL; MEENA, 2007; WIELANEK, 2007; BRITO, 2017).

A fase crônica da CHIKF se caracteriza por uma progressão e persistência da artralgia grave, de forma que a inflamação de uma articulação se dissemina ao longo do tempo para outras articulações (AMDEKAR; PARASHAR; ALAGARASU, 2017), e em alguns pacientes a dor debilitante persiste por 3 anos ou mais (SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012; SCHILTE, 2013).

Estima-se que no mundo todo mais de um milhão de pessoas sejam acometidas por ano pela CHIKF. A alta taxa de transmissibilidade da doença é um dos principais problemas de saúde pública em regiões afetadas. Estudos epidemiológicos mostraram que cerca de 75 % dos indivíduos infectados pelo CHIKV desenvolvem sintomas da doença (SERGON et al., 2007; GÉRARDIN et al., 2008; GANESAN; DUAN; REID, 2017).

Até o ano de 2000, algumas epidemias do CHIKV se limitaram a territórios asiáticos e africanos, sendo o ano de 2004 marcado por uma grande epidemia no Quênia que logo se espalhou para mais de 40 países da África, Ásia, Europa e Oceania (WEAVER; FORRESTER, 2015). Na epidemia na ilha francesa La Reunion em 2005, casos graves da doença com manifestações neurológicas, cardíacas e mortes associadas foram reportados pela primeira vez (BURT et al., 2017). Neste mesmo período, uma adaptação genética do vírus circulante, que até então era transmitido pelo mosquito *Ae. aegypti*, permitiu que o CHIKV fosse transmitido de forma eficiente pelo *Ae. albopictus*. Essa adaptação genética foi caracterizada por uma mutação na glicoproteína E1 do envelope viral, que permitiu que o vírus fosse rapidamente introduzido em áreas prevalentes de *Ae. albopictus* (TSETSARKIN et al., 2007).

Em 2013, o CHIKV foi detectado no Caribe e logo em seguida afetou mais de 50 países nas Américas (CASSADOU, 2014; LEPARC-GOFFART, 2014; VAN BORTEL, 2014). Em 2014 apareceram os primeiros casos de CHIKV relatados no Brasil e causados pelos dois genótipos do vírus (NUNES et al., 2015). No mesmo ano, no Brasil foram confirmados 1.424 casos autóctones de CHIKV, e em 2016 foram confirmados mais de 145 mil casos com relatos de casos graves e com mais de 200 mortes associadas à infecção. Em 2017 e 2018, 231 óbitos por CHIKV foram confirmados sendo 273 mil casos de CHIKV registrados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

O CHIKV continua a causar grandes epidemias em todo o mundo e ainda não há tratamento ou vacina disponível para prevenir a infecção.

1.7 Produtos naturais e a biodiversidade como fonte de drogas antivirais

Os produtos naturais (PN) são substâncias produzidas pelo metabolismo secundário dos organismos vivos, tendo sido selecionados pela natureza durante milênios de evolução nas suas interações com o meio ambiente. As interações entre os organismos e seu ambiente permitem ou induzem a formulação de diversas entidades químicas complexas, que favorecem sua sobrevivência e competitividade. Portanto, devido a suas funções biológicas e origem, os PN são estruturas químicas com alto potencial terapêutico.

A utilização de PN com propriedades terapêuticas é tão antiga quanto a civilização humana, já que por um longo tempo, produtos minerais, vegetais e animais foram as principais fontes de drogas utilizadas para o tratamento de doenças. Há registros de um grande número de formulações empregando ervas medicinais descritas por diversas civilizações antigas. Os primeiros registros, feitos em tabuletas de argila em escrita cuneiforme, são da Mesopotâmia e datados de 2600 a.C. Há vários relatos de formulações por outras civilizações antigas, entre elas: a civilização egípcia (Papiro de Ebers, 1500 a.C.), a chinesa (LI et al., 2011; 2014), a hindu (Ayurved; System of Medicine, 1000 a.C.) e a grega (relatadas nos trabalhos de Teofrasto de aproximadamente 300 a.C. e de Galeno de 130-200 d.C). Ainda hoje, o óleo de cedro (*Cedrus* spp.), de cipreste (*Cupressus sempervirens*), a mirra (*Commiphora* spp.) e a dormideira (*Papaver somniferum*) são utilizados para o tratamento de tosse, resfriados, infecções parasitárias e inflamações (DE PASQUALE, 1984).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO), em muitos países desenvolvidos, principalmente da Europa, uma grande parcela da população ainda hoje faz uso de práticas complementares de saúde, sobretudo, com o uso de plantas medicinais. Mesmo com fácil acesso à medicina moderna, o uso de plantas medicinais nesses países ainda mantém uma alta popularidade, tanto por razões culturais quanto históricas. Já nos países em desenvolvimento, principalmente dos continentes asiático e africano, 65-80 % da população depende exclusivamente de plantas medicinais para cuidados básicos de saúde. Esse é outro importante motivo pelo qual as plantas medicinais e sua biodiversidade são economicamente importantes (RAHMAN et al., 2004). Atualmente, esse conjunto de práticas de atenção à saúde baseadas na tradição e sabedoria popular, como o conhecimento, a experiência e as crenças de culturas indígenas, são definidas pela WHO como medicina alternativa.

No Brasil, o uso de plantas medicinais foi disseminado principalmente pela cultura indígena. O Brasil se destaca por ser um dos países mais ricos em biodiversidade em todo o mundo. De fato, o território brasileiro possui vários biomas, como a Caatinga, o Campo, o Cerrado, a Floresta Amazônica, a Mata Atlântica, a Mata de Araucária, a Mata de Cocais, o Pantanal e as Zonas Litorâneas. Esses biomas são uma fonte riquíssima de produtos naturais terapêuticos. Embora muitas plantas medicinais tradicionais já tenham atividade antiviral descrita (KUDI; MYINT, 1999; BETANCUR-GALVIS et al., 1999) e sejam utilizadas para o tratamento de

infecções por espécies de vírus DNA e RNA em animais e humanos (MULLER et al., 2007), as pesquisas sobre o potencial das plantas como fonte de antivirais ou outros fármacos, ainda são pobremente exploradas no nosso país, contrastando com países como a Alemanha, os Estados Unidos e o Canadá (CALIXTO, 2000; RATES, 2001).

Em 20 de maio de 2015, o Congresso Nacional Brasileiro aprovou a LEI Nº 13.123 que regulamenta o acesso ao bioma brasileiro para fins de pesquisa e inovação tecnológica. No entanto, várias questões ainda permanecem incertas, como: (i) a informação genética sobre a origem de substâncias do metabolismo dos seres vivos; (ii) o conhecimento tradicional associado que indica um uso potencial para o conhecimento genético; (iii) o consentimento prévio e informado, ou seja, a permissão para uso em pesquisa e inovação dada pelo detentor do conhecimento tradicional; (iv) e o acesso: permissão para coleta de material para pesquisa científica e desenvolvimento tecnológico (CALIXTO, 2019).

Historicamente, companhias farmacêuticas utilizaram extratos de plantas para produzir formulações terapêuticas relativamente rudimentares, mas com o avanço dos antibióticos em meados do século XX, formulações de drogas com substâncias razoavelmente purificadas tornaram-se mais frequentes (FIRN; JONES, 2003). Os extratos brutos contêm uma complexidade de misturas variáveis, portanto, o risco de efeitos secundários indesejados é sempre alto. Certamente, a maneira mais simples para diminuir o risco de efeitos indesejados é isolar a substância ativa. No entanto, inicialmente esse não foi o motivo pelo qual pretendeu-se a purificação de substâncias contidas em produtos naturais. O principal motivo foi a necessidade de identificar produtos de plantas adulterados por meio da determinação da quantidade de princípios ativos contidos neles. Somente depois que isso pôde ser feito, foi reconhecido que a composição dos produtos químicos e as substâncias ativas variavam quantitativamente e qualitativamente durante todo o ciclo de vida da planta. As mudanças nas condições climáticas, o tempo de colheita, a adequação do processo de secagem, a natureza e duração do armazenamento, entre outros aspectos, influenciam notavelmente no perfil de substâncias contidas em um extrato (CONNOR, 2005).

Paralelamente à ideia da obtenção de substâncias “puras”, despertou-se a possibilidade de modificações estruturais, visando à produção de drogas mais ativas e seguras, com aumento da atividade, seletividade e/ou a redução de efeitos adversos ou toxicidade. Como exemplos, destacam-se o isolamento da morfina por Emanuel

Merck em 1826 e a primeira droga semissintética, a aspirina, produzida pela Bayer em 1899 (DE PASQUALE, 1984; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; CHATTOPADHYAY; NAIK, 2007). A aspirina, um dos primeiros produtos químicos naturais modificados quimicamente, continua tendo um importante papel no mercado. Infelizmente, modificações químicas em compostos naturais não são simples de serem feitas e, frequentemente, as diferenças entre o composto modificado e o natural são quase imperceptíveis.

Apesar de muitas vantagens e sucessos do passado, houve uma diminuição do uso de plantas em ensaios de triagens para a descoberta de novas drogas. Isso aconteceu em decorrência das dificuldades de acesso e de fornecimento, da complexidade da química e da lentidão inerente de se trabalhar com tais produtos. Associados a esses fatores surgiram novas tecnologias, como o uso da química combinatória e o desenvolvimento de métodos de triagem biológicos automatizados, como as triagens de alto desempenho (HTS, do inglês *High Throughput Screening*) para a obtenção de um maior número de substâncias biologicamente ativas.

Basicamente, a química combinatória refere-se a métodos químicos sintéticos que permitem preparar um grande número de compostos em um único processo. As reações são feitas em várias etapas paralelamente e os produtos reacionais resultantes são combinações aleatórias dos reagentes e, portanto, milhares de substâncias novas são geradas (YUNES; CALIXTO, 2001).

Concomitantemente ao aperfeiçoamento das técnicas da química combinatória, o método HTS permite a avaliação *in vitro* de milhares de substâncias por ensaio, sendo um processo rápido que determina a atividade biológica de amostras de uma Quimioteca Combinatória. Tais técnicas empregadas simultaneamente, permitem a identificação de novos compostos capazes de interagirem com os alvos terapêuticos testados em escala nanomolar. Devido ao emprego dessas estratégias combinadas surgiu o termo *hit*, usado para definir uma substância ativa contra determinado alvo biológico, *in vitro*, identificada pelo emprego dessas técnicas (DIAS; CORREA, 2001). Essas novas tecnologias contribuíram bastante para que as empresas farmacêuticas diminuíssem o interesse na triagem de produtos naturais, principalmente entre 1984 e 2003, favorecendo o desenvolvimento de bibliotecas de compostos sintéticos (BAKER, 2007; RISHTON, 2008).

Entretanto, mesmo com os avanços tecnológicos observados na pesquisa de novas entidades químicas e o investimento de bilhões de dólares em pesquisas e

desenvolvimento nessa área, até 2014, o aumento esperado na produtividade e descoberta de *hits* não se materializou. Apenas 2 moléculas obtidas dessa estratégia, o sorafenib e o ataluren, atingiram o mercado farmacêutico (NEWMAN; CRAGG, 2016). O sorafenib é utilizado na terapia da leucemia mieloide crônica, carcinoma de células renais e carcinoma hepatocelular, e o ataluren, usado para o tratamento da distrofia muscular de Duchenne.

Atualmente, ressurgiu o interesse por produtos naturais como fonte de substâncias bioativas. Isso se deve aos avanços nas técnicas de separação, purificação, identificação de compostos em misturas complexas e a aplicação dos vários métodos analíticos nessa área. Tais métodos incluem cromatografia líquida de alta/ultra performance, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, biologia estrutural, genômica, biologia molecular, bioquímica, entre outros. O acesso às fontes naturais, por outro lado, comprova que a natureza é praticamente insuperável e a evolução tecnológica dessas técnicas tornou-se uma poderosa aliada no processo de descoberta não só de novas moléculas, mas de alvos e estratégias terapêuticas nunca antes pensadas.

O tratamento de doenças infecciosas e oncológicas tem se utilizado de numerosas classes de drogas capazes de interagir com muitos alvos celulares específicos (XIAO; MORRIS-NATSCHKE; LEE, 2016). Na oncologia, no período entre os anos 1940 até o final de 2014, das 175 moléculas aprovadas, 85 são de produtos naturais ou derivados diretos. Em relação às doenças infecciosas, a influência das estruturas de produtos naturais é bastante acentuada. Há um reconhecimento cada vez maior de que algumas substâncias promissoras são produzidas somente por microrganismos em interações microbianas específicas com os hospedeiros dos quais são isolados (NEWMAN; CRAGG, 2016).

O mercado global anual de medicamentos vale cerca de 1 trilhão de dólares, e um terço dos medicamentos mais vendidos no mundo são produtos naturais ou seus derivados (CALIXTO, 2016). A variedade e complexidade de metabólitos especiais sintetizados por plantas evoluíram como mecanismos de defesa às condições de adaptação ambientais ricas em insetos, animais e microrganismos, incluindo os vírus. Dessa forma, as plantas constituem-se num enorme laboratório de síntese orgânica, fruto de milhões de anos de evolução (MONTANARI; BOLZANI, 2001). Newman e Cragg (2016) avaliaram a participação dos produtos naturais nos medicamentos aprovados pela FDA entre 1981 e 2014. Nesse período foram aprovados 1.562

medicamentos, sendo 67 produtos naturais inalterados, 320 derivados de produtos naturais e 61 sintéticos com farmacóforos de produtos naturais.

Indubitavelmente, um dos produtos naturais mais conhecidos derivado de fungo (*Penicillium notatum*) é a penicilina, descoberta em 1929 por Alexander Fleming (MANN, 1994). Os fungos têm feito parte da vida humana por milhares de anos e, além de fontes de medicamentos, são usados como alimentos (cogumelos), na preparação de alimentos, bebidas alcoólicas, entre outros. Atualmente, com os avanços da microbiologia, seu uso tem sido estendido para o desenvolvimento de enzimas, controle biológico, vários antibióticos e outros compostos farmacologicamente ativos.

As vias metabólicas fúngicas são responsáveis pela produção de uma enorme gama de compostos bioativos, incluindo diferentes classes de moléculas secundárias, tais como terpenoides, policetídeos, alcaloides, poliacetilenos e outros compostos com diferentes atividades biológicas. Essas moléculas são consideradas importantes protótipos para o desenvolvimento de novos pesticidas e drogas.

Os macrofungos (políporos), basidiomicetos e ascomicetos, são uma importante fonte de substâncias farmacologicamente ativas. Cerca de 80 % dos fungos políporos testados mostraram forte atividade antimicrobiana e muitos exibiram atividades antiviral, citotóxica, cardiovascular, anti-inflamatória, imunoestimulante e anticancerígenas (STAMETS, 2002; ZJAWIONY, 2004). Extratos obtidos de fungos basidiomicetos, mostraram atividade antiviral contra o vírus influenza A, *in vitro* e *in vivo* (KABANOV et al., 2011). Em outro estudo foi mostrado que o extrato aquoso do fungo *Inonotus obliquus* possui um alto efeito virucida contra o vírus da hepatite C (SHIBNEV et al., 2011). Embora seja um grupo menos estudado em relação aos antivirais, Linnakoski e colaboradores, 2018, em revisão recente mencionam compostos fúngicos já isolados e com atividades antivirais contra vários vírus tais como DENV, ZIKV, JEV (RAEKIANSYAH et al., 2017), Enterovírus 71 (PANG et al., 2018), vírus da influenza A (SACRAMENTO et al., 2015), HIV (BASHYAL et al., 2014; ZHAO et al., 2017) entre outros.

1.8 Substâncias antivirais contra DENV, ZIKV e CHIKV

As infecções causadas por DENV, ZIKV e CHIKV têm um alto custo econômico para a sociedade, como salários perdidos, produtividade diminuída, despesas de custos associados à prestação de cuidados de saúde, além de despesas médicas diretas. Apenas no hemisfério ocidental, o custo da dengue foi estimado em cerca de 2,1 bilhões de dólares por ano (BEATTY et al., 2011). Portanto, a busca por moléculas antivirais em fontes naturais é uma abordagem promissora para o descobrimento e desenvolvimento de drogas para tratamento de pacientes acometidos por essas arboviroses.

Várias plantas já foram descritas com atividade antiviral contra DENV (KADIR; YAAKOB; ZULKIFLI, 2013). Até o momento, já foram descritas mais de 30 espécies distribuídas em todo o mundo, sendo que algumas ainda não foram investigadas cientificamente. Ademais, nos últimos anos têm aumentado o número de trabalhos publicados relatando a atividade antiviral de espécies de plantas contra DENV, sendo que várias delas são consideradas plantas medicinais (KAUSHIK, et al., 2018).

Nas Filipinas, a *Euphorbia hirta* conhecida localmente como “tawa-tawa”, é usada na medicina popular pela população de áreas rurais para tratar a dengue. Popularmente, acredita-se que o consumo das folhas de “tawa-tawa” possa combater a infecção viral e prevenir hemorragias, e desse modo, proteger o paciente de desenvolver as formas graves da dengue. No entanto, ainda não existem estudos científicos comprovando a eficácia da *E. hirta* (<http://www.curelibrary.com/blog/2007/04/>). Em outro estudo, no tratamento de um paciente com dengue com extrato aquoso de folhas de mamoeiro (*Carica papaya*), da família Caricaceae, foi possível avaliar um aumento da contagem de plaquetas e glóbulos brancos, principalmente neutrófilos, característica essencial para evitar a progressão para as formas graves da dengue (AHMAD et al., 2011).

Extratos metanólicos de *Andrographis paniculata* (Acanthaceae) e *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) apresentaram alta atividade antiviral contra DENV-1 em ensaios *in vitro* baseados apenas na análise do efeito citopático (TANG et al., 2012). O extrato aquoso de folhas de Nim (*Azadirachta indica* Juss) da família Meliaceae, testados na sua dose máxima não tóxica em ensaios de inibição viral, inibiu completamente a replicação do DENV-2 *in vitro*. A planta Nim é nativa da Índia e do

Paquistão e comumente é encontrada em países tropicais e subtropicais. Nesse mesmo estudo, tal extrato também inibiu completamente a replicação do DENV-2, *in vivo*, após inoculação intracerebral em camundongos lactentes (PARIDA et al., 2002).

Substâncias da planta medicinal *Boesenbergia rotunda*, da família Zingiberaceae inibiram a protease NS3 do DENV-2 (KIAT et al., 2006). Outro estudo indicou que vários extratos de plantas medicinais tailandesas, *Rhizophora apiculata*, *Flagellaria indica* Linn., *Cladogynos orientalis* Zipp. (Euphorbiaceae) e *Houttuynia cordata* Thunb., apresentaram atividade antiviral contra DENV-2, sendo fontes para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da dengue (KLAWIKKAN et al., 2011).

A *Uncaria tomentosa*, família Rutaceae, uma videira conhecida como unha-de-gato encontrada na região tropical da América do Sul e América Central teve sua atividade antiviral demonstrada, *in vitro*, em monócitos humanos infectados com DENV-2 e tratados com o extrato. Além da atividade antiviral demonstrada, o extrato bruto de *U. tomentosa* foi responsável pela imunomodulação dessas células, reduzindo os níveis de citocinas com potencial inflamatório, como o TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e o IFN- α (interferon alfa). Os fagócitos mononucleares, tais como monócitos e células dendríticas, são ativadas após a infecção por DENV (SCOTT et al., 1980; HALSTEAD, 1988; NEVES-SOUZA et al., 2005) e produzem mediadores pró-inflamatórios incluindo TNF- α , interleucina-6 (IL-6), IL-8, entre outros. Essas citocinas são também conhecidas por estarem aumentadas em pacientes com dengue (HOBER et al., 1993; BOZZA et al., 2008), e provavelmente desempenham um papel na ativação de células endoteliais e na permeabilidade vascular, podendo levar às manifestações clínicas mais graves da doença.

Em 2013, Lee e colaboradores demonstraram a atividade inibitória, *in vitro*, contra o DENV-2, após o tratamento simultâneo de um coquetel de extratos aquosos de quatro espécies do gênero *Phyllanthus* (*P. urinaria*, *P. niruri*, *P. amarus* e *P. watsonii*). Os autores desse trabalho observaram mais de 90 % de redução viral após o tratamento com o coquetel de extratos do gênero *Phyllanthus* e várias substâncias bioativas foram identificadas, tais como o ácido gálico, a geranina, a siringina e a corilagem. A análise de proteômica das células infectadas com DENV, tratadas ou não com o coquetel, revelou a expressão diferencial de 13 proteínas potencialmente

associadas à ligação e entrada do vírus às células, à produção da poliproteína viral, à replicação do RNA viral e também ao processo de montagem e maturação viral.

Em relação às substâncias antivirais de fungos, principalmente contra DENV-2 e ZIKV, há poucos trabalhos publicados, o que torna esse campo de pesquisa ainda mais promissor. Em 2017, Estoppey e colaboradores demonstraram que a cavinafungina, um lipopeptídeo de origem fúngica, é ativo contra DENV1-4 e também contra ZIKV.

De forma geral, há uma carência de pesquisas de antivirais contra ZIKV em produtos naturais. No entanto, há trabalhos que demonstram que as plantas são fontes importantes a serem investigadas. Polifenóis como o galato de epigalocatequina e cloreto de delphinidina presentes na planta *Camellia sinensis*, planta do chá verde, foram ativos contra ZIKV (CARNEIRO et al., 2016).

Embora a comunidade científica tenha feito um enorme esforço em busca de candidatos antivirais que possam ser utilizados contra o ZIKV, a pesquisa por antivirais a partir de produtos naturais, parece não ter sido a principal delas. Entre as diferentes abordagens devido a urgência de uma droga efetiva contra o ZIKV, comumente, o que tem ocorrido é uma tentativa de reposicionamento de drogas já liberadas e utilizadas na prática clínica para o tratamento de outras doenças. Claramente há uma ênfase na busca, *in vitro* e *in vivo*, entre compostos com atividade antiviral conhecida para outros vírus ou na triagem de bibliotecas compostas por centenas de moléculas bioativas. Essas moléculas têm como alvos componentes virais e celulares, incluindo análogos de nucleosídeos e inibidores da síntese de nucleosídeos. Outras drogas que têm como alvos enzimas virais, moléculas anti-inflamatórias, assim como aquelas com atividades antitumorais, antibióticas e antiparasitárias também têm sido bastante exploradas em ensaios contra o ZIKV.

Alguns derivados/análogos de nucleosídeos que têm como alvos as polimerases virais, tais como: nucleosídeos 2'-C-metilados, que têm mostrado inibição do ZIKV em culturas celulares (EYER et al., 2016; ZMURKO et al., 2016; HERCIK et al., 2017), sofosbuvir e BCX4430 (BULLARD-FEIBELMAN et al., 2017; JULANDER et al., 2017; SACRAMENTO et al., 2017), induziram maiores taxas de sobrevivência em camundongos imunodeficientes infectados com ZIKV e tratados (BULLARD-FEIBELMAN et al., 2017; JULANDER et al., 2017).

A bromocriptina, usada no tratamento de tumores da hipófise, inibiu a protease NS2B-NS3 de ZIKV, consequentemente inibindo a replicação e redução da carga viral

do ZIKV (CHAN et al., 2017). Os inibidores da síntese de pirimidina NITD008, CID91632869, finasterida, brequinar, 6-azauridina, gencitabina e 5-fluorouracil reduziram a multiplicação viral de ZIKV *in vitro* (PASCOALINO et al., 2016; ADCOCK et al., 2017; KUIVANEN et al., 2017). O tratamento com NITD008 melhorou as taxas de sobrevivência em camundongos infectados com ZIKV (DENG et al., 2016).

O N-(4-hidroxifenil) retinamida, composto sintético demonstrado como inibidor do DENV-2 por diminuição do RNA viral (CAROCCI et al., 2015) (FRASER et al., 2014), também inibiu o ZIKV *in vitro*, reduzindo a viremia e a carga viral no cérebro de modelo murino de infecção do ZIKV (PITTS et al., 2017).

Vários outros compostos com atividade anti-ZIKV foram identificados em estudos de reposicionamento de drogas ou em triagens com milhares de moléculas, muitas delas já conhecidas como bioativas. As substâncias saliphe, montesina, niclosamida (XU et al., 2016; ADCOCK et al., 2017; KUIVANEN et al., 2017), bortezomibe, sertralina (BARROWS et al., 2016), palonosetron (PASCOALINO et al., 2016), obatoclax (RAUSCH et al., 2017) e PHA-690509 também demonstraram atividade contra o ZIKV.

Drogas imunossupressoras tais como a ciclosporina A, o ácido micofenólico e a azatioprina também foram descritas como inibidores do ZIKV (QING, et al., 2009; BARROWS et al., 2016). Do mesmo modo, medicamentos hipolipidêmicos como a lovastatina, PF-429242, fatostatina, ácido nordihidroguaiarético e o ácido tetra-O-metil-nordihidroguaiarético demonstraram atividade inibitória contra o ZIKV em culturas celulares (PASCOALINO et al., 2016; MERINO-RAMOS et al., 2017).

Os antiparasitários e antimaláricos, como a ivermectina, cloroquina, quinacrina, mefloquina, GSK-36796 e pirimetamina (BARROWS et al., 2016; DELVECCHIO et al., 2016; BALASUBRAMANIAN et al., 2017), bem como antibióticos como a nanchangmicina, a daptomicina e a kitasamicina também reduziram *in vitro* a multiplicação do ZIKV (BARROWS et al., 2016; PASCOALINO et al., 2016; RAUSCH et al., 2017).

A busca por antivirais contra o CHIKV tem aumentado bastante desde a epidemia causada por esse vírus em 2004/2005 nas ilhas do Oceano Índico (WHO, 2006). E inúmeros esforços têm sido feitos para a descoberta ou desenvolvimento de uma substância antiviral contra o CHIKV.

Um dos primeiros compostos demonstrados como antivirais, *in vitro*, contra o CHIKV foi a cloroquina (KHAN et al., 2010), amplamente usada para o tratamento da

malária. No entanto, a cloroquina foi demonstrada como ineficaz em estudos de fase I conduzidos em indivíduos que desenvolveram artralgia por CHIKV na Ilha francesa La Reunion (DE LAMBALLERIE et al., 2008; ROQUES et al., 2018).

O análogo sintético do nucleosídeo purina (GRACI; CAMERON, 2006), a ribavirina, já licenciada pela FDA para o tratamento de infecções pelo vírus sincicial respiratório (VSR) (COOPER, 2003) e também para o tratamento da Hepatite C em combinação com o IFN peguilado (POYNARD et al., 1998; MANGIA et al., 2008), foi demonstrado como potente inibidor do efeito citopático (ECP) induzido por CHIKV em células Vero (BRIOLANT et al., 2004; GALLEGOS et al., 2016). Um estudo conduzido, por pelo menos duas semanas, com pacientes com artrite e dores nos pés após infecção por CHIKV, constatou que a administração da ribavirina reduziu edemas e dores nas articulações (RAVICHANDRAN; MANIAN, 2008). Seis dos 10 pacientes tratados puderam caminhar livremente com o tratamento e sete pacientes não necessitaram de analgésicos após 4 semanas de tratamento. Apesar dos resultados promissores, o número de pacientes nessa coorte foi baixo para observações conclusivas sobre a eficácia da ribavirina. Contudo, a atividade anti-CHIKV *in vitro* e *in vivo* observada com o tratamento com a ribavirina justifica um estudo mais aprofundado sobre seu uso para o tratamento da CHIKF.

A 6-azauridina, assim como a ribavirina, é um análogo de nucleosídeo que tem demonstrado amplo espectro viral (RADA; DRAGUN, 1977). Clinicamente, ela é usada para o tratamento da psoríase grave sem efeitos adversos graves. Além dos estudos mecanísticos, a 6-azauridina é uma substância que requer avaliação cuidadosa em modelos adequados, *in vivo*, de infecção por CHIKV.

O ácido micofenólico também foi demonstrado como inibidor do CHIKV. Seu modo de ação demonstrado foi a depleção de *pools* de GTP e subsequente inibição da apoptose induzida pelo CHIKV, resultando numa diminuição do ECP (KHAN et al., 2011).

O arbidol é um antiviral de amplo espectro aprovado na Rússia e na China para o tratamento e profilaxia de infecções causadas pelo vírus influenza, assim como para outras infecções virais respiratórias. Em 2011, o arbidol foi demonstrado como ativo contra o CHIKV. Há mais de 20 anos em uso clínico, o arbidol é uma substância bem tolerada e apresenta poucos efeitos adversos, sendo portanto, um bom candidato para realização de pesquisas clínicas com pacientes com CHIKF (DELOGU et al., 2011).

A substância cetona clorometil-RVCR-decanoil também foi demonstrada como inibidor da infecção pelo CHIKV por inibição da furina, prejudicando desse modo, a disseminação para células vizinhas (OZDEN, et al., 2008).

Há trabalhos que mostram que produtos naturais podem ser fontes de inibidores enzimáticos diretos e indiretos contra o CHIKV. Lucas-Hourani e colaboradores, 2013, conduziram um ensaio fenotípico no qual testaram mais de 3 mil compostos, identificando alguns derivados naturais que bloquearam parcialmente a atividade da proteína NSP2 do CHIKV e impactando a replicação viral *in vitro*. Em outro estudo, os flavonoides baicaleína, fisetina e quercetagina também afetaram a produção de RNA e a expressão de proteínas virais com baixa toxicidade (LANI et al., 2016).

Allard e colaboradores (2012) realizaram o fracionamento biomonitorado de extratos de casca de *Trigonostemon cherrieri* para identificar inibidores da porção da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) da NS5 do DENV. Os autores isolaram uma nova série de ortoésteres diterpenoides oxigenados carregando uma porção clorada incomum que inibiram o ECP causado pelo CHIKV em células Vero. Dado o alvo que abordaram no ensaio de triagem, é bem provável que esses compostos inibam a replicase do CHIKV.

Ressalta-se que estruturas de compostos naturais podem ser otimizadas, em termos de atividades biológicas, através de transformações sintéticas. Há poucos relatos sobre o efeito de produtos naturais em enzimas virais do CHIKV, sendo os produtos naturais relativamente inexplorados nesse sentido. Considerando a vasta gama de compostos disponíveis na natureza, é possível prever que mais investigações nesse campo sejam descritas em um futuro próximo.

Acreditamos que a exploração da biodiversidade de plantas e de fungos certamente é uma estratégia promissora para a identificação de substâncias com propriedades antivirais para utilização no tratamento de doenças virais tais como arboviroses como a dengue, zika e chikungunya.

A maioria das substâncias antivirais descritas e citadas neste trabalho estão apenas nas etapas preliminares da pesquisa e isso se deve, em parte, às várias lacunas na biologia dos vírus, especialmente DENV, ZIKV e CHIKV. Como exemplo, os processos que contribuem para a encefalite induzida por CHIKV e para a artrite crônica ainda são mal compreendidos, obviamente sendo obstáculos à descoberta de medicamentos antivirais.

1.9 Alvos para descoberta e desenvolvimento de antivirais

Os agentes antivirais podem agir em diferentes etapas da replicação viral, incluindo a síntese e degradação de proteínas, na replicação dos genomas virais e modificação dos fatores ou vias do hospedeiro que afetam o ciclo de replicação do vírus. Além disso, etapas de entrada e saída dos vírus das células também são pontos de interferência. Na maioria dos casos, os antivirais de ação direta agem sobre polimerases e proteases.

Na busca por antivirais, vários fatores são considerados, tais como: (i) é desejável que tenha um bom nível de inibição. Idealmente, uma droga que seja capaz de eliminar a replicação do vírus. Na prática, uma inibição de 50 a 90 % é considerada ótima para o desenvolvimento de um antiviral. Mesmo uma redução de 50 % na replicação pode reduzir a carga viral a um nível no qual o sistema imunológico do hospedeiro possa prontamente eliminá-lo; (ii) ter um alvo específico pois a ligação ou inibição de um alvo não intencional na célula hospedeira pode levar a efeitos adversos e até mesmo à morte celular. O antiviral deve, portanto, atuar apenas em alvos virais ou do hospedeiro aos quais se destinam. Portanto, a toxicidade celular tem que ser monitorada paralelamente à potência geral da substância. Ademais, há esforços para atingir proteínas específicas do ciclo de vida do vírus, como por exemplo a RdRp (RNA polimerase dependente de RNA) que não está presente na célula hospedeira não infectada; (iii) ação efetiva em vários vírus de uma mesma família (inibição de amplo espectro); (iv) capacidade de entrar rapidamente nas células, seja através de transporte ativo, difusão ou como pró-droga; (v) ação imediata, pois, por exemplo, pacientes infectados com DENV, ZIKV ou CHIKV geralmente não apresentam sintomas por 4-10 dias e, portanto, os antivirais precisam impedir que tais vírus se espalhem em um período relativamente tarde no ciclo de infecção (BOTTING; KUHN, 2012).

Sendo assim, várias etapas do ciclo de replicação viral são investigadas como possíveis alvos de inibição. Substâncias capazes de interromper os mecanismos de adsorção viral, fusão e entrada, escape endossomal, processamento do RNA viral, replicação do genoma, montagem do vírus, evasão da resposta imune do hospedeiro e liberação do vírus para outras células, podem ser promissoras para o desenvolvimento de um antiviral (BOTTING; KUHN, 2012).

A entrada do vírus na célula hospedeira é essencial para que ocorra a replicação. Um inibidor que impede a penetração viral na célula alvo minimiza uma variedade de efeitos negativos causados por fatores de virulência, além de possibilitar que o vírus fique mais vulnerável para ser eliminado pelo sistema imunológico. No caso dos flavivírus, a proteína E é responsável pela entrada e fusão na membrana, portanto, é um bom alvo terapêutico, pois inibiria as etapas seguintes no ciclo de vida do vírus, inclusive a liberação endossomal. Os inibidores de entrada também podem ter como alvos componentes extracelulares como os receptores das células hospedeiras, os quais são mais acessíveis, com a vantagem de reduzir as doses requeridas e os limites de toxicidade (TEISSIER; PENIN; PÉCHEUR, 2011). Os receptores usados pelo CHIKV são expressos em várias células, especificamente a proibitina (WINTACHAI, et al., 2012), fosfatidilserina, glicosaminoglicanos, receptores da subunidade β da ATP sintase (VAN DUIJL-RICHTER et al., 2015) e o receptor Mxra8 (MONTEIRO et al., 2019).

A inibição específica do RNA viral é uma outra abordagem válida para o desenvolvimento de um antiviral. No entanto, os vírus que têm um genoma RNA de fita simples e de senso positivo se assemelham ao mRNA celular. Embora conveniente para esses vírus, é desafiador atingir o RNA viral sem a inibição colateral de mRNA celulares.

Outros alvos interessantes para a atuação de inibidores, são as proteínas NS dos flavivírus, que estão envolvidas na replicação do genoma viral e na evasão pelo vírus do sistema imune do hospedeiro. Há estudos que demonstraram que a exclusão da NS1 do genoma de flavivírus iniba a replicação viral (LINDENBACH; RICE, 1999). O celgosivir é um pró-fármaco natural da castanospermina (*Castanospermum australe*) clinicamente aprovado para tratamento do HCV, que é convertido a castanospermina por difusão dentro da célula. Essa droga demonstrou atividade antiviral, contra DENV *in vitro* e *in vivo*, promovendo a inibição da glicosilação da proteína NS1 e sua acumulação no RE. Embora o celgosivir atue na etapa celular de glicosilação, a sua eficiência mostra que a NS1 tem um papel vital na replicação desse vírus e a identifica como um alvo promissor (RATHORE et al., 2011).

As proteínas NS3 e NS5 dos flavivírus são os alvos mais estudados e considerados promissores para a pesquisa e desenvolvimento de antivirais para os flavivírus. A NS3 é uma enzima multifuncional que atua como protease para o processamento das poliproteínas, como RNA trifosfatase para capear o RNA viral

nascente e como helicase, que desenrola os ácidos nucleicos em dupla-fita durante a replicação do RNA viral. A NS5 tem um domínio metiltransferase, envolvido no capeamento do RNA mensageiro viral, e um domínio RdRp, responsável pela replicação da fita positiva do RNA genômico.

Ainda em relação aos flavivírus, outros alvos em estudo são a NS2a, crucial para a síntese de RNA viral e a montagem do vírion (XIE et al., 2015), a NS2b que se liga à NS3 e forma a protease NS3 funcional (FALGOUT et al., 1991), e a NS4b, uma proteína de membrana integral que se insere nas membranas derivadas do RE no sítio de replicação, essencial para a função normal da replicação (MILLER et al., 2007). Alguns inibidores que interferem na função da NS4b já foram identificados, no entanto, ainda não se sabe como essas moléculas inibem especificamente a NS4b, e mesmo se a inibição seria adequada para reduzir a carga viral (PATKAR et al., 2009; XIE et al., 2011). A NS4a possui o peptídeo 2K que é uma sequência de 32 aminoácidos na sua porção C-terminal que a direciona à membrana do RE. Na inserção na membrana, a sequência 2K é clivada por proteases virais e celulares para originar as proteínas maduras NS4a e NS4b. Uma mutação na 2K do WNV foi responsável por conferir resistência à licorina (MILLER et al., 2007; ROOSENDAAL et al., 2006). Portanto, há uma hipótese de que a inibição do peptídeo 2K interfere no rearranjo da membrana ou reconhecimento do seu sítio de clivagem. Tal hipótese implica que os substratos de proteases também podem fornecer uma gama de novas estratégias de inibição. Além disso, é provável que o peptídeo 2K tenha outra função no complexo de replicação além do alvo proteico, já que ele se co-localiza com as proteínas de replicação viral.

O capsídeo envolve e protege o genoma viral. Até o momento, não existem compostos antivirais direcionados à proteína C para interferir na montagem e desnudamento do vírion. Contudo, a inibição da proteína C por estratégias de silenciamento de genes com short hairpin RNA (shRNA) reduziu bastante a produção viral do WNV (ONG; CHU; NG, 2008; QIN; QIN, 2006). Portanto, esse pode ser mais um alvo eficaz no futuro e vale a pena ser investigado. Teoricamente, seria efetivo um inibidor com capacidade de bloquear as interações entre a proteína C e “congelar” o nucleocapsídeo em uma conformação na qual não fosse possível a liberação do RNA genômico. Os precursores das glicoproteínas de maturação também são alvos que podem ser inibidos.

Em relação ao CHIKV, a proteína precursora E3E2 é clivada pela furina, uma protease celular, nas formas maduras E3 e E2. E um inibidor da furina já foi descrito como supressor da infecção por CHIKV (OZDEN et al., 2008). Em teoria, as proteínas não estruturais NSP1, NSP2, NSP3 e NSP4 do CHIKV também são alvos a serem investigados. Essas 4 proteínas se juntam para formar o complexo de replicação viral e servem de molde para a síntese de RNAs subgenômicos. Uma mutação na região da NSP2 inibiu a replicação do CHIKV, demonstrando ser um alvo atraente para antivirais (LUCAS-HOURANI et al., 2013). A NSP1 está envolvida na síntese da fita negativa do RNA viral. A NSP2 possui um domínio de protease envolvido no processamento das poliproteínas virais, uma RNA helicase, uma RNA trifosfatase envolvida no capeamento do RNA viral e uma trifosfatase nucleotídica (BOURAI et al., 2012). A NSP3 faz parte da unidade da replicase e a NSP4 representa a RNA polimerase viral. Em suma, há vários alvos para o desenvolvimento de antivirais, e as pesquisas por moléculas que atuem nesses alvos é uma área que visivelmente está avançando.

2 JUSTIFICATIVA

A descoberta de novas drogas antivirais torna-se cada dia mais importante devido à ameaça global de pandemias e surtos epidêmicos de doenças virais (Noble et al., 2010). O Brasil vem enfrentando várias epidemias causadas pelos vírus da dengue e, mais recentemente, por ZIKV, CHIKV e pelo YFV. De fato, no período de 2016 a 2017 foi registrada uma epidemia de febre amarela no Brasil, sobretudo na região Sudeste, que foi caracterizada como a maior epidemia deste século no país.

Além do desenvolvimento de vacinas, outra estratégia de combate a essas viroses, a exemplo do que aconteceu com a AIDS (Síndrome da imunodeficiência adquirida), é o desenvolvimento de fármacos antivirais para aliviar a carga viral nos pacientes, de forma a permitir que o sistema imune seja capaz de eliminar o vírus, bem como minimizar as diversas formas de transmissão pelo vetor. Portanto, se faz necessária e urgente a descoberta de drogas capazes de impedir/diminuir a proliferação de vírus nos pacientes infectados.

As plantas sempre tiveram uma participação importante na medicina tradicional e, ainda hoje, são empregadas no tratamento dos sintomas de várias doenças de etiologia viral. Várias espécies de plantas já foram demonstradas como inibidoras da multiplicação ou infecção de vários vírus (ASWAL et al., 1996) tais como o HIV (LEE-HUANG et al., 2003), o *Influenza virus* (YAMADA et al., 2009), o DENV (SIMOES et al., 2011); (LEE et al., 2013) e o HHV (*Human herpesvirus 2*) (ZHU et al., 2006). Portanto, a busca em produtos naturais de substâncias ativas é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de drogas antivirais. Ademais, aproximadamente 40 % dos medicamentos modernos são derivados de fontes naturais, seja utilizando a substância natural ou mesmo sua versão sintetizada (JASSIM; NAJI, 2003; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Do mesmo modo que as plantas, os fungos apresentam uma enorme biodiversidade tanto no número de espécies quanto na sua complexidade metabólica, uma vez que possuem vias bioquímicas incomuns ou até mesmo únicas para a produção de enzimas, metabólitos secundários e outros compostos bioativos. Algumas espécies de fungos exploradas pelo homem produzem importantes fármacos como a penicilina, ciclosporina e as estatinas. Assim, é de crucial importância a identificação de novos compostos bioativos produzidos por fungos que poderão ser usados como moléculas protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos.

De fato, há uma variedade de motivos que justificam o interesse terapêutico na busca de antivirais a partir de produtos naturais, a saber: (i) o limitado tempo de utilização de alguns medicamentos para o tratamento de certas infecções virais devido aos problemas relacionados à resistência viral; (ii) problemas de latência e recorrência de infecções virais em pacientes imunocomprometidos; (iii) a falta de medicamentos eficientes para o tratamento da maior parte das doenças causadas por vírus; e (iv) a diversidade estrutural de metabólitos secundários provenientes de plantas e de fungos.

No entanto, sabe-se que apenas uma pequena fração do vasto reservatório de compostos disponíveis na natureza é explorada visando à descoberta de substâncias antivirais. Isso também se aplica à biodiversidade brasileira, incluída entre as maiores do planeta e que se constitui em um imenso laboratório químico altamente sofisticado. Espécies de plantas e de fungos endofíticos de diferentes biomas brasileiros, assim como fungos de biomas como o deserto do Atacama e o continente Antártica também são explorados neste trabalho quanto ao potencial de moléculas antivirais. A utilização das mais variadas espécies sob diferentes processos de pressão natural ampliam enormemente as chances de identificação de moléculas de alta complexidade com ação antiviral. Do mesmo modo, a utilização de diferentes espécies de vírus, isto é, diferentes alvos abordados neste trabalho, favorece a descoberta de moléculas que podem ter especificidade para uma espécie viral em detrimento de outra.

A descoberta de moléculas promissoras dará subsídios para a preservação e exploração consciente principalmente das riquezas naturais. Os metabólitos secundários ou especiais identificados como antivirais poderão se notabilizar como matéria-prima valiosa para a produção de antivirais. De fato, inúmeros fármacos tiveram um ponto de partida nos produtos naturais, fazendo deste trabalho mais um exemplo que servirá de base nesse campo de pesquisa contra outros vírus que assim como os abordados neste trabalho, também constituem-se em graves ameaças à saúde pública.

Por fim, soma-se aos motivos impulsionadores deste trabalho, os excelentes resultados mostrados na nossa tese de mestrado, na qual foram identificados 115 extratos com atividade antiviral *in vitro* contra DENV-2, dentre os mais de 3.000 extratos de plantas e fungos da extratoteca da Fiocruz, albergada no IRR, e avaliados (Barbosa, 2015).

A descoberta de substâncias que possam ser utilizadas para o tratamento de doenças causadas pelos vírus da dengue, zika e chikungunya, será uma enorme conquista para a humanidade, tendo em vista que mais de 4 bilhões de pessoas vivem em áreas com prevalência ou em risco iminente de novas epidemias causadas por esses vírus.

3 OBJETIVOS

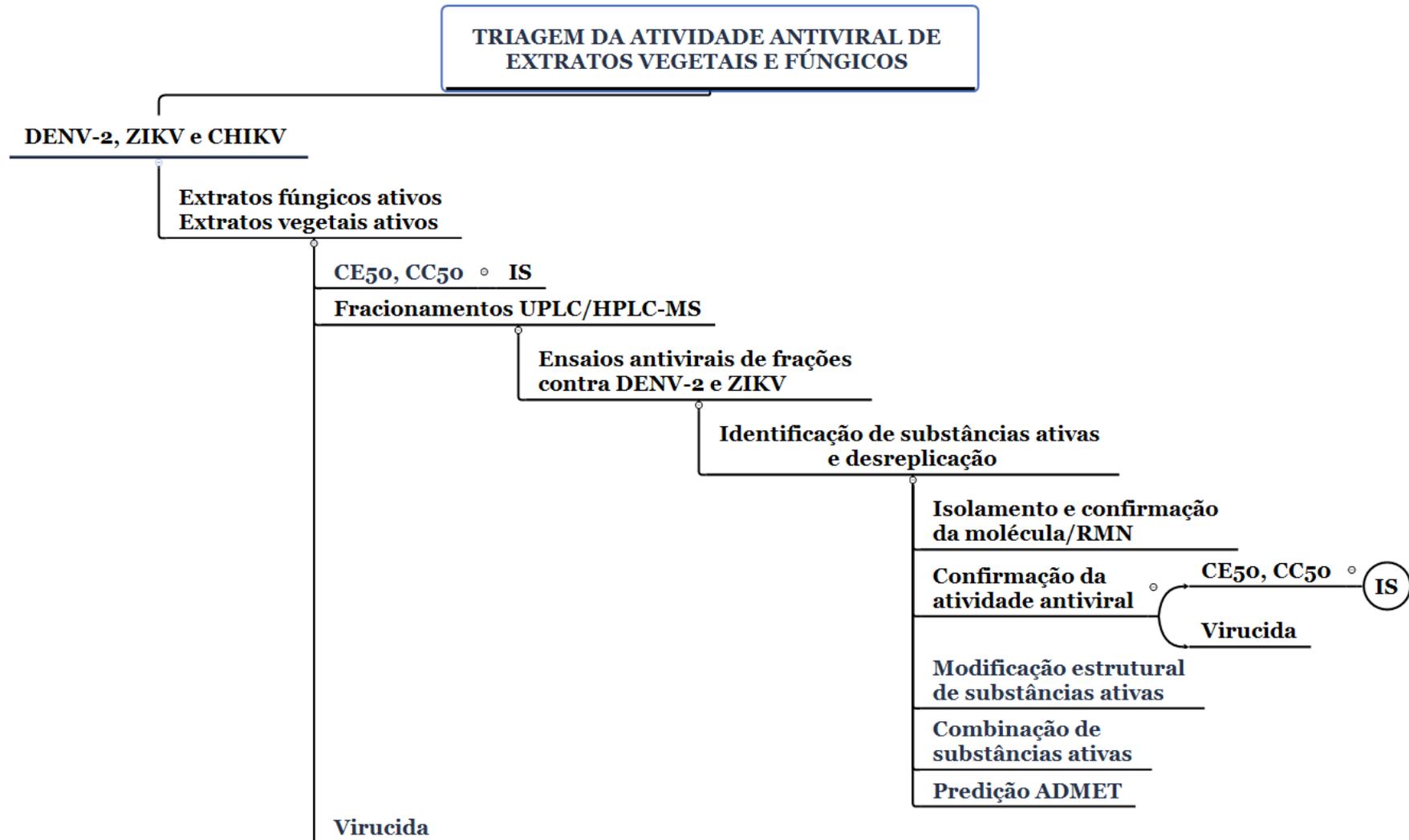
3.1 Objetivo geral

Identificar substâncias antivirais em extratos de plantas e de fungos ativos contra o DENV-2, o ZIKV e o CHIKV.

3.2 Objetivos específicos

1. Identificar (triar) extratos de plantas e de fungos com atividade antiviral contra o DENV-2, o ZIKV e o CHIKV;
2. Determinar a CC_{50} , a CE_{50} e o IS de extratos/frações e substâncias selecionados;
3. Realizar o fracionamento biomonitorado de pelo menos 10 extratos selecionados para identificação de substâncias/compostos antivirais;
4. Avaliar a ação virucida de extratos/frações ou substâncias purificadas selecionadas;
5. Elucidar a estrutura de substâncias sugeridas em frações ativas pelas plataformas de análise contra DENV-2 e/ou ZIKV;
6. Modificar a estrutura de substâncias ativas para potencialização da atividade antiviral e diminuição da citotoxicidade;
7. Combinar substâncias ativas para avaliação da atividade antiviral e citotoxicidade por isoblograma;
8. Realizar a predição ADMET de substâncias ativas contra DENV-2 e ZIKV.

4 FLUXOGRAMA DA ESTRATÉGIA DE TRABALHO



5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Vírus e linhagens celulares

Dengue virus 2 - A amostra do DENV-2 utilizada neste estudo foi isolada de paciente com febre do dengue do município de Ribeirão Preto – São Paulo, e desde então, foi multiplicada em cérebro de camundongo neonato e em células C6/36. Essa amostra foi cedida pela Dra. Erna Geessien Kroon do Laboratório de Vírus da UFMG.

Zika virus – A amostra do ZIKV utilizada neste estudo, denominada PE243/2015; GenBank: KX197192.1, foi isolada de soro de paciente em células Vero no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) – FIOCRUZ Pernambuco, pela equipe da Dra. Marli Tenório Cordeiro. O *pool* semente dessa amostra foi feito em células C6/36 no Laboratório de Imunologia de Doenças Virais (IDV) da Fiocruz Minas. O estoque (*pool* trabalho) de ZIKV para utilização neste trabalho é proveniente da terceira passagem em células C6/36.

Chikungunya virus – A amostra do CHIKV utilizada neste estudo foi cedida pelo Dr. Maurício Nogueira da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - SP. Para obtenção do *pool* trabalho do CHIKV tal alíquota foi multiplicada em células Vero.

Células BHK-21 - Linhagem celular de fibroblastos derivados de rim de hamster *Mesocricetus auratus* neonato de um dia de idade, adquirida do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ), com teste microbiológico negativo para micoplasma e na passagem 63. O cultivo das células BHK-21 foi feito em garrafa média de 75 cm² (TPP, Suíça) utilizando-se de meio de *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM) [Thermo, USA], no qual foi adicionado 5 % de soro fetal bovino (SFB) [Gibco], 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (Thermo, USA). As células foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO₂. Essa linhagem celular foi utilizada nos experimentos de titulação do DENV-2, assim como para a triagem anti-DENV-2, determinação da concentração efetiva 50 (CE₅₀) contra DENV-2 e determinação da citotoxicidade 50 (CC₅₀) de extratos de plantas e de fungos.

Células C6/36 – Linhagem celular derivada de larvas do mosquito *Aedes albopictus* adquirida do BCRJ com teste microbiológico negativo de infecção por micoplasmas. Para a manutenção desta linhagem celular foi utilizado meio Leibowitz 15 (L-15) [Cultilab, Campinas] suplementado com 5 % de SFB contendo antibióticos (100 UI/mL

de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B) [Thermo, USA] em garrafa média de 75 cm² (TPP, Suíça), sendo as células incubadas em estufa a 28 °C. Esta linhagem celular foi utilizada para a multiplicação do DENV-2 e do ZIKV.

Células Vero – Linhagem celular oriunda de rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*) cedida gentilmente pela Dra. Erna G. Kroon do Laboratório de Vírus da UFMG. O cultivo das células Vero foi feito utilizando-se de meio mínimo essencial de *Eagle* (MEM) [Thermo, USA] suplementado com 5 % SFB e contendo 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (Thermo, USA). As células foram mantidas em garrafa média de 75 cm² (TPP, Suíça) em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO₂. As células Vero foram utilizadas para os ensaios antivirais com ZIKV e CHIKV, como titulação, experimentos de triagem antiviral, CE₅₀, ensaio virucida e também para ensaios de CC₅₀.

5.2 Multiplicação do DENV-2 para obtenção de estoque viral (pool trabalho)

Para a multiplicação do DENV-2 foram utilizadas monocamadas de células C6/36 apresentando 80 a 90 % de confluência observada ao microscópio óptico invertido (modelo IMT-2, Olympus Optical, USA). Uma alíquota de DENV-2 com título conhecido foi diluída no meio L-15 suplementado com 2 % de SFB e antibióticos, para obter-se uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) igual a 0,1 (m.o.i. = 0,1), ou seja, 1 vírion para cada 10 células. Em seguida, 5 mL desta diluição foram inoculados em frascos de cultura de 150 cm² (TPP, Suíça) contendo monocamada de células C6/36, de forma a cobrir toda a monocamada celular com um filme fino de líquido. Para a adsorção viral, a garrafa foi incubada por 1h a 28 °C com homogeneização delicada do meio sobre a monocamada a cada 10min, para melhor distribuição da suspensão viral. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 25 mL de meio L-15 suplementado com 2 % de SFB contendo 1 % de antibióticos. As células foram incubadas em estufa a 28 °C por 5 dias e monitoradas diariamente ao microscópio óptico para a observação do efeito citopático causado pelo DENV-2, caracterizado pela formação de sincícios (células multinucleadas). Vale ressaltar que no terceiro dia de incubação foi acrescentado cerca de 30 % do volume de meio L-15 completo para

que as células não fossem prejudicadas pela carência de nutrientes. No quarto dia de incubação, um volume apropriado de SFB foi adicionado à garrafa para obter-se uma concentração final de 10 % de SFB no meio de cultura. Tal concentração de SFB favorece uma melhor estabilização da partícula viral e, conseqüentemente, a manutenção do título do vírus. No quinto dia, após confirmação da formação de sincícios em pelo menos 90 % da monocamada celular, o sobrenadante foi transferido para tubos cônicos de polipropileno (50 mL), centrifugados por 10min a 200 g e a 4 °C (rotor RT-6000B, centrífuga Legend RT, Sorvall) para clarificação da suspensão viral. O sobrenadante foi distribuído em alíquotas de 0,5 e 1 mL em tubos estéreis e armazenado a - 70 °C. O título viral foi determinado em células BHK-21 pelo método de formação de placas de lise como descrito no item 5.5.

5.3 Multiplicação do ZIKV para obtenção de estoque viral (*pool* trabalho)

Para a multiplicação do ZIKV foram utilizadas monocamadas de células C6/36 apresentando 80 a 90 % de confluência observada ao microscópio óptico invertido (Olympus Optical, modelo IMT-2). Para a infecção celular com m.o.i. = 0,1 foi feita uma suspensão de 5 mL do ZIKV em meio L-15 sem SFB, feita a partir do *pool* semente, referente à segunda passagem da amostra viral em células C6/36 após isolamento do vírus em células Vero. Cinco mL da suspensão viral foram inoculados em garrafa de cultura de 150 cm² contendo monocamada de células C6/36. Em seguida, a garrafa foi incubada por 1h a 28 °C para adsorção viral, sendo feita a homogeneização a cada 15min. O sobrenadante foi aspirado e foram adicionados 25 mL de meio L-15 suplementado com 2 % de SFB e antibióticos. A garrafa foi novamente incubada em estufa a 28 °C e as células monitoradas diariamente ao microscópio óptico para a observação da ocorrência ou não de ECP causado pelo ZIKV. No terceiro dia foram adicionados à garrafa incubada com células C6/36 infectadas com o vírus, 30 % a mais do meio de cultura presente, ou seja, 7,5 mL de meio L-15 suplementado com 2 % de SFB e 1 % de antibióticos. No oitavo dia, um volume apropriado de SFB foi adicionado à garrafa para obter-se uma concentração final de 10 % de SFB no meio de cultura. Acredita-se que tal concentração de SFB favoreça uma melhor estabilização da partícula viral e, conseqüentemente, a manutenção do título do vírus. No décimo dia pós-infecção (pi) foi feita a coleta do

sobrenadante para congelamento do vírus, mesmo não sendo observado ECP nas células C6/36. Após, 25 mL de meio L-15 suplementado com 2 % de SFB e 1 % de antibióticos foram adicionados à garrafa, que em seguida foi incubada novamente por mais 3 dias e o sobrenadante transferido para tubos cônicos de polipropileno (50 mL). Os sobrenadantes coletados foram centrifugados por 10min a 200 g a 4 °C (rotor RT-6000B, centrífuga Legend RT, Sorvall) para clarificação da suspensão viral, distribuídos em alíquotas de 500 µL em tubos estéreis e armazenados a - 70 °C.

5.4 Multiplicação do CHIKV para obtenção de estoque viral (*pool* trabalho)

A multiplicação do CHIKV foi feita em frascos de culturas de células de 150 cm² (TPP, Suíça) contendo monocamada de células Vero. Para a multiplicação do CHIKV, tais células foram cultivadas até atingirem a densidade de aproximadamente 80 % de confluência. Após, foi preparada a suspensão do vírus para infecção com o m.o.i. = 0,01. Para a adsorção viral, o meio de cultura das garrafas foi descartado e foram adicionados 5 mL de suspensão viral à monocamada celular, volume que permite um filme de líquido sobre as células, que em seguida foram incubadas por 1h e 30min a 37 °C. Nessa etapa foi feita homogeneização de 15 em 15 min. Após, descartou-se a suspensão viral e foram adicionados 30 mL de meio MEM suplementado com 2 % de SFB. As garrafas foram incubadas por 3 dias, sendo observadas diariamente para certificar o surgimento do ECP viral. Após aparecimento do ECP viral em aproximadamente 80 % da monocamada celular, um volume apropriado de SFB foi adicionado à garrafa para obter-se uma concentração final de 8 % de SFB no meio de cultura. Após 24h, o sobrenadante foi clarificado a 200 g, a 4 °C por 15min, alíquotado e congelado a - 70 °C.

5.5 Titulação de DENV-2

A titulação do DENV-2 foi feita em células BHK-21 pelo método de formação de placas de lise (DULBECCO; VOGT, 1953). A determinação do título do *pool* trabalho foi feita em placas de 6 poços (Sarstedt, USA) em duplicata. Para tal, foram

adicionadas $4,0 \times 10^5$ células por poço contendo meio DMEM suplementado com 5 % de SFB e antibióticos, e incubadas por 24h em atmosfera com 5 % CO_2 a 37 °C para obtenção de monocamada com 80 a 90 % de confluência.

Após, o meio de cultura foi descartado e 500 μL de diluições decimais seriadas da suspensão do DENV-2 a ser titulada (10^{-3} a 10^{-7}) foram adicionados aos respectivos poços. Um dos poços da placa foi reservado para o controle de células não infectadas. Para a adsorção viral, as placas foram incubadas a 37 °C durante 1 hora, sendo que neste período foram homogeneizadas delicadamente a cada 15min para melhor distribuição da suspensão viral. O meio da placa foi então desprezado e foram adicionados 5 mL por poço de meio semissólido contendo 1,5 % de carboximetilcelulose (CMC) [Sigma Aldrich, USA]. Para o preparo do meio semissólido foi utilizado DMEM 2X (duas vezes concentrado) suplementado com 2 vezes a concentração final de antibióticos adequada e 3 % de SFB, adicionando-se igual volume de solução aquosa de CMC a 3 % estéril. A placa foi incubada em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO_2 durante 5 dias para a formação de placas de lise.

As células foram fixadas adicionando-se cerca de 10 mL/poço de solução aquosa de formaldeído a 10 % por 2h à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas abundantemente com água retirando-se o meio semissólido, sendo então coradas com solução de cristal violeta a 1 % (dissolvido em 70 mL de álcool etílico PA e 30 mL de água tipo I) por 5min. Para a determinação do título viral foi considerada a contagem das placas de lise da diluição que apresentou entre 30 a 100 placas. O título viral foi calculado de acordo com a fórmula $\text{PFU/mL} = n \cdot fc \cdot x$, onde n é igual ao número de placas de lise contadas por poço, fc é o fator de correção, ou seja, é o número pelo qual o volume do inóculo viral utilizado deve ser multiplicado para que se obtenha 1 mL, sendo “2” o fator de correção neste caso, pois 500 μL de volume foram utilizados para adsorção viral, e x é o inverso da diluição na qual foi encontrado o valor de n. Desse modo, o título foi definido em unidades formadoras de placa (PFU) por mL de suspensão viral, já que teoricamente cada placa é iniciada pela infecção de uma única partícula viral infectante.

5.6 Titulação do ZIKV e do CHIKV

As titulações do ZIKV e do CHIKV foram feitas utilizando-se de monocamadas de células Vero em placa de 12 poços (Sarstedt, USA) em duplicata e pelo método de formação de placas de lise (DULBECCO; VOGT, 1953). Para tal, foram adicionadas $1,0 \times 10^5$ células por poço contendo meio MEM suplementado com 5 % de SFB e 1 % de antibióticos. As placas foram incubadas por 24h em atmosfera com 5 % CO₂ e a 37 °C para formação da monocamada celular. Em seguida, o meio de cultura da placa foi descartado e foram adicionados 250 µL das diluições das suspensões virais a serem tituladas (diluições 10^{-1} a 10^{-7}) nos respectivos poços. Em cada placa foram reservados poços para o controle de células não infectadas. Para a adsorção viral, as placas foram incubadas a 37 °C durante 1 hora, sendo neste período homogeneizadas a cada 10min para melhor distribuição da suspensão viral. Ao final de 1 hora de incubação, a suspensão viral foi descartada e foram adicionados 5 mL por poço de meio MEM semissólido contendo 1,5 % de CMC de média viscosidade (Sigma Aldrich, USA), 1 % de SFB e 1 % de antibióticos. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e com atmosfera de 5 % de CO₂, durante 5 dias para o ZIKV e 3 dias para o CHIKV, para a formação de placas de lise.

Para a revelação do ensaio, foram adicionados às placas, sobre o meio semissólido, cerca de 2 mL/poço de solução aquosa de formaldeído a 10 %, sendo essas incubadas em temperatura ambiente de um dia para outro. Em seguida, as placas foram lavadas com água de torneira até retirar todo o meio semissólido e coradas com solução de cristal violeta a 1 % (item 5.5) por 5min. O título viral foi calculado pelo número de placas de lise verificadas na diluição que apresentou no mínimo 30 placas de lise. O título viral foi estabelecido conforme fórmula descrita no item 5.5.

5.7 Extratoteca da Plataforma RPT10A – Coleção de extratos de plantas e de fungos da Fiocruz

Desde 1990, o Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos (QPNB) vem estabelecendo uma coleção de extratos brutos obtidos a partir de plantas, fungos e bactérias que foram coletadas em diversas regiões do Brasil e da Antártica (Figura 3).

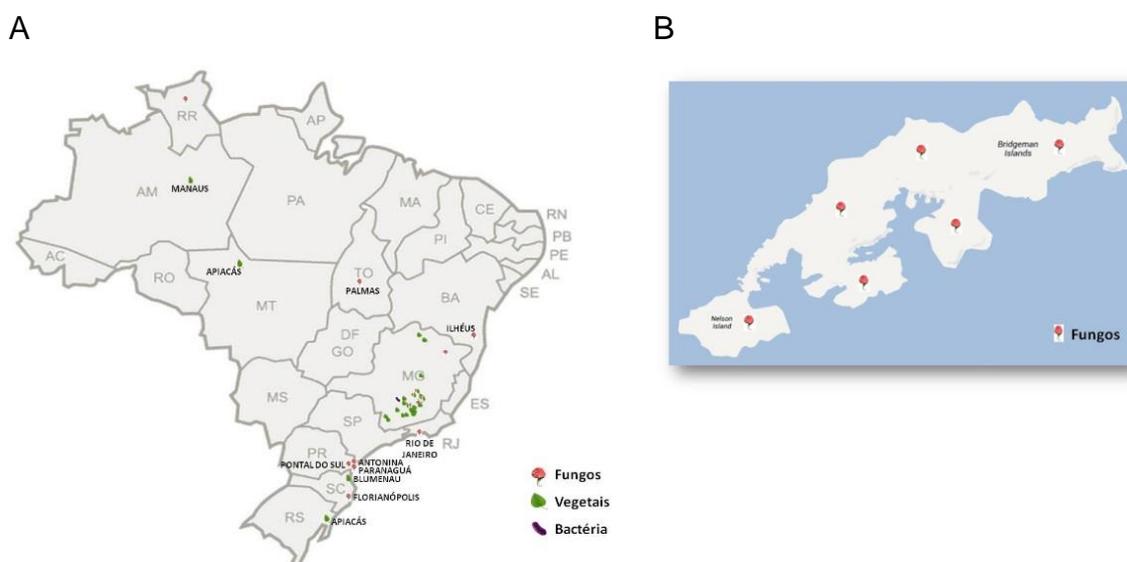


Figura 3 - (A) Locais de coleta de amostras de fungos, vegetais e bactérias no Brasil e (B) no continente Antártica (Ihas de Bridgeman e Nelson) depositadas na extratoteca do IRR.

Atualmente, a Extratoteca da Fiocruz conta com cerca de 19.000 extratos mantidos a -20°C na sua forma bruta ou dissolvidos em DMSO aquoso a 90 %. Esses extratos também são utilizados em outros ensaios biológicos em modelos experimentais, *in vitro*, relevantes para diversas doenças negligenciadas como as leishmanioses, doença de Chagas e malária. Os extratos ativos na triagem preliminar nas concentrações de 20 e/ou 25 $\mu\text{g/mL}$ têm suas CE_{50} e atividade virucida determinadas. No caso de organismos intracelulares, a citotoxicidade (CC_{50}) dos extratos é determinada para a célula hospedeira. Os extratos identificados como promissores são então preparados em maior escala a partir de novas coletas das plantas ou por recultivo dos microrganismos (fungos) de modo a possibilitar o isolamento e a identificação do(s) princípio(s) ativo(s). Os extratos ativos são analisados por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao detector de

ultravioleta (UV) e espectrometria de massas de alta resolução (UPLC-DAD-HRMS) para registro do perfil cromatográfico, espectros de UV e espectros de massa. Desse modo, na maioria dos casos é possível determinar as fórmulas moleculares dos componentes presentes nos extratos. Para todos os extratos de plantas depositados na extratoteca do IRR é requerido ao depositante que preencha o formulário padrão de depósito. As informações obrigatórias incluem local da coleta (País, Estado, Município e local específico), coordenadas geográficas, partes da planta que foram coletadas, período do ano, identificação do herbário, códigos das exsicatas depositadas e identificações taxonômicas preliminares. Todos os acessos estão regularizados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN).

5.8 Produção de extratos de plantas e de fungos em maior escala

Para a obtenção de maior quantidade de extratos de plantas, a parte contendo o princípio ativo (raiz, folha, fruto, etc) foi coletada, triturada e macerada em etanol absoluto. Essa mistura foi deixada por pelo menos uma semana à temperatura ambiente e ao abrigo da luz antes de ser filtrada e o solvente eliminado por centrifugação a vácuo (SC250 Express SpeedVac®, Thermo Savant) a 45 °C. Para utilização nos ensaios biológicos, 20 mg de cada extrato foi dissolvido em 1 mL de DMSO aquoso a 90 % e mantidos a – 20 °C até o momento do ensaio biológico.

A obtenção de maior quantidade de extratos de fungos foi feita pela equipe do Prof. Dr. Luiz H. Rosa do Departamento de Microbiologia da UFMG. Os fungos filamentosos de interesse foram cultivados em placas de Petri (Synth, 90 x 15 mm) utilizando-se as mesmas condições usadas para o seu isolamento. Para os cultivos em maior escala, os fungos foram inoculados em 300 placas de Petri (90 x 15 mm) nas quais três discos de 5 mm de diâmetro eram colocados no centro das placas. Após, o conteúdo das placas foi fragmentado e transferido para um frasco, ao qual foi adicionado etanol absoluto em quantidade suficiente para cobrir os fragmentos. Após 3 dias, o material foi filtrado e o solvente eliminado em centrífuga a vácuo (SC250 Express SpeedVac®, Thermo Savant). Do mesmo modo feito para os extratos de plantas, 20 mg de cada extrato fúngico foram dissolvidos em 1 mL de DMSO a 90 % e mantidos a - 20 °C até o momento do ensaio biológico.

Na tentativa de recuperar a produção de princípios ativos antivirais produzidos pelo isolado inicial do *P. chrysogenum*, mas perdido em cultivos subsequentes, esse fungo foi recultivado em diferentes meios de cultura e condições de incubação. Resumidamente: Em (1a) **meio marinho** (Difco) em ágar nas temperaturas de 15, 25 e 30 °C; (1b) em **meio marinho líquido** sob agitação a 30 °C; (2) em **meio Ágar Czapeck** (Difco) em ágar nas temperaturas de 15, 25 e 30 °C; (3) em **meio ágar-batata dextrosado** (Difco) em ágar nas temperaturas de 15, 25 e 30 °C; (4a) em **meio de extrato de malte e extrato de levedura** (Difco) em ágar nas temperaturas de 15, 25 e 30 °C; (4b) em **meio líquido de extrato de malte e extrato de levedura** sob agitação a 30 °C; (5a) em **meio de extrato de malte** (Difco) em ágar nas temperaturas de 15, 25 e 30 °C; (5b) em **meio líquido de extrato de malte** sob agitação a 30 °C; (6a) em **meio de arroz** (Difco) em ágar nas temperaturas de 15, 25 e 30 °C; (6b) em **meio líquido de arroz** sob agitação a 30 °C; (7a) em **meio de aveia** (Difco) em ágar nas temperaturas de 15, 25 e 30 °C e (7b) em **meio líquido de aveia** sob agitação a 30 °C.

5.9 Preparo de microplacas com os extratos para os ensaios de triagem da atividade antiviral

Para os ensaios de triagem da atividade antiviral contra DENV-2, ZIKV e CHIKV, os extratos de plantas e de fungos foram fornecidos de duas formas pela extratoteca do IRR em placas de polipropileno com 96 poços (Kasvi, Brasil): (i) na forma de filme seco, sendo 10 µg de extrato por poço; ou (ii) em solução a 20 mg/mL em DMSO aquoso a 90 % (1 µL/poço, 20 µg/poço). Em cada placa foram disponibilizadas 80 amostras de extratos distribuídas nas colunas 2 a 11, ficando as colunas 1 e 12 livres para os controles (esquema mostrado na Figura 4). As placas contendo os extratos foram armazenadas a - 20 °C até o momento do ensaio antiviral.

A solubilização dos extratos fornecidos em forma de filme seco foi feita em 50 µL/poço de solução aquosa estéril contendo 8 % de DMSO (Sigma-Aldrich) sob agitação orbital (SI-A236, Scientific Industries) por 60min em temperatura ambiente. Em seguida, o volume da solução aquosa foi completado para 210 µL/poço de meio DMEM ou MEM suplementado com 2 % de SFB e 1 % de antibióticos para o ensaio antiviral.

Aos extratos disponibilizados em DMSO aquoso a 90 % na placa, foram adicionados 49 µL/poço de água estéril. A placa foi mantida sob agitação orbital por

60min à temperatura ambiente. Vale ressaltar que a solubilização dos extratos foi feita imediatamente antes da realização do ensaio antiviral.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CC+DMSO	Ex01	Ex09	Ex17	Ex25	Ex33	Ex41	Ex49	Ex57	Ex65	Ex73	CV+DMSO
B	CC+DMSO	Ex02	Ex10	Ex18	Ex26	Ex34	Ex42	Ex50	Ex58	Ex66	Ex74	CV+DMSO
C	CC+DMSO	Ex03	Ex11	Ex19	Ex27	Ex35	Ex43	Ex51	Ex59	Ex67	Ex75	CV+DMSO
D	CC+DMSO	Ex04	Ex12	Ex20	Ex28	Ex36	Ex44	Ex52	Ex60	Ex68	Ex76	CV+DMSO
E	CC-DMSO	Ex05	Ex13	Ex21	Ex29	Ex37	Ex45	Ex53	Ex61	Ex69	Ex77	CV-DMSO
F	CC-DMSO	Ex06	Ex14	Ex22	Ex30	Ex38	Ex46	Ex54	Ex62	Ex70	Ex78	CV-DMSO
G	IFN	Ex07	Ex15	Ex23	Ex31	Ex39	Ex47	Ex55	Ex63	Ex71	Ex79	IFN
H	IFN	Ex08	Ex16	Ex24	Ex32	Ex40	Ex48	Ex56	Ex64	Ex72	Ex80	IFN

Figura 4 – Mapa utilizado nas triagens de extratos vegetais e fúngicos contra DENV-2, ZIKV e CHIKV. Representação da placa de 96 poços usada em ensaios antivirais, a saber: (i) colunas 2 a 11: células infectadas e tratadas com 80 extratos com concentração final de 20 a 25 µg/mL; (ii) colunas 1 e 12 reservadas aos controles: coluna 1 (A-D - células não infectadas e não tratadas, e **com** DMSO), (E-F - células não infectadas e não tratadas, **sem** DMSO), (G-H - células infectadas e tratadas com 600 UI/mL de IFN-α 2b); coluna 12 (A-D - células infectadas e não tratadas, e **com** DMSO); (E-F - células infectadas e não tratadas, e **sem** DMSO); G-H - células infectadas e tratadas com 300 UI/mL de IFN-α 2b. O IFN-α 2b foi utilizado como controle positivo apenas nos ensaios antivirais contra DENV-2 e ZIKV.

Como mostrado na figura 4 nas placas de 96 poços utilizadas nos ensaios de triagem da atividade antiviral, os poços A-F da coluna 1 são destinados ao controle de células (células não tratadas e não infectadas) e os poços A-F da coluna 12, ao controle de vírus. Aos poços A1, B1, C1 e D1 (controle de células + DMSO) e aos poços A12, B12, C12 e D12 (controle de vírus + DMSO) foi adicionado meio de cultura com a mesma concentração de DMSO presente nos poços com os 80 extratos solubilizados (colunas 2 a 11). A concentração final de DMSO/poço foi de 0,25 % para extratos disponibilizados em filme seco e de 0,13 % para extratos disponibilizados em solução aquosa com DMSO a 90 %. Meio de cultura sem DMSO foi adicionado aos poços E-F da coluna 1 (controle de células) e E-F da coluna 12 (controle de vírus). Os demais poços das colunas 1 e 12 foram reservados para o tratamento com IFN-α 2b (INREC, Alemanha), usado como controle positivo do efeito antiviral contra DENV-2 e ZIKV. Nesses poços, as células foram infectadas e tratadas com 600 UI/mL e 300 UI/mL de IFN-α 2b. Não foi utilizada nenhuma substância como controle positivo nos ensaios com o CHIKV. O procedimento descrito acima também foi utilizado para a verificação da atividade antiviral de frações dos extratos fracionados por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-HRMSMS).

5.10 Triagem da atividade antiviral de extratos e frações contra DENV-2, ZIKV e CHIKV

DENV-2: Para o ensaio com extratos/frações contra DENV-2 foram adicionadas $8,0 \times 10^3$ células BHK-21/poço em placas de 96 poços (Kasvi, Brasil) e incubadas por 24h em estufa a 37 °C com 5 % de CO₂, tempo e condições adequadas para a formação de monocamada celular com 80 % de confluência. No dia seguinte, imediatamente antes do ensaio, o meio de cultura foi descartado e foram adicionados, simultaneamente, 100 µL dos extratos na concentração de 50 µg/mL mais 100 µL de suspensão viral com m.o.i = 2. Para cálculo de m.o.i considerou-se um crescimento de 30 % das células BHK-21 no período de 24h. Após, as placas foram reincubadas nas mesmas condições por 72h. A avaliação do efeito antiviral dos extratos foi feita pelo método que avalia a viabilidade celular utilizando-se o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), doravante chamado de ensaio do MTT. Trata-se de uma técnica colorimétrica, sensível e quantitativa vastamente utilizada para a avaliação *in vitro* da viabilidade celular e citotoxicidade, bem como no estudo de aditivos, micotoxinas e fármacos. Tal análise é feita baseando-se em uma reação biológica, em células viáveis, catalisada por desidrogenases mitocondriais que reduzem o sal de tetrazólio, composto hidrossolúvel de coloração amarelo-pálido, a cristais de formazana. A absorbância da formazana, medida espectrofotometricamente, é diretamente correlacionada ao número de células metabolicamente ativas. Sendo assim, valores de absorbância altos indicam uma elevada produção de formazana (cor roxa), o que significa uma alta atividade enzimática e, conseqüentemente, um maior número de células viáveis (MOSMANN, 1983; BETANCUR-GALVIS, 1999). Para o ensaio do MTT, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 30 µL/poço de solução de MTT a 2 mg/mL em PBS, sendo as placas incubadas por 90min a 37 °C. Após, foram adicionados 130 µL/poço de DMSO puro para dissolução dos cristais de formazana gerados pela redução do MTT e a placa foi incubada por 5min em um agitador. A medida da absorbância em 540 nm (DO₅₄₀) foi feita em leitor de microplacas (SpectraMaxM5 - Molecular Devices, USA). A porcentagem de proteção, ou seja, de células viáveis, foi calculada com a fórmula $100 \cdot (A-B)/(C-B)$, onde A, B e C correspondem aos valores de DO₅₄₀ medidos nos poços, sendo: **(A)** células infectadas e tratadas com os extratos/frações; **(B)** apenas células infectadas/controle de vírus e **(C)** células não infectadas e não tratadas/controle de células.

Os extratos de plantas e de fungos que mostraram atividade antiviral de pelo menos 30 % de proteção no primeiro ensaio de triagem foram submetidos a um novo ensaio nas mesmas condições para confirmação da proteção antiviral (reteste).

ZIKV e CHIKV: Os ensaios de triagem dos extratos/frações contra o ZIKV e contra o CHIKV foram feitos de forma semelhante à descrita para DENV-2, mas utilizando-se de células Vero na densidade de $1,0 \times 10^4$ células/poço. Uma vez que células Vero têm um perfil de multiplicação diferente de células BHK-21, para cálculo da m.o.i. = 2 para os ensaios com ZIKV e da m.o.i. = 0,2 para os ensaios com CHIKV, foi considerada a mesma quantidade de células/poço semeadas 24h antes dos ensaios antivirais. A incubação do ensaio com ZIKV foi de 96h e para CHIKV foi de 72h até a revelação pelo método do MTT. Ademais, os ensaios de triagem contra ZIKV e contra CHIKV foram feitos paralelamente aos ensaios de toxicidade. Ou seja, células Vero não infectadas também foram tratadas com os respectivos extratos na mesma concentração (20 $\mu\text{g/mL}$) utilizada nos ensaios antivirais. Essa otimização dos ensaios nos permitiu saber se a concentração dos extratos usada foi tóxica ou não às células hospedeiras. Os extratos com toxicidade acima de 40 % na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ foram testados novamente nas concentrações de 10,0; 5,0; 2,5 e 1,3 $\mu\text{g/mL}$.

5.11 Avaliação da atividade antiviral de extratos contra DENV-2 pelo efeito citopático (ECP) viral

A avaliação da atividade anti-DENV-2 de extratos vegetais e fúngicos também foi feita pela observação do efeito citopático (ECP) viral por microscopia óptica, imediatamente antes da execução do método do MTT. Trata-se de uma avaliação qualitativa do ECP viral comumente chamado de método de cruzes. O ECP viral foi estimado por comparação da integridade da monocamada celular no controle de células (índice 0) com o ECP máximo (++++) observado no controle de vírus (células infectadas com DENV-2 e não tratadas). Conforme observado, às células infectadas e tratadas com os extratos foram designados os ECP virais variando do índice 0 a 100 % de ECP. De forma que para monocamadas com ECP até 25 % foi atribuída uma cruz (+), para ECP entre 26-50 % foram atribuídas duas cruzes (++) , para ECP entre 51-75 % foram atribuídas três cruzes (+++) e para monocamadas com ECP de 76-100 % foram atribuídas quatro cruzes (++++), como exemplificado na Figura 5.

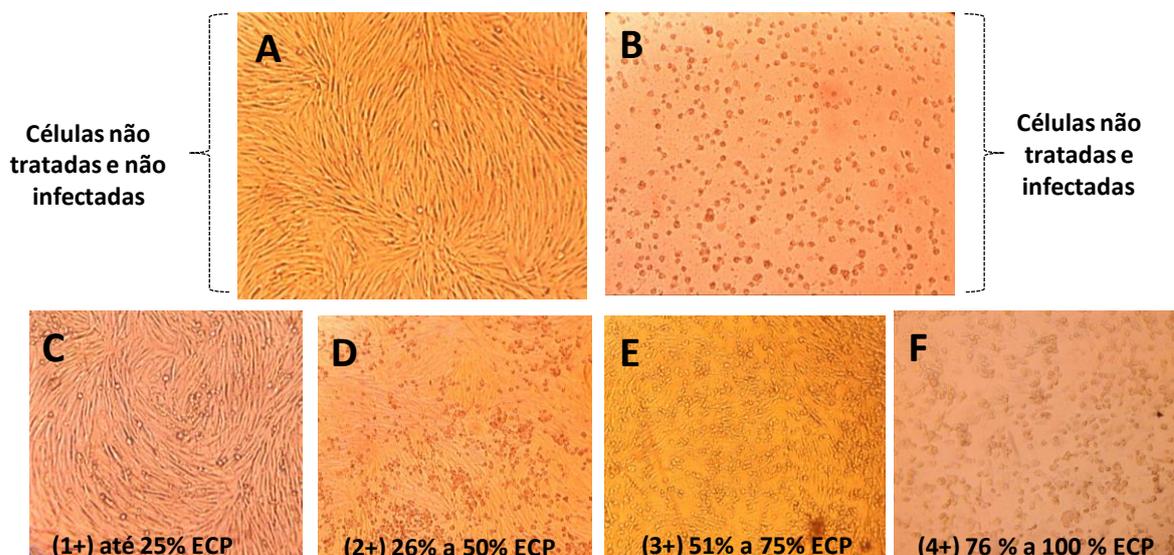


Figura 5 - Classificação do ECP do DENV-2 em células BHK-21. A classificação do ECP causado pelo DENV-2 na presença ou ausência do extrato em monocamadas de células BHK-21 foi realizada após 72h de incubação e foi baseada nos critérios ilustrados nessa figura. Na imagem (A) estão representadas células não infectadas e não tratadas (índice 0); (B) células infectadas com DENV-2 e não tratadas (índice ++++); (C) monocamada apresentando até 25 % de ECP viral (+); em (D) monocamada celular apresentando de 26 a 50 % (++); (E) monocamada celular apresentando de 51 a 75 % (+++) e em (F) está representada uma monocamada celular com 76 a 100 % de ECP viral (++++). Aumento 40X. (BARBOSA, 2015)

5.12 Determinação da Concentração Efetiva 50 (CE₅₀) dos extratos, frações e substâncias com atividade antiviral contra DENV-2 e ZIKV

Define-se como concentração efetiva 50 (CE₅₀) a concentração de uma droga capaz de produzir metade da resposta máxima que tal droga pode gerar numa determinada estrutura biológica. Portanto, a CE₅₀ de cada extrato foi definida pela concentração do extrato na qual foi observado 50 % de inibição do ECP viral, ou seja, a concentração do extrato que promoveu a proteção de 50 % do ECP viral nas células tratadas comparadas ao ECP observado nas células infectadas com DENV-2 ou ZIKV na ausência do extrato em questão (controle de vírus).

Os extratos de plantas e de fungos que mostraram atividade antiviral de pelo menos 2+ e/ou 50 % de proteção nos ensaios de triagem contra DENV-2 e acima de 30 % de proteção contra ZIKV, foram selecionados para a determinação de suas respectivas CE₅₀.

Células BHK-21 infectadas com DENV-2 e células Vero infectadas com ZIKV foram tratadas, simultaneamente à infecção, com as seguintes concentrações dos extratos: 100,0; 50,0; 25,0; 12,5; 6,3; 3,1; 1,6 e 0,8 µg/mL. As substâncias puras testadas tiveram suas concentrações definidas em µM (micromolar). As diluições dos extratos e substâncias foram feitas em meio de cultura suplementado com 2 % de SFB e 1 % de antibióticos, de forma que a concentração final de DMSO por poço atingisse no máximo 0,45 %. Células infectadas e tratadas com IFN-α 2b em oito diferentes concentrações (500 a 3,9 UI/mL) foram usadas como controle positivo do ensaio. Para a revelação da atividade antiviral utilizou-se apenas o método do MTT. Os valores de proteção para cada concentração foram determinados conforme descrito no item 5.10.

Para a determinação da CE_{50} , as porcentagens de proteção de cada dose contra os respectivos vírus foram plotadas no software GraphPad Prism 5 e os dados modelados por regressão não linear a uma curva sigmoide de *Hill* com 4 parâmetros. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas ou triplicatas.

5.13 Determinação da Concentração Citotóxica 50 (CC_{50}) de extratos, frações e substâncias em células BHK-21 e em células Vero

A determinação da toxicidade de extratos, frações e substâncias identificados como antivirais nas células hospedeiras é imprescindível. Numa situação ideal, as células hospedeiras infectadas não devem sofrer nenhum efeito adverso pelo extrato/substância quando forem tratadas numa concentração efetiva contra os vírus. A concentração citotóxica 50 (CC_{50}) de um extrato bruto ou de determinada substância/droga é definida como a concentração na qual se observa 50 % de toxicidade em células tratadas quando comparadas àquelas não tratadas (controle celular).

Os ensaios de CC_{50} foram realizados paralelamente aos ensaios de CE_{50} , obviamente excluindo-se a etapa de infecção viral, nas mesmas concentrações: 100,0; 50,0; 25,0; 12,5; 6,3; 3,1; 1,6 e 0,8 µg/mL. As substâncias puras testadas tiveram suas concentrações definidas em µM.

Os extratos foram diluídos em meio suplementado com 2 % de SFB e 1 % de antibióticos, sendo a concentração final de DMSO de 0,45 %. Controles de células

não tratadas e sem DMSO e células não tratadas e com DMSO a 0,45 % foram adicionados. O tempo de incubação foi o mesmo usado nos ensaios antivirais, sendo 72h para células BHK-21 e 96h para células Vero (item 5.10). O ensaio do MTT foi utilizado para revelação e de posse dos valores de absorbância foram determinados os percentuais de toxicidade no programa Excel pela fórmula, $[(A-B)/A] \times 100$, onde A e B são os valores de DO_{540} verificados nos poços que correspondem às células não tratadas (A) e tratadas (B), respectivamente. De posse das porcentagens da viabilidade celular, os dados foram plotados no GraphPad Prism 5 para determinação da CC_{50} de cada amostra do mesmo modo feito para a determinação da CE_{50} . Todos os experimentos foram realizados em duplicatas ou triplicatas.

5.14 Índice de seletividade (IS) de extratos/frações/substâncias com atividade antiviral

A relação entre os efeitos farmacológicos e tóxicos de uma amostra em estudo é um requisito importante na previsão de sua aplicabilidade como potencial agente terapêutico. O índice de seletividade (IS) expressa a razão entre a concentração do extrato/fração/substância que é tóxica para 50 % da monocamada celular (CC_{50}) e a concentração que protege 50 % da monocamada celular da infecção viral (CE_{50}). O IS é obtido pela fórmula: $IS = CC_{50}/CE_{50}$ e é um índice de valor que expressa a ideia de seletividade. Espera-se que seja o mais alto possível, significando que o extrato, a fração ou a substância ajam especificamente ou de forma seletiva ao vírus sem ser tóxico às células hospedeiras. Para o cálculo do IS de extratos, frações e substâncias deste estudo, foram considerados os valores de CE_{50} e CC_{50} obtidos de análises resultantes de revelação pelo método do MTT.

5.15 Ensaio virucida de extratos, frações e substâncias ativas contra DENV-2 e ZIKV

O ensaio virucida é realizado para determinar se a atividade antiviral de um determinado extrato ou substância foi resultado da inativação direta da partícula viral pelo contato direto com tal extrato/substância. Para o ensaio virucida, preparações

contendo o inóculo viral (q.s.p. 30 PFU/poço em placas de 24 poços) adicionadas de igual volume de extrato/substância em concentrações variadas foram incubadas por 1 hora a 37 °C. Para cada extrato/substância foram usadas três concentrações distintas, a saber: (i) a concentração correspondente à CE₅₀ do extrato, (ii) o dobro do valor da CE₅₀ (CE₅₀*2) e (iii) a metade da CE₅₀ (CE₅₀/2). O percentual de partículas virais inativadas no processo foi avaliado pelo método de formação de placas de lise.

Para tal, as misturas do inóculo viral tratadas com o extrato/substância nas três concentrações foram transferidas para uma placa de 24 poços contendo monocamadas de células BHK-21 (DENV-2) ou células Vero (ZIKV). A placa foi incubada por 1 hora a 37 °C com 5 % de CO₂, sendo levemente agitada a cada 15min para favorecer a adsorção viral. Em seguida, a mistura foi removida e a monocamada celular foi lavada duas vezes com PBS à temperatura ambiente para remoção do extrato/substância e das partículas virais não adsorvidas. Os seguintes controles foram utilizados: (i) controle de células - células não infectadas e não tratadas; (ii) controle de toxicidade - células não infectadas e tratadas com as mesmas concentrações dos extratos/substâncias do teste e (iii) controle de vírus – células infectadas com a suspensão viral adicionada de meio de cultura, incubadas nas mesmas condições das misturas de vírus + extratos. Após, foram adicionados 2,5 mL/poço de meio semissólido (CMC + meio de cultura) [Sigma Aldrich] e as placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5 % de CO₂ por 5 dias. Para revelação das placas de lise, as monocamadas foram fixadas com formaldeído a 10 % e incubadas de um dia para outro à temperatura ambiente. Em seguida, todo o meio semissólido adicionado de formaldeído a 10 % foi lavado das placas e essas foram coradas com cristal violeta (Sigma Aldrich) a 1 % dissolvido em água:etanol na razão 70:30 para avaliação e contagem das placas de lise/poço.

O percentual de redução do número de PFU comparado ao controle de cada extrato/substância foi calculado pela fórmula: $\text{redução de PFU (\%)} = \frac{(C-T) \times 100}{C}$, onde C é a média do número de PFU verificado no controle de vírus e T é a média entre as duplicatas do número de PFU nos poços tratados (ZANDI et al., 2011). O extrato foi considerado virucida quando foi capaz de inativar 90 % ou mais das partículas virais em relação ao controle de vírus, em pelo menos uma das respectivas concentrações testadas.

5.16 Fracionamento biomonitorado de extratos

O fracionamento biomonitorado envolve o uso de diferentes métodos de separação de misturas, usualmente métodos cromatográficos, seguido de ensaios biológicos para identificar a fração ou frações com a ação biológica esperada. O processo é iterativo e após cada fracionamento, as subfrações obtidas são novamente submetidas aos ensaios biológicos.

Para o fracionamento biomonitorado dos extratos ativos selecionados, foram utilizados os seguintes equipamentos: cromatógrafo 2D SepBox 250 (Sepiatec), cromatógrafo Surveyor com UV e ESI-IonTrap (Thermo), cromatógrafo UPLC Shimadzu com DAD e ESI-qTOF MaXis (Bruker).

Nas separações de amostras com massa na faixa 1-50 mg foram utilizadas a coluna HPLC Shimpak ODS 5 μm , 10 x 250 mm, com gradientes da fase orgânica (ACN ou MeOH) em água, em 60min e fluxo de 4,5 mL/min, com split de 10 % para o ELSD, detecção UV 254 nm e ELSD e frações de 4,5 mL (1 min) em placas de 48 poços (com 6 mL de capacidade por poço). Para amostras com massas entre 50 e 500 mg foram empregadas colunas Shimpak ODS 5 μm , 25 x 250 mm com fluxo de 9 mL/min e frações de 30 segundos (4,5 mL).

Para a cromatografia analítica (5-50 μg de amostra) foi empregada coluna Phenomenex Luna RP18, 3 μm , 2,1 x 150 mm, gradientes da fase orgânica (ACN ou MeOH) em água em 20 – 60min, solventes com 0,1 % de ácido fórmico, fluxo de 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ (com split de 80 % para o coletor), detecção no UV (normalmente 254 nm), espectros MS e MSⁿ e frações de 200 μL (60seg) em placas de 96 poços (250 μL). As separações analíticas também foram realizadas em cromatógrafo UPLC (Shimadzu) com DAD e ESI-qTOF MaXis (Bruker) coluna Shimadzu RP18, 1,7 μm , 2,1 x 150 mm e gradientes da fase orgânica (ACN ou MeOH) em água em 20 – 60min. Solventes com 0,1 % de ácido fórmico e fluxo 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. A detecção foi em 200 – 650 nm (DAD), espectros MS e MS² de alta resolução e frações de 200 μL (30seg) em placas de 96 poços (250 μL).

Para a eliminação dos solventes utilizou-se o evaporador rotativo a 45 °C para amostras com volume maior do que 100 mL e centrífuga a vácuo a 45 °C para frascos com até 15 mL e para as placas de 48 e 96 poços.

5.17 Cromatografia analítica em HPLC e UPLC com coleta de frações para bioensaio

Os fracionamentos analíticos em HPLC e UPLC foram feitos com 50 µg de extrato bruto empregando-se um fluxo de 0,4 mL/min para coleta de 80 frações de 200 µL em placa de 96 poços. No HPLC utilizou-se coluna LUNA PFP 150 x 2 mm, partículas de 3 µm e para o UPLC uma coluna Shimpak ODS 150 x 2 mm, partículas de 1,7 µm. Para as frações coletadas considerou-se a sua massa como equivalente à massa injetada, ou seja, se foram injetados 50 µg do extrato, considerou-se que cada fração continha 50 µgEq da amostra. Em seguida, os solventes foram eliminados em centrífuga a vácuo e a placa selada e mantida em refrigerador a - 20 °C até o momento do ensaio. Imediatamente antes do ensaio, as amostras eram dissolvidas em solução aquosa com 4 % de DMSO de forma a se obter uma concentração final para o ensaio biológico de 50 µgEq/mL.

5.18 Cromatografia semipreparativa com coleta de frações para bioensaio

Neste caso, entre 100 e 500 mg da amostra foram injetados na coluna de tal modo que as frações tinham massa suficiente para terem sua massa determinada com precisão e o ensaio realizado em concentrações conhecidas. Caso a fração fosse constituída do componente majoritário (> 95 %) e massa superior a 1 mg, ela também era utilizada para obtenção de dados espectrais para permitir a sua identificação estrutural. O fracionamento foi feito empregando-se coluna RP18 de 20 x 2 cm com partícula de 5 µm, fluxo de 9 mL/min, coletando-se uma fração a cada 30 seg em placa de 48 poços. As frações coletadas foram transferidas para frascos de vidro tarados (20 mL de capacidade) e os solventes removidos em centrífuga a vácuo. Uma alíquota de cada fração (1 - 5 mg) foi dissolvida com DMSO aquoso a 90 % para se obter soluções estoque na concentração de 20 mg/mL. Dessas soluções, 1 µL (20 µg) foi dispensado nos poços das placas a serem enviadas para o ensaio antiviral. Antes dos ensaios, as amostras foram diluídas em solução aquosa com 4 % de DMSO de forma a obter uma concentração final no ensaio biológico de 20 µg/mL.

5.19 Elucidação estrutural de substâncias sugeridas pelas plataformas de análise

Nos experimentos de fracionamento em microescala, ou seja, de 10 a 100 µg de amostra, é possível obter on-line os espectros de UV-Vis e de massa ao mesmo tempo em que se coleta as frações em microplacas para o bioensaio. No UPLC é possível realizar a cromatografia em altíssima pressão (500-1000 bar) com a coleta dos dados de UV-Vis e MS² de alta resolução. Já no equipamento da marca Thermo, a cromatografia é de alta pressão (até 300 bar) e o analisador de massas é de baixa resolução, mas com capacidade de realizar até dez fragmentações sequenciais, ou seja, é possível obter o espectro de massa a partir da fragmentação de um íon (MS²), em seguida a partir de um íon obtido do anterior (MS³) e assim sucessivamente até a fragmentação MS¹⁰.

Os dados brutos obtidos são registrados pelos respectivos softwares dos equipamentos para permitir a análise pelo usuário, especialmente no caso dos dados de massa de alta resolução, bem como a busca de similaridade espectral em bancos de dados criados localmente ou acessados via internet como, por exemplo, no site do KNApSAcK (<http://kanaya.naist.jp/KNApSAcK/>). Com a análise é possível obter pistas sobre a identidade do componente detectado. Alternativamente, os dados brutos são exportados e analisados usando softwares gratuitos disponíveis para acesso on-line como, por exemplo, no gnps.ucsd.edu, ou para instalação local, como o CSI-FingerID disponível no endereço: <https://www.csi-fingerid.uni-jena.de/>.

De posse de informações robustas acerca da possível identidade da substância analisada, a confirmação da identidade só é possível por meio da comparação com amostras autênticas ou pelo isolamento da substância em quantidades suficientes para se obter espectros de ressonância magnética nuclear (RMN), infravermelho, atividade óptica, etc., sendo necessário o isolamento de pelo menos 5 mg da substância com mínimo de 95 % de pureza. Para a realização dos ensaios biológicos confirmatórios a pureza deve ser maior que 99 %.

5.20 Análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A RMN fornece dados sobre as conexões e posições relativas (topologia) dos diferentes átomos que compõem uma determinada molécula, sendo uma ferramenta indispensável para a determinação estrutural de produtos naturais. Os experimentos de RMN foram realizados, em espectrômetro Bruker Avance 400 MHz (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) com o TMS (tetrametilsilano) como um padrão interno, pela equipe técnica da RPT13A - Métodos Analíticos - Ressonância Magnética Nuclear em Farmanguinhos no Rio de Janeiro.

5.21 Preparação dos acetatos de licorina

Os acetatos da licorina foram preparados pelo Dr. Carlos L. Zani usando os procedimentos descritos por Wang e colaboradores (2014), sendo as estruturas confirmadas por comparação dos dados espectrais lá descritos. A licorina (lycorine.HCl salt form), CAS No: 476-28-8 free base, fórmula molecular $C_{16}H_{17}NO_4.HCl$, utilizada para a síntese dos acetatos foi adquirida da BOC Sciences (USA). Assim, para a obtenção da 1,2-diacetil-licorina, 9,5 mL de anidrido acético foram adicionados a uma solução de licorina em piridina (3,17 g em 8,0 mL) e a mistura foi agitada a 50 °C por 12h. Em seguida, foram adicionados 25 mL de metanol e a mistura colocada em agitação por 3h à temperatura ambiente. O solvente foi removido a vácuo seguido da adição de 50 mL de diclorometano e 40 mL de água.

A camada orgânica foi lavada em funil de separação com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio e depois com solução aquosa saturada de NaCl. A fase orgânica foi então seca sobre sulfato de sódio anidro. O solvente orgânico foi removido em rotavapor e o resíduo bruto foi purificado por cromatografia em gel de sílica usando uma mistura de CH_2Cl_2 -EtOAc- CH_3OH , 10:10:1 como eluente, fornecendo 3,78 g do diacetato de licorina (rendimento de 93 %). Aproximadamente 1 g do derivado diacetilado foi dissolvido em 100 mL de metanol seguido da adição de 20 mL de ácido clorídrico concentrado, sendo a mistura agitada por 1h a 55 °C. A mistura reacional foi basificada (pH 8,0) com uma solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio, seguido da adição de 25 mL de diclorometano (CH_2Cl_2). A fase orgânica foi separada em funil de separação e tratada como na reação anterior para fornecer 0,50 g do derivado monoacetilado com rendimento de 59 %.

5.22 Avaliação *in vitro* da atividade antiviral e da citotoxicidade de combinações da licorina com a pretazetina

A atividade antiviral contra DENV-2 e ZIKV e a citotoxicidade em células BHK-21 e Vero de combinações da licorina e pretazetina foram avaliadas *in vitro* pelo método do isobograma modificado (ODDS, 2003). Para isso, soluções com a mesma molaridade de licorina e pretazetina foram preparadas separadamente e em seguida foram combinadas (licorina-pretazetina e pretazetina-licorina) em diferentes proporções de volume, a saber: 1:0, 1:2, 1:3, 1:5 e 1:10. Ensaios de CE_{50} e CC_{50} , como descritos nos itens 5.12 e 5.13, foram feitos para cada combinação. Por análises de regressão não linear no software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.) foram determinadas a CE_{50} e CC_{50} das substâncias não combinadas, bem como de cada substância quando combinada ignorando a substância em combinação para cálculo de cada concentração inibitória fracional (FIC).

As FIC foram determinadas pela razão entre a CE_{50} das substâncias combinadas e a CE_{50} das substâncias não combinadas: $[CE_{50} \text{ quando combinada}] / [CE_{50} \text{ quando não combinada}]$. Em seguida, foi feita a somatória das FIC ($\sum FIC$) de cada combinação de acordo com o exemplo seguinte: para a combinação de licorina:pretazetina (1:3) $\sum FIC = FIC \text{ da licorina} + FIC \text{ da pretazetina}$. Da média da somatória de todas as FIC ($x\sum FIC$) foi calculado o índice das concentrações inibitórias fracionadas (FICI). Esse índice obtido foi utilizado para definir as interações entre as substâncias como: sinérgicas (quando $x\sum FIC \leq 0,5$), indiferentes ($x\sum FIC$ entre 0,5 e $\leq 4,0$) ou antagonistas ($x\sum FIC$ foi $\geq 4,0$), como recomendado por Odds, 2003.

Para ilustrar o efeito antiviral e citotóxico da associação da licorina com a pretazetina, o isobograma foi construído com a plotagem das FIC de cada proporção, sendo no eixo x a FIC da pretazetina (FIC_P) e no eixo y a FIC da licorina (FIC_L). Basicamente, o isobograma é um gráfico bidimensional com as FIC das duas substâncias nas coordenadas. As diferentes linhas, os isoboles, conectam as diferentes combinações que produzem a mesma intensidade de efeito. Todos os pontos são interceptações que definem a linha de aditividade (interação nula) (TALLARIDA, 2001; 2012; FIVELMAN; ADAGU; WARHURST, 2004; SEIFERT, CROFT, 2006). Pelo menos dois ensaios independentes foram realizados com cada combinação de substâncias.

5.23 Predição *in silico* de parâmetros farmacocinéticos e toxicológicos (ADMET) de substâncias isoladas

A predição *in silico* dos parâmetros Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade (ADMET) permite uma avaliação, a priori, do perfil farmacocinético e toxicológico esperado para candidatos a protótipos de fármacos, consistindo em um método alternativo para auxiliar na seleção do protótipo de melhor perfil fármaco-terapêutico.

A predição ADMET e as análises das 5 substâncias identificadas neste trabalho foram feitas pelos Drs. Douglas E. V. Pires e Carlos L. Zani utilizando a plataforma pkCSM (PIRES et al., 2015). A plataforma pkCSM é um recurso abrangente e fácil de usar, baseado na web, que permite a triagem rápida de 30 propriedades diferentes em termos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (<https://omictools.com/pkcsm-tool>).

Esse recurso baseia-se no conceito de assinaturas baseadas em gráficos (PIRES et al., 2011; 2013) para modelar propriedades físico-químicas e geométricas de pequenas moléculas. Elas são usadas como evidência para treinar modelos baseados em aprendizado de máquina para prever e melhorar as propriedades farmacocinéticas de substâncias bioativas (PIRES et al., 2018). Estruturas de compostos de interesse foram fornecidas ao servidor da web pkCSM como sua representação canônica do Sistema de Entrada de Linha de Dados Moleculares Simplificado (SMILES). O SMILES é uma notação química usada para descrever a natureza e a topologia de estruturas moleculares para a plataforma de análise.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Breve histórico da busca por antivirais contra arbovírus pelo nosso grupo de pesquisa

Durante nosso mestrado (2013 a 2015) foi investigada a atividade antiviral *in vitro* de 3.100 extratos de plantas e de fungos contra DENV-2, dentre os quais foram identificados 115 extratos (3,7 %) ativos.

Cinquenta e dois extratos ativos contra DENV-2 foram obtidos de plantas pertencentes a 19 famílias distintas: Amaryllidaceae (3), Annonaceae (1), Asteraceae (2), Begoniaceae (1), Calophyllaceae (1), Combretaceae (1), Erythroxylaceae (1), Fabaceae (4), Lythraceae (2), Malpighiaceae (9), Malvaceae (1), Melastomataceae (2), Myrtaceae (3), Ochnaceae (1), Primulaceae (1), Rubiaceae (8), Sapindaceae (9), Vitaceae (1), Vochysiaceae (1) [tabela A]. Os extratos mais promissores, aqueles que apresentaram IS de 24 a 32, foram obtidos de plantas da família Amaryllidaceae e da família Fabaceae.

Os demais 63 extratos ativos contra DENV-2 foram obtidos de culturas de fungos endofíticos coletados em várias regiões no Brasil, de fungos endofíticos e de solo coletados no continente Antártico e no Deserto do Atacama. Entre os extratos fúngicos, 3 deles foram obtidos dos fungos *Penicillium citrinum* e *Penicillium chrysogenum*, ambos da família Trichocomaceae, e do fungo *Hypoxylon* sp. da família Xylariaceae (tabela B). Alguns desses extratos apresentaram IS de > 8 a > 32.

Diante desses resultados promissores, elaboramos nosso projeto de doutorado que tem como objetivo identificar moléculas responsáveis pela atividade antiviral de extratos ativos contra DENV e também contra ZIKV e CHIKV. Além disso, para maximizar nossas chances de sucesso na identificação de antivirais, foi feita a triagem de centenas de extratos de plantas e de fungos ainda não testados contra DENV, ZIKV e CHIKV.

6.2 Triagem da atividade antiviral de extratos de plantas e de fungos contra DENV-2, ZIKV e CHIKV

6.2.1 Triagem de extratos contra DENV-2

Durante o período de 2015-2019, cerca de 4.000 extratos vegetais e fúngicos foram testados contra DENV-2 (Figura 6). A seleção de extratos ativos contra DENV-2 foi feita utilizando-se o método de cruces para a avaliação do ECP viral ao microscópio óptico (item 5.11) e o método do MTT (item 5.10). Como resultado dessa triagem, foram identificados 190 (4,7 %) extratos ativos contra DENV-2 como mostrado na Figura 6 e nas tabelas C e D, sendo 129 extratos de fungos e 61 de plantas. O percentual de proteção destes 190 extratos contra o DENV-2 foi de pelo menos 40 %.

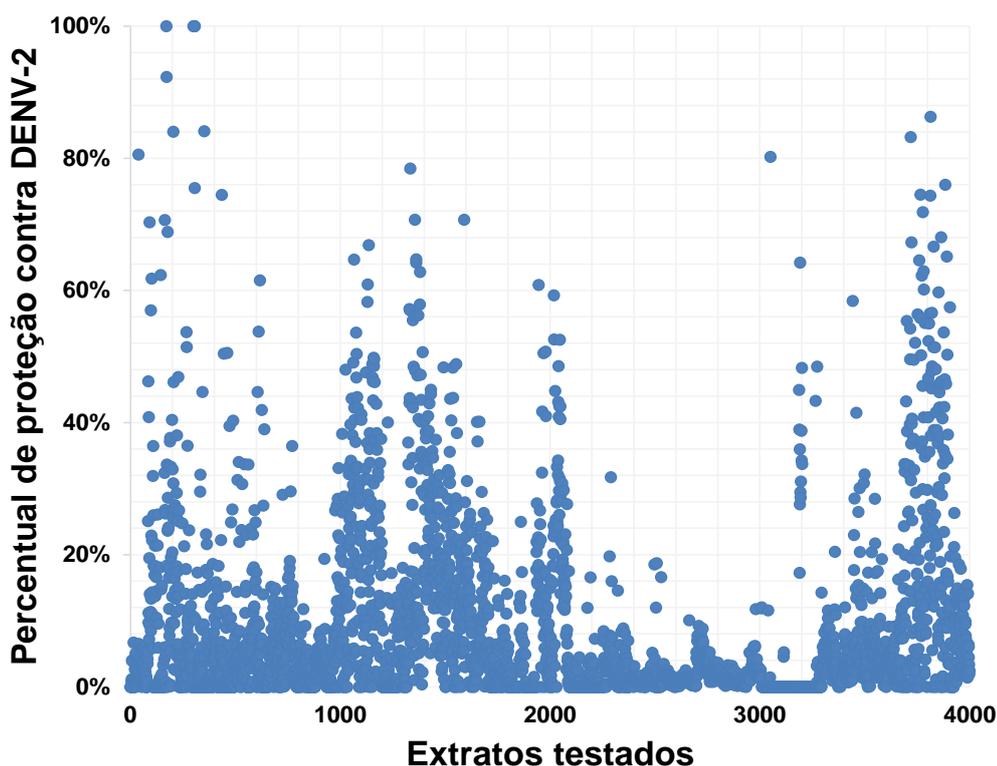


Figura 6 - Triagem da atividade antiviral de 4.000 extratos de plantas e de fungos contra DENV-2 feita no período de 2015 a 2019. O eixo y mostra os percentuais de proteção contra DENV-2 dos 4.000 extratos testados em células BHK-21. A triagem foi feita como descrito no item 5.10.

Dentre as dezenas de famílias e mais de 1.000 espécies de plantas testadas nesse período foram identificados 61 extratos vegetais ativos contra DENV-2. Tais extratos foram obtidos de 42 espécies de plantas e 26 famílias, a saber: Amaranthaceae (*Alternanthera* sp.), Apocynaceae (*Forsteronia* sp., *Peltastes* sp. e *Mandevilla* sp.), Asteraceae (*Chromolaena* sp., *Lessingianthus* sp., *Baccharis oblongifolia* e *Fleischmannia* sp.), Boraginaceae (*Tournefortia* sp.), Campanulaceae (*Siphocampylus* sp. e *Lobelia* sp.), Convolvulaceae (*Evolvulus* sp.), Cyperaceae (*Cyperus pohlii*), Erythroxylaceae (*Erythroxylum* sp.), Euphorbiaceae (*Alchornea sidifolia*), Fabaceae (*Andira* sp. e *Lonchocarpus* sp.), Hypericaceae (*Vismia* sp.), Lauraceae (*Cryptocarya* sp.), Malpighiaceae (*Banisteriopsis* sp.), Melastomataceae (*Leandra* sp.), Moraceae (*Ficus* sp.), Myrtaceae (*Eugenia* sp., *Myrciaria glanduliflora*, *Marlierea laevigata*, *Myrcia* sp.), Onagraceae (*Ludwigia* sp. e *Fuchsia* sp.), Rhamnaceae (*Colubrina* sp.), Rubiaceae (*Amaioua* sp., *Ixora* sp., *Psychotria* sp. e *Galianthe* sp.), Rutaceae (*Zanthoxylum* sp.), Santalaceae (*Phoradendron* sp.), Sapindaceae (*Serjania* sp.), Solanaceae (*Solanum diploconos* e *Solanum* sp.), Symplocaceae (*Symplocos* sp.), Verbenaceae (*Lantana* sp.) e Xyridaceae (*Xyris* sp.) [tabela C].

A maioria dos 129 extratos fúngicos foi produzida a partir de cultura de fungos endofíticos isolados dos seguintes hospedeiros: *Vellozia gigantea* (3), *Baccharis trimera* (8), *Usnea antarctica* (11), *Usnea* sp. (16) e *Piper* sp. (77). Entretanto, apenas alguns desses fungos endofíticos foram identificados até o momento, sendo o fungo *Muscodor* sp. (família Xylariaceae) e *Penicillium citrinum* (Trichocomaceae) isolados de *Vellozia gigantea* e o fungo *Phoma* sp. (Didymellaceae) isolado das plantas hospedeiras *Usnea* sp. e *Baccharis trimera* (tabela D).

Vários extratos fúngicos ativos foram isolados do solo, a saber: *Pseudogymnoascus* sp. da família Pseudeurotiaceae; *Aspergillus chevalieri*, *Talaromyces calidicanus* e *Penicillium* sp., ambos da família Trichocomaceae; *Fusarium nygamai* (Nectriaceae), *Clonostachys rogersoniana* (família Bionectriaceae) e o *Trichoderma caribaeum*, pertencente à família Hypocreaceae (tabela D).

Todos os 190 extratos identificados como ativos na etapa de triagem foram retestados na mesma concentração, e alguns deles tiveram suas respectivas CE₅₀ e CC₅₀ determinadas para cálculo do IS. De forma geral, os extratos fúngicos apresentaram valores de IS altos contra DENV-2. Vários extratos apresentaram proteção contra DENV-2 acima de 80 % (EX15438, EX16655, EX16797, EX16799,

EX16800 e EX17982) e alguns deles (EX15116 e EX15437) mostraram 100 % de proteção, como mostrado na tabela D.

Triagem contra DENV-2 (de 2015-2019)

4.000 extratos de plantas e de fungos testados

Total de 190 (4,7 %) de extratos ativos contra DENV-2

61 extratos vegetais

129 extratos fúngicos

6.2.2 Triagem da atividade antiviral de extratos de plantas e de fungos contra ZIKV

A triagem da atividade antiviral de extratos de plantas e de fungos contra ZIKV foi feita como descrito no item 5.10, na concentração de 20 µg/mL, incluindo: (i) os 115 extratos identificados como ativos contra DENV-2 em 2013-2015; (ii) os 190 extratos identificados como ativos contra DENV-2 em triagens feitas de 2015 a 2019; (iii) os 200 extratos obtidos de plantas recoletadas e de fungos recultivados, cujos extratos originais foram ativos contra DENV-2; e (iv) 602 extratos nunca testados contra DENV-2, totalizando 1.107 extratos. Na figura 7 estão os resultados das triagens de extratos, em gráficos de dispersão, mostrando os percentuais de proteção apresentados pelos extratos contra ZIKV e os percentuais de citotoxicidade dos extratos em células Vero.

Observa-se que 127 extratos apresentaram citotoxicidade acima de 40 % na concentração de 20 µg/mL, e alguns desses extratos foram 100 % tóxicos nesta concentração. Para avaliar a atividade antiviral de tais extratos, aqueles com citotoxicidade elevada foram testados em concentrações menores (10,0; 5,0; 2,5 e 1,3 µg/mL).

No ensaio de triagem contra o ZIKV, dentre os 1.107 extratos testados, 48 extratos apresentaram 40 % de proteção, em pelo menos uma das replicatas, em concentração não citotóxica e foram selecionados para determinação de CE₅₀. Desses, 28 são extratos vegetais (tabela E) e 20 são extratos fúngicos (tabela F).

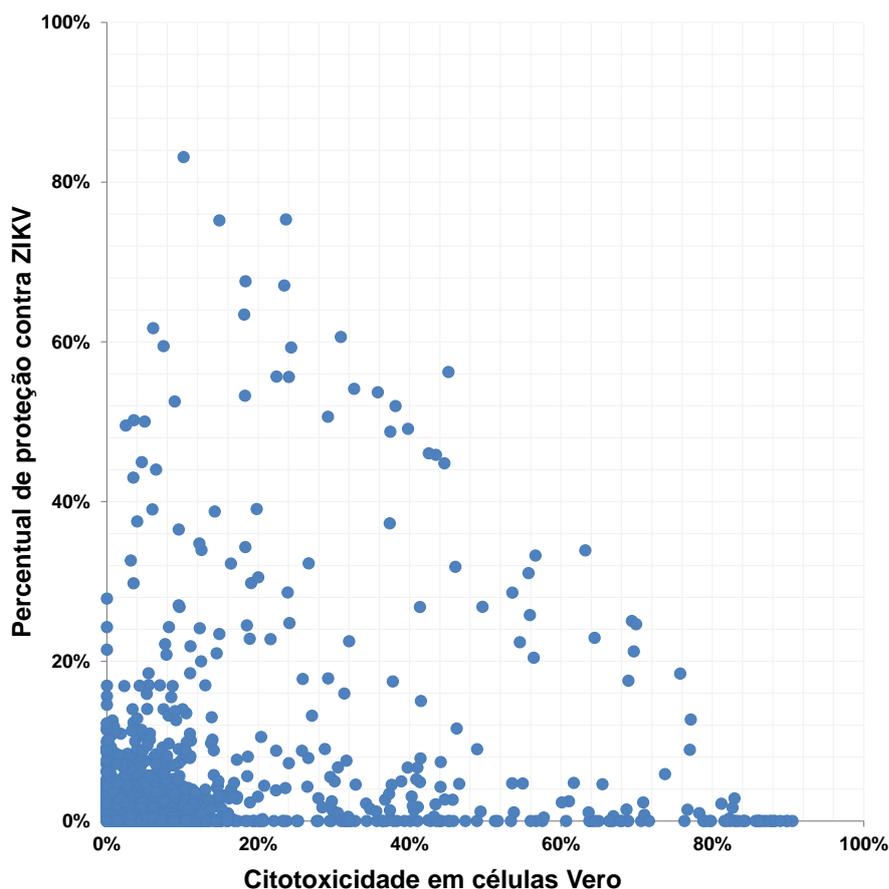


Figura 7 - Triagem da atividade citotóxica em células Vero e antiviral contra ZIKV de 1.107 extratos de plantas e de fungos. O eixo y mostra o percentual de proteção dos extratos em células Vero infectadas com ZIKV, com a m.o.i. = 2, e tratadas com 20 µg/mL de cada extrato. O eixo x mostra o percentual de toxicidade dos mesmos extratos em células Vero tratadas com 20 µg/mL de extrato na ausência do vírus. Os ensaios de triagem de atividade antiviral e de toxicidade dos extratos foram feitos como descrito no item 5.10.

Os 28 extratos vegetais ativos contra ZIKV foram obtidos de 23 espécies de plantas de 14 famílias distintas, a saber: Amaryllidaceae (*Hippeastrum glaucescens* e *H. puniceum*), Asteraceae (*Chrysolaena* sp.), Begoniaceae (*Begonia* sp.), Calophyllaceae (*Kielmeyera* sp.), Erythroxylaceae (*Erythroxylum* sp.), Fabaceae (*Chamaecrista* sp.), Lythraceae (*Diplusodon* sp.), Malpighiaceae (*Banisteriopsis* sp., *Banisteriopsis laevifolia*, *Banisteriopsis membranifolia* e *Byrsonima intermedia*),

Myrsinaceae (*Ardisia* sp.), Myrtaceae (*Eugenia* sp.), Ochnaceae (*Ouratea* sp.), Orchidaceae (*Habenaria petalodes* Lindl.), Rubiaceae (*Galianthe* sp., *Amaioua* sp., *Ixora* sp. e *Palicourea* sp.), Sapindaceae (*Cupania* sp., *Urvillea* sp. e *Matayba juglandifolia*) [tabela E].

Os extratos fúngicos ativos contra ZIKV, de forma geral, foram menos tóxicos que os extratos de plantas, uma vez que a atividade antiviral de todos aqueles considerados ativos foi detectada na concentração de 20 µg/mL. Entre os ativos contra ZIKV, estão os extratos do fungo *Penicillium chrysogenum*, da família Aspergillaceae, isolado de uma alga, e do fungo *Pseudogymnoascus* sp., pertencente à família Pseudeurotiaceae, isolado de um molusco. Dez extratos fúngicos foram obtidos de fungos isolados dos hospedeiros *Bowdichia nitida*, *Usnea antarctica* e *Piper* sp. e ainda estão em processo de identificação. Outros 6 extratos foram obtidos de fungos ainda não identificados isolados de solo da Antártica (tabela F).

Triagem contra ZIKV

1.107 extratos de plantas e fungos testados

(incluindo 305 extratos ativos contra DENV-2)

48 (4,3 %) extratos ativos

28 extratos vegetais

20 extratos fúngicos

6.2.3 Triagem da atividade antiviral de extratos contra CHIKV

A triagem da atividade antiviral de extratos de plantas e de fungos contra CHIKV foi feita como descrito no item 5.10. Semelhante à triagem feita contra ZIKV, todos os extratos ativos contra DENV-2 foram testados contra CHIKV na concentração de 20 µg/mL. Na figura 8 estão os resultados da triagem da atividade antiviral de 565 extratos contra o CHIKV mostrando os percentuais de proteção dos extratos e os percentuais de toxicidade dos extratos em células Vero.

Setenta e cinco extratos apresentaram acima de 40 % de toxicidade às células Vero na concentração de 20 µg/mL, sendo alguns com toxicidade de acima de 80 %. Para avaliar se esses extratos poderiam apresentar atividade antiviral em concentrações menores, todos aqueles considerados muito tóxicos foram testados nas concentrações de 10,0; 5,0; 2,5 e 1,3 µg/mL.

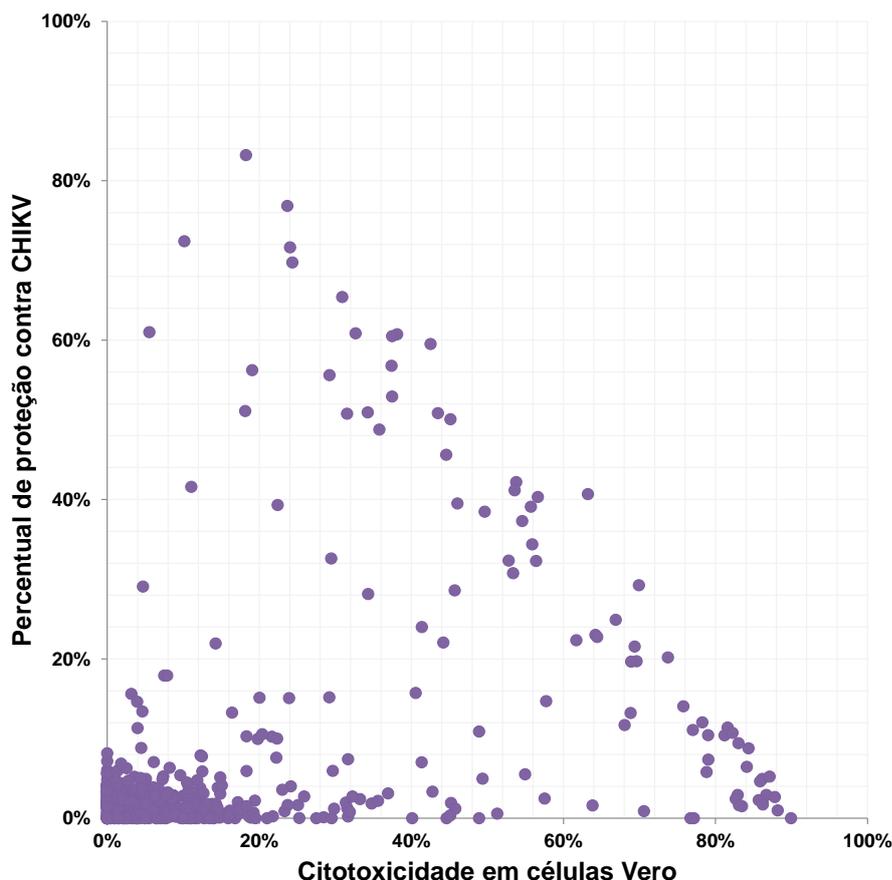


Figura 8 - Triagem da atividade citotóxica e antiviral contra CHIKV de 565 extratos de plantas e de fungos. O eixo y mostra o percentual de proteção dos extratos em células Vero infectadas com CHIKV, com a m.o.i = 0,2, e tratadas com 20 µg/mL de cada extrato. O eixo x mostra o percentual de toxicidade dos mesmos extratos em células Vero tratadas com 20 µg/mL de extrato na ausência do vírus. Os ensaios de triagem de atividade antiviral e de toxicidade dos extratos foram feitos como descrito no item 5.10.

Portanto, dentre os 565 extratos testados contra CHIKV, 33 extratos apresentaram média de 40 % de proteção e foram selecionados para determinação de CE₅₀. Desses, 20 extratos foram obtidos de plantas (tabela G) e 13 de fungos (tabela H).

Os 20 extratos vegetais ativos contra CHIKV foram obtidos de 16 espécies e 11 famílias de plantas, sendo: Amaryllidaceae (*H. glaucescens* e *H. puniceum*), Begoniaceae (*Begonia* sp.), Calophyllaceae (*Kielmeyera* sp.), Fabaceae (*Chamaecrista* sp.), Lauraceae (*Criptocarya* sp.), Lythraceae (*Diplusodon* sp.), Malpighiaceae (*Banisteriopsis* sp. e *Byrsonima intermedia*), Malvaceae (*Melochia* sp.), Melastomataceae (*Trembleya parviflora* e *Fuchsia* sp.), Rubiaceae (*Galianthe* sp.) e Sapindaceae (*Cupania* sp., *Serjania* sp. e *Urvillea* sp.).

Dos 13 extratos fúngicos ativos contra CHIKV, 4 foram obtidos do fungo *Penicillium chrysogenum*, família Aspergillaceae, isolados de algas do continente Antártica, e outro extrato obtido do *Muscodor* sp., família Xylariaceae, isolado da planta *Vellozia gigantea*. Os demais, ainda em processo de identificação, compreendem 2 extratos de fungos isolados do hospedeiro *Usnea antarctica* e 6 de fungos isolados do solo da Antártica (tabela H).

Triagem contra CHIKV

565 extratos de plantas e fungos testados

(incluindo 305 extratos ativos contra DENV-2)

33 (5,8 %) extratos ativos:

20 extratos vegetais

13 extratos fúngicos

6.2.4 Extratos ativos contra DENV-2, ZIKV e/ou CHIKV

Como mencionado anteriormente, os 305 extratos ativos contra DENV-2, sendo 113 extratos vegetais e 192 extratos fúngicos, foram testados também contra o ZIKV e o CHIKV.

Os extratos vegetais ativos contra DENV-2 pertencem a 39 famílias de plantas (itens 6.1 e 6.2.1), ilustradas na figura 9. Desses, 8 famílias de plantas originaram extratos ativos contra os 3 vírus estudados neste trabalho, sendo: Amaryllidaceae,

Begoniaceae, Calophyllaceae, Fabaceae, Lythraceae, Malpighiaceae, Rubiaceae e Sapindaceae.

Se nosso critério de escolha for a atividade antiviral contra DENV-2 e ZIKV, excluindo-se o CHIKV, somam-se às famílias citadas: Asteraceae, Erythroxylaceae, Myrsinaceae, Myrtaceae, Ochnaceae e Orchidaceae, ou seja, os extratos provenientes dessas famílias foram inativos contra o CHIKV.

Os extratos ativos contra DENV-2 e CHIKV, e inativos contra ZIKV, pertencem às famílias Lauraceae, Malvaceae, Melastomataceae e Onagraceae (Figura 9).

Dentre os 192 extratos fúngicos ativos contra DENV-2, 11 extratos também foram ativos contra ZIKV e CHIKV, a saber: 3 extratos de fungos *P. chrysogenum*, 2 extratos de fungos endofíticos (EX15077 e EX15032) e 6 extratos de fungos do solo do continente Antártica.

Oito extratos de fungos endofíticos não identificados e o extrato do fungo *Pseudogymnoascus* sp. foram ativos apenas contra DENV-2 e ZIKV e inativos contra o CHIKV (Figura 10).

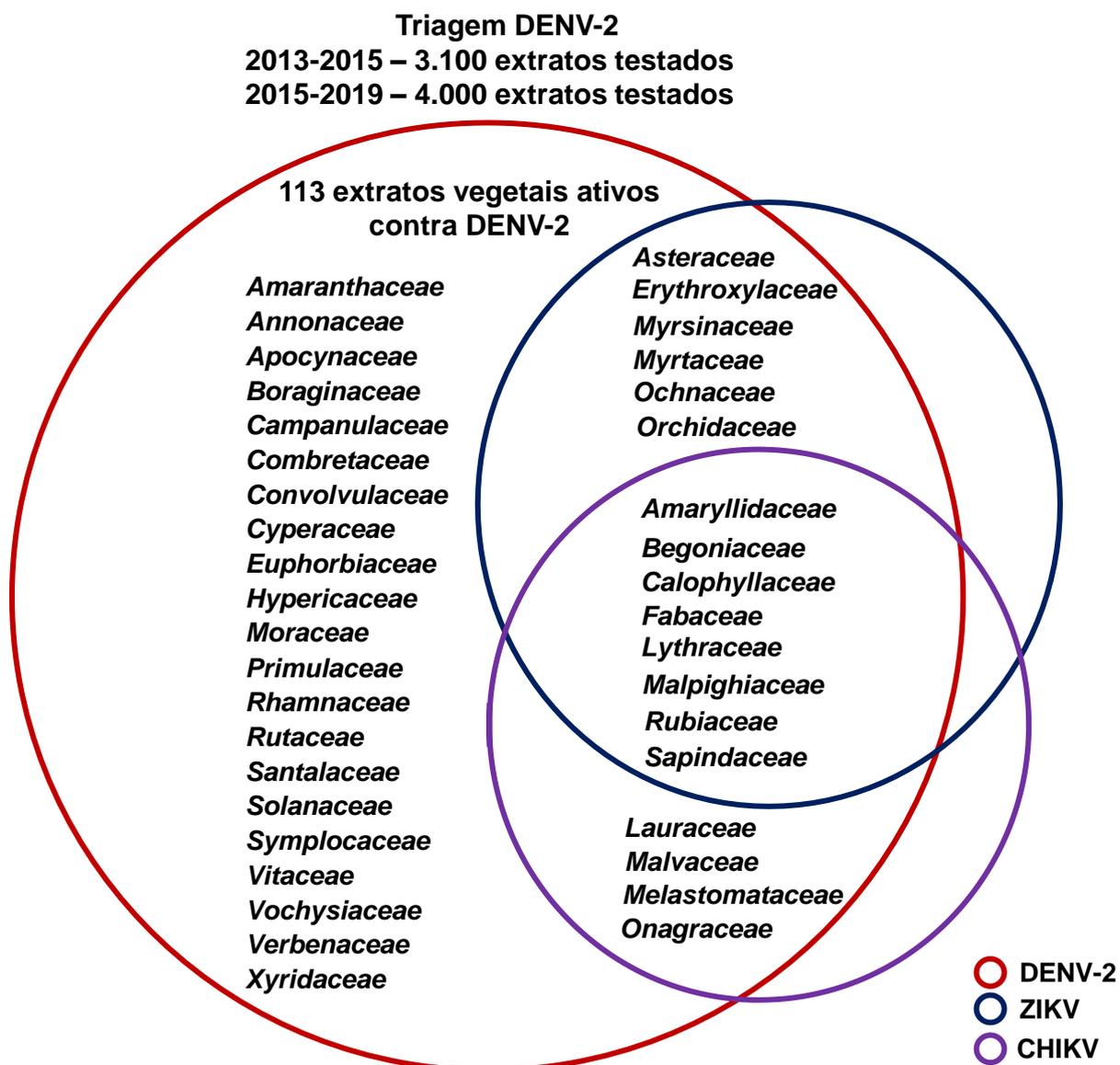


Figura 9 – Famílias de plantas que geraram extratos com atividade antiviral contra DENV-2, ZIKV e CHIKV. Dentro do círculo vermelho estão as famílias de plantas dos 113 extratos vegetais ativos contra DENV-2; dentro do círculo azul estão as famílias dos 28 extratos ativos contra ZIKV e dentro do círculo roxo, estão as famílias de plantas dos 20 extratos ativos contra o CHIKV. Na interseção dos 3 círculos estão as 8 famílias de plantas que geraram extratos ativos contra os 3 vírus.

Triagem DENV-2
2013-2015 – 3.100 extratos testados
2015-2019 – 4.000 extratos testados

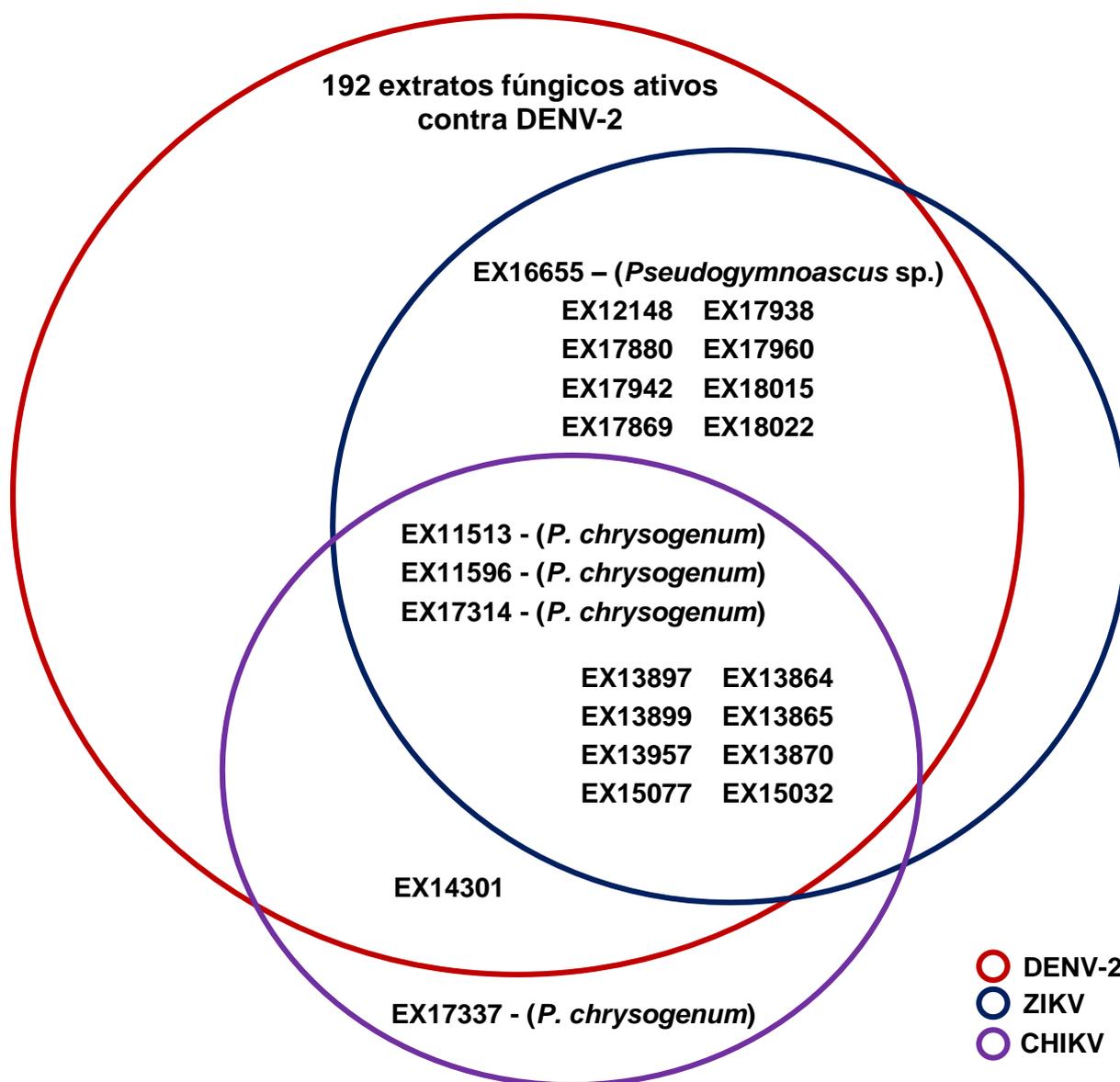


Figura 10 – Extratos fúngicos com atividade antiviral contra DENV-2 e também ativos contra ZIKV e CHIKV. Dos 192 extratos fúngicos ativos contra o DENV-2, representados pelo círculo vermelho, foram listados acima 20 extratos que também foram ativos contra o ZIKV (círculo azul) e 12 extratos ativos contra o CHIKV (círculo roxo). Na interseção dos 3 círculos estão os 11 extratos que foram ativos para os 3 vírus. Um extrato inativo contra o DENV-2 (fora do círculo vermelho) é mostrado como ativo contra o CHIKV (dentro do círculo roxo).

Triagem de extratos de plantas e fungos contra DENV-2, ZIKV e CHIKV

Atividade antiviral dos extratos de plantas

Extratos ativos contra DENV-2: derivados de 39 famílias de plantas

Extratos ativos contra ZIKV e DENV-2: 14 famílias de plantas

Extratos ativos contra CHIKV e DENV-2: 4 famílias de plantas

Extratos ativos contra os 3 vírus: 8 famílias de plantas

Atividade antiviral dos extratos de fungos

192 extratos fúngicos ativos contra DENV-2

20 foram ativos contra ZIKV e DENV-2

11 extratos foram ativos contra DENV-2, ZIKV e CHIKV

A investigação de substâncias ativas em extratos brutos frequentemente pode levar à identificação de substâncias já conhecidas ou que já tiveram sua atividade antiviral demonstrada. Neste projeto, os extratos foram testados de forma aleatória, ou seja, sem conhecimento prévio das informações sobre a família, gênero, espécie, local da coleta das plantas ou fungos que geraram tais extratos. Portanto, consideramos que a triagem aleatória de mais 4 mil extratos de brutos contra DENV-2 foi uma estratégia satisfatória para maximizar as chances de sucesso na identificação de substâncias antivirais inéditas ou nunca descritas contra os vírus abordados neste estudo.

Inicialmente dispúnhamos de 115 extratos ativos contra DENV-2 sendo o nosso objetivo principal a identificação das substâncias responsáveis pela atividade antiviral de pelo menos 10 destes extratos. Todavia, no decorrer do projeto houve a necessidade de se investigar a atividade antiviral desses extratos contra o ZIKV, outro flavivírus; e contra o CHIKV, um alphavirus da família *Togaviridae*. É provável que algumas drogas ativas contra o DENV possam ser usadas para o tratamento de pacientes infectados pelo ZIKV ou até mesmo pelo CHIKV. Considerando-se que a biologia desses vírus é distinta, hipoteticamente, substâncias ativas contra vírus de famílias diferentes teriam como alvo moléculas dirigidas à montagem do capsídeo ou

às próprias proteínas do capsídeo que são altamente conservadas em uma família viral. Tais substâncias induziriam pouco ou nenhuma seleção de resistência (LINGAPPA; HURT; GARVEY, 2013).

Um dos problemas/desafios enfrentados na execução deste projeto foi a quantidade de massa de extrato suficiente para os ensaios necessários. Como vários dos extratos ativos não estavam disponíveis na extratoteca na quantidade necessária, foram necessários o recultivo dos seus respectivos fungos e a coleta das respectivas plantas. Vale ressaltar que a extratoteca da plataforma de bioprospecção do IRR é constituída de pequenas quantidades de cada extrato (20-100 mg), portanto, a coleta das plantas ou recultivo dos fungos se faz necessária quando algum desses extratos é considerado/selecionado para experimentos que demandam maior quantidade de massa. No caso das plantas a serem coletadas para a obtenção de novos espécimes, a dificuldade é aumentada já que é importante considerar a estação do ano e a região da coleta que gerou o extrato original.

O recultivo de fungos e a coleta de plantas são etapas que demandam muito tempo e os novos extratos gerados passam novamente por retestes nos ensaios antivirais. Via de regra, os novos extratos não apresentaram atividade antiviral identificada no extrato original. Isso pode ser devido ao fato de que novas coletas de plantas e o recultivo *in vitro* do fungo nem sempre fornecem extratos com a mesma composição ou perfil bioquímico do extrato original.

Nossos ensaios de triagem, mesmo sendo realizados de forma manual e em escala muito menor do que as triagens de alto rendimento (*High Throughput Screening*) passaram por etapas de padronização e validação. Tais etapas são de grande relevância para a comprovar a robustez e o desempenho dos ensaios. Portanto, as etapas de padronização e validação dos ensaios antivirais de triagem contra DENV-2, em células BHK-21, e contra ZIKV em células Vero, foram feitos conforme o manual de validação de ensaios de HTS publicado pelo *National Institutes of Health* (NIH) (IVERSEN et al., 2012) utilizando o IFN- α 2b como controle positivo de atividade antiviral contra ambos os vírus. A estratégia adotada para a triagem de extratos contra ZIKV e contra CHIKV foi distinta da utilizada para triagem contra DENV-2. Para otimizar o processo de triagem contra ZIKV e CHIKV, incluímos controles de citotoxicidade de cada extrato para identificar extratos falso negativos e falso positivos. Após, a atividade antiviral dos extratos tóxicos foi testada em menores concentrações.

Portanto, os extratos ativos contra DENV-2 identificados no período de 2013-2015 somados àqueles ativos contra DENV-2 identificados na triagem no período de 2015-2019 e demais obtidos de fungos recultivados, recoletas de plantas, assim como extratos aleatórios da extratoteca foram testados contra ZIKV e CHIKV. Como pode ser observado, dentre os extratos ativos contra DENV-2, houve em sua maioria, aqueles extratos ativos contra ZIKV e inativos contra CHIKV, extratos ativos contra CHIKV e inativos contra ZIKV e extratos ativos contra os 3 vírus testados. Além disso, a triagem de outros extratos contra ZIKV e CHIKV abriu a possibilidade de identificar extratos inativos contra DENV-2, mas ativos contra ZIKV ou CHIKV.

Nos resultados de triagem de extratos contra DENV-2 a maioria dos extratos positivos foram provenientes de fungos. Embora os dados de triagem sejam preliminares, já que nem todos foram investigados quanto à respectiva atividade antiviral, ainda assim são dados promissores. Os fungos, por apresentarem uma vasta biodiversidade, também é um grupo significativamente favorável para o descobrimento de novas moléculas antivirais.

Após a triagem inicial e a confirmação da atividade numa segunda passagem, faz-se necessário a determinação da CE_{50} , CC_{50} e IS dos extratos ativos.

6.3 CC_{50} , CE_{50} , IS e atividade virucida de extratos vegetais

Notas: (i) Neste trabalho, a determinação da CC_{50} , CE_{50} , IS e a verificação da atividade virucida de extratos vegetais foram feitas apenas contra DENV-2 e ZIKV;

(ii) O termo “muito ativo” é usado somente para extratos com $CE_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$;

(iii) A descrição detalhada das propriedades dos extratos selecionados para o fracionamento biomonitorado está no item 6.5.

Para a determinação da CE_{50} contra DENV-2 e ZIKV, a infecção viral foi feita simultaneamente ao tratamento com os extratos vegetais nas concentrações de 100 a 0,8 $\mu\text{g/mL}$ (item 5.12). Paralelamente, células não infectadas também foram tratadas com as mesmas concentrações dos extratos para determinação das respectivas CC_{50} (item 5.13), e para o cálculo do IS dos extratos selecionados (item 5.14). A execução paralela dos ensaios de CE_{50} e CC_{50} contribuiu para a redução da influência de variáveis relativas à manipulação dos extratos e células, como por exemplo, solubilização, congelamento e descongelamento dos extratos, cultivo e passagem das células.

Como mostrado na tabela 1, 45 extratos testados contra DENV-2 demonstraram IS com valores de 0,8 a 125, e os 34 extratos testados contra ZIKV tiveram IS > 1,0 a 5,2. Destaca-se que os 4 extratos de plantas das famílias Asteraceae, Sapindaceae e Vitaceae que apresentaram altos IS contra o DENV-2 (de 49,5 a 125) foram inativos ou apresentaram valores baixíssimos de IS contra o ZIKV. Os demais extratos apresentaram baixa seletividade, pois a concentração efetiva determinada foi muito próxima da concentração citotóxica às células hospedeiras. Os extratos vegetais foram ativos em menores concentrações contra DENV-2 do que contra ZIKV. Em contrapartida, a maioria deles foram de 2 a 5 vezes mais tóxicos para as células BHK-21 do que para as células Vero.

Visto que o IS reflete a seletividade da atividade do extrato sobre o vírus comparada com a atividade sobre a célula hospedeira, quanto maior o IS, maior a atividade do extrato ou substância contra o vírus e menor a sua citotoxicidade sobre a célula hospedeira. Obviamente, relatos de atividade antiviral de extratos ou substâncias, mesmo em concentrações muito baixas, mas sem dados de IS, são de valor limitado.

Sabe-se que um extrato bruto pode conter vários princípios ativos que, por sua vez, podem interagir entre si de forma aditiva, sinérgica ou antagônica. Por isso, sua análise deve ser diferenciada e cautelosa até que sejam isoladas/ identificadas as substâncias ativas e que suas respectivas CE_{50} e CC_{50} sejam determinadas (DE LEAN; MUNSON; RODBARD, 1978; MINHO; GASPAR; DOMINGUES, 2016).

Como primeiro passo de investigação do mecanismo antiviral de alguns extratos, vários deles foram submetidos ao ensaio virucida, como descrito no item 5.15. Os resultados desses ensaios permitiram-nos verificar se a atividade antiviral já detectada foi decorrente ou não da inativação/destruição da partícula viral, ou seja, pela ação virucida. Neste trabalho, aqueles extratos que reduziram o número de PFUs em 90 %, em pelo menos uma das concentrações testadas, foram considerados virucidas.

De forma geral, os agentes antivirais interferem com um ou mais processos dinâmicos durante a penetração e biossíntese dos vírus e são, conseqüentemente, candidatos ao uso clínico, enquanto que substâncias virucidas inativam a infectividade do vírus extracelularmente e são candidatas a biocidas que exibem um amplo espectro de atividades germicidas.

Tabela 1 - Extratos de plantas: Determinação da CC₅₀, CE₅₀, IS e atividade virucida contra DENV-2 e ZIKV

Família	Espécie	Parte	EX	DENV-2				ZIKV			
				CE ₅₀	CC ₅₀ BHK-21	IS	VIR	CE ₅₀	CC ₅₀ Vero	IS	VIR
Amaryllidaceae	<i>H. glaucescens</i>	Flor	13356	27,9	> 100	> 3,6	Não	61,6	> 100	> 1,6	Não
Amaryllidaceae	<i>H. glaucescens</i>	Bulbo	13358	3,9	8,6	2,2	Não	11,0	53,0	4,8	Não
Amaryllidaceae	<i>H. glaucescens</i>	Bulbo	17006	6,2	8,4	1,4	Não	10,6	44,1	4,2	Não
Amaryllidaceae	<i>Hippeastrum</i> sp.	Raiz	13418	27,5	76,2	2,8	Não	61,1	> 100	> 1,6	Não
Amaryllidaceae	<i>Hippeastrum</i> sp.	Folha	13357	93,7	> 100	1,1	Não	> 100	> 100	> 1	Não
Amaryllidaceae	<i>H. puniceum</i>	Flor	17007	3,1	8,7	2,8	Não	6,8	18,2	2,7	Não
Amaryllidaceae	<i>H. puniceum</i>	Raiz	17010	3,1	5,9	1,9	Não	5,5	16,5	3,0	Não
Amaryllidaceae	<i>H. puniceum</i>	Bulbo	17011	0,8	1,3	1,7	Não	1,1	4,2	3,8	Não
Amaryllidaceae	<i>H. puniceum</i>	Caule	17008	Inativo	> 100	-	Sim	Inativo	> 100	-	Sim
Amaryllidaceae	<i>H. puniceum</i>	Folha	17009	Inativo	> 100	-	Sim	Inativo	> 100	-	Sim
Annonaceae	<i>Duguetia furfuraceae</i>	Fruto	12829	9,8	> 100	> 10,2	Sim	34,7	> 100	> 2,9	Sim
Asteraceae	<i>Chrysolea</i> sp.	Caule	13211	8,9	16,4	1,8	Sim	35,1	> 100	> 2,8	Sim
Asteraceae	<i>Pterocaulon</i> sp.	Raiz	11087	0,8	46,8	58,5	NT	Inativo	> 100	-	NT
Asteraceae	<i>Miconia</i> sp.	Fruto	13194	20,6	25,5	1,2	NT	Inativo	> 100	-	NT
Asteraceae	<i>Baccharis trimera</i>	Folha	12802	40,2	32,5	0,8	NT	Inativo	95,8	-	NT
Combretaceae	<i>Terminalia</i> sp.	Caule	10312	7,3	26,3	3,6	Sim	> 100	> 100	> 1,0	NT
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum</i> sp.	Caule	13023	9,1	41,1	4,5	Sim	29,3	> 100	> 3,4	Sim
Fabaceae	<i>Chamaecrista</i> sp.	Caule	11280	7,8	> 100	20,5	Não	> 100	> 100	> 1,0	Não
Fabaceae	<i>Chamaecrista</i> sp.	Fruto	11279	2,9	35,4	11,9	Sim	53,7	> 100	> 1,9	Sim
Fabaceae	<i>Inga</i> sp.	Flor	10437	49,9	62,7	1,3	NT	Inativo	> 100	-	NT
Fabaceae	<i>Piptadenia</i> sp.	Folha	10333	0,9	23,1	25,6	Sim	7,4	38,5	5,2	NT
Lythraceae	<i>Diplusodon</i> sp.	Flor	11320	7,1	19,1	2,7	NT	> 100	> 100	> 1,0	NT

EX: número do extrato; CE₅₀: concentração efetiva 50; CC₅₀: concentração citotóxica 50; IS: índice de seletividade do extrato; VIR: atividade virucida do extrato; NT: não testado; (-) não se aplica.

Tabela 1 - Extratos de plantas: Determinação da CC₅₀, CE₅₀, IS e atividade virucida contra DENV-2 e ZIKV (continuação)

Família	Espécie	Parte	EX	DENV-2				ZIKV			
				CE ₅₀	CC ₅₀ BHK-21	IS	VIR	CE ₅₀	CC ₅₀ Vero	IS	VIR
Malpighiaceae	<i>Banisteriopsis laevifolia</i>	Caule	11298	12,5	36,3	2,9	Sim	48,9	> 100	> 2,0	Sim
Malpighiaceae	<i>Banisteriopsis</i> sp.	Caule	11117	34,8	80,5	2,3	Sim	63,2	> 100	> 1,6	Sim
Malpighiaceae	<i>Byrsonima intermedia</i>	Flor	13203	9,4	26,7	2,8	Sim	43,4	> 100	> 2,3	Sim
Malpighiaceae	<i>Banisteriopsis membranifolia</i>	Folha	11323	23,9	43,7	1,8	NT	Inativo	> 100	-	NT
Malpighiaceae	<i>Banisteriopsis membranifolia</i>	Caule	11311	23,9	64,3	2,7	Sim	63,6	> 100	> 1,6	NT
Malpighiaceae	<i>Banisteriopsis</i> sp.	Flor/fruto	11115	41,0	34,8	0,8	NT	> 25	> 100	> 4,0	NT
Malpighiaceae	<i>Banisteriopsis</i> sp.	Caule	11324	49,0	45,1	0,9	NT	> 100	> 100	> 1,0	NT
Myrtaceae	<i>Eugenia klotzschiana</i>	Caule	13015	5,1	33,0	6,5	NT	Inativo	62,7	-	NT
Myrtaceae	<i>Eugenia</i> sp.	Caule	11159	12,0	29,3	2,4	NT	Inativo	30,2	-	NT
Primulaceae	<i>Ardisia</i> sp.	Caule	12875	11,8	31,1	2,6	Sim	43,9	> 100	> 2,3	Sim
Rubiaceae	<i>Palicourea</i> sp.	Flor	12860	16,5	> 100	> 6,0	Sim	62,4	> 100	> 1,6	Sim
Rubiaceae	<i>Galianthe</i> sp.	Caule	11137	35,6	41,6	1,2	Sim	99,8	> 100	> 0,9	Sim
Sapindaceae	<i>Urvillea</i> sp.	Caule	11123	23,8	31,5	1,3	Sim	43,1	> 100	> 2,3	Sim
Sapindaceae	<i>Cupania</i> sp.	Folha	11107	19,5	38,7	2,0	Sim	52,7	> 100	> 1,9	Sim
Sapindaceae	<i>Cupania</i> sp.	Caule	11108	17,8	47,9	2,7	Sim	21,6	> 100	4,6	Sim
Sapindaceae	<i>Cupania</i> sp.	Flor	11106	> 0,8	49,5	61,8	NT	> 100	> 100	> 1	NT
Sapindaceae	<i>Serjania</i> sp.	Caule	11046	0,9	44,6	49,5	NT	> 100	> 100	> 1	NT
Sapindaceae	<i>Matayba juglandifolia</i>	Caule	13039	9,8	27,6	2,8	NT	26,2	> 100	> 3,8	NT
Sapindaceae	<i>Serjania</i> sp.	Folha	12956	11,1	20,6	1,9	NT	Inativo	19,4	-	NT
Ochnaceae	<i>Ouratea</i> sp.	Flor	12969	5,2	51,7	9,9	Sim	26,1	> 100	> 3,8	Sim
Vitaceae	<i>Cissus</i> sp.	Fruto	11067	0,8	> 100	125	NT	Inativo	> 100	-	NT
Vochysiaceae	<i>Qualea</i> sp.	Folha	10463	57,6	98,6	1,7	NT	91,1	> 100	1,1	NT
Orchidaceae	<i>Habenaria petalodes</i>	Caule	748	1,0	1,3	1,3	Não	0,8	1,4	1,7	NT

EX: número do extrato; CE₅₀: concentração efetiva 50; CC₅₀: concentração citotóxica 50; IS: índice de seletividade do extrato; VIR: atividade virucida do extrato; NT: não testado; (-) não se aplica.

Os extratos obtidos de espécies das famílias Annonaceae, Asteraceae, Combretaceae, Erythroxylaceae, Malpighiaceae, Primulaceae, Rubiaceae, Sapindaceae e Ochnaceae foram virucidas tanto contra DENV-2 quanto contra ZIKV. Portanto, dos 29 extratos de plantas ativos contra DENV-2, 19 foram virucidas enquanto 16 foram virucidas contra ZIKV.

Vinte e dois extratos obtidos de plantas das famílias Amaryllidaceae, Annonaceae, Asteraceae, Combretaceae, Erythroxylaceae, Fabaceae, Lythraceae, Myrtaceae, Sapindaceae, Ochnaceae e Vitaceae foram ativos contra DENV-2 em concentrações entre 10 e 0,8 µg/mL. Esses extratos também foram ativos contra o ZIKV, embora alguns tenham apresentado valores de CE_{50} menores em relação ao DENV.

Família Amaryllidaceae - Vários extratos obtidos de diferentes partes das espécies *Hippeastrum* sp., *H. puniceum* e *H. glaucescens* foram ativos em baixas concentrações contra o DENV-2 e contra o ZIKV. Os extratos de bulbo, flor e raiz do *H. puniceum* e *H. glaucescens* não foram virucidas e foram selecionados para o fracionamento biomonitorado (6.5.2.3 e 6.5.2.4).

No entanto, o extrato de caule EX17008, de folha EX18118 e folha verde com EX17009, todos do *H. puniceum* mostraram 100 % de atividade virucida mas foram inativos em ensaios de CE_{50} mesmo nas mais altas concentrações testadas. É interessante notar que tais extratos apresentaram toxicidade muito baixa quando comparados aos extratos muito ativos, sendo a $CC_{50} > 100$ µg/mL tanto em células BHK-21 quanto em células Vero.

Os extratos EX13418 e EX13357 obtidos respectivamente da raiz e folha-flor do *Hippeastrum* sp. foram menos ativos, mas não foram virucidas contra o DENV-2 e nem contra o ZIKV. O extrato de raiz com IS de 2,8 contra DENV-2 e $> 1,6$ contra ZIKV teve CE_{50DENV} de 27,5 µg/mL, CE_{50ZIKV} de 61,1 µg/mL, $CC_{50BHK-21}$ de 76,2 µg/mL e CC_{50Vero} de > 100 µg/mL. O extrato obtido da folha-flor apresentou valores de CE_{50} e CC_{50} muito próximos de 100 µg/mL para ambos os vírus e células testadas, portanto, apresentou IS de 1,1 e $> 1,0$ contra DENV-2 e ZIKV, respectivamente.

Família Fabaceae – Quatro extratos obtidos de três espécies de plantas da família Fabaceae também foram investigados quanto às respectivas atividade antiviral contra o DENV-2 e contra o ZIKV. Os extratos de *Chamaecrista* sp. e *Piptadenia* sp. foram muito ativos contra ambos os vírus e também são abordados no tópico

fracionamentos de extratos vegetais (item 6.5.2). Quanto ao extrato EX10437 obtido da flor de *Inga* sp., ativo apenas contra DENV-2, apresentou CE₅₀ de 49,9 µg/mL, CC₅₀ em células BHK-21 de 62,7 µg/mL e IS de 1,3. Esse extrato não foi avaliado quanto a sua atividade virucida.

Família Asteraceae – Dessa família foram testados os extratos obtidos de caule de *Chrysolaena* sp. (EX13211), raiz de *Pterocaulon* sp. (EX11087), fruto de *Miconia* sp. (EX13194) e folha de *Baccharis trimera* (EX12802). O extrato da raiz de *Pterocaulon* sp. foi inativo contra o ZIKV e muito ativo contra o DENV-2 (CE₅₀ de 0,8 µg/mL, CC₅₀ de 46,8 µg/mL e IS de 58,5), sendo o maior IS obtido entre os extratos vegetais.

Do mesmo modo, ativos apenas contra DENV-2, o extrato do fruto de *Miconia* sp., apresentou CE₅₀ de 20,6 µg/mL, CC₅₀ em células BHK-21 de 25,5 µg/mL e IS de 1,2 e o extrato de folha de *Baccharis trimera*, apresentou CE₅₀ de 40,2 µg/mL, CC₅₀ em células BHK-21 de 32,5 µg/mL e IS de 0,8.

O único extrato da família Asteraceae que foi testado em ensaio virucida e foi ativo contra o DENV-2 e contra o ZIKV, foi o extrato obtido do caule de *Chrysolaena* sp., com respectivas CE₅₀ de 8,9 µg/mL e 35,1 µg/mL e respectivos IS de 1,8 e > 2,8.

Todos os 4 extratos obtidos de espécies da família Asteraceae apresentaram maior toxicidade em células BHK-21 do que em células Vero, uma vez que as respectivas CC₅₀ em Vero foram maiores ou iguais a 100 µg/mL.

Algumas espécies da família Asteraceae são conhecidas por várias de suas atividades biológicas, sendo usadas para tratamento de infecções do trato respiratório, de infecções urinárias, doenças venéreas, infecções fúngicas (TOURSARKISSIAN, 1980), dor de garganta e aftas (CROVETTO, 1964; 1981). Além disso, espécies dessa família já foram demonstradas em outros trabalhos como antivirais e não virucidas contra o poliovírus tipo 2 (JAIME, 2013).

Família Combretaceae – O extrato obtido do caule de *Terminalia* sp. (EX10312) apresentou CE₅₀ contra DENV-2 de 7,3 µg/mL e contra ZIKV de > 100 µg/mL. Embora muito ativo contra DENV-2, também foi mais tóxico em células BHK-21, com CC₅₀ de 26,3 µg/mL, do que em células Vero, com CC₅₀ > de 100 µg/mL. O IS contra DENV-2 foi de 3,6 e contra ZIKV de > 1,0. Tal extrato foi virucida contra DENV-2 e sua atividade virucida contra o ZIKV ainda não foi investigada.

Essa família de plantas tem distribuição tropical e é conhecida por ter várias espécies que são utilizadas por suas propriedades medicinais, tais como: antiulcerogênicas, antioxidantes, anti-inflamatórias, sedativas e antidiarreicas (BAG; BHATTACHARYYA; CHATTOPADHYAY, 2013; PÁDUA et al., 2013, NUNES et al., 2014). Plantas dessa família também tendo sido estudadas em relação às propriedades antivirais contra os vírus HIV-1 e Influenza (JEONG, 2002; MA, 2010).

Família Erythroxylaceae - O extrato obtido do caule de *Erythroxylum* sp., (EX13023) foi muito ativo contra DENV-2 e apresentou CE_{50} de 9,1 $\mu\text{g/mL}$, CC_{50} em células BHK-21 de 41,1 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 4,5. Esse extrato também foi ativo contra o ZIKV, sendo a CE_{50} de 29,3 $\mu\text{g/mL}$, CC_{50} em células Vero de > 100 $\mu\text{g/mL}$ e IS de > 3,4. O EX13023 foi virucida contra ambos os vírus.

Apenas o gênero *Erythroxylum* dessa família ocorre no Brasil. Esse gênero contém mais de 100 espécies encontradas em ambientes florestais e de cerrado (AMARAL JÚNIOR, 1980; RIBEIRO et al., 1999) sendo que algumas são conhecidas pelas suas propriedades medicinais e outras pela importância socioeconômica, como por exemplo a popular “coca” (*Erythroxylon coca*). A *E. coca* possui em sua composição química de 0,2 a 0,8 % de alcaloides, sendo 90 % de cocaína (BACCHI, 2004).

Algumas das espécies do gênero *Erythroxylum* já foram relatadas por possuir propriedades medicinais antioxidantes, anticancerígenas, anti-inflamatórias (EVANS, 1981; ANSEL; Jr ALLEN, 1995; NAKAMURA, 2003) e antivirais. Estudos com extratos de espécies desse gênero também mostraram que os flavonoides glicosilados presentes nesses extratos inibiram a replicação do HHV-1. E em algumas espécies desse mesmo gênero foram identificados metabólitos secundários pertencentes ao grupo dos esteroides, lactonas, cumarinas, açúcares redutores e taninos (GONZÁLEZ-GUEVARA, 2004).

Família Malpighiaceae - É uma família que contém mais de 60 gêneros e 600 espécies pantropicais com relevância econômica importante na indústria alimentícia (APG, 2003). Como exemplo de espécies dessa família, temos o “murici” (*Byrsonima crassifolia*) fruta típica do Nordeste brasileiro e a “acerola” (*Malpighia emarginata*). Pode-se citar ainda, pesquisas de compostos na espécie dessa família, *Banisteriopsis caapi*, para o combate da doença de Parkinson (SCHWARZ, et al., 2003). É dessa planta o famoso chá de ayahuasca, bebida utilizada por indígenas da Amazônia com

propósitos medicinais e religiosos. Outras espécies dessa família são investigadas em relação a atividade antifúngica (NARUZAWA; PAPA, 2011) e antiviral contra HHV (LOPEZ; HUDSON; TOWERS, 2001).

No nosso trabalho, 5 espécies dessa família originaram extratos ativos contra DENV-2, ZIKV e CHIKV. Em ensaios de CE_{50} , os extratos dessa família foram demonstrados como mais ativos contra DENV-2 do que para ZIKV. Tais extratos foram virucidas para ambos os vírus. O extrato EX11117, 2,9 vezes mais ativo contra DENV-2, foi obtido do caule de *Banisteriopsis* sp. e apresentou CE_{50} contra DENV de 34,8 $\mu\text{g/mL}$ e CE_{50} contra ZIKV de $> 100 \mu\text{g/mL}$. Os valores de toxicidade nas células hospedeiras foram semelhantes para as duas linhagens, sendo a CC_{50} em células BHK-21 de 80,5 $\mu\text{g/mL}$ e em Vero de acima de 100 $\mu\text{g/mL}$. Os respectivos IS para DENV-2 e ZIKV foram de 2,3 e $> 1,6$.

O extrato de EX11311, obtido do caule de *Banisteriopsis membranifolia*, apresentou CE_{50} contra DENV-2 de 23,9 $\mu\text{g/mL}$, CE_{50} contra ZIKV de 63,6 $\mu\text{g/mL}$, CC_{50} em células BHK-21 de 64,3 $\mu\text{g/mL}$ e CC_{50} em Vero de $> 100 \mu\text{g/mL}$. Os IS contra DENV-2 e ZIKV foram respectivamente 2,7 e $> 1,6$. Esse extrato não foi testado quanto à sua atividade virucida contra o ZIKV.

O extrato EX13203, obtido da flor de *Byrsonima coccolobifolia*, apresentou CE_{50} contra DENV-2 de 9,4 $\mu\text{g/mL}$ e CE_{50} contra ZIKV de 43,4 $\mu\text{g/mL}$. Esse extrato foi 4,6 vezes mais ativo contra DENV-2 do que contra ZIKV, no entanto, foi 3,7 vezes mais tóxico em células BHK-21 (CC_{50} 26,7 $\mu\text{g/mL}$) do que em Vero (CC_{50} de $> 100 \mu\text{g/mL}$). Portanto os IS contra DENV-2 (2,8) e contra ZIKV ($> 2,3$) ficaram com valores bem semelhantes. De forma geral, os valores de atividade antiviral para diferentes espécies dessa família estão semelhantes, exceto pelo extrato de EX11323, obtido da folha de *Banisteriopsis* sp., que foi ativo contra DENV-2 (CE_{50} de 23,9 $\mu\text{g/mL}$, CC_{50} de 43,7 $\mu\text{g/mL}$ em células BHK-21 e IS de 1,8) e inativo contra o ZIKV.

Família Lythraceae - O EX11320, obtido da flor de *Diplusodon* sp., foi muito ativo contra DENV-2 e fracamente ativo contra o ZIKV. Esse extrato também foi ativo contra o CHIKV nos ensaios de triagem. O EX11320 também foi 5 vezes mais tóxico para células BHK-21 do que para células Vero e apresentou IS para DENV-2 de 2,7 e $> 1,0$ para ZIKV. Futuramente, esse extrato será fracionado para identificação das substâncias responsáveis pela atividade antiviral demonstrada neste trabalho.

A família Lythraceae encontra-se bem distribuída em países tropicais, mas com poucas espécies em regiões temperadas (GRAHAM; CRISCI; HOCH, 1993). Há espécies que se destacam pelo emprego frequente na medicina popular como opções de tratamento e prevenção de doenças cardiovasculares (SCHULD, 2004) e diabetes (GARCIA, 1940). Há também estudos com espécie dessa família que demonstraram atividade redutora dos níveis de colesterol em ratos (BIAVATTI et al. 2004), atividade antibiótica contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (DUARTE et al.. 2002), e algumas apresentaram atividade antiviral contra o HHV-1 (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2005) e HIV, no caso deste último, houve inibição da protease e transcriptase reversa pelos compostos ácido gálico e ácido elágico (NUTAN et al., 2013). Proantocianidinas, compostos fenólicos e polissacarídeos ácidos foram identificados na caracterização bioquímica de espécies de Lythraceae (LUSA; BONA, 2011). Até o momento, não foram encontrados estudos que reportam atividade antiviral de espécies dessa família contra o DENV-2, ZIKV e/ou CHIKV.

Família Primulaceae – O extrato obtido do caule de *Ardisia* sp. foi 3,7 vezes mais ativo contra DENV-2 (CE₅₀ de 11,8 µg/mL) do que contra o ZIKV (CE₅₀ de 43,9 µg/mL) com respectivos IS de 2,6 e > 2,3. Esse extrato foi 2,3 vezes menos tóxico em células Vero do que em células BHK-21, com respectivas CC₅₀ de > 100 µg/mL e 31,1 µg/mL. O extrato de *Ardisia* sp. também apresentou atividade virucida contra DENV-2 e ZIKV mas ainda não foi fracionado para identificação das substâncias responsáveis pela atividade antiviral.

No Brasil são registrados 12 gêneros e mais de 140 espécies da família Primulaceae (ZAPPI, et al., 2015; FREITAS; CARRIJO; LUNA, 2017). A espécie dessa família, *Anagallis arvensis*, já foi reportada como antiviral contra o HHV-1 e o poliovírus tipo 2. O princípio ativo antiviral identificado foi uma saponina e os autores demonstraram que o mecanismo de ação envolve a inibição da adsorção viral à membrana celular, desse modo, impedindo a penetração e a replicação viral (AMOROS, FAUCONNIER; GIRRE, 1987) por um mecanismo também virucida. Uma investigação mais aprofundada poderá nos dizer se a *Ardisia* sp. contém saponinas inibidoras do DENV-2 e do ZIKV.

Família Rubiaceae – No nosso trabalho, extratos de *Amaioua* sp., *Ixora* sp., *Psychotria* sp., *Palicourea* sp. (item 6.5.2) e *Galianthe* sp. foram ativos contra DENV-2 e/ou ZIKV. O extrato EX11137, obtido do caule de *Galianthe* sp., apresentou CC₅₀

de 41,6 µg/mL em células BHK-21 e > 100 µg/mL em células Vero. Esse extrato foi virucida contra DENV-2 e também contra ZIKV. A CE₅₀ contra DENV-2 foi de 35,6 µg/mL e o IS foi de 1,2, enquanto que para ZIKV, a CE₅₀ foi de 99,8 µg/mL e o IS de > 0,9. Esse extrato também foi ativo contra o CHIKV nos ensaios de triagem.

A família Rubiaceae é uma das maiores famílias de angiospermas, com cerca de 10.700 espécies e 640 gêneros (Robbrecht, 1988), tendo ocorrência em todas as regiões do mundo, mas principalmente nos trópicos. Segundo Mabberley (1997), ela ocupa o quarto lugar em diversidade entre as Angiospermas, perdendo apenas para as famílias Asteraceae, Orchidaceae e Fabaceae. Há diversas espécies de Rubiaceae que são utilizadas como plantas ornamentais, na indústria de alimentos e também na medicina. Economicamente, um dos membros mais importantes são a *Coffea robusta* e *Coffea arabica* utilizadas na produção do café. Na medicina, espécies do gênero *Cinchona* são conhecidas por serem fontes de alcaloides, sendo o exemplo mais conhecido, a quinina, utilizada no tratamento da malária (KAROU et al., 2011). A atividade antiviral de espécies dessa família contra flavivírus ainda não foi relatada, no entanto, há trabalhos que demonstram atividade antiviral de espécies de Rubiaceae contra o HIV e contra o HBV (vírus da Hepatite B) (QUINTERO et al., 2011).

Família Sapindaceae - Seis extratos de diferentes partes de *Cupania* sp., *Serjania* sp., e *Matayba juglandifolia* foram ativos contra DENV-2 e apresentaram CE₅₀ que variaram de 0,8 a 19,5 µg/mL. Desses, cinco foram fracamente ativos contra o ZIKV. Em relação à citotoxicidade dos extratos dessa família, as CC₅₀ em células BHK-21 variaram de 20,6 a 49,5 µg/mL e em células Vero as CC₅₀ foram > 100 µg/mL para todos aqueles que foram ativos contra o ZIKV. Apenas os extratos de caule e folha de *Cupania* sp. foram testados em ensaios virucidas contra DENV-2 e ZIKV, sendo virucidas para ambos. De forma geral os IS variaram de 1,9 a 61,8 contra DENV-2 e de 1,9 a 4,6 contra ZIKV. Destaca-se o extrato do caule de *Serjania* sp. e o extrato da flor de *Cupania* sp. com respectivos IS de 49,5 e 61,8. Os extratos muito ativos contra DENV-2, assim como aqueles fracamente ativos contra o ZIKV, merecem ser investigados para a identificação das substâncias antivirais presentes. Aqueles que mostraram altos IS contra DENV-2 e não agiram como virucidas, especificamente os extratos de flor de *Cupania* sp. e de caule de *Serjania* sp., são promissores para mais investigações. É interessante notar que os extratos de *Serjania*

sp. foram ativos contra DENV-2 e CHIKV e inativos contra o ZIKV, enquanto o extrato *M. juglandifolia* foi ativo contra DENV-2 e ZIKV e inativo contra o CHIKV. A identificação das substâncias ativas desses extratos poderá nos direcionar a mecanismos de inibição viral comuns entre o DENV e o CHIKV e/ou entre o DENV e o ZIKV. Embora os extratos dessa família não tenham sido investigados quanto ao composto ativo, a atividade virucida de 3 deles foi confirmada contra o DENV-2 e o ZIKV.

A família Sapindaceae possui mais de 130 gêneros e 1.700 espécies com distribuição predominantemente pantropical. No Brasil, ela está representada por mais de 400 espécies distribuídas em todo o território. Algumas dessas espécies são reconhecidas por seu valor alimentício e econômico, como o guaraná (*Paullinia cupana*), que é endêmico da região amazônica ou a pitomba, fruto da pitombeira (*Talisia esculenta*), que é típica do Nordeste brasileiro (SOMMER; FERRUCCI; ACEVEDO-RODRIGUES, 2010). Quanto a propriedades biológicas, atividade antiviral já foi reportada para algumas espécies dessa família, como por exemplo: a *Zanha africana*, demonstrada como antiviral para poliovírus e também por possuir constituintes indutores de IFN alfa e beta; e também para a *Nephelium lappaceum*, que foi demonstrada como anti-HHV tanto *in vitro* quanto *in vivo* (NAWAWI et al., 1999).

Neste trabalho, as famílias de plantas que originaram extratos antivirais e não virucidas para ambos os vírus testados foram Amaryllidaceae, Fabaceae e Orchidaceae (tabela 1). Ressalta-se que as espécies de *Hippeastrum puniceum* e *Chamaecrista* sp., originaram tanto extratos virucidas como extratos não virucidas. Por exemplo, o extrato de fruto de *Chamaecrista* sp. foi virucida contra DENV-2 e contra o ZIKV, enquanto o extrato obtido do seu caule não foi virucida contra DENV-2 e nem contra o ZIKV. Do mesmo modo, extratos de caule e de folha verde de *H. puniceum* foram virucidas contra DENV-2 e ZIKV, enquanto os extratos de flor, raiz e bulbo dessa mesma planta não foram virucidas para esses vírus. De fato, cada parte de uma planta demonstrou um perfil químico diferente, sendo comum que extratos de uma parte contenham substâncias distintas de outras partes da mesma planta.

Observou-se também que alguns extratos vegetais muito ativos ou muito citotóxicos, ou seja, aqueles que apresentam, respectivamente, CE₅₀ e CC₅₀ em baixas concentrações, comumente apresentam resultados falso negativos, já que seu

efeito citotóxico se confunde com a ação virucida. Portanto, decidiu-se por fracionar alguns extratos com valores de CE_{50} baixos, independentemente do valor de IS, na expectativa de que as substâncias com ação antiviral fossem distintas daquelas com ação citotóxica. Além disso, todos os extratos vegetais virucidas contra DENV-2 também o foram contra ZIKV, provavelmente porque ambos são flavivírus e compartilham estruturas similares. O mecanismo de ação dos extratos vegetais ativos mas que não foram virucidas aqui identificados ainda será investigado. Pretende-se verificar qual a etapa do ciclo de multiplicação viral que é inibida pelo extrato, ou preferencialmente, pela substância antiviral dele purificada.

Extratos ativos derivados de plantas

45 extratos derivados de espécies de 16 famílias de plantas

IS contra DENV-2: 0,8 a 125

IS contra ZIKV: > 1,0 a 5,2

Atividade antiviral

DENV-2: 19 extratos virucidas e 10 extratos não virucidas

ZIKV: 16 extratos virucidas e 9 extratos não virucidas

Os 19 extratos não virucidas foram obtidos de plantas das famílias Amaryllidaceae, Fabaceae e Orchidaceae

6.4 CC_{50} , CE_{50} , IS e atividade virucida de extratos fúngicos

Notas: (i) Neste trabalho, a determinação da CC_{50} , CE_{50} , IS e a verificação da atividade virucida de extratos fúngicos foram feitas apenas contra o DENV-2;

(ii) O termo “muito ativo” é usado somente para extratos com $CE_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$;

(iii) A descrição mais detalhada das propriedades dos extratos selecionados para o fracionamento biomonitorado está no item 6.5.1.

Os valores de CC_{50} , CE_{50} e IS dos 89 extratos fúngicos ativos contra DENV-2 estão mostrados na tabela 2. Vários extratos fúngicos ativos contra DENV-2 foram

inativos contra ZIKV mesmo quando testados nas concentrações de 100 a 0,8 µg/mL. Um exemplo é o extrato EX17458, obtido do fungo *P. chrysogenum*, que foi ativo contra DENV-2 com CE₅₀ de 8,6 µg/mL e IS de > 11,6; mas foi inativo contra ZIKV em todas as concentrações usadas nos ensaios de CE₅₀. O *P. chrysogenum* que gerou esse extrato foi um isolado de queijo e foi cedido à Extratoteca pela coleção de cultura da Fiocruz – RJ. Tal extrato apresentou CC₅₀ em células BHK-21 de > 100 µg/mL e em células Vero de 47,9 µg/mL (tabela 2).

Os extratos de EX11596 e EX17314, obtidos de culturas de *P. chrysogenum*, foram isolados de uma alga marinha do continente Antártica. O EX17314 não foi testado para ação virucida contra DENV-2 e ZIKV, mas apresentou CE₅₀ e IS de 27,0 µg/mL e 1,6 contra DENV-2 e 41,7 µg/mL e 1,0 contra ZIKV. O extrato EX11596, descrito em detalhes no item 6.5.1.2, despertou maior interesse neste trabalho por ser antiviral e não virucida nos ensaios contra o DENV-2.

O EX15382, obtido de um fungo isolado do líquen *Usnea* sp., foi ativo contra o ZIKV e contra o DENV-2, sendo não virucida contra o último. O EX15382 apresentou CE₅₀ de 53,7 µg/mL e IS de > 1,9 contra o DENV-2; e CE₅₀ de > 100 µg/mL e IS de > 1,0 contra o ZIKV. O extrato do fungo *Pseudogymnoascus* sp., EX16655, também foi ativo contra o ZIKV e o DENV-2 e é abordado no item 6.5.1.3. O EX16655, assim como outros 51 extratos fúngicos, foi virucida contra o DENV-2 (tabela 2).

De forma geral, os extratos fúngicos se destacaram por apresentarem CE₅₀ relativamente baixa e altos IS contra o DENV-2, sendo a maioria deles virucida contra esse vírus (tabela 2). Isso é bem evidente em alguns grupos de extratos originados de fungos endofíticos neste trabalho. Inicialmente, mais de 40 extratos provenientes de fungos isolados do hospedeiro *Melocactus ernestii*, espécie de Cactaceae endêmica em Minas Gerais e Bahia, foram muito ativos contra o DENV-2. Os 29 extratos mais promissores são mostrados na tabela 2 e dentre eles, 9 apresentaram CE₅₀ < 10 µg/mL. Além disso, quase todos apresentaram CC₅₀ > 200 µg/mL e IS que variaram de 21,9 a > 212,8. Demais extratos apresentaram CE₅₀ entre 10 a 40,9 µg/mL com IS variando de > 4,9 a > 19,2. Os isolados fúngicos que originaram tais extratos foram submetidos a vários recultivos com o objetivo de gerar massa suficiente para o fracionamento biomonitorado (tabela 2). Após esse processo, dois extratos representantes desse grupo foram investigados e são abordados no item 6.5.1.1.

Tabela 2 - Extratos de fungos: Determinação de CC₅₀, CE₅₀, IS e atividade virucida contra DENV-2 e ZIKV

Código Voucher	EX	Espécie	Hospedeiro/ Local coleta	DENV-2				ZIKV			
				CE ₅₀	CC ₅₀ BHK-21	IS	VIR	CE ₅₀	CC ₅₀ Vero	IS	VIR
UFMGCB12518	16655	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Molusco	24,4	90,5	3,7	Sim	12,4	43,5	3,5	NT
UFMGCB12518	17638	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Molusco	> 100	> 100	> 1,0	Sim	> 100	> 100	> 1,0	NT
UFMGCB6126	11596	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Alga - Antártica	6,5	38,9	6,0	Não	12,1	40,8	3,4	NT
UFMGCB6126	17314	<i>P. chrysogenum</i>	<i>Palmaria decipiens</i> Antártica	27,0	43,0	1,6	NT	41,7	43,2	1,0	NT
UFMGCB6046	16524	<i>P. chrysogenum</i>	Alga	5,9	> 100	> 16,9	Sim	Inativo	> 100	-	NT
UFMGCB 6126	16900	<i>P. chrysogenum</i>	Alga	57,0	> 100	> 1,8	NT	Inativo	19,5	-	NT
UFMGCB 6126	16902	<i>P. chrysogenum</i>	Alga	47,0	> 100	> 2,1	NT	Inativo	> 100	-	NT
UFMGCB 6126	16904	<i>P. chrysogenum</i>	Alga	99,0	> 100	> 1,0	NT	Inativo	15,7	-	NT
UFMGCB 6126	16906	<i>P. chrysogenum</i>	Alga	35,0	> 100	> 2,8	NT	Inativo	> 100	-	NT
PC-EM	17458	<i>P. chrysogenum</i>	Queijo	8,6	> 100	> 11,6	Sim	Inativo	47,9	-	NT
UFMGCB9411	15382	NI	<i>Usnea</i> sp.	53,7	> 100	> 1,9	Não	> 100	> 100	> 1,0	NT
BRM047710	16804	<i>Penicillium</i> sp.	Solo	< 0,8	> 100	> 125,0	Sim	Inativo	> 100	-	NT
BRM047710	16805	<i>Penicillium</i> sp.	Solo	0,7	> 100	> 142,9	Sim	Inativo	12,5	-	NT
BRM047710	16806	<i>Penicillium</i> sp.	Solo	0,6	> 100	> 166,7	Sim	Inativo	> 100	-	NT
UFMGCB9445	13864	NI	Solo - Antártica	10,6	23,4	2,2	NT	13,5	24,2	1,8	NT
UFMGCB9446	13865	NI	Solo - Antártica	15,4	33,4	2,2	NT	18,1	26,6	1,5	NT
UFMGCB9538	13957	NI	Solo - Antártica	1,1	4,6	4,2	NT	7,0	15,9	2,3	NT
UFMGCB9451	13870	NI	Solo - Antártica	1,4	8,5	6,1	NT	41,5	74,2	1,8	NT
UFMGCB9480	13899	NI	Solo - Antártica	1,5	8,5	5,7	NT	47,9	65,1	1,4	NT
UFMGCB9478	13897	NI	Solo - Antártica	2,5	21,8	8,7	NT	18,7	75,5	4,0	NT
BRM047709	16792	<i>Aspergillus chevalieri</i>	Solo	0,4	> 100	> 250,0	Sim	Inativo	> 100	-	NT
BRM047709	16793	<i>A. chevalieri</i>	Solo	0,4	> 100	> 250,0	Sim	Inativo	43,2	-	NT
BRM047712	16795	<i>Talaromyces calidicanus</i>	Solo	0,5	> 100	> 200,0	Sim	Inativo	> 100	-	NT

EX: número do extrato; CE₅₀: concentração efetiva 50; CC₅₀: concentração citotóxica 50; IS: índice de seletividade do extrato; VIR: atividade virucida do extrato; NT: não testado; (-) não se aplica; (*) extrato testado apenas na concentração de 20 µg/mL.

Tabela 2 - Extratos de fungos: determinação de CC₅₀, CE₅₀, IS e atividade virucida contra DENV-2 e ZIKV (continuação)

Código Voucher	EX	Espécie	Hospedeiro/ Local coleta	DENV-2				ZIKV			
				CE ₅₀	CC ₅₀ BHK-21	IS	VIR	CE ₅₀	CC ₅₀ Vero	IS	VIR
BRM047712	16796	<i>T. calidicanus</i>	Solo	0,3	> 100	> 333,3	Sim	Inativo	> 100	-	NT
BRM047712	16797	<i>T. calidicanus</i>	Solo	0,2	> 100	> 500,0	Sim	Inativo	> 100	-	NT
BRM047711	16798	<i>Fusarium nygamai</i>	Solo	1,8	> 100	> 125,0	Sim	Inativo	89,9	-	NT
BRM047711	16799	<i>F. nygamai</i>	Solo	10,7	> 100	> 9,3	Sim	Inativo	> 100	-	NT
BRM047711	16800	<i>F. nygamai</i>	Solo	0,2	> 100	> 500,0	Sim	Inativo	> 100	-	NT
BRM047708	16803	<i>Clonostachys rogersoniana</i>	Solo	< 0,8	> 100	> 125,0	Sim	Inativo	> 100	-	NT
UFMGCB5658	11657	NI	<i>M. Ernestii</i>	0,94	> 200	> 212,8	NT	Inativo	> 100	-	NT
UFMGCB5797	11658	NI	<i>M. Ernestii</i>	7,4	> 100	> 13,5	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5797	16525	NI	<i>M. Ernestii</i>	3,1	> 100	> 32,3	Sim	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5797	16605	NI	<i>M. Ernestii</i>	1,4	> 100	> 71,4	NT	NT	NT	-	NT
UFMGCB5779	11659	NI	<i>M. Ernestii</i>	10,5	> 100	> 9,5	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5779	16526	NI	<i>M. Ernestii</i>	4,9	> 100	> 20,4	Sim	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5779	16604	NI	<i>M. Ernestii</i>	2,1	> 100	> 47,6	NT	NT	NT	-	NT
UFMGCB5846	11656	NI	<i>M. Ernestii</i>	2,7	> 200	> 74,1	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5710	11748	NI	<i>M. Ernestii</i>	3,1	> 200	> 64,5	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5749	11738	NI	<i>M. Ernestii</i>	8,5	> 200	> 23,7	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5821	11684	NI	<i>M. Ernestii</i>	8,6	> 200	> 23,1	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5644	11688	NI	<i>M. Ernestii</i>	9,1	> 200	> 21,9	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5750	11683	NI	<i>M. Ernestii</i>	10,4	> 200	> 19,2	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5740	11768	NI	<i>M. Ernestii</i>	10,5	> 200	> 19,0	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5879	11707	NI	<i>M. Ernestii</i>	11,6	> 200	> 17,2	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5877	11698	NI	<i>M. Ernestii</i>	11,9	> 200	> 16,8	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5651	11711	NI	<i>M. Ernestii</i>	11,9	> 200	> 16,8	NT	Inativo*	NT	-	NT

EX: número do extrato; CE₅₀: concentração efetiva 50; CC₅₀: concentração citotóxica 50; IS: índice de seletividade do extrato; VIR: atividade virucida do extrato; NT: não testado; (-) não se aplica; (*) extrato testado apenas na concentração de 20 µg/mL.

Tabela 2 - Extratos de fungos: determinação de CC₅₀, CE₅₀, IS e atividade virucida contra DENV-2 e ZIKV (continuação)

Código Voucher	EX	Espécie	Hospedeiro/ Local coleta	DENV-2				ZIKV			
				CE ₅₀	CC ₅₀ BHK-21	IS	VIR	CE ₅₀	CC ₅₀ Vero	IS	VIR
UFMGCB5754	11706	NI	<i>M. Ernestii</i>	13,5	> 200	> 14,8	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5813	11699	NI	<i>M. Ernestii</i>	15,0	> 200	> 13,3	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5792	11685	NI	<i>M. Ernestii</i>	15,9	> 200	> 12,6	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5838	11719	NI	<i>M. Ernestii</i>	17,2	> 200	> 11,6	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5808	11744	NI	<i>M. Ernestii</i>	17,8	> 200	> 11,2	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5892	11740	NI	<i>M. Ernestii</i>	18,3	> 200	> 10,9	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5851	11726	NI	<i>M. Ernestii</i>	24,4	> 200	> 8,2	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5839	11721	NI	<i>M. Ernestii</i>	30,9	> 200	> 6,5	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5756	11742	NI	<i>M. Ernestii</i>	33,3	> 200	> 6,0	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5837	11730	NI	<i>M. Ernestii</i>	34,6	> 200	> 5,8	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5789	11745	NI	<i>M. Ernestii</i>	35,6	> 200	> 5,6	NT	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB5654	11735	NI	<i>M. Ernestii</i>	40,9	> 200	> 4,9	NT	Inativo*	NT	-	NT
-	16977	Extrato de ágar	-	0,6	> 100	> 166,6	NT	Inativo	> 100	-	NT
-	16870	Meio controle <i>M. Ernestii</i>	-	11,7	> 100	> 8,5	NT	NT	NT	-	NT
UFMGCB15291	17731	<i>Trichoderma caribbaeum</i>	<i>Piper</i> sp.	2,9	> 100	> 34,5	Sim	Inativo	60,9	-	NT
UFMGCB15603	17986	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Piper</i> sp.	10,5	> 100	> 9,5	Sim	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB15653	18022	<i>Diaporthe</i> sp.	<i>Piper</i> sp.	6,7	> 100	> 14,9	Sim	Inativo	> 100	-	NT
UFMGCB15475	17880	NI	<i>Piper</i> sp.	1,7	> 100	> 58,8	Sim	Inativo	> 100	-	NT
UFMGCB15625	18003	NI	<i>Piper</i> sp.	4,3	> 100	> 23,3	Sim	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB15710	18074	NI	<i>Piper</i> sp.	4,4	> 100	> 22,7	Sim	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB15703	18067	NI	<i>Piper</i> sp.	4,5	> 100	> 22,2	Sim	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB15643	18015	NI	<i>Piper</i> sp.	6,2	> 100	> 16,1	Sim	Inativo	> 100	-	NT
UFMGCB15682	18047	NI	<i>Piper</i> sp.	6,8	> 100	> 14,7	Sim	Inativo*	NT	-	NT

EX: número do extrato; CE₅₀: concentração efetiva 50; CC₅₀: concentração citotóxica 50; IS: índice de seletividade do extrato; VIR: atividade virucida do extrato; NT: não testado; (-) não se aplica; (*) extrato testado apenas na concentração de 20 µg/mL.

Tabela 2 - Extratos de fungos: Determinação de CC₅₀, CE₅₀, IS e atividade virucida contra DENV-2 e ZIKV (continuação)

Código Voucher	EX	Espécie	Hospedeiro/ Local coleta	DENV-2				ZIKV			
				CE ₅₀	CC ₅₀ BHK-21	IS	VIR	CE ₅₀	CC ₅₀ Vero	IS	VIR
UFMGCB15668	18035	NI	<i>Piper</i> sp.	7,4	> 100	> 13,5	Sim	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB15673	18038	NI	<i>Piper</i> sp.	7,5	> 100	> 13,3	Sim	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB15516	17917	NI	<i>Piper</i> sp.	7,8	> 100	> 12,8	Sim	Inativo	> 100	-	NT
UFMGCB15592	17978	NI	<i>Piper</i> sp.	8,9	> 100	> 11,2	Sim	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB15700	18064	NI	<i>Piper</i> sp.	9,5	> 100	> 10,5	Sim	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB15545	17942	NI	<i>Piper</i> sp.	9,6	> 100	> 10,4	Sim	Inativo	> 100	-	NT
UFMGCB15540	17938	NI	<i>Piper</i> sp.	9,9	> 100	> 10,1	Sim	Inativo	> 100	-	NT
UFMGCB15508	17909	NI	<i>Piper</i> sp.	10,1	> 100	> 9,9	Sim	Inativo	87,4	-	NT
UFMGCB15688	18053	NI	<i>Piper</i> sp.	10,5	> 100	> 9,5	Sim	Inativo	> 100	-	NT
UFMGCB15525	17923	NI	<i>Piper</i> sp.	11,9	> 100	> 8,4	Sim	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB15598	17982	NI	<i>Piper</i> sp.	11,9	> 100	> 8,4	Sim	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB15663	18031	NI	<i>Piper</i> sp.	12,5	> 100	> 8,0	Sim	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB15563	17960	NI	<i>Piper</i> sp.	13,2	> 100	> 7,6	Sim	Inativo	> 100	-	NT
UFMGCB15522	17921	NI	<i>Piper</i> sp.	13,8	> 100	> 7,2	Sim	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB15396	17813	NI	<i>Piper</i> sp.	16,1	> 100	> 6,2	Sim	Inativo	> 100	-	NT
UFMGCB15661	18029	NI	<i>Piper</i> sp.	18,3	> 100	> 5,5	Sim	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB15593	17979	NI	<i>Piper</i> sp.	24,5	> 100	> 4,1	Sim	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB15461	17869	NI	<i>Piper</i> sp.	25,7	> 100	> 3,9	Sim	Inativo	> 100	-	NT
UFMGCB15675	18040	NI	<i>Piper</i> sp.	27,5	> 100	> 3,6	Sim	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB15544	17941	NI	<i>Piper</i> sp.	42,2	> 100	> 2,4	Sim	Inativo	> 100	-	NT
UFMGCB15630	18006	NI	<i>Piper</i> sp.	45,8	> 100	> 2,2	Sim	Inativo*	NT	-	NT
UFMGCB15468	17876	NI	<i>Piper</i> sp.	88,2	> 100	> 1,1	Sim	Inativo*	NT	-	NT

EX: número do extrato; CE₅₀: concentração efetiva 50; CC₅₀: concentração citotóxica 50; IS: índice de seletividade do extrato; VIR: atividade virucida do extrato; NT: não testado; (-) não se aplica; (*) extrato testado apenas na concentração de 20 µg/mL.

Trinta e um extratos de fungos endofíticos isolados da planta *Piper* sp. apresentaram atividade antiviral promissora contra DENV-2, mas não contra o ZIKV. *Piper* é um importante gênero de plantas da família Piperaceae e várias de suas espécies possuem potencial medicinal (DI STASI et al., 1989). Esse gênero possui mais de mil espécies que se encontram distribuídas em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo. O nome do gênero deu o nome à família Piperaceae, de importância ornamental, alimentícia, medicinal e industrial, sendo a pimenta-do-reino o mais clássico de seus produtos comerciais (RUSCHEL, 2004).

Três dos fungos endofíticos de *Piper* sp. já foram identificados, sendo um a nível de espécie: *Trichoderma caribbaeum*, *Fusarium* sp. e *Diaporthe* sp. O EX17731, obtido *T. caribbaeum*, apresentou CE₅₀ contra DENV-2 de 2,9 µg/mL e IS de > 34,5 (tabela 2). O EX17986, obtido de *Fusarium* sp., apresentou CE₅₀ de 10,5 µg/mL e IS > 9,5 enquanto o extrato obtido do fungo *Diaporthe* sp. (EX18022) apresentou CE₅₀ de 6,7 µg/mL e IS > 14,9.

Quinze extratos obtidos de fungos endofíticos não identificados de *Piper* sp., apresentaram CE₅₀ que variaram de 10,1 a 88,2 µg/mL e IS que variaram de > 1,1 a 9,9 (tabela 2). Treze deles foram muito ativos contra DENV-2 e apresentaram CE₅₀ < 10 µg/mL e com baixa toxicidade, com IS que variaram de > 10,1 à > 58,8 (tabela 2).

Neste trabalho, decidiu-se investigar a atividade antiviral pós-infecção viral de 16 dos extratos obtidos de *Piper* sp., mesmo sabendo que eles apresentavam atividade virucida contra DENV-2. Os escolhidos foram aqueles com menores valores de CE₅₀, a saber; o extrato de *T. caribbaeum*, o extrato de *Diaporthe* sp. e os extratos EX17880, EX18003, EX18015, EX18035, EX18047, EX18064, EX18067, EX18074, EX18038, EX17917, EX17978, EX17942, EX17938 e EX17909. Nestes experimentos, células BHK-21 foram deixadas em contato com uma suspensão de DENV-2 (m.o.i = 2) por 1h, em seguida, o sobrenadante foi descartado, as células infectadas lavadas e tratadas com os extratos nas concentrações de 100 a 0,8 µg/mL. Os extratos obtidos apenas de meios de cultura de crescimento dos fungos foram incluídos como controles negativos. Após 72h de incubação, a viabilidade celular foi revelada pelo ensaio do MTT. Nenhum desses extratos exerceu efeito protetor nas células infectadas e tratadas, mesmo nas concentrações mais altas, confirmando que a atividade de tais extratos se dá pela inativação da partícula viral.

Neste trabalho mostramos que extratos do *Fusarium* sp., *Diaporthe* sp. e *Trichoderma caribbaeum* isolados de *Piper* sp. apresentam atividade virucida contra

DENV-2. Esse dado sugere que espécies do gênero *Piper* hospedeiros de fungos endofíticos são produtores de substâncias antivirais. Rufin (2019), destaca em uma revisão de forma abrangente ao longo do período 1981–2019, o potencial bioativo de metabólitos produzidos por fungos endofíticos do gênero *Fusarium* assim como várias das suas atividades biológicas. Hawas (2016) demonstrou que *Fusarium equiseti* isolado da alga *Padina pavonica* sintetiza vários metabólitos capazes de inibir a protease do HCV. Ainda não há registros na literatura quanto à produção de metabólitos com potencial antiviral pelos os fungos *Diaporthe* sp. e *Trichoderma caribbaeum*.

Dentre os extratos fúngicos que tiveram suas CE_{50} determinadas, 18 foram obtidos de fungos isolados do solo, sendo 6 de solo do continente Antártica. Esses últimos, podem ser fontes de antivirais com amplo espectro contra DENV-2, ZIKV e CHIKV, já que foram ativos contra esses 3 vírus nos ensaios de triagem (tabelas B1, F1 e H1). Estes extratos, EX13864, EX13865, EX13870, EX13897, EX13899, EX13957, mostraram IS baixos contra DENV-2 e ZIKV e também alta toxicidade em ambas as linhagens celulares (tabela 2).

A atividade antiviral e a citotoxicidade dos extratos EX13864 e EX13865 foram semelhantes contra o DENV-2 e o ZIKV. A CE_{50} e o IS do extrato EX13864, foram respectivamente, contra DENV-2 de 10,6 $\mu\text{g/mL}$ e 2,2 e contra ZIKV de 13,5 $\mu\text{g/mL}$ e 1,8. A CC_{50} em células BHK-21 foi de 23,4 $\mu\text{g/mL}$ e em Vero de 24,2 $\mu\text{g/mL}$. O extrato EX13865 apresentou CE_{50} e IS contra DENV-2 de 15,4 $\mu\text{g/mL}$ e 2,2 e contra ZIKV de 18,1 $\mu\text{g/mL}$ e 1,5. A CC_{50} em células BHK-21 foi de 33,4 $\mu\text{g/mL}$, enquanto em células Vero foi de 26,6 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 2).

O EX13957 apresentou CE_{50} e IS contra DENV-2 de 1,1 $\mu\text{g/mL}$ e 4,2 e contra ZIKV de 7,0 $\mu\text{g/mL}$ e 2,3. Embora menos ativo contra ZIKV, foi 3,4 vezes menos tóxico em células Vero (CC_{50} de 15,9 $\mu\text{g/mL}$) do que em células BHK-21 (CC_{50} de 4,6 $\mu\text{g/mL}$). O extrato EX13897 foi 7,5 vezes mais ativo contra DENV-2 (CE_{50} de 2,5 $\mu\text{g/mL}$) do que contra ZIKV (CE_{50} de 18,7 $\mu\text{g/mL}$), mas foi 3,5 vezes mais tóxico em células BHK-21 (CC_{50} de 21,8 $\mu\text{g/mL}$) do que em células Vero (CC_{50} de 75,5 $\mu\text{g/mL}$). Os respectivos IS contra DENV-2 e ZIKV foram de 8,7 e 4,0 (tabela 2).

Os valores de CE_{50} contra DENV-2 dos extratos EX13870 e EX13899 foram de 1,4 e 1,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, enquanto contra ZIKV, foram de 41,5 e 47,9 $\mu\text{g/mL}$. Os valores de toxicidade desses extratos também variaram bastante entre células Vero e BHK-21. A CC_{50} em células BHK-21 foi de 8,5 $\mu\text{g/mL}$, para ambos os extratos,

e a CC_{50} em células Vero foi de 74,2 $\mu\text{g/mL}$ (EX13870) e 65,1 $\mu\text{g/mL}$ (EX13899). Portanto, esses extratos foram cerca de 30 vezes mais ativos contra DENV-2 e cerca de 7 a 8 vezes mais tóxicos em células BHK-21. Ainda assim, apresentaram IS mais altos contra DENV-2 do que contra ZIKV. O IS do EX13870 foi de 6,1 contra DENV-2 e 1,8 contra ZIKV, enquanto o EX13899 apresentou IS de 5,7 contra DENV-2 e 1,4 contra ZIKV (tabela 2).

Nenhum dos extratos obtidos de fungos de solo da Antártica foram testados em ensaios virucidas e a atividade antiviral contra CHIKV foi detectada apenas na etapa de triagem a 20 $\mu\text{g/mL}$, conforme tabela H. O recultivo desses fungos geraram extratos inativos, mas novos recultivos, assim como a identificação dos fungos estão sendo feitos pelos nossos colaboradores.

Os isolados fúngicos coletados no solo da Antártica, assim como a maioria dos extratos fúngicos depositados na Extratoteca do IRR, só são submetidos ao processo de identificação taxonômica ou molecular somente após serem detectados como ativos em algum ensaio biológico. Os fungos foram isolados por nossos colaboradores em diferentes áreas ecológicas do Brasil, do deserto do Atacama e do continente Antártica. Após seu isolamento, o fungo é cultivado em condições apropriadas e a cultura extraída com etanol para gerar o respectivo extrato. Estimativas mais recentes que preveem a diversidade de espécies de fungos indicam que apenas 3 a 8 % das espécies de fungos existentes, são descobertas e descritas (HAWKSWORTH; LÜCKING, 2017). Portanto, os fungos investigados e com atividade antiviral positiva até agora representam apenas uma pequena fração desses organismos e do seu potencial.

Os fungos produtores de extrato antiviral foram cultivados em maior escala para viabilizar o fracionamento biomonitorado. No caso dos fungos coletados em solo Antártico os novos cultivos geraram extratos inativos e não foram mais investigados. A perda da atividade antiviral de extratos obtidos após o recultivo foi recorrente durante este projeto, provavelmente, porque a produção de determinados metabólitos secundários é induzida em condições ambientais específicas ou durante etapas específicas do ciclo de vida do fungo. Desse modo, no cultivo *in vitro*, o fungo recebe estímulos diferentes daqueles que recebeu no seu ambiente natural que induziram a produção de metabólitos para sua adaptação, defesa, sinais químicos de comunicação, inibição para crescimento de outros microrganismos competidores por

territórios, alimentação, etc (STRAUSS; REYES-DOMINGUEZ, 2011; BRAKHAGE; 2013).

Para tentar recuperar a capacidade de produção do componente antiviral, condições de cultivo diferentes, inclusive com o uso de moduladores epigenéticos foram testadas. A manipulação nutricional, a adição de componentes para simular ambientes, bem como mudanças de temperatura, pH, luminosidade e captação de oxigênio têm sido tradicionalmente usadas para interferir em vias biossintéticas, tendo em vista que a produção de metabólitos secundários depende diretamente das condições de cultivo do fungo (BODE et al., 2002; TAKAHASHI et al., 2013).

Neste trabalho, dezenas de extratos fúngicos recebidos do DQ-UFMG são um exemplo de como o meio de cultura pode interferir na produção de metabólitos secundários. Esses extratos foram obtidos dos fungos *Penicillium* sp., *Aspergillus chevalieri*, *Talaromyces calidicanus*, *Fusarium nygamai* e *Clonostachys rogersoniana* cultivados em diferentes meios de cultura. Apenas 12 extratos obtidos de fungos cultivados em meio de cultura composto por ágar bacteriológico, extrato de carne e glicerina (meio 1), em meio contendo ágar bacteriológico e extrato de carne (meio 2) e no meio contendo ágar bacteriológico e glicerina (meio 3) demonstraram forte atividade antiviral contra DENV-2. Esses extratos apresentaram $CE_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$ e não foram tóxicos até a concentração de $100 \mu\text{g/mL}$, sendo alguns deles com valores de IS acima de 500, os mais altos verificados neste estudo. Entretanto, dezenas de extratos obtidos dos mesmos fungos cultivados em outros meios de cultura (dados não mostrados) não foram ativos contra ZIKV nem contra DENV-2.

De forma semelhante, Liu e colaboradores (2016) demonstraram que o fungo *Talaromyces wortmannii* foi capaz de gerar um composto diferente em cada meio no qual foi cultivado. Em outro trabalho, Hewage e colaboradores (2014) cultivaram o *Dothideomycete* sp. em meios de batata-dextrose e meios de malte Czapek e observaram que a produção dos metabólitos pesquisados dependia não apenas dos meios de cultura serem diferentes, mas também das fontes de batata e malte utilizados, gerando assim, diferentes compostos de acordo com cada situação proposta para o fungo.

Em vista destes resultados promissores, todos os 12 extratos foram fracionados por UPLC e suas frações testadas contra o DENV-2.

Em suma, em sua maioria, os extratos fúngicos foram virucidas muito potentes contra o DENV-2. Há diversos mecanismos pelos quais extratos ou substâncias puras

podem desempenhar atividade virucida, como por exemplo, o mascaramento de receptores celulares usados pelos vírus para entrar nas células. Gescher e colaboradores (2011) demonstraram que a atividade virucida do extrato de *Myrothamnus flabellifolia*, rico em polifenóis, contra o HHV-1 ocorre pela sua interação com alguns aminoácidos das glicoproteínas virais, principalmente a glicoproteína D, necessária para entrada na célula. De fato, Zhu e colaboradores, (2004), propuseram que a atividade virucida de compostos é em decorrência da desintegração e solubilização do envelope viral, ou de alterações químicas, degradação e mascaramento das proteínas de adsorção.

Extratos fúngicos ativos

89 extratos ativos contra DENV-2: **IS de** > 1,1 a > 500

11 extratos ativos contra ZIKV: **IS de** > 1,0 a 4,0

11 extratos ativos contra DENV, ZIKV e CHIKV: 6 obtidos de fungos de solo da Antártica

Propriedade virucida dos extratos ativos*

49 extratos virucidas contra DENV-2 e inativos contra ZIKV*

(Extratos dos fungos de solo: *Penicillium* sp., *Aspergillus chevalieri*, *Talaromyces calidicanus*, *Fusarium nygamai* e *Clonostachys rogersoniana* crescidos; extratos de fungos endofíticos de *Piper* sp. e *M. ernestii*)

2 não virucidas contra DENV-2 e ativos contra ZIKV*
(extratos de *P. chrysogenum* e endofítico não identificado de *Usnea* sp.)

1 extrato virucida contra DENV-2 e ativo contra ZIKV*
(extrato de *Pseudogymnoascus* sp.)

*Nenhum extrato fúngico foi testado em ensaio virucida contra ZIKV até o momento

6.5 Identificação de substâncias antivirais pelo fracionamento biomonitorado de extratos ativos por UPLC-HRMS/MS

Uma das estratégias para a descoberta de produtos naturais bioativos é a triagem de extratos em um ensaio biológico seguida do fracionamento biomonitorado dos extratos ativos para identificar frações contendo substâncias ativas.

No presente trabalho, o ensaio do MTT foi utilizado para triagem da atividade antiviral de milhares de extratos contra DENV-2, ZIKV e CHIKV e também utilizado para a detecção da atividade antiviral das mais de 6.000 frações geradas no processo de fracionamento biomonitorado de 46 extratos ativos para descoberta de substâncias antivirais contra ZIKV e/ou DENV-2. Assim, 15 extratos vegetais e 20 extratos fúngicos foram selecionados para o fracionamento biomonitorado visando isolar e identificar as substâncias responsáveis pela atividade antiviral contra DENV-2. Todos os 15 extratos vegetais e 9 extratos fúngicos também foram submetidos ao fracionamento biomonitorado contra ZIKV (Figura 11).

Via de regra, foram priorizados os fracionamentos (item 5.16) dos extratos com massa disponível na extratoteca e que apresentaram os maiores IS e/ou menores valores de CE_{50} . Portanto, inicialmente o fracionamento de extratos ativos seguiu a lógica de se trabalhar em microescala, ou seja 50 μ g do extrato bruto foram submetidos à cromatografia HPLC ou UPLC, coletando-se 80 frações em cada experimento que foram testadas contra DENV-2 e/ou ZIKV.

Diversas estratégias para desreplicação/identificação dos princípios ativos foram adotadas: i) a comparação automática com os bancos de espectros locais e da web (e.g., MassBank); ii) simulação de espectros e fragmentações usando o MassFrontier v.5 e; iii) comparação de árvores de fragmentos pela plataforma Sirius (WEB).

Após o fracionamento analítico em HPLC ou UPLC (50 μ g de amostra) usado para a identificação das frações ativas e para a desreplicação, foi necessário o fracionamento em maior escala visando isolar/purificar o princípio ativo para a elucidação da sua estrutura. Todavia, vários fungos, quando recultivados, deixaram de produzir o princípio ativo. Várias tentativas de se recuperar a produção das substâncias ativas pelos fungos foram tentadas, sendo todas elas sem sucesso.

Esse processo resultou na identificação de 12 substâncias em extratos fúngicos e 31 substâncias em extratos vegetais. Várias substâncias por nós isoladas/identificadas tiveram sua estrutura química elucidada mediante análise de dados espectrais e tiveram suas CE_{50} e CC_{50} determinadas contra ZIKV, DENV-2 e/ou CHIKV.

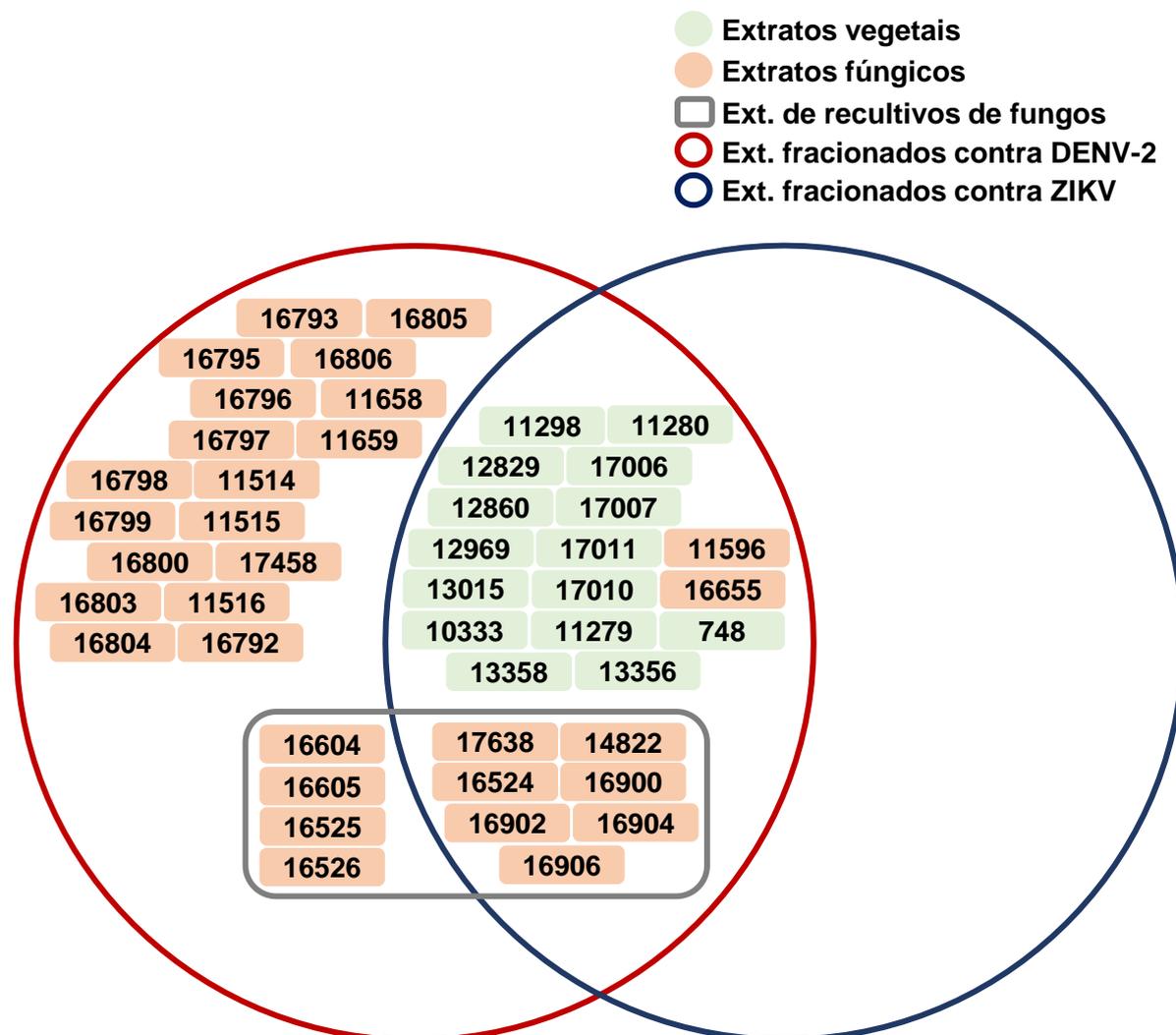


Figura 11 - Extratos vegetais e fúngicos fracionados e testados contra DENV-2 e ZIKV. Dentro do círculo vermelho estão os 31 extratos fúngicos e os 15 extratos vegetais que foram fracionados e suas frações testadas contra DENV-2. Os 15 extratos de plantas e os 9 extratos fúngicos que tiveram suas frações testadas também contra ZIKV ocupam a intersecção com o círculo azul. Os extratos dentro dos limites do retângulo foram obtidos de recultivos de fungos.

6.5.1 Extratos fúngicos fracionados

Trinta e um extratos fúngicos foram fracionados e suas respectivas frações testadas contra DENV-2. Nove desses extratos também tiveram suas frações testadas contra ZIKV (Figura 11). Os extratos dos meios de cultura sem fungo (extrato controle) também foram fracionados.

Nenhuma das frações do EX11514, extrato obtido do isolado UFMGCB6035, do EX11516, obtido do fungo UFMGCB6037 e dos extratos EX11515 e EX17458, obtidos do *Penicillium chrysogenum*, foram ativas contra o DENV-2.

Como já mencionado, a atividade virucida seletiva contra DENV-2 e inatividade contra ZIKV dos extratos de 5 espécies de fungos isolados do solo (*Penicillium* sp., *Aspergillus chevalieri*, *Talaromyces calidicanus*, *Fusarium nygamai* e *Clonostachys rogersoniana*) levanta vários questionamentos sobre as diferenças entre tais vírus, uma vez que ambos são membros do mesmo gênero da família *Flaviviridae*. Assim, decidimos fracionar os 12 extratos obtidos do cultivo destas 5 espécies de fungos assim como os extratos dos meios de cultura.

As frações ativas dos extratos EX16792 e EX16793, do *A. chevalieri*, foram eluídas com água no início da cromatografia em fase reversa. A análise dos espectros de massa destas frações sugeriu que se trata de mistura complexa de compostos polares e ionizados de difícil identificação.

As frações eluídas aos 0,5 - 1min (fração 2) no fracionamento dos 3 extratos do *T. calidicanus* (EX16795, EX16796 e EX16797) foram ativas contra DENV-2. As análises dos espectros de massa obtidos destas frações sugerem a presença de lisina, carnitina, 2,4-diidroxiprolina e também da tirosina. A fração 16, também ativa contra DENV-2, não apresentou nenhum sinal no LC-UV-MS.

Da mesma forma, a fração 2 dos extratos do *F. nygamai*, (EX16798, EX16799 e EX16800), apresentou atividade antiviral contra DENV-2. Os espectros de massa da fração 2 do EX16798 sugeriram a presença da carnitina, desidrocarnitina e tirosina. Entretanto, análises dos espectros de massas da fração 2 dos extratos EX16799 e EX16800 indicaram a presença da 2,4-ciclo-histidil-prolina e da ulvalina, respectivamente. As frações 15, 16 e 17 do EX16799, sem sinal no LC-UV-MS, apresentaram baixa atividade antiviral contra DENV-2.

Resultados similares foram obtidos para o EX16803, do *C. rogersoniana*. As frações 2, 15 e 16 foram ativas contra DENV-2. Nos espectros da fração 2 foi possível identificar compostos polares e ionizados em uma mistura contendo dois íons majoritários, a ulvalina e a betaína lipídica. As frações 15 e 16, também ativas contra DENV-2, não emitiram sinais para análise no LC-UV-MS.

Os extratos obtidos do *Penicillium* sp., EX16804, EX16805, EX16806, foram fracionados e mais uma vez, as frações 2 e 16 foram ativas no ensaio contra DENV-2. Os espectros de massa obtidos na fração 2 desses 3 extratos, mostraram apenas

uma mistura complexa de substâncias polares e ionizadas. A fração 16 de cada um dos extratos EX16804 e EX16805, também foi parcialmente ativa contra DENV-2, no entanto, não há sinais no LC-UV-MS para identificação das possíveis substâncias presentes.

Em suma, embora a massa desses extratos tenha sido insuficiente para o isolamento de substâncias presentes na frações ativas, as análises sugeriram as seguintes substâncias: di-hidroxi prolina, tirosina, betaína, ulvalina, lisina, carnitina, desidrocarnitina e 2,4-ciclo-histidil-prolina. Deve-se ressaltar que todas estas substâncias não foram retidas pela fase estacionária, no caso a sílica ligada a octadecilsilano (ODS ou RP18), e foram eluídas no “front” da cromatografia na forma de misturas complexas, o que dificultou a sua identificação estrutural. Portanto, a identidade inequívoca de tais substâncias deverão ser confirmadas pelo uso de outras técnicas de separação.

A di-hidroxi prolina é um tipo de hidroxiprolina que assim como a tirosina, são aminoácidos não essenciais. A hidroxiprolina é um componente importante do colágeno proteico e níveis elevados na urina e/ou soro estão normalmente associados à degradação do tecido conjuntivo.

A tirosina está associada à síntese de proteínas e tecido muscular do corpo, sendo também um precursor dos neurotransmissores noradrenalina e dopamina. Não há qualquer relato de atividade antiviral para esse aminoácido.

A betaína é conhecida por sua capacidade de proteger o fígado de substâncias tóxicas (MUKHERJEE, 2011) e já foi descrita como antiviral, *in vitro* e *in vivo*, contra o vírus da hepatite B, além de diminuir a resistência viral à lamivudina e ao IFN- α , drogas usadas no tratamento desta hepatite (ZHANG et al., 2016).

Quanto à lisina, há estudos desde 1952 que a descrevem como inibidor da replicação viral de HHV (MILLER; FOULKE, 1984). Acredita-se que o equilíbrio lisina-arginina possa afetar a expressão do HHV. Proteínas ricas em arginina são necessárias para a replicação do HHV, sendo um indutor da síntese de proteínas do capsídeo viral, enquanto a lisina inibe competitivamente sua síntese (GRIFFITH, 1981; GABY, 2006).

A carnitina é uma molécula que está envolvida no transporte de ácidos graxos para as mitocôndrias (FLANAGAN et al., 2010). É conhecido que o HCV se utiliza do metabolismo dos ácidos graxos nos hepatócitos infectados, aproveitando as gotículas lipídicas para a montagem do vírus (MIYANARI et al., 2007). Estudos recentes

mostram que a carnitina exibe atividade anti-HCV por apresentar atividade antiadipogênica em células infectadas pelo HCV, diminuindo o tamanho e quantidade das gotículas lipídicas e conseqüentemente inibindo a montagem do vírus (TSUKUDA et al., 2017). Vários trabalhos têm mostrado que durante a infecção viral, a modulação dos níveis de colesterol facilita a entrada, a formação dos complexos de replicação, a montagem e egresso dos flavivírus, sendo mais crucial para o DENV (LEE et al., 2008; CARRO; DAMONTE, 2013; REYES-DEL VALLE et al., 2014; OSUNA-RAMOS; REYES-RUIZ; DEL ANGEL, 2018). No entanto, a dependência de colesterol nas etapas de entrada e pós-entrada de DENV em várias linhas celulares de mamíferos (LEE et al., 2008; SOTO-ACOSTA et al., 2013; MARTÍNEZ-GUTIERREZ et al., 2014), não parece imprescindível, já que o colesterol não é necessário para a multiplicação do DENV em células Vero (ACOSTA et al., 2009; CARRO; DAMONTE, 2013). Embora haja vários estudos sobre o papel do colesterol na infecção por flavivírus, principalmente em relação ao DENV, sua importância para a infecção por ZIKV ainda é desconhecida.

É interessante observar que mesmo estando presentes em extratos de *T. calidicanus*, *F. nygamai* e *C. rogersoniana* que apresentaram excelente atividade virucida contra DENV-2, nenhuma das substâncias identificadas já foi descrita com tal atividade.

6.5.1.1 Extratos dos fungos endofíticos UFMGCB5797 e UFMGCB5779

Os extratos EX11658 e EX11659 obtidos de isolados fúngicos do cacto *M. ernestii*, foram muito ativos contra DENV-2. O EX11658 apresentou CE_{50} contra DENV-2 de 7,4 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 13,5 e o EX11659 apresentou CE_{50} de 10,5 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 9,5 (tabela 2). Todavia, quando recultivados os extratos foram inativos contra DENV-2. No entanto, a extração desses novos extratos foi feita utilizando o solvente diclorometano em lugar do etanol, o que poderia justificar a perda da atividade. Portanto, foi feita uma nova cultura, também em pequena escala (10 placas de Petri), sendo que desta vez a extração foi realizada com etanol, originando os extratos EX16525 com CE_{50} de 3,1 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 32,2 e o EX16526 com CE_{50} de 4,9 $\mu\text{g/mL}$ e IS 20,4 (tabela 2) nos ensaios contra DENV-2.

Para o fracionamento biomonitorado, os fungos foram recultivados em maior escala e submetidos à extração com etanol, seguido de liofilização. A cultura do isolado UFMGCB5779 forneceu 17 gramas de extrato seco (EX16604), enquanto o isolado UFMGCB5797 forneceu cerca de 15 gramas do EX16605. O controle do meio de cultura gerou 500 mg de extrato (EX16870). Esses extratos mantiveram a atividade antiviral contra DENV-2 e mostraram CE_{50} em torno de 2 $\mu\text{g/mL}$ com respectivos IS de > 47,6 e > 71,4. No entanto, o extrato controle do meio de cultura (EX16870) também foi muito ativo contra DENV-2 e mostrou CE_{50} de 11,7 $\mu\text{g/mL}$ e IS de > 8,5 (tabela 2). O fracionamento em microescala do extrato mostrou que a atividade antiviral se concentrava nas frações iniciais da cromatografia em fase reversa, indicando tratar-se de moléculas polares.

Uma alíquota de cada extrato foi suspensa em metanol (10X v/v) e a suspensão agitada em vórtex por 5min. Após centrifugação, somente o *pellet*, ou seja, a fração insolúvel em metanol, foi ativa contra DENV-2. Do mesmo modo, somente as frações aquosas geradas a partir do tratamento do extrato com extração em fase sólida com cartuchos sep-pak C18 foram ativas. O mesmo foi observado em frações geradas a partir da extração em fase sólida com resina XAD-4, mostrando que o princípio ativo era muito polar.

Nos experimentos de partição líquido-líquido as frações geradas mostraram os mesmos resultados, ou seja, sendo ativas somente as frações aquosas, polares. Uma alíquota da fração aquosa obtida da partição líquido-líquido foi submetida a cromatografia de filtração em gel, usando-se uma coluna Shodex GS310 de 30 x 2 cm, eluída com água a 4 mL/min e coletando-se 1 fração por minuto. A atividade antiviral contra DENV-2 foi observada nas frações iniciais, entre 10-15min (Figura 12), permitindo inferir que se tratava de macromoléculas de alto peso molecular. De fato, a análise destas frações no espectrômetro de massas de alta resolução indicou que se tratava de uma mistura complexa de polissacarídeos, com picos separados por perdas sucessivas de fragmentos de hexoses. Por outro lado, experimentos de cromatografia em colunas de troca iônica mostraram que as substâncias presentes nestas frações se apresentavam ionizadas negativamente, apontando para a possibilidade de se tratar de polissacarídeos sulfatados.

Uma busca na literatura mostrou que em 1963, Schulze e Schlesinger descreveram a atividade antiviral de polissacarídeos sulfatados contra DENV-2, mostrando que extratos aquosos de ágar inibem o efeito citopático e a formação de

placas de lise por DENV-2, reduzem a patogenicidade, em camundongos injetados com DENV via intracerebral, e a capacidade de hemaglutinação. Essa inibição provou ser devida a uma reação reversível entre partículas virais livres e os polissacarídeos sulfatados (SCHULZE; SCHLESINGER, 1963; SCHULZE, 1964). Os polissacarídeos sulfatados têm cargas negativas e exercem seu efeito inibitório pela interação com as cargas positivas do vírus, prevenindo desse modo, a adsorção e/ou penetração na célula hospedeira (HATCH et al., 1977; EHRESMANN et al., 1979).

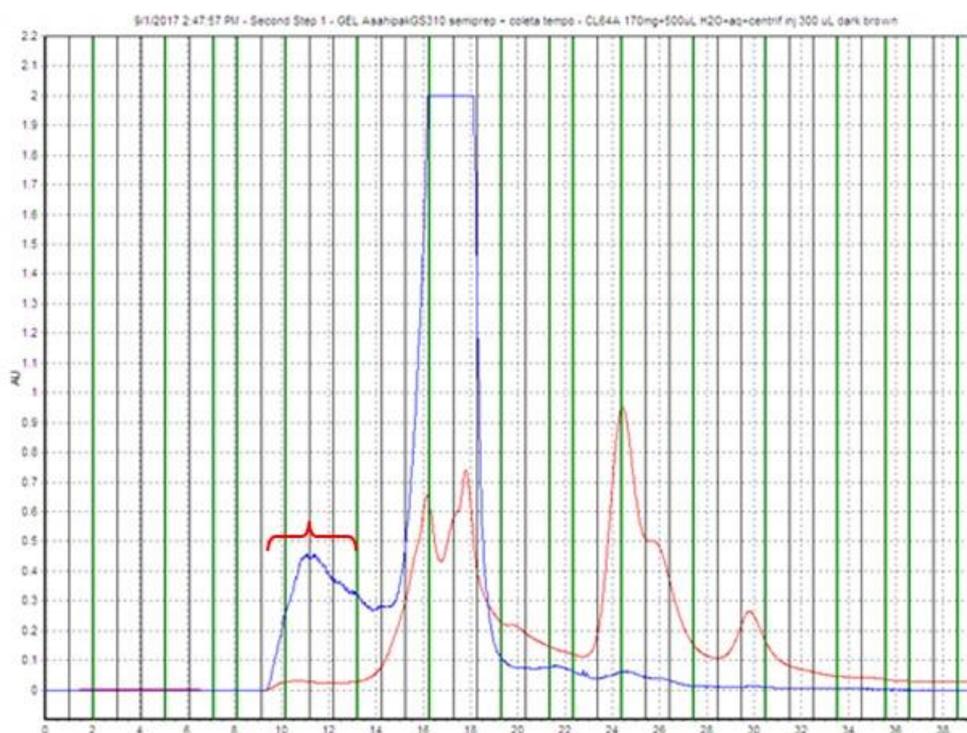


Figura 12 - Cromatograma da fração aquosa da partição (MeOH-água-hexano 5:5:10) do extrato do fungo UFMGCB5797 em coluna de filtração em gel (Asahipak GS310). Traço vermelho do detector UV a 254 nm, traço azul do detector ELSD. A chave vermelha indica a região do cromatograma que corresponde às frações ativas contra DENV-2.

Restava a questão de como o etanol poderia extrair substâncias tão polares e insolúveis em metanol. A resposta veio da revisão dos procedimentos de extração executados pelos nossos colaboradores do ICB – UFMG para esse lote de amostras. O aluno responsável pela extração usou etanol aquoso 60 % na proporção de 1:2 (volume de solvente / volume do meio). Como o meio gelificado é composto de 99 % de água, a mistura extratora acabou sendo o etanol aquoso a 30 %. Com esta proporção de água, a extração de polissacarídeos é possível, e de fato, explicaria a

detecção da atividade antiviral dentre os compostos de alta polaridade e de alto peso molecular; a presença de lâminas transparentes de ágar nos extratos liofilizados e a alta viscosidade das soluções aquosas obtidas, impedindo a filtração ou injeção das amostras no HPLC.

Para confirmar a presença de ágar nos extratos foi feito um extrato de ágar puro usando etanol aquoso a 30 % (EX16977). Esse extrato foi muito ativo contra DENV-2 e apresentou CE_{50} de 0,6 $\mu\text{g/mL}$ e IS de $> 166,6$. Também não apresentou toxicidade em células BHK-21 e/ou Vero até a concentração testada, sendo sua $CC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$. Em vista desse resultado contra DENV-2, foi abortado o estudo dos extratos obtidos dos isolados fúngicos UFMGCB5797 e UFMGCB5779, assim como dos demais extratos obtidos de fungos endofíticos do *M. ernestii*.

Ademais, é possível também que tais fungos possam conter outros compostos antivirais ou mesmo produzir polissacarídeos sulfatados, e a cultura em meio líquido, sem ágar, poderá nos dar esta informação. Ressalta-se que em extratos de alguns organismos marinhos como bactérias, algas, esponjas, fungos e corais, já foram isolados polissacarídeos sulfatados (GHOSH et al., 2009; NAKASHIMA et al., 1987).

Um resultado interessante (dados não mostrados) foi que 5 dos extratos fúngicos obtidos de fungos do *M. ernestii* apresentaram $> 50 \%$ de inibição do replicon do vírus da febre amarela em uma linhagem de BHK-21 modificada. Considerando que neste ensaio não há a possibilidade da interação polissacarídeo-vírus, o mecanismo de inibição do replicon deve ser outro. De fato, Gonzalez e colaboradores, 1987, descobriram que a carragenina, um polissacarídeo de algas, não tem efeito na ligação ou penetração do HHV nas células hospedeiras, mas a síntese de proteínas virais no interior das células foi inibida. Do mesmo modo, outros polissacarídeos sulfatados de algas inibem seletivamente a enzima transcriptase reversa do HIV e sua replicação *in vitro* (BIESERT et al., 1988; MOELLING; SCHULZE; DIVINGER, 1989), ou a formação de novas partículas de HHV (HULEIHEL, 2001).

Por outro lado, é interessante notar que todos os extratos provenientes de fungos endofíticos do *M. ernestii* foram inativos contra o ZIKV, assim como o extrato de ágar (tabela 2) testado em várias concentrações. No entanto, há estudos que mostram que há interação entre a proteína E do ZIKV com glicosaminoglicanos, uma categoria de polissacarídeos, sendo que essa interação é mais pronunciada com oligossacarídeos altamente sulfatados, como no caso da heparina comercial (KIM et al., 2017).

6.5.1.2 Extratos do *Penicillium chrysogenum*

O fungo *Penicillium chrysogenum* foi isolado de uma alga coletada na Antártica. O extrato desse fungo (EX11596) foi ativo contra DENV-2, ZIKV e CHIKV nos ensaios de triagem. Esse extrato foi não virucida e apresentou CE_{50} de 6,5 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 6,0 contra DENV-2. A CE_{50} contra ZIKV foi de 12,1 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 3,4. Quando fracionado por UPLC-HRMS, as frações 34 e 35, eluídas entre 17 e 18min, (Figura 13), foram ativas, com 52 e 31 % de proteção contra DENV-2, respectivamente.

A análise dos espectros HRMS² indicou que a substância presente nessas frações era a cicloheximida (CHX). A confirmação foi feita por comparação dos tempos de retenção e dos espectros MS-MS obtidos a partir de amostra padrão comercial. A CHX foi ativa contra DENV-2 (CE_{50} de 0,07 μM) e ZIKV (CE_{50} de 0,16 μM). A CC_{50} para células BHK-21 foi de 0,97 μM e Vero de 0,65 μM , resultando em IS de 13,8 contra DENV-2 e 4,1 contra ZIKV (tabela 3).

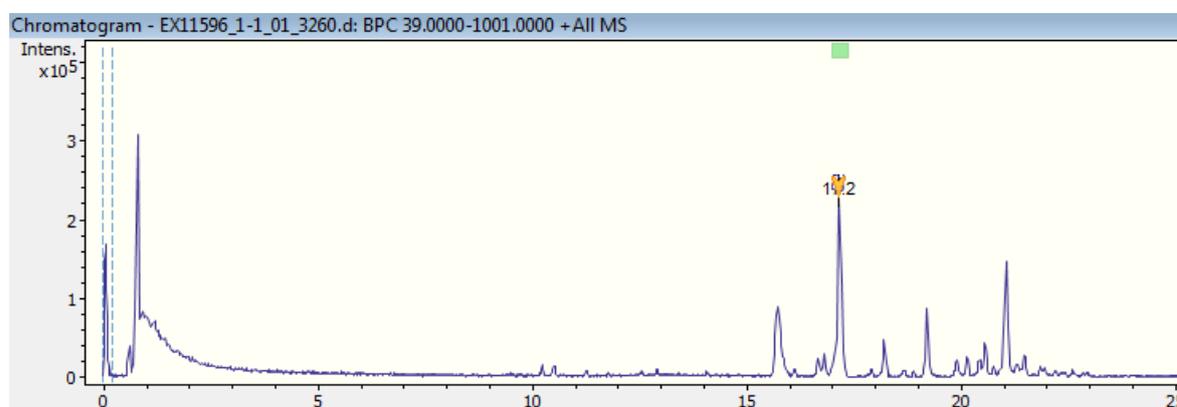


Figura 13 - Fracionamento biomonitorado do extrato EX11596, obtido do fungo *Penicillium chrysogenum*. Parte do cromatograma obtido em UPLC analítico, empregando-se um fluxo de 0,4 mL/min, coletando-se 80 frações de 200 μL em placa de 96 poços. A atividade antiviral das frações foi testada contra DENV-2 e as frações 34 e 35, correspondendo àquelas eluídas aos 17,2min (seta amarela), foram ativas contra DENV-2.

A CHX é um composto da família de produtos naturais de poliketóides contendo glutarimida, amplamente conhecido na literatura, e tem sido usado por décadas como um inibidor da tradução em eucariotos (HUANG et al., 2011). A CHX é produzida por várias espécies de bactérias do gênero *Streptomyces* (YIN et al., 2014; YANG et al., 2017) mas ainda não há nenhum relato de produção por fungos. A CHX apresenta atividade inibitória contra diversos vírus de RNA, como o vírus da Floresta de Semliki

(SFV), um arbovírus isolado na África Central (FRIEDMAN; GRIMLEY, 1969), HIV-1 (IRVINE et al., 1998), vírus influenza A (MARK et al., 1979; JI et al., 2010), vírus coxsackie B, enterovírus (EV71), reovírus (WATANABE et al., 1967), sendo a inibição da síntese proteica como seu principal mecanismo de ação antiviral. Além desses, também apresenta atividade antiviral contra vírus DNA como o HHV, HCMV (citomegalovirus humano) e vírus da hepatite B (GUO et al., 2009; 2010; JI et al., 2010).

Outro cultivo em pequena escala do *P. chrysogenum*, gerou o extrato EX16524 que foi inativo contra o ZIKV e apresentou CE_{50} de 5,9 $\mu\text{g/mL}$ contra DENV-2. A CC_{50} desse extrato foi de $> 100 \mu\text{g/mL}$ para células BHK-21 e também para células Vero. Diferentemente do EX11596, o EX16524 foi virucida contra o DENV-2 (tabela 2). No fracionamento do EX16524, somente a fração 2 eluída no tempo de 0,5-1 min foi ativa, com média de 75,5 % de proteção contra DENV-2 na concentração de 50 $\mu\text{gEq/mL}$. Por se tratar da fração inicial da cromatografia, a presença de diversos compostos polares não permitiu a proposição de nenhuma fórmula molecular com base nos dados de HRMS. Tendo em vista os resultados obtidos anteriormente com os fungos isolados de *Melocactus*, a contaminação desse extrato por ágar pode ser aventada.

Diferentes condições de cultivo do *P. chrysogenum* foram testadas usando diversos meios de cultura: sólidos e líquidos, com e sem agitação e em diferentes temperaturas de incubação (item 5.8). Tais ensaios geraram quarenta e dois extratos incluindo os respectivos controles. Todos foram submetidos aos ensaios antivirais e de citotoxicidade em concentrações de 100 - 0,8 $\mu\text{g/mL}$ contra DENV-2 e ZIKV, assim como nas respectivas células hospedeiras. Todos se mostraram inativos contra ZIKV e apenas os extratos EX16900, EX16902, EX16904 e EX16906 foram fracamente ativos contra DENV-2 (tabela 2). Esses 4 extratos, quando fracionados por UPLC, não apresentaram frações com atividade antiviral significativa, isto é, acima de 30 % de proteção contra DENV-2 e/ou ZIKV na concentração equivalente a 125 $\mu\text{g/mL}$.

A meleagrina, identificada por desreplicação e comparação com amostra comercial, foi o componente majoritário presente nestes extratos (Figura 14), sendo, todavia, inativa contra DENV-2, ZIKV e CHIKV. As respectivas CC_{50} para células BHK-21 e Vero foram 2,6 e 2,9 μM (tabela 3).

A meleagrina é um alcaloide indólico que foi inicialmente isolada do *Penicillium meleagrinum*, sendo também encontrada em outras espécies de fungos como o *P. chrysogenum*. Entre outras funções biológicas, já foi reportada como sendo um

inibidor da redutase proteica bacteriana e da biossíntese de ácidos graxos e crescimento de *Staphylococcus aureus* (NOZAWA; NAKAJIMA, 1979; ZHENG, et al., 2013). Também foi mostrada como sendo um inibidor do crescimento de linhagens celulares de câncer de mama humano sem afetar linhagens não tumorigênicas (MADY et al., 2016). Até o momento, não há menção de atividade antiviral para a meleagrina.

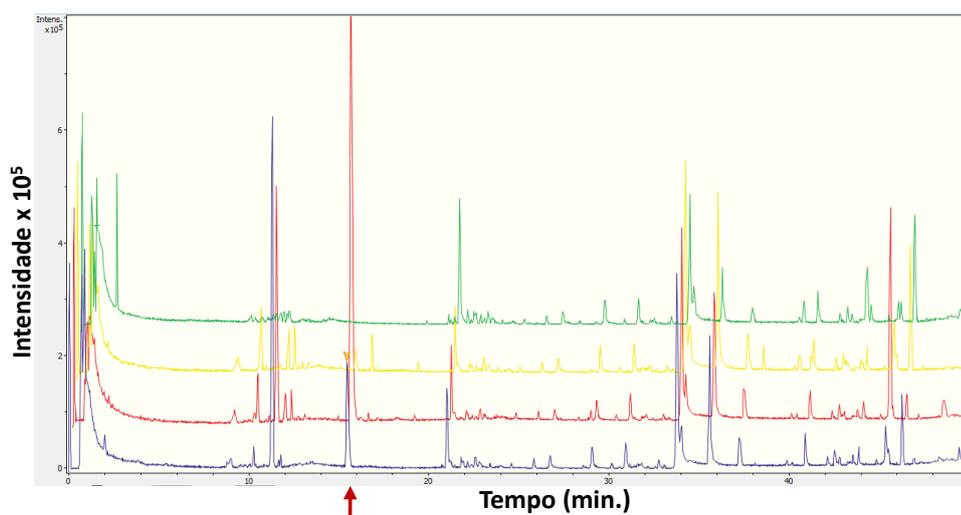


Figura 14 - Identificação da meleagrina em extratos de *P. chrysogenum*. Estão representados os cromatogramas dos extratos de *P. chrysogenum*: EX16902 (azul escuro), EX16904 (vermelho), EX16906 (amarelo) e do extrato do meio de cultura (verde). A seta vermelha (14min) indica o pico relativo à meleagrina.

O fracionamento biomonitorado do extrato original do *P. chrysogenum* (pós-isolamento) mostrou que a atividade antiviral foi observada numa fração na qual foi identificada a cicloheximida. Todavia, apesar do *P. chrysogenum* ser sabidamente resistente a essa substância, não há relato na literatura de que o fungo seja capaz de produzi-la. Dezenas de extratos foram obtidos de culturas deste fungo em diferentes condições (item 5.8), mas em nenhuma delas a CHX foi detectada. Portanto, a presença dessa substância no extrato original foi interpretada como uma contaminação acidental de origem química ou microbiológica do cultivo original. Por outro lado, a meleagrina, uma substância inativa nos ensaios com os vírus, estava presente em todos eles.

Uma análise por UPLC-MS e comparação dos cromatogramas dos extratos obtidos do recultivo *P. chrysogenum* com o extrato original desse fungo, o EX11596,

mostra que a CHX está presente apenas no EX11596 (Figura 15). Não se pode, portanto, descartar a contaminação química ou biológica desse extrato.

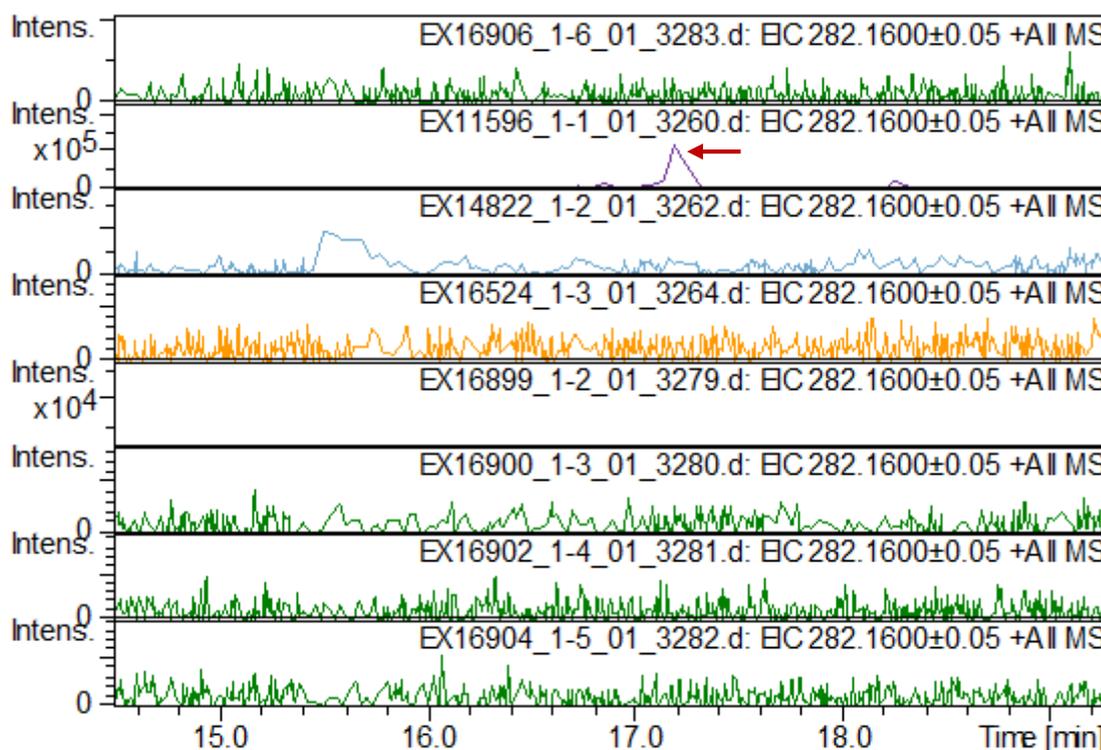


Figura 15 - Cromatogramas de íons com m/z 282 obtidos por UPLC-HRMS de extratos obtidos de recultivo do fungo *P. chrysogenum*. Apenas o extrato EX11596, original do *P. chrysogenum*, apresentou o íon correspondente à cicloheximida aos 17,2min; indicado pela seta vermelha.

6.5.1.3 Extratos do *Pseudogymnoascus* sp.

O fungo endofítico *Pseudogymnoascus* sp. foi isolado de um molusco marinho também da Antártica e do seu cultivo foi obtido o extrato EX16655. Esse extrato apresentou CE_{50} de 24,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e IS de 3,7 contra DENV-2 e CE_{50} de 12,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e IS de 3,5 contra ZIKV.

No primeiro fracionamento do EX16655, a fração 43, eluída aos 21,5min como mostrado no cromatograma (Figura 16A), foi ativa contra DENV-2 apresentando média de 63 % de proteção. Análises das substâncias presentes nessa fração possibilitou identificar uma substância majoritária com M+H 421,0797 e M+Na 443,0611. Essa substância, pelo perfil do envelope isotópico observado no espectro de massa de alta resolução, contém um átomo de cloro e a provável fórmula

$C_{19}H_{17}ClN_2O_7$ (Figura 16B). Uma busca no Scifinder mostrou 4 compostos (Figura 17) já descritos na literatura com essa fórmula molecular: o composto 2 é um derivado da biotransformação da tetraciclina e os demais são sintéticos (Figura 17), indicando que este derivado clorado, minoritário no extrato, pode ser inédito.

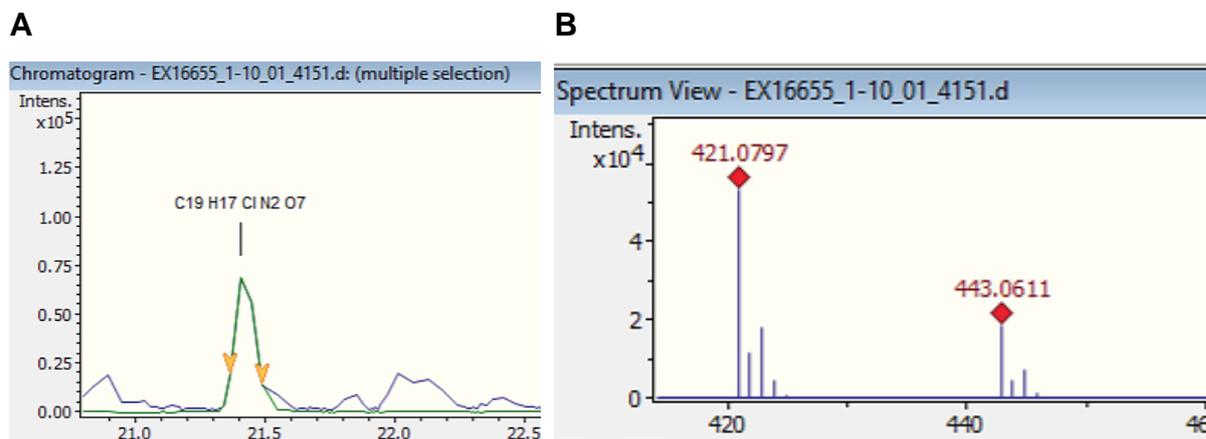


Figura 16 - Cromatogramas e espectros obtidos do fracionamento biomonitorado do extrato de *Pseudogymnoascus* sp. (A) Parte do cromatograma obtido em UPLC analítico empregando-se um fluxo de 0,4 mL/min. O cromatograma no tempo de 21,5min corresponde à fração ativa, contendo a substância majoritária. Em (B) é mostrado o espectro da possível substância ativa com M+H 421,0797 e M+Na 443,0611 correspondendo à fórmula molecular $C_{19}H_{17}ClN_2O_7$.

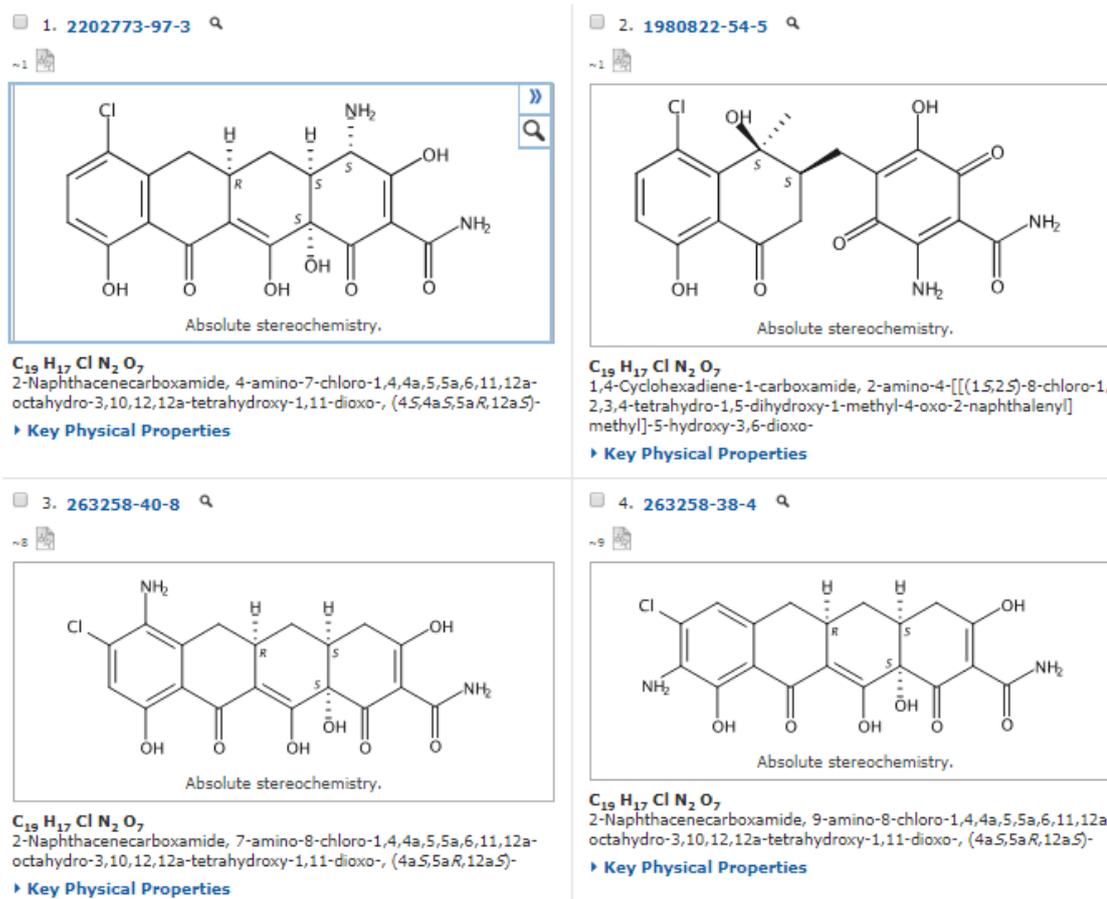


Figura 17 - Possibilidades de fórmula estrutural para o composto de fórmula molecular C₁₉H₁₇ClN₂O₇ e com M+H 421,0797 e M+Na 443,0611. Busca feita no Scifinder mostrando as 4 possibilidades para o composto citado. O composto 2 é um derivado de biotransformação da tetraciclina e os demais são sintéticos.

A tetraciclina é um antibiótico produzido por espécies de *Streptomyces* por via semissintética através da remoção do cloro da clortetraciclina por hidrogenação (HARVEY, 1990). Alguns estudos na literatura mostram a atividade antiviral de derivados da tetraciclina contra os DENV1-4. Os mecanismos de ação reportados foram inibição da adsorção, bloqueando a entrada do vírus e inibição da replicação pós-infecção viral por inibição da serino-protease desses vírus (ROTHAN et al., 2013; 2014). Ressalta que tal extrato demonstrou atividade virucida contra DENV-2 e não foi testado contra ZIKV. Não foram encontrados estudos da tetraciclina ou derivados contra ZIKV. Mas devido às similaridades entre esses dois vírus, podemos usar o conhecimento que temos acerca do DENV para direcionar alguns estudos sobre ZIKV.

Um novo cultivo do fungo gerou o EX17638 (tabela 2). O fracionamento por UPLC seguido de bioensaios com DENV-2 e ZIKV evidenciou que o composto estava

presente e conferia proteção de 100 % contra o DENV-2 e 43 % contra o ZIKV, quando testada na concentração de 125 µgEq/mL. No entanto, a substância estava presente numa proporção bem menor do que no extrato original. Além disso, a quantidade de extrato produzida foi insuficiente para permitir o isolamento do composto. Apesar do fungo apresentar crescimento extremamente lento, o que dificulta a obtenção de extrato, está em andamento o recultivo desse fungo para a produção do derivado clorado em quantidades suficientes para a sua purificação e identificação estrutural.

Em resumo, as análises dos espectros de massa de alta resolução das frações de extratos fúngicos com ação antiviral sugeriram a presença de 12 substâncias, a saber: di-hidroxiprolina (1), tirosina (2), betaína (3), ulvalina (4), lisina (5), carnitina (6), desidrocarnitina (7), 2,4-ciclo-histidil-prolina (8), polissacarídeos sulfatados (9), substância clorada não identificada $C_{19}H_{17}ClN_2O_7$ (10), meleagrina (11) e cicloheximida (12). Apenas as duas últimas tiveram a sua estrutura confirmada por comparação com amostras comerciais autênticas. Três delas foram obtidas para os ensaios, sendo polissacarídeos sulfatados (isolados do ágar) ativos para o DENV-2 e inativos contra o ZIKV e o CHIKV, a meleagrina inativa contra DENV-2, ZIKV e CHIKV e a cicloheximida ativa contra o DENV-2 e contra o ZIKV.

Substâncias identificadas em extratos fúngicos

Lisina, carnitina, 2,4-diidroxiprolina e tirosina
T. calidicanus (frações ativas contra DENV-2)

Carnitina, desidrocarnitina, tirosina, 2,4-ciclo-histidil-prolina e ulvalina
F. nygamai (frações ativas contra DENV-2)

Ulvalina e betaína lipídica
C. rogersoniana (frações ativas contra DENV-2)

Substância $C_{19}H_{17}ClN_2O_7$
Pseudogymnoascus sp. (frações ativas contra DENV-2 e ZIKV)

Polissacarídeos sulfatados derivados do ágar do meio de cultura
Ativos contra DENV-2 e inativos contra ZIKV

Cicloheximida
Ativa contra DENV-2 e contra o ZIKV

Meleagrina
Inativa contra DENV-2, ZIKV e CHIKV

6.5.2 Fracionamento biomonitorado de extratos vegetais

Os 15 extratos vegetais selecionados para o fracionamento biomonitorado foram obtidos de espécies de plantas das seguintes famílias: Malpighiaceae, Annonaceae, Rubiaceae, Ochnaceae, Myrtaceae, Fabaceae, Orchidaceae e Amaryllidaceae, sendo a atividade antiviral de todas as frações obtidas (cerca de 2.500 frações) testadas contra DENV-2 e ZIKV.

A família **Malpighiaceae** é discutida no item 6.3. O extrato EX11298 obtido do caule de uma de suas espécies, a *Banisteriopsis laevifolia*, foi virucida contra DENV-2 e contra o ZIKV. A CE_{50} desse extrato contra DENV-2 foi de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ e contra ZIKV de 48,9 $\mu\text{g/mL}$, com respectivos IS de 2,9 e $> 2,0$ (tabela 1). O fracionamento por UPLC desse extrato não gerou frações ativas contra DENV-2 e nem contra o ZIKV.

Annonaceae: O extrato EX12829, obtido do fruto de *Duguetia furfuraceae*, apresentou CC_{50} de $> 100 \mu\text{g/mL}$ tanto em células BHK-21 quanto em células Vero. A CE_{50} e IS determinados contra DENV-2 foi de 9,8 $\mu\text{g/mL}$ e $> 10,2$; e contra o ZIKV foi de 9,8 $\mu\text{g/mL}$ e $> 2,9$. Esse extrato foi virucida contra DENV-2 e contra ZIKV e não apresentou frações ativas contra esses vírus, não sendo possível identificar as substâncias responsáveis pela atividade antiviral demonstrada. A *Duguetia furfuracea*, popularmente conhecida como "sofre-do-rim-quem-quer" e "araticum-seco", é um arbusto que ocorre em várias regiões do Brasil. Na medicina popular a infusão de suas folhas e galhos é usada no tratamento de reumatismo e cólica renal (CAROLLO et al., 2006a, RODRIGUES; CARVALHO, 2001), enquanto que o pó da semente é misturado com água para o tratamento de pediculose (SILBERBAUER-GOTTSBERGER, 1981/82). Estudos anteriores têm descrito atividades biológicas desta planta com ação citotóxica (TOLEDO et al., 2006) tripanossomicida, antiplasmódica, antitumoral e antileishmania (CAROLLO et al., 2006a; FISCHER et al., 2004, MESQUITA et al., 2007; SILVA, 2009).

Rubiaceae: O extrato EX12860, obtido da flor de *Palicoureae* sp., demonstrou atividade antiviral e virucida contra DENV-2 e ZIKV e baixa toxicidade em células Vero e BKH-21, sendo a CC_{50} de $> 100 \mu\text{g/mL}$. Esse extrato apresentou CE_{50} de 16,5 $\mu\text{g/mL}$ e IS de $> 6,0$ contra DENV-2. No ensaio contra o ZIKV foi menos ativo, sendo sua CE_{50} de 62,4 $\mu\text{g/mL}$ e IS de $> 1,6$ (tabela 1). No fracionamento biomonitorado desse extrato não houve frações ativas contra DENV-2 e ZIKV. Rubiaceae é uma família com prevalência em regiões tropicais e subtropicais e compreende mais de 650

gêneros e 13.000 espécies (DELPRETE, 2004). Amplamente distribuída no Brasil, está presente em quase todas as formações naturais, como mata atlântica, cerrado, caatinga, restingas, floresta amazônica, matas serranas e de altitude, tabuleiros, dunas e campos abertos (DELPRETE, 2004; LIMA et al., 2010). No nosso trabalho, extratos de várias espécies dessa família foram identificados em ensaios de triagem, e aqueles das espécies *Galianthe* sp. e *Palicourea* sp., foram confirmados para sua atividade antiviral e virucida contra DENV-2 e ZIKV. Há poucos estudos de atividade antiviral de espécies de Rubiaceae, no entanto, a *Psychotria ipecacuanha* Stokes é uma fonte rica do alcaloide emetina (WIEGREBE, et al., 1984), descrita como tendo ação antiviral contra todos os sorotipos de DENV (LOW et al., 2009).

Ochnaceae: O extrato EX12969 obtido da flor de *Ouratea* sp., foi ativo e virucida contra DENV-2 e contra ZIKV. A CE_{50} contra DENV-2 foi de 5,2 $\mu\text{g/mL}$, IS de 9,9 e a CC_{50} em células BHK-21 foi de 51,7 $\mu\text{g/mL}$. A CE_{50} contra ZIKV foi de 26,1 $\mu\text{g/mL}$, IS de 3,8 e a CC_{50} em células Vero de > 100 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 1). Das frações obtidas, a fração 2 apresentou 40 % de proteção contra DENV-2, no entanto, as análises dos espectros de HRMS² dessa fração mostraram apenas uma mistura de compostos polares ou ionizáveis de difícil interpretação.

Myrtaceae: O extrato EX13015, obtido do caule de *Eugenia klotzschiana*, foi ativo apenas contra DENV-2, com CE_{50} de 5,1 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 6,5 (tabela 1). Não foi possível a análise dos espectros da fração 2, que foi fracamente ativa contra DENV-2. Análises subsequentes da atividade antiviral desses extratos são necessárias, uma vez que espécies dessa família já foram relatadas como antivirais contra HHV e HIV (LOCHER et al., 1995; 1996).

Fabaceae: O extrato EX10333, obtido da folha de *Piptadenia* sp., foi ativo e virucida contra DENV-2, com CE_{50} de 0,9 $\mu\text{g/mL}$, IS de 25,6 e CC_{50} em células BHK-21 de 23,1 $\mu\text{g/mL}$. Esse extrato foi menos ativo contra ZIKV e não foi avaliado quanto a sua atividade virucida para esse vírus. A CE_{50} contra ZIKV foi de 7,4 $\mu\text{g/mL}$, IS de 5,2 e a CC_{50} de 38,5 $\mu\text{g/mL}$ em células Vero (tabela 1). O EX10333 não apresentou frações ativas contra DENV-2 ou ZIKV.

Diversos são os motivos pelos quais tais extratos não geraram frações ativas, entre eles, podemos citar a possibilidade de degradação do princípio ativo durante o processo de fracionamento; e/ou da possibilidade de que a atividade antiviral exercida pelo extrato, tenha sido em decorrência de um efeito sinérgico de duas ou mais

substâncias presentes nos extratos, que podem ter sido separadas no processo de fracionamento.

6.5.2.1 Extratos de *Chamaecrista* sp. (Fabaceae)

Fabaceae é uma das maiores famílias de plantas e abrange aproximadamente 695 gêneros e 19.000 espécies (GIULIETTI et al., 2005). Nessa família são incluídas várias espécies vulgarmente conhecidas como leguminosas. A presença de terpenos, fenilpropanoides, flavonoides e biflavonoides já foi relatada em algumas de suas espécies (BAHIA et al., 2005). Diversos estudos relatam propriedades medicinais para espécies de Fabaceae, como atividade antitumoral (MULLER; KRAUS; FRANZ, 1989), antitérmica, anti-inflamatória (CHOPRA et al., 1956), vermífuga e antisséptica (MENDONÇA; ONOFRE, 2009) e antiviral contra o MAYV (SPINDOLA et al., 2014).

Os extratos EX11279 e EX11280 foram obtidos respectivamente do fruto e do caule de *Chamaecrista* sp. O extrato EX11280 foi ativo e não virucida para os dois vírus testados, sendo a CE_{50} de 7,8 $\mu\text{g/mL}$ contra o DENV-2 e $> 100 \mu\text{g/mL}$ contra o ZIKV, com respectivos IS de 20,5 e $> 1,0$. Curiosamente, o extrato EX11279 foi virucida para ambos os vírus e apresentou CE_{50} contra DENV de 2,9 $\mu\text{g/mL}$ e contra ZIKV de 53,7 $\mu\text{g/mL}$, com respectivos IS de 11,9 e $> 1,9$ (tabela 1). Além de ativo contra o DENV-2 e o ZIKV, o EX11279 também se mostrou ativo contra o CHIKV na concentração a 20 $\mu\text{g/mL}$.

A fração 3 do EX11279 e EX11280 foi ativa e com 30 e 42 % de proteção contra DENV-2 e ZIKV, respectivamente. Essa fração 3 foi eluída no tempo 1 a 1,5min e apresentou cerca de 40 % de toxicidade apenas em células BHK-21, não sendo tóxica para células Vero.

A análise do cromatograma e espectros das possíveis substâncias contidas na fração 3 do EX11280, apontou para um íon com m/z 325, com provável fórmula molecular de $C_{12}H_{20}O_{10}$. A pesquisa nas plataformas DEREPEP-NP e Sirius apontou os compostos presentes como **derivados de dissacarídeos de agarobiose e similares**. A análise dos dados de dissecação UHPLC-HRMS revelou um composto principal com m/z 242,1498 e provável fórmula molecular $C_{11}H_{19}N_3O_3$. A pesquisa no DEREPEP-NP sugeriu dois compostos, a **leuhistina e a plumbagina A**, compatíveis com a perda de

água detectada nos espectros de fragmentação. A análise dos espectros de fragmentos *in silico* no Sirius também lista a leuhistina dentre as possíveis estruturas.

A agarobiose é um dissacarídeo composto por estruturas alternadas de D-galactose e 3,6-anidro-L-galactopiranosose. As unidades básicas de agarobiose compõem a agarose. E as unidades de agarose, que é um polissacarídeo neutro, compõem o ágar isolado de certas algas marinhas. Até o momento não há relatos de atividade biológica da agarobiose.

Quanto à leuhistina, sua função biológica conhecida é a inibição de aminopeptidases (YOSHIDA et al., 1991). Trata-se de um grupo de enzimas presentes em diferentes compartimentos celulares de eucariotos e procariotos e que catalisam hidrólises de resíduos de aminoácido na posição N-terminal de peptídeos e proteínas. As aminopeptidases desempenham importantes funções como a degradação de proteínas, manutenção do *pool* de aminoácidos utilizados para a síntese *in novo* de proteínas, geração de energia metabólica e reciclagem de cofatores (GONZALES; ROBERT-BAUDOY, 1996). Até o momento, não há estudos que demonstrem que a leuhistina possui atividade antiviral.

A plumbagina é um naftoquinona isolada pela primeira vez de raízes da planta medicinal *Plumbago zeylanica* L., também conhecida como Chitrak, usada há mais de 2.500 anos para tratamentos de várias doenças na medicina indiana. A plumbagina também está presente na noz preta e em outras plantas medicinais. Atividades biológicas anticancerígenas e antiproliferativas em modelos animais e em cultura celular (GOMATHINAYAGAM et al., 2008; SAND et al., 2011), além de potente efeito antileishmania e antitripanossoma (SALOMÃO et al., 2013), já foram demonstrados. Entre outras atividades biológicas, a plumbagina já foi demonstrada como antifúngica e antiviral contra o HCV (HASSAN et al., 2016) e Influenza (CHAVAN et al., 2016). No entanto, ainda não foi demonstrada como antiviral contra DENV, ZIKV ou CHIKV.

6.5.2.2 Extratos de *Habenaria petalodes* (Orchidaceae)

A família Orchidaceae apresenta mais de 25.000 espécies distribuídas em quase todo o globo (SUTTLEWORTH et al., 1982). O potencial ornamental das flores é uma das características principais dessa família. Alguns gêneros dessa família fornecem produtos alimentícios, como a baunilha, (espécies do gênero *Vanilla*),

medicinais e outros produtos utilizados na indústria (HOEHNE, 1949). Várias espécies dessa família demonstraram diversas atividades biológicas como antirreumáticas, anti-inflamatórias, anticancerígenas, hipoglicêmicas, antimicrobianas, anticonvulsivas, neuroprotetoras, antivirais entre outras (GUTIERREZ, 2010). A atividade antiviral demonstrada contra HIV, Influenza, CMV (BALZARINI et al., 1991; 1992) e DENV (QIU et al., 2007) foi atribuída a uma série de carboidratos ramificados com manoses e, no caso do DENV, a polissacarídeos dextrano sulfatados. Uma grande quantidade de compostos químicos como alcaloides, derivados do bibenzilo, flavonoides, fenantrenos, terpenoides e vitanolídeos (lactonas esteroidais) têm sido isolados de espécies dessa família (GUTIERREZ, 2010).

O extrato EX748 foi obtido do caule de *H. petalodes* e devido a alta toxicidade, a atividade antiviral desse extrato contra DENV-2 e ZIKV foi identificada somente em concentrações próximas de 1,0 µg/mL. No entanto, o IS desse extrato para ambos os vírus foi muito baixo, sendo de 1,7 e 1,3 contra DENV-2 e ZIKV, respectivamente. Como apresentaram alta toxicidade, suas frações foram testadas na concentração de 1,25 µgEq/mL. Nessa concentração não houve frações ativas contra DENV-2 e nem contra ZIKV. O segundo fracionamento foi feito na concentração de 25 µgEq/mL e as frações 79 e 80, que correspondem à “lavagem” da coluna usando ACN pura, apresentaram proteção contra DENV-2 de 64,5 e 67 %, respectivamente. Essas frações não apresentaram toxicidade nessa concentração, sendo apenas a fração 77 com 84 % de toxicidade em células BHK-21. Análises do cromatograma e espectros das frações 79 e 80, mostraram uma mistura complexa de compostos apolares que não puderam ser identificados. A análise dos espectros MS² de alta resolução dos componentes com picos UV mais intensos, feita pelo Sirius, indica a possibilidade destas substâncias possuírem um núcleo porfirínico, ou seja, um anel tetrapirrólico que geralmente acomoda um íon metálico.

Na tentativa de se obter melhor resolução das substâncias apolares, foi feito um fracionamento aumentando o tempo de corrida para se obter uma melhor separação dos compostos. Assim, a fração 24 foi ativa com cerca de 40 % de proteção contra DENV-2 e também contra ZIKV. No entanto, essa mesma fração apresentou 75 % de toxicidade em células BHK-21 e 50 % em células Vero. Na fração 24, correspondente ao tempo de coleta de 11,5 a 12min, foram identificados os íons com m/z 355 (C₂₁H₃₈O₄), m/z 279 (C₁₈H₃₀O₂), m/z 473 (C₂₈H₄₀O₆). Buscas nas plataformas

DEREP-NP e Sirius sugerem várias substâncias, entre elas: **ésteres de glicol de ácidos graxos, ácidos graxos** e similares, e **vitanolídeos**.

As frações 23 e 33 desse novo fracionamento apresentaram acima de 70 % de toxicidade tanto em células Vero quanto em células BHK-21. A análise de componentes dessas frações sugerem a presença dos prováveis íons com m/z de 307 (fração 23) e m/z 353 (fração 33), com fórmulas moleculares de $C_{20}H_{34}O_2$ e $C_{19}H_{38}O_4$, respectivamente. Com base nas fórmulas estruturais, o DEREPE-NP e Sirius sugerem **terpenoides, ésteres de ácidos graxos e ésteres etílicos de ácidos graxos**, presentes na fração 23, e **ésteres de glicol de ácidos graxos ou similares** na fração 33.

Desde 1960, mais de 700 vitanolídeos têm sido isolados em diversas famílias de plantas. Essa classe de compostos já foi demonstrada como antileishmania, antitripanossoma e antiproliferativa (SUN et al., 2017; LIMA et al., 2018), mas não como antivirais, principalmente contra DENV-2 e/ou ZIKV.

Em relação aos ácidos graxos, há estudos que demonstram o seu efeito antiviral. Thormar e colaboradores, 1987, demonstraram que a gordura do leite humano tem efeitos antivirais contra vírus envelopados. Embora o efeito antiviral com ácidos graxos saturados de cadeia curta tenha ocorrido somente em concentrações mais altas testadas, os ácidos graxos saturados de cadeia média e insaturados de cadeia longa foram muito ativos contra o vírus da estomatite vesicular (VSV) e também contra o HHV-1. Os monoglicerídeos desses ácidos graxos também foram muito ativos, isto é, numa concentração 10 vezes menor que a dos ácidos graxos livres. Em outro estudo, foi demonstrado que monoglicerídeos e álcoois insaturados com cadeia de 16 ou 18 carbonos são inativadores potentes do HHV-2 e de bacteriófagos em baixíssimas concentrações (0,2 μ M) não tóxicas (SANDS; AUPERIN; SNIPES, 1979). O mecanismo de ação demonstrado foi que os ácidos graxos desintegram o envelope viral das partículas virais. O mesmo fenômeno foi observado em culturas de células incubadas com leite humano armazenado, resultando em lise e em morte celular (THORMAR et al., 1987).

O extrato da *H. petalodes*, antiviral contra DENV-2 e ZIKV, não apresentou atividade virucida em concentrações não tóxicas e também foi inativo contra o CHIKV. Curiosamente, o primeiro fracionamento do extrato gerou frações ativas e não tóxicas e não foi possível a identificação dos compostos. Os fracionamentos posteriores indicaram frações ativas e tóxicas contendo substâncias como ácidos graxos e

similares. Nossos resultados sugerem que diferentes substâncias antivirais com diferentes perfis de toxicidade podem estar presentes nesse extrato, o qual continuará sendo investigado.

Extratos de Habenaria petalodes (Orchidaceae)

Ésteres de glicol de ácidos graxos, ácidos graxos e similares, vitanolídeos, terpenoides, ésteres de ácidos graxos e ésteres etílicos de ácidos graxos

6.5.2.3 Extratos de *Hippeastrum glaucescens* (Amaryllidaceae)

A família Amaryllidaceae compreende 58 gêneros e mais de 870 espécies (JUDD et al., 2002). Amarilidáceas são fontes ricas de alcaloides que apresentam várias propriedades biológicas, incluindo ação analgésica, citotóxica (LIN et al., 1995), antitumoral, antiviral (LEWIS, 1990; 2002; DOPKE et al., 1995; ANTOUN et al., 1993), imunestimulante e antifúngica (THI-NGOC-TRAM et al., 2002). No nosso estudo, vários extratos de *Hippeastrum* foram ativos em concentrações muito baixas e alguns não apresentaram efeito virucida. Entretanto, todos apresentaram toxicidade para as células hospedeiras em concentrações muito próximas daquelas em que apresentaram um aparente efeito protetor, resultando em baixos IS.

Em um estudo da atividade antiviral de alcaloides isolados de amarilidáceas, Gabrielsen e colaboradores, 2012, observa que, embora os alcaloides dessa família apresentem alta toxicidade, novos membros dessa classe precisam ser sintetizados ou isolados, na expectativa de que mantenham a atividade antiviral com toxicidade diminuída nas células hospedeiras. Sendo assim, mesmo ciente da toxicidade desses extratos, eles foram submetidos à técnicas de fracionamento biomonitorado com o objetivo de identificar as substâncias antivirais.

Os extratos de flores e bulbos de *H. glaucescens* apresentaram atividade antiviral contra DENV-2 e ZIKV e não apresentaram ação virucida. O extrato EX13356 foi obtido da flor e os extratos EX13358 e EX17006 foram obtidos do bulbo dessa planta. O EX13356 apresentou baixa toxicidade com $CC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ para células

BHK-21 e Vero. A atividade antiviral, desse último, foi detectada em concentrações mais altas, sendo CE_{50} de 27,9 $\mu\text{g/mL}$ e IS de $> 3,6$ contra o DENV-2, e CE_{50} de 61,6 $\mu\text{g/mL}$ e IS de $> 1,6$ contra o ZIKV. Os extratos obtidos de bulbos foram muito ativos: o extrato EX13358 apresentou CE_{50} de 3,9 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 2,2 contra DENV-2 e CE_{50} de 11,0 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 4,8 contra ZIKV. A CC_{50} desse extrato em células BHK-21 foi de 8,6 $\mu\text{g/mL}$ e em células Vero foi de 53,0 $\mu\text{g/mL}$. O extrato EX17006 apresentou CE_{50} de 6,2 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 1,4 contra DENV-2 e CE_{50} de 10,6 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 4,2 contra ZIKV. A CC_{50} em células BHK-21 foi de 8,4 $\mu\text{g/mL}$ e em Vero foi de 44,1 $\mu\text{g/mL}$.

Extrato de flores do *H. glaucescens*: Inicialmente, o extrato EX13356 foi fracionado em HPLC analítico com as frações correspondentes aos picos em 20,1; 21,1 e 27,3min apresentando 80 % de proteção contra DENV-2 (Figura 18).

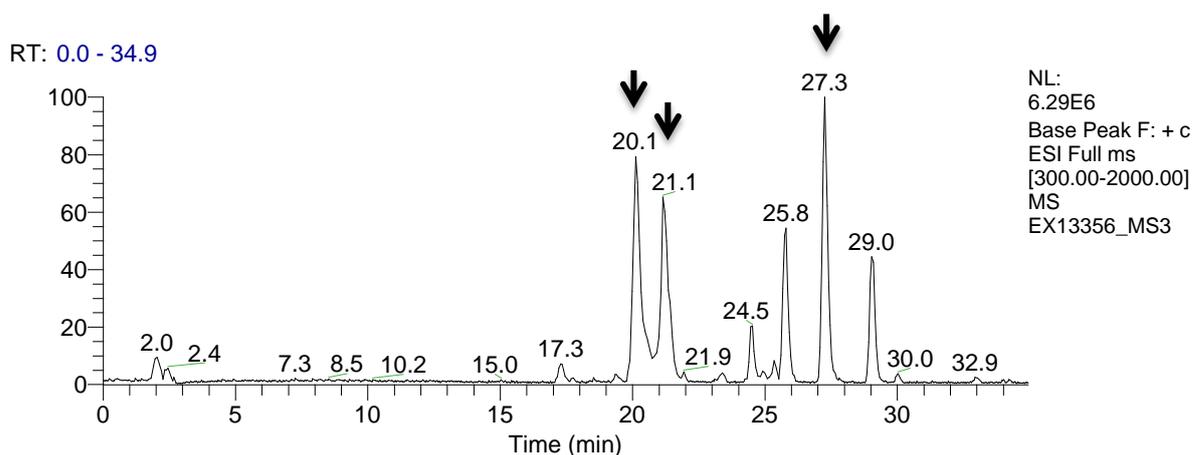


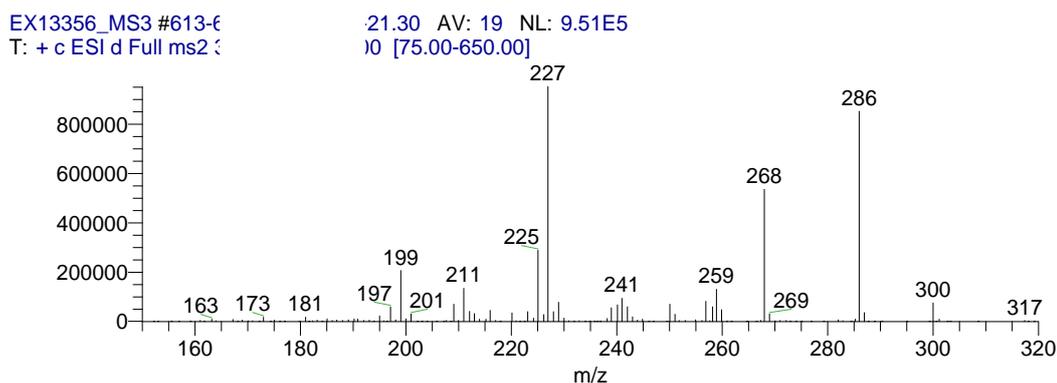
Figura 18 - Cromatograma obtido no fracionamento do extrato de flores (EX13356) de *H. glaucescens*. Cinquenta microgramas do extrato em HPLC analítico (coluna LUNA PFP 150 x 2 mm, partículas de 3 μm), fluxo de 0,4 mL/min, frações de 0,2 mL e coleta de 80 frações de 200 μL em placa de 96 poços. Os picos com tempo de retenção 20,1; 21,1 e 27,3 (setas) correspondem às frações ativas contra DENV-2 e ZIKV.

Os espectros de massa de alta resolução do componente majoritário que elui aos 20,1min permitiu identificar a fórmula molecular como $C_{17}H_{19}NO_5$. Dentre as substâncias com essa fórmula molecular descritas no SciFinder, a única que poderia gerar o fragmento com m/z 227 observado no espectro (Figura 19A), e previsto pelo software MassFrontier v.5 é a pancratina.

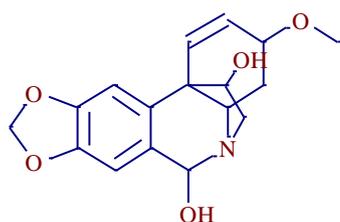
A pancratina também é conhecida como hemantidina e já foi reportada pela sua ação anti-inflamatória (ÇITOGLU; TANKER; GUMUSEL, 1998), analgésica, com maior atividade do que aquela reportada pelo ácido acetilsalicílico (TANKER et al., 1996), e também como antiparasitária (HERRERA et al., 2001; SENER et al., 2003).

A atividade antiviral da pancratina ainda não foi reportada, e embora tenha sido identificada nesse trabalho como um componente majoritário de uma fração ativa contra DENV-2, a sua estrutura ainda não foi confirmada e também não foi testada contra o ZIKV e CHIKV.

A

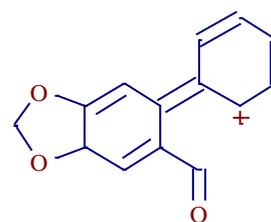


B



Pancratina $[M+H]^+$ 318,1336

C



Fragmento com m/z 227,0703

Figura 19 - Proposta de identificação do componente eluindo aos 20,1min como pancratina: (A) MS^2 do íon com m/z 318 da substância que elui aos 20,1min, tentativamente identificada como pancratina com base na presença do íon diagnóstico com m/z 227. (B) Fórmula estrutural da pancratina e (C) fórmula estrutural do fragmento gerado.

O espectro de massas de baixa resolução do pico que eluiu aos 21,1min mostrou a presença do íon $[M+H]^+ = 332$, cuja fragmentação (MS^3) está mostrado na Figura 20. A análise desta fração (21,1min) por UPLC-HRMS registrou o íon $[M+H]^+ = 332,1496$ ($C_{17}H_{19}NO_5$), indicativo da presença da pretazetina (Figura 20). Essa hipótese foi confirmada pela análise do espectro de RMN de uma fração purificada (2,0 mg) a partir da cromatografia de aproximadamente 200 mg do extrato e comparação com dados da literatura (Moraes, 2016), conforme tabela J.

A pretazetina foi ativa contra o DENV-2 e contra o ZIKV, mas foi inativa contra o CHIKV. A CE_{50} determinada contra DENV-2 foi de 0,8 μM e IS de 6,8; enquanto

contra ZIKV, apresentou CE_{50} de 1,9 μM e IS de 3,8. A CC_{50} foi 5,4 μM em células BHK-21 e 7,2 μM em células Vero. A pretazetina não apresentou atividade virucida contra DENV-2 e nem contra o ZIKV (tabela 3).

A pretazetina é um alcaloide e foi isolado pela primeira vez da planta *Narcissus tazetta* por Furusawa e colaboradores em 1976. Entre as várias atividades biológicas, a pretazetina já foi demonstrada como sendo um inibidor da DNA polimerase dependente de RNA (transcriptase reversa) do vírus da mieloblastose aviária (PAPAS et al., 1973) e do vírus da leucemia de Rauscher em células com infecção aguda (FURUSAWA et al., 1978). Há trabalhos que mostram sua atividade antiviral contra HHV-1 (RENARD-NOZAKI et al., 1989), contra flavivírus, tais como o JEV, YFV e também contra o bunyavírus, contra o vírus Punta Toro e contra o vírus da febre do Vale do Rift (GABRIELSEN et al., 1992).

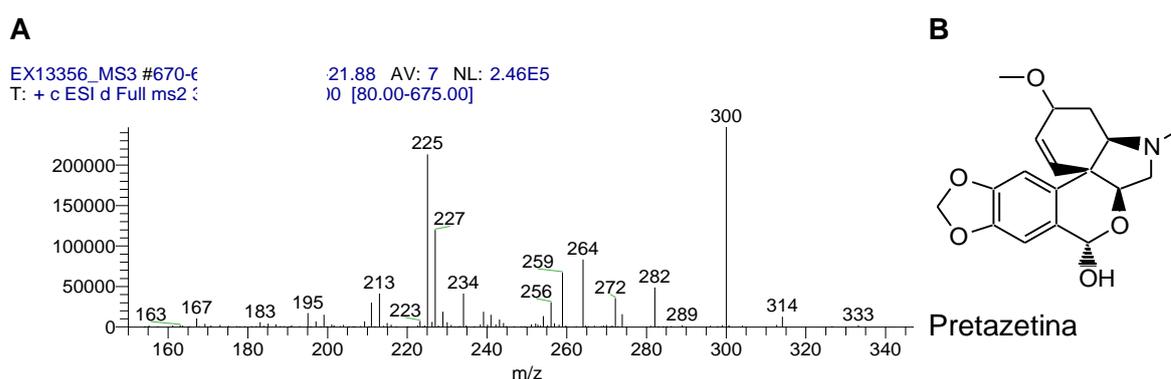


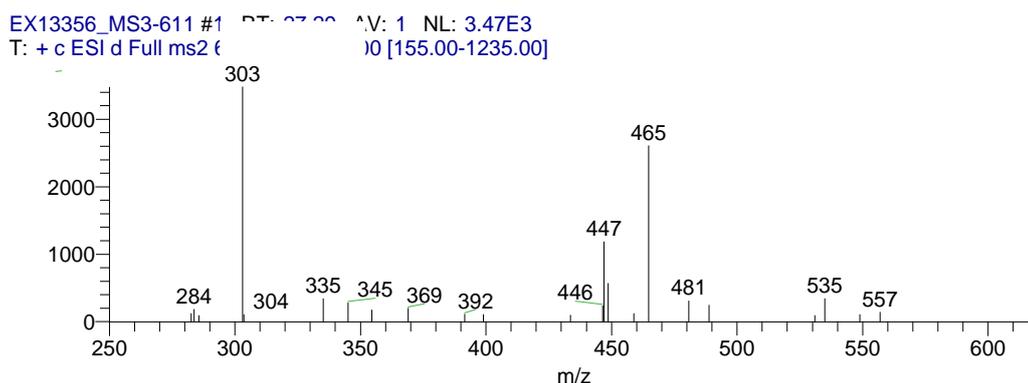
Figura 20 - Identificação da pretazetina: MS do componente majoritário da fração ativa do EX13356 no tempo de retenção de 21,1min. (A) MS_3 de baixa resolução do íon com m/z 332 da substância eluída aos 21,1min, correspondendo à pretazetina. (B) Fórmula estrutural da pretazetina, confirmada por isolamento e espectros de RMN.

Na fração eluída aos 27,3min; a presença majoritária da rutina foi indicada pela análise e comparação dos espectros de massas de alta resolução com os obtidos da amostra comercial, mostrado na Figura 21. Todavia, a rutina comercial foi inativa contra DENV-2, ZIKV e CHIKV (tabela 3) e não apresentou toxicidade em células BHK-21 e Vero até a concentração de 300 μM .

A rutina ou rutosídeo (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rhamnoglucoside) é um flavonol encontrado abundantemente em plantas, como a flor de maracujá, trigo-sarraceno, chá e maçã (KREFT; KNAPP; KREFT, 1997). O nome rutina deriva-se da planta *Ruta graveolens* e já foi demonstrada como responsável por várias atividades

farmacológicas, incluindo ação anti-oxidante, citoprotetora, vasoprotetora, anti-carcinogênica, neuroprotetiva e também cardioprotetora (JAVED et al., 2012, RICHETTI et al., 2011, NASSIRI-ASL et al., 2010, MELLOU et al., 2006, TRUMBECKAITE et al., 2006, SCHWEDHELM et al., 2003, JANBAZ; SAEED; GILANI, 2002, LA CASA et al., 2000).

A



B

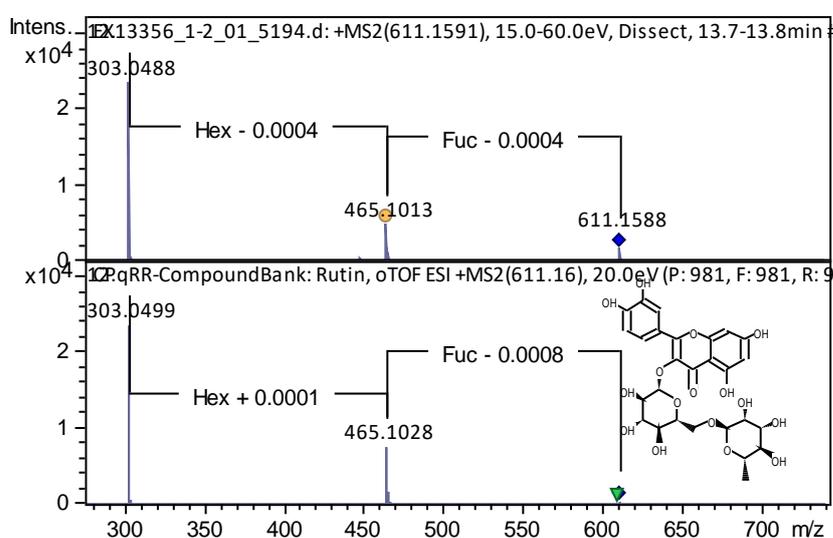


Figura 21 - Identificação e confirmação da rutina. HRMS do componente majoritário da fração ativa do extrato EX13356 no tempo de retenção de 27,3min. (A) Espectro MS³ de baixa resolução obtido da fração eluída aos 27,3min. (B) Espectros MS² de alta resolução do íon com m/z 611,1591 (superior) e do íon com m/z 611,1600 da rutina comercial (inferior).

Bose e colaboradores, 2017, em um estudo utilizando “*virus like-particles-HCV*”, demonstraram que a rutina tem efeito antiviral sobre o HCV. Nesse caso, o mecanismo de ação demonstrado foi a inibição da etapa de adsorção de VLP-HCV em células Huh-7, isto é, o bloqueio da fase inicial da infecção viral. Embora o HCV

pertença a mesma família do DENV-2 e ZIKV, ZANDI e colaboradores, 2011, demonstraram que a rutina não apresentou atividade antiviral quando testada contra DENV-2, e de fato, isso foi corroborado no nosso trabalho. A inatividade da rutina, principalmente contra o DENV-2, sugere que componentes minoritários da fração ativa poderiam ser responsáveis pela atividade anti-DENV.

Extratos de bulbos do *H. glaucescens*: O extrato EX13358 foi fracionado em UPLC analítico e as frações 2, 13 e 14 foram ativas contra ZIKV. Tais frações apresentaram respectivamente, 26, 48 e 16 % de proteção e correspondem aos dois picos coloridos em azul no cromatograma (Figura 22).

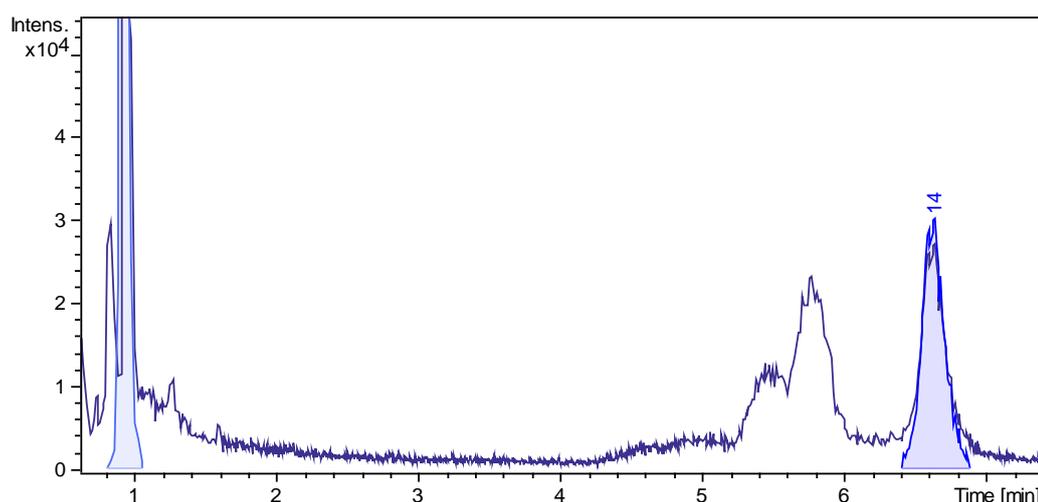


Figura 22 - Cromatogramas do fracionamento do extrato EX13358, obtido de bulbos de *H. glaucescens*. Os picos do cromatograma em azul correspondem às frações ativas. A atividade antiviral contra o ZIKV foi detectada na fração 2, eluída no tempo de 0,5 a 1min e nas frações 13 e 14, com tempo de eluição de 6,4 a 6,8 minutos.

Foi possível sugerir a partir da análise dos espectros MS^2 , que a substância presente na fração 2 com $[M+H]^+$ 288,1226 e fórmula molecular $C_{16}H_{17}NO_4$, seria a licorina. Essa hipótese foi reforçada após comparação do tempo de retenção e dados espectrais obtidos a partir de uma amostra comercial da licorina (Figura 23). Assim, os espectros mostrados na Figura 23 apresentam alta similaridade dos picos mais intensos, sugerindo tratar-se da mesma substância, ou seja, a licorina. O espectro da substância padrão foi obtido com energia de colisão de 20 eV enquanto o da fração

que elui após 1min foi obtido com um gradiente de energia de colisão entre 15 e 60 eV, o que justifica a presença de outros fragmentos registrados neste espectro. A cromatografia do padrão comercial nas mesmas condições cromatográficas usadas para o fracionamento do extrato mostra que a licorina também elui da coluna em 1min.

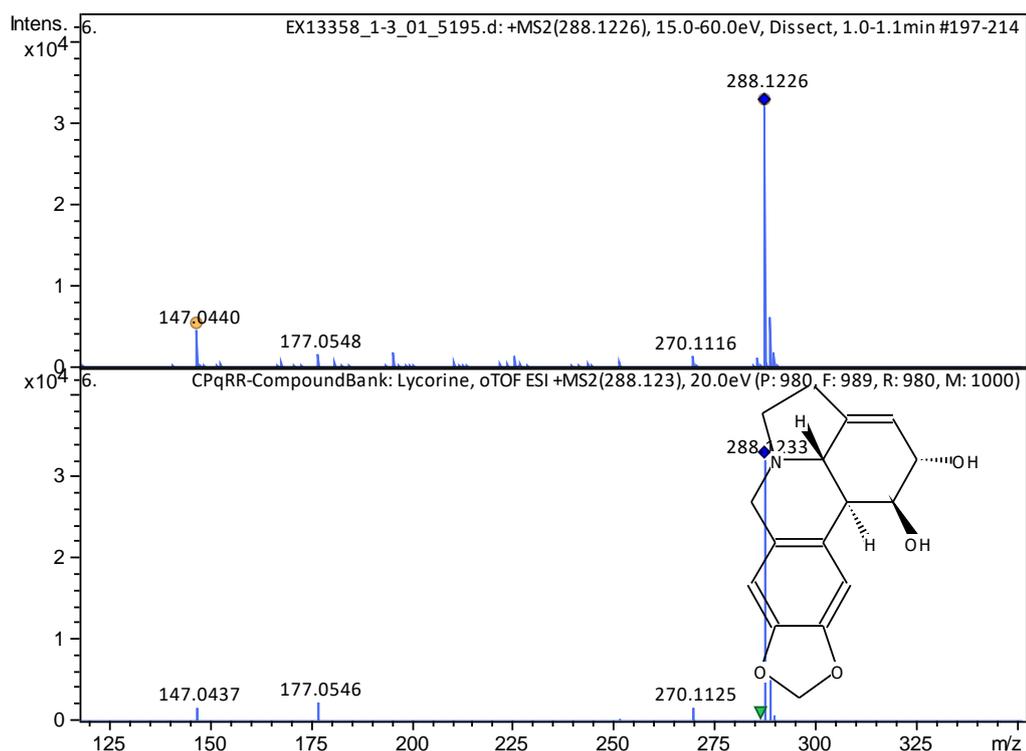


Figura 23 - Identificação da licorina. Comparação do espectro MS² do íon M+H da fração com tempo de retenção de 1min (painel superior, obtido com gradiente de energia de colisão de 15-60 eV) com o espectro MS² do padrão comercial (painel inferior) registrado no banco de dados do espectrômetro e obtido com energia de colisão de 20 eV.

A licorina foi ativa contra DENV-2, ZIKV e inativa contra o CHIKV, e apresentou alta toxicidade em células BHK-21 e Vero, com respectivas CC₅₀ de 4,3 µM e 3,4 µM. Em ensaios virucidas, ficou comprovado que a atividade antiviral da licorina não é devido a efeito virucida sobre os vírus testados. Embora já reportada na literatura quanto à sua atividade contra o DENV, nossos dados são semelhantes aos já descritos, sendo sua CE₅₀ de 0,5 µM e IS de 8,6. A atividade antiviral da licorina contra ZIKV é apresentada pela primeira vez neste trabalho, sendo sua CE₅₀ de 0,9 µM e IS de 3,7 (tabela 3).

A licorina é um dos principais alcaloides encontrados em folhas e bulbos de amarilidáceas (ILAVENIL; KALEESWARAN; RAVIKUMAR, 2010). Foi primeiramente

isolada de *Narcissus pseudonarcissus* em 1877 e sua estrutura foi elucidada em 1956 por Nakagawa e colaboradores. São várias as suas propriedades biológicas relatadas, como atividade anticancerígena (LAMORAL-THEYS et al., 2010), antiplasmódica (CEDRÓN et al., 2010), antitripanossoma (TORIIZUKA et al., 2008), antifúngica (SHEN et al., 2014), anti-inflamatória (ÇITOGLU; TANKER; GUMUSEL, 1998), analgésica (ÇITOGLU et al., 2012) e também antiviral contra o poliovírus (IEVEN et al., 1982), coronavírus associado à síndrome respiratória aguda grave – SARS (LI et al., 2005), herpes simplex-1 (RENARD-NOZAKI et al., 1989) e enterovírus humano 7 (LIU et al., 2011). A licorina e seus derivados possui atividade antiviral *in vitro* contra vários vírus membros da família *Flaviviridae*, como os DENV1-4, WNV, YFV e o JEV. Seu mecanismo de ação demonstrado se dá principalmente pela supressão da síntese de RNA viral (GABRIELSEN et al., 1992; ZOU et al., 2009; MERTENS et al., 2010; WANG et al., 2014) e fracamente pela inibição da tradução de proteínas virais (HE et al., 2015).

Zou e colaboradores, 2009, demonstraram também que a licorina foi inativa contra alphavírus, neste caso, o vírus da encefalite equina ocidental (EEEV). Esse dado corrobora os resultados obtidos da inatividade da licorina contra o CHIKV, vírus pertencente ao mesmo gênero do EEEV. Além disso, no mesmo trabalho, relatam a atividade antiviral da licorina contra DENV, YFV e WNV, em concentrações abaixo de 1,5 μM . De fato, em nossos experimentos a licorina foi ativa contra DENV-2 e ZIKV abaixo de 1,5 μM . Nossos resultados, todavia, contrastam com os reportados sobre a toxicidade da licorina em células Vero. A CC_{50} determinada neste trabalho foi de 3,4 μM , enquanto Zou e colaboradores (2009) reportaram como 24 μM , ou seja, uma concentração 7 vezes maior. No entanto, os autores informam que todos os ensaios antivirais feitos com a licorina foram em concentrações $\leq 1,5 \mu\text{M}$. Embora a sensibilidade celular a determinados compostos possa variar, ainda assim, a diferença observada foi bastante significativa. Neste trabalho, tanto em células BHK-21 quanto em células Vero testadas com a licorina nas concentrações de 10 e 20 μM , observou-se 100 % de morte celular (dados não mostrados). Dentre as concentrações de licorina utilizadas, a melhor proteção observada contra DENV-2, com proteção antiviral e viabilidade celular acima de 90 % foi na concentração de 1,2 μM . Do mesmo modo, contra ZIKV, foi possível observar 80 % de proteção antiviral com 100 % de viabilidade celular na concentração de 1,4 μM .

Ainda em relação à figura 22, a substância eluída aos 6,8min, correspondente às frações 13 e 14, foi isolada em pequena escala (3 mg) e seus espectros de MS² e de RMN (¹H e ¹³C) foram idênticos aos publicados para a pretazetina (tabela J) (Figura 20).

No processo de investigação das substâncias antivirais ativas presentes, o extrato de uma nova coleta de bulbos do *H. glaucescens*, EX17006, apresentou a fração 2 com 23 % de proteção contra DENV-2 e ZIKV, e com 50 % de toxicidade em células Vero e BHK-21. As análises dos compostos presentes nessa fração apontaram a licorina como a substância majoritária em meio a várias outras substâncias não identificadas. Em um segundo fracionamento, as frações 3, 7, 27 e 28 foram ativas contra DENV-2, respectivamente com 20, 62, 43 e 33 % de proteção. A análise dos cromatogramas e espectros demonstrou que a fração 3 era uma mistura complexa contendo o íon [M+H]⁺ 290,1387 com a fórmula molecular C₁₆H₁₉NO₄, possivelmente da pseudo-licorina. Na fração 7, as substâncias majoritárias foram a licorina, a pancracina e a nangustina, e nas frações 27 e 28, foi identificado o íon com [M+H]⁺ 332,1496 com a fórmula molecular C₁₈H₂₁NO₅. No entanto, essa fórmula é compartilhada por pelo menos 10 alcaloides de amarilidáceas, inclusive a pretazetina. Dada a toxicidade destas frações sobre as células, até o momento, não investimos no isolamento ou na obtenção da pseudo-licorina, pancracina e nangustina para confirmação estrutural e avaliação da atividade antiviral das substâncias puras.

A pseudo-licorina foi inicialmente isolada de bulbos da amarilidácea *Lycoris radiata* e demonstrou atividade antiproliferativa contra linhagens de células cancerígenas (VAN GOIETSENOVEN et al., 2010), antiprotozoária contra *Plasmodium falciparum* (OSORIO et al., 2010), indução de apoptose em células de leucemia humana (MCNULTY et al., 2009) e linhagens celulares como neoplasma linfóide, alvéolo pulmonar e hepatomas (SILVA, 2005). Assim como a licorina, a pseudo-licorina também já demonstrou efeitos contra flavivírus como o JEV, o YFV e DENV-4, sendo ativa também contra o *Punta Toro virus* e contra o vírus da febre do Vale Rift (GABRIELSEN et al., 1992).

Até o momento, não há trabalhos que demonstram atividade antiviral da pancracina e nangustina. A literatura relata que a pancracina foi identificada inicialmente nas espécies de plantas *Pancratium maritimum* (WILDMAN; BROWN, 1968) e a nangustina em *Narcissus angustifolius* (LABRAÑA et al., 2002), ambas da família Amaryllidaceae.

No quadro abaixo, estão listadas as substâncias identificadas/isoladas em frações ativas de *H. glaucescens*.

Substâncias identificadas em extratos de flores e/ou bulbos de *H. glaucescens*

Pretazetina (estrutura confirmada): ativa contra DENV-2 e ZIKV; inativa contra CHIKV

Rutina (estrutura confirmada): inativa contra DENV-2, ZIKV e CHIKV

Licorina (estrutura confirmada): ativa contra DENV-2, ZIKV; inativa contra CHIKV

Pancratina, Pseudo-licorina, Pancracina e Nangustina

Ainda sem confirmação de estrutura e da atividade antiviral

6.5.2.4 Extratos de *Hippeastrum puniceum* (Amaryllidaceae)

Os extratos obtidos de diferentes partes do *H. puniceum* foram ativos contra DENV-2 e ZIKV, no entanto, se mostraram pouco seletivos, já que se mostraram tóxicos para as células hospedeiras mesmo em baixas concentrações. Todos os extratos foram de 2 a 3 vezes mais tóxicos em células BHK-21 do que em células Vero. Os extratos obtidos de flores, raízes e bulbos não foram virucidas contra DENV-2 e ZIKV, e foram escolhidos para serem investigados para identificação das substâncias com atividade antiviral.

Extrato de flores do *H. puniceum*: O extrato EX17007 foi muito ativo contra DENV-2, com CE_{50} de 3,1 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 2,8; e contra ZIKV com CE_{50} de 6,8 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 2,7. Esse extrato apresentou CC_{50} de 8,7 $\mu\text{g/mL}$ em células BHK-21 e de 18,2 $\mu\text{g/mL}$ em células Vero (tabela 1). Esse extrato foi ativo nos ensaios de triagem contra o CHIKV e apresentou cerca de 40 % de proteção, mas sua atividade antiviral contra o CHIKV ainda não foi investigada.

Várias frações do EX17007 mostraram atividade antiviral contra o ZIKV. A fração 2 apresentou 50 % de proteção, as frações 17-22 apresentaram 25 a 50 % de proteção e a fração 25 apresentou 43 % de proteção. Na fração 2, correspondente ao tempo de eluição de 0,5 a 1 min, mostrada no cromatograma (Figura 24), a análise do

seu componente majoritário no espectro MS² apresentou o íon [M+H]⁺ 290,1396 e fórmula molecular C₁₆H₁₉NO₄, identificado como sendo provavelmente a pseudo-licorina. Na região correspondente às frações 17-22, no tempo de eluição de 9 a 11min, há compostos minoritários, entre eles o íon [M+H]⁺ 334,1658 com a fórmula molecular C₁₈H₂₃NO₅, compatível com a incartina.

Portanto, com base nas análises dos espectros de massa de alta resolução de frações ativas, foi proposta a presença da incartina em extratos de flores do *H. puniceum*. A incartina foi isolada pela primeira vez da flor de *Lycoris incarnata* (KIHARA et al., 1994) e, até o momento, não foram encontrados trabalhos que demonstram atividades biológicas ou antivirais para essa molécula.

Nas análises da fração 25, correspondente ao tempo de eluição de 12,5min, observa-se espectros de íons majoritários indicando a perda de grupos aldeídos (CH₂O) e com a fórmula molecular C₃₀H₃₇NO₄. Nossas buscas no Scifinder revelaram a presença de produtos naturais com essa fórmula molecular apenas em outras famílias de plantas.

Devido à quantidade insuficiente do extrato na Extratoteca do IRR, não foi possível o isolamento da pseudo-licorina e da incartina para confirmação da estrutura e avaliação da atividade antiviral dessas substâncias.

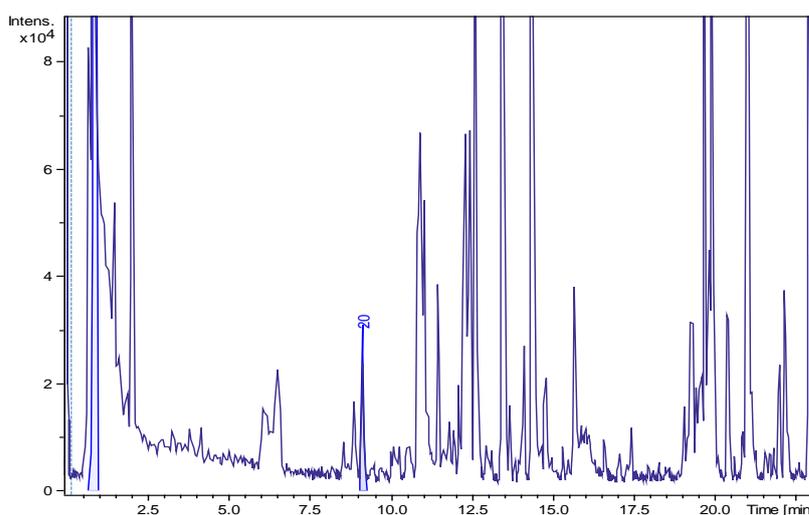


Figura 24 - Cromatograma do fracionamento do extrato de flor do *H. puniceum*. Os cromatogramas selecionados em azul nos tempos de 0,5 e 1 min e 9 e 9,5min correspondem às frações ativas contra ZIKV, e neste caso, apontam para a pseudo-licorina e a incartina.

Extrato de raízes do *H. puniceum*: O extrato EX17010 também foi muito ativo contra DENV-2, com CE_{50} de 3,1 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 1,9. No ensaio com ZIKV, esse extrato apresentou CE_{50} de 5,5 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 3,0. A CC_{50} do EX17010 foi de 5,9 $\mu\text{g/mL}$ em células BHK-21 e de 16,5 $\mu\text{g/mL}$ em células Vero (tabela 1). A atividade antiviral contra DENV-2 e ZIKV foi detectada em várias frações do EX17010. Especificamente contra O ZIKV, a fração 2 apresentou 49 % de proteção, as frações 17 a 22 apresentaram proteção variando de 20 a 40 % e a fração 25 apresentou 38 % de proteção.

As análises dos espectros de HRMS² da fração 2 mostrou a possível presença da licorina e da licoramina ($[M+H]^+$ 290,1396). A região do cromatograma referente às frações 17-20 não apresentou sinais de UV ou MS. Já na região do cromatograma que contempla as frações 21 e 22, o componente majoritário identificado foi o íon $[M+H]^+$ 376,1758, compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{25}NO_6$ e tentativamente identificado como sendo o acetato de narcissidina. Nessas mesmas frações, foi identificado o íon $[M+H]^+$ 336,1812 compatível com a fórmula molecular $C_{18}H_{25}NO_5$ e identificado tentativamente como sendo a 6-hidroxi-hippeastrina. A análise do espectro HRMS² da fração 25 evidenciou tratar-se de uma mistura complexa de substâncias minoritárias que não puderam ser identificadas. As substâncias identificadas nas frações ativas do extrato de raiz ainda não foram isoladas para confirmação das estruturas propostas e avaliação da atividade antiviral.

Extrato de bulbos do *H. puniceum*: O extrato EX17011 apresentou CE_{50} contra DENV-2 de 0,8 $\mu\text{g/mL}$ e IS de 1,7. No ensaio com ZIKV a CE_{50} foi de 1,1 $\mu\text{g/mL}$ e o IS foi de 3,8. O EX17011 foi não virucida contra DENV-2 e ZIKV, e apresentou CC_{50} em células BHK-21 de 1,3 $\mu\text{g/mL}$ e em células Vero de 4,2 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 1). Esse extrato também foi ativo contra o CHIKV, promovendo 70 % de proteção na concentração de 1,3 $\mu\text{g/mL}$.

As frações 3-17 foram ativas contra ZIKV com a proteção variando de 20 a 40 %. A análise dos espectros das frações 3-4 mostraram uma mistura complexa incluindo uma substância com o íon $[M+H]^+$ 338,1605, compatível com fórmula molecular $C_{17}H_{21}NO_6$ para a qual não se encontrou informação no SciFinder, indicando tratar-se de um alcaloide inédito. Os espectros das frações 3 e 4 indicaram ainda a possível presença da licoramina E, licoramina C, licorina e a N-norlicoramina. Na análise MS² das frações 5-15 foi possível observar uma mistura complexa com dezenas de compostos inviabilizando as tentativas de identificação. Já nas frações

16-17 foi possível propor a presença da acetil-nerbowdina. Na fração 25, que causou 23 % de proteção contra o ZIKV, identificou-se um glicosídeo da narciclasina conhecido como kalbreclasina. A análise MS² das frações 18-24, que foram tóxicas para células Vero (77 a 85 % de toxicidade), apontou a possível presença da narciclasina, acetato de narcissidina e incartina.

A kalbreclasina é um derivado glicosídeo da narciclasina isolado em 1985 a partir da amarilidácea *Haemanthus kalbreyeri*. Sabe-se que já foi demonstrada como ativadora de linfócitos esplênicos *in vitro*, característica de imunoestimulantes (GHOSAL et al., 1985), e até o momento não foi demonstrada como antiviral. Os alcaloides licoramina, acetato de narcissidina e a 6-hidroxi-hippeastrina também foram identificados tentativamente como sendo as substâncias majoritárias em frações de extratos de raízes do *H. puniceum*. Ainda não há estudos com resultados positivos de ação antiviral dessas substâncias, inclusive contra DENV-2, ZIKV ou CHIKV. Até o momento de escrita desse trabalho, essas substâncias não foram purificadas para identificação estrutural ou ensaios biológicos. Trata-se de substâncias pouco conhecidas e as quais não há relatos de atividade biológica, assim como a acetil-nerbowdina e a substância de fórmula molecular C₁₇H₁₉NO₆.

Os fracionamentos por UPLC do EX17011 indicaram várias substâncias presentes em frações ativas que não puderam ser isoladas devido à pequena quantidade desse extrato. Buscando viabilizar o isolamento dos alcaloides em quantidades suficientes para a elucidação estrutural e ensaios biológicos, 2 kg de bulbos do *H. puniceum* foram coletados. Como a maior parte dos bulbos é composta por água, o peso seco dos bulbos foi de 200 g. A extração em etanol gerou cerca de 5 g de extrato e a fração alcaloídica, 500 mg.

Assim, 500 mg do extrato alcaloídico foi fracionado em HPLC semipreparativa para obtenção de quantidades maiores de cada fração de modo a permitir que os ensaios biológicos pudessem ser realizados em concentrações definidas. As frações coletadas entre 10 e 40min que apresentaram massa acima de 1 mg foram testadas contra ZIKV nas concentrações de 20,0; 10,0; 5,0 e 2,5 µg/mL.

Nesses ensaios foi possível observar que ao mesmo tempo em que os alcaloides protegem as células contra os efeitos da infecção, em concentrações ligeiramente maiores eles começam a ser citotóxicos, como ilustrado na Figura 25. Assim, à medida que a concentração aumenta, a viabilidade celular também aumenta, indicando efeito protetor (curva laranja). Todavia, a partir de uma determinada

concentração passa a prevalecer a toxicidade para as células e a viabilidade celular decresce (curva azul). Como as concentrações dos alcaloides de amarilidáceas que causam efeito citotóxico (curva azul) são muito próximas das concentrações que protegem as células (curva laranja), a curva dose resposta resultante toma a forma de um sino (curva vermelha) (Figura 25). Nota-se que nos controles com células infectadas e não tratadas, a viabilidade celular era baixa. Este efeito cruzado causava confusão nas análises baseadas apenas nos resultados dos ensaios com células infectadas. Esses ensaios eram usados após os fracionamentos biomonitorados feito em microescala, nos quais as concentrações de cada fração não eram conhecidas.

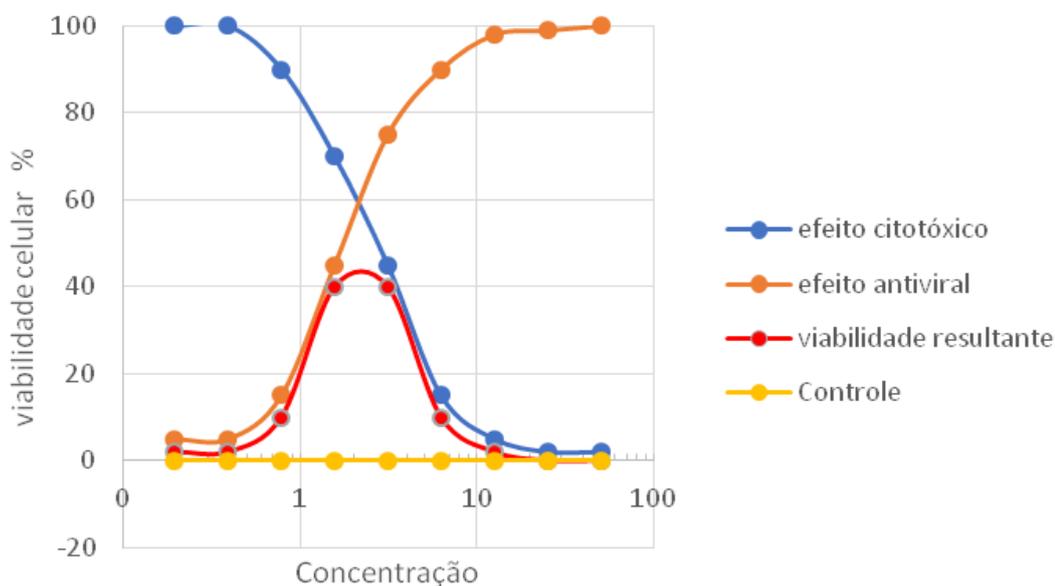


Figura 25 - Efeito cruzado entre ação antiviral contra ZIKV e toxicidade em células Vero. A curva dose resposta resultante (em vermelho) do tratamento com frações de extratos de amarilidáceas incluídos no nosso estudo medida pelo método do MTT, assume a forma de sino. Em amarelo o controle de células infectadas e não tratadas.

As frações 26-30 foram ativas somente nas concentrações de 20 e 10 $\mu\text{g/mL}$ e nas frações 31-36 não foi possível identificar se realmente eram inativas, já que foram tóxicas em todas as a concentrações. No entanto, foi possível identificar que a narciclasina era a substância majoritária da fração 34 e que sua atividade antiviral não era detectada nesses ensaios pelo fato das suas concentrações já estarem dentro da faixa em que a toxicidade prevalece em células Vero, ação que era confundida com a morte celular causada pelo vírus. A fração 37 apresentou toxicidade reduzida além de ter conferido uma proteção significativa contra o ZIKV à medida em que sua concentração era reduzida para 10,0; 5,0 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$. A substância majoritária da

fração 37 foi isolada e identificada por RMN como narciclasina-4-O- β -D-xilopiranosídeo, um heterosídeo que até aquele momento ainda não havia sido descrito na literatura. Além desse heterosídeo, a narciclasina foi isolada da fração 34 e sua estrutura confirmada por RMN. Infelizmente, das frações obtidas do extrato de bulbos do *H. puniceum* por HPLC semipreparativa, somente as frações 34 e 37 estavam disponíveis em quantidade suficiente para isolamento de substâncias.

A narciclasina apresentou CE_{50} , contra DENV-2 e ZIKV, de 0,02 μ M e CC_{50} de 0,09 μ M em células BHK-21, e de 0,12 μ M em células Vero. Os IS contra DENV-2 e ZIKV foram respectivamente 4,5 e 6,0. A narciclasina-4-O- β -D-xilopiranosídeo apresentou CE_{50} de 7,9 μ M contra DENV-2 e contra ZIKV. Em células BHK-21 apresentou CC_{50} de 39,3 μ M e em células Vero, de 51,8 μ M. Os IS contra DENV-2 e ZIKV foram respectivamente 4,9 e 6,5. No ensaio para avaliação do efeito virucida em DENV-2 e ZIKV a narciclasina e a narciclasina-4-O- β -D-xilopiranosídeo não inativaram as partículas virais por tratamento direto (tabela 3), dado que sugere que a atividade antiviral de tais substâncias provavelmente se dá em alguma das etapas pós-internalização viral.

Em suma, foram várias as substâncias identificadas em frações ativas de extratos de diferentes partes do *H. puniceum*, no entanto, o isolamento e confirmação da atividade antiviral só foram possíveis para a narciclasina e a narciclasina-4-O- β -D-xilopiranosídeo. Ademais, o extrato de flor e de bulbo do *H. puniceum* foram ativos contra CHIKV no ensaio de triagem, sugerindo que alguma (s) das substâncias identificadas podem ser ativas contra DENV-2, ZIKV e CHIKV.

A narciclasina, isolada pela primeira vez em 1967 e inicialmente descrita como antimetabólica (CERIOTTI, 1967; PIOZZI et al., 1968), induz apoptose ativando receptores de morte FAS e DR4 e vias mitocondriais nas células tumorais, mas não em células normais (DUMONT et al., 2007). Gabrielsen e colaboradores, 1992, demonstraram que a narciclasina possui propriedades antivirais contra vários flavivírus, como o JEV, YFV e DENV-4. Neste trabalho, o perfil de atividade antiviral da narciclasina está bem semelhante àquele reportado contra os flavivírus citados acima, assim como sua toxicidade nas células hospedeiras, sendo um dos alcaloides dessa família mais tóxicos até então reportados.

A narciclasina-4-O- β -D-xilopiranosídeo é um derivado biossintético da narciclasina. Até o momento da nossa identificação tal molécula ainda era inédita na literatura. No entanto, em janeiro de 2019, ela foi isolada da amarilidácea

Zephyranthes minuta (Kunth) (KATOCH et al., 2019). Naquele trabalho os autores mostram que essa molécula apresentou baixa toxicidade em duas linhagens de células tumorais humanas, células KB e células SiHa, com valores de $IC_{50} > 100 \mu M$. De fato, no nosso trabalho, a narciclasina-4-*O*- β -D-xilopiranosídeo foi cerca de 430 vezes menos tóxica do que a narciclasina em células BHK-21 e Vero. Infelizmente, também foi aproximadamente 400 vezes menos ativa contra DENV-2 e ZIKV do que a narciclasina, portanto, mantendo uma janela terapêutica estreita como demonstrado para outros alcaloides de amarilidáceas. No quadro abaixo, estão listadas as substâncias identificadas/isoladas em frações ativas de *H. puniceum*.

Substâncias identificadas em frações ativas de extratos de flor, raiz e bulbos de *H. puniceum*

Extrato de raiz: Licorina, Licoramina, Acetato de narcissidina, 6-hidroxi-Hippeastrina

Extratos de bulbo: Licorina, Narciclasina, Kalbreclasina (estrutura confirmada) Narciclasina-4-*O*- β -D-xilopiranosídeo (estrutura confirmada); $C_{17}H_{21}NO_6$, Licoramina E, Licoramina C, N-Norlicoramina, Acetil-nerbowdina, Acetato de Narcissidina, Incartina.

Extrato de flor: Pseudo-licorina, Incartina e $C_{30}H_{37}NO_4$ (possivelmente inédita)

Atividade antiviral

Narciclasina: atividade não virucida contra DENV-2 e ZIKV

Narciclasina-4-*O*- β -D-xilopiranosídeo: atividade não virucida contra DENV-2 e ZIKV

6.5.3 Identificação e isolamento de substâncias de extratos vegetais

O fracionamento biomonitorado dos extratos vegetais resultou na identificação e/ou isolamento de várias substâncias com ação antiviral (Tabela 3). Ressalta-se que nem todas as substâncias presentes em frações ativas foram identificadas ou testadas

isoladamente para confirmação da atividade antiviral. Várias delas já foram descritas na literatura, mas não quanto às suas propriedades antivirais. Outras, embora já tivessem atividade antiviral descrita na literatura, ainda não haviam sido testadas contra todos os vírus aqui estudados.

Tabela 3 - CC₅₀, CE₅₀, IS e atividade virucida de substâncias contra DENV-2, ZIKV e CHIKV

Compostos	DENV-2			ZIKV			CHIKV	CC ₅₀ (μM)	
	CE ₅₀ μM	VIR	IS	CE ₅₀ μM	VIR	IS	CE ₅₀ μM	BHK-21	Vero
Cicloheximida	0,07	NT	13,8	0,16	NT	4,1	Inativa	0,97	0,65
Meleagrina	Inativa	NT	-	Inativa	NT	-	Inativa	2,6	2,9
Pretazetina	0,8	Não	6,8	1,9	Não	3,8	Inativa	5,4	7,2
Rutina	Inativa	Não	-	Inativa	NT	-	Inativa	> 300	> 300
Licorina	0,5	Não	8,6	0,9	Não	3,7	Inativa	4,3	3,4
Narciclasina	0,02	Não	4,5	0,02	NT	6,0	NT	0,09	0,12
Narciclasina-4- <i>O</i> -β-D-xilopiranosídeo	7,9	Não	4,9	7,9	Não	6,5	NT	39,3	51,8
1-acetil-licorina	Inativa	Não	-	19,3	Não	1,0	Inativa	7,8	19,8
1,2-diacetil-licorina	Inativa	Não	-	Inativa	Não	-	Inativa	> 100	> 100

Substâncias testadas em ensaios de CE₅₀ e virucidas contra DENV-2, ZIKV, CHIKV e nas respectivas células hospedeiras para determinação da CC₅₀. VIR: virucida; (-): Não se aplica; NT: Não testado.

Em suma o fracionamento biomonitorado possibilitou a identificação de 25 substâncias e 6 classes de compostos em extratos derivados de 3 famílias de plantas listadas no quadro abaixo.

Substâncias identificadas/isoladas em extratos de plantas

Família Amaryllidaceae

Licorina (estrutura confirmada), **Pretazetina** (estrutura confirmada), **Pancreatina**, **Rutina** (estrutura confirmada), **Panpracina**, **Nangustina**, **Pseudo-licorina**, **Incartina**, substância **C₃₀H₃₇NO₄** (possivelmente inédita), **Licoramina**, **Acetato de narcissidina**, **6-hidroxi-Hippeastrina**, substância **C₁₇H₁₉NO₆**, **Licoramina E**, **Licoramina C**, **N-norlicoramina**, **Acetil-nerbowdina**, **Kalbreclasina**, **Narciclasina** (estrutura confirmada), **Narciclasina-4-O-β-D-xilopiranosídeo** (estrutura confirmada)

Família Fabaceae

Dissacarídeos de agarobiose, substância **C₁₂H₂₀O₁₀**, Substância **C₁₁H₁₉N₃O₃**, **leuhistina e plumbagina A**

Classes de compostos derivados de extratos da família Ochnaceae

Ésteres de glicol de ácidos graxos, ácidos graxos, vitanolídeos, terpenoides, ésteres de ácidos graxos, ésteres etílicos de ácidos graxos

6.6 Atividade antiviral de acetatos de licorina contra DENV-2, ZIKV e CHIKV

De forma geral, as substâncias com propriedades antivirais identificadas neste trabalho apresentaram-se tóxicas às células hospedeiras em baixas concentrações. Ainda assim, representam fontes promissoras para o desenvolvimento de análogos sintéticos. Numa perspectiva futura, análogos poderão ser preparados buscando melhorar seus perfis farmacológicos e farmacocinéticos. Como prova de princípio, Zou e colaboradores, 2009, mostraram que modificações na licorina, especialmente nos dois grupos hidroxila dessa molécula, reduziram drasticamente sua toxicidade em células Vero e melhoraram sua potência em relação ao WNV. Com base nesse trabalho, Wang e colaboradores, 2014, desenvolveram e sintetizaram uma série de derivados da licorina que foram testados para estudo das relações estrutura-atividade

em relação à atividade anti-DENV. Como resultado, entre os análogos de licorina, um derivado monoacetilado exibiu potente atividade contra DENV-2 e com reduzida toxicidade, resultando em um IS de > 750 (Wang et al., 2014).

Para verificar se o mesmo derivado preparado por Zou teria ação semelhante contra ZIKV e CHIKV, a licorina foi utilizada para a síntese de dois derivados acetilados para avaliar se essa modificação simples poderia reduzir a toxicidade e com isto promover um aumento da “janela terapêutica”. Portanto, a partir da amostra comercial da licorina foram preparados o monoacetilado (1-acetil-licorina) e o diacetilado (1,2-di-acetil-licorina) que foram testados contra DENV-2, ZIKV e CHIKV.

O derivado monoacetilado da licorina foi fracamente ativo contra ZIKV, com CE_{50} de $19,3 \mu\text{M}$ e IS de 1,0. Além disso, foi inativo contra DENV-2 e CHIKV e cerca de 2,5 vezes mais tóxico em células BHK-21, com CC_{50} de $7,8 \mu\text{M}$, do que em Vero, que apresentou CC_{50} de $19,8 \mu\text{M}$. A licorina diacetilada, com $CC_{50} > 100 \mu\text{M}$ em células Vero e BHK-21, embora com toxicidade reduzida de 20 a 30 vezes em relação à licorina, foi inativa contra DENV-2, ZIKV e CHIKV. Os dois compostos foram testados em concentrações não citotóxicas e não foram virucidas contra DENV-2 e ZIKV (tabela 3).

Nossos dados contrastam com os dados de Wang e colaboradores, 2014, sobretudo em relação ao monoacetilado contra DENV-2, no entanto, ressalta-se que a atividade medida contra DENV-2 neste trabalho foi em células BHK-21, enquanto no trabalho de Wang e colaboradores, 2014, foi em células A549. Portanto, mais estudos são necessários a fim de verificar a influência da linhagem celular sobre a ação antiviral.

6.7 Combinação da licorina com a pretazetina: Avaliação da atividade antiviral em células infectadas com DENV-2 e ZIKV e toxicidade em células BHK-21 e Vero

A proteção antiviral contra DENV-2 e ZIKV e toxicidade em células BHK-21 e Vero do tratamento simultâneo com licorina e pretazetina, combinadas, foram avaliadas pela construção do isoblograma correspondente (item 5.22). As interações entre as duas substâncias são ilustradas nos isobogramas que mostram as interseções das FIC (Figura 26) bem próximas da linha de interação nula. Os valores determinados para as FIC estão mostrados nas tabelas L1, L2, L3 e L4, assim

como o FICI, que foi de 0,94 contra ZIKV; 0,87 contra DENV-2; 1,08 para células BHK-21 e 1,17 para células Vero. Conforme os valores do FICI, as interações em relação à atividade antiviral e toxicidade da licorina combinada com a pretazetina foram indiferentes.

A combinação da licorina e pretazetina surgiu como uma hipótese de que poderia haver uma melhora da atividade antiviral, contra DENV-2 e ZIKV, se fossem combinadas. Uma explicação plausível poderia ser a atuação sinérgica sobre mecanismos distintos no processo de inibição da replicação viral. De fato, o impressionante progresso na terapêutica com HIV e HCV demonstra claramente que isso pode ocorrer. Em relação ao HCV, por exemplo, inibidores da protease e polimerase atualmente desenvolvidos, quando combinados, têm o potencial de curar quase todas as infecções crônicas pelo HCV (MANNIS; VON HAHN, 2013).

Outro fator relevante e como perspectiva dessa combinação foi a possibilidade da diminuição da toxicidade por antagonismo entre as duas substâncias. Embora o antagonismo esteja associado a um cenário negativo, já que muitos pesquisadores procuram identificar interações sinérgicas entre compostos para algum tipo de efeito terapêutico adicional, no sentido toxicológico, poderia ser benéfico ter um efeito antagônico na combinação dessas substâncias. A metodologia usual para detectar tais interações envolve a construção de isobogramas (TALLARIDA; KIMMEL; HOLTZMAN, 1997). O isobograma nada mais é do que uma representação gráfica dos valores da FIC de duas substâncias quando administradas em conjunto, sendo as doses de um composto exibidas ao longo de um eixo e as doses de um segundo composto ao longo do segundo eixo. Os isobogramas elaborados a partir dos valores da FIC têm sido amplamente utilizados para detectar sinergia ou antagonismo entre duas drogas (FIVELMAN; ADAGU; WARHURST, 2004). No entanto, são os valores da Σ FIC usualmente recomendados para a análise estatística (TALLARIDA; KIMMEL; HOLTZMAN, 1997) e conforme Odds, 2003, também foram usados neste trabalho para definir as interações entre as duas substâncias.

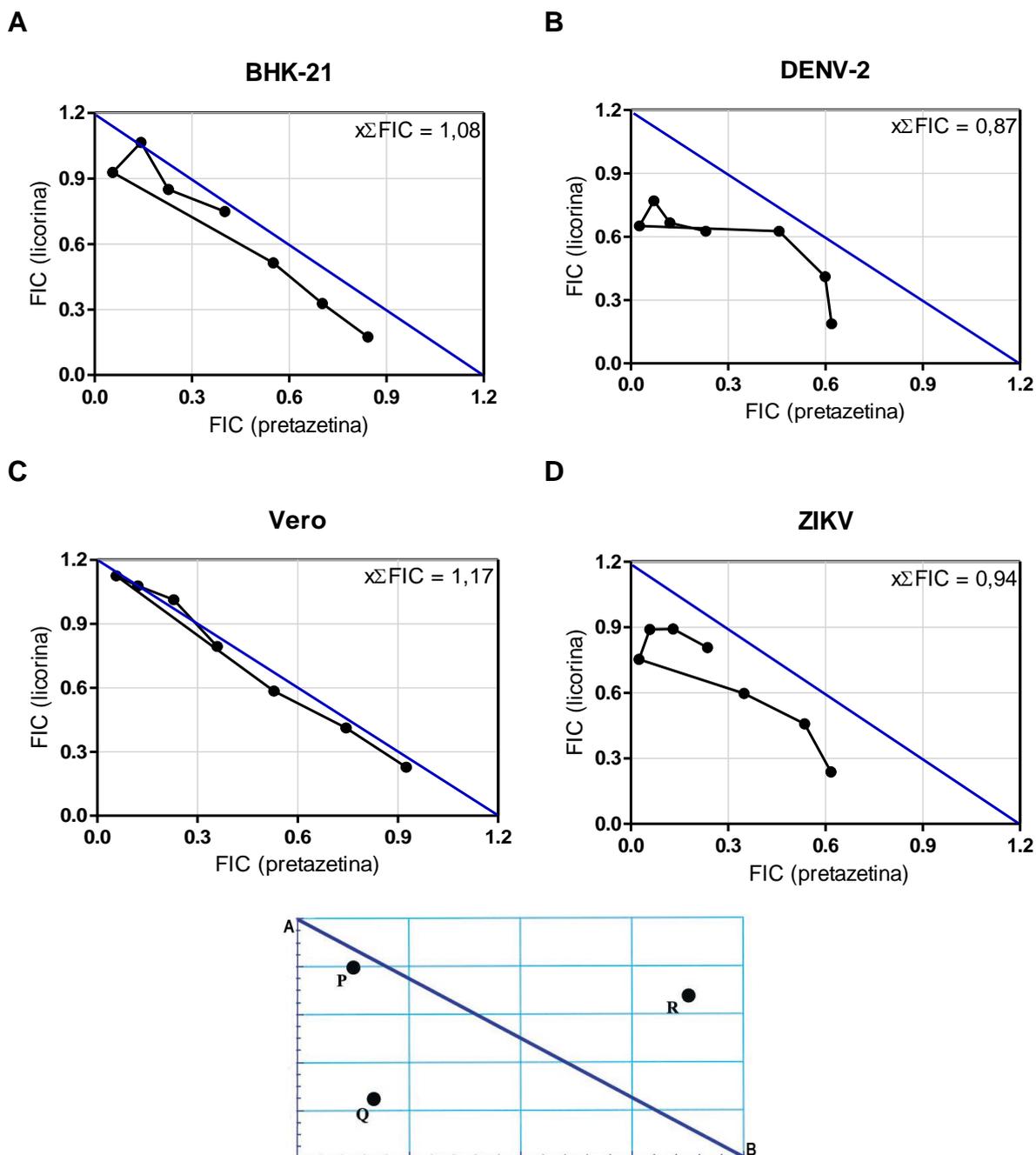


Figura 26 - Isobologramas demonstrando a atividade antiviral e citotoxicidade da licorina:pretazetina quando combinadas. As FIC obtidas a partir da CE_{50} e CC_{50} de cada substância em cada combinação foram plotadas nos gráficos acima, sendo o eixo x ($FIC_{pretazetina}$) e no eixo y ($FIC_{licorina}$). As combinações das FIC foram somadas entre si e obteve-se o FICI pela média dos valores resultantes das somas ($\bar{x}\Sigma FIC$), mostrados no canto superior direito dos isobologramas. Em A) combinações da licorina:pretazetina avaliadas quanto à citotoxicidade em células BHK-21 e C) em Vero; e em B) as combinações avaliadas quanto à atividade antiviral contra DENV-2 e D) contra ZIKV. A ilustração abaixo é o exemplo da linha de interceptação que liga os pontos A e B. Nessa linha, os pares de concentrações deverão fornecer determinado efeito. As concentrações das 2 substâncias no ponto Q é um exemplo de sinergismo, no ponto R, antagonismo e no ponto P, indiferente.

6.8 Predição de perfis farmacocinéticos e de toxicidade das substâncias com estrutura confirmada

Para caracterizar os perfis farmacocinéticos e de toxicidade (ADMET) das 5 substâncias com estrutura confirmada até o momento, 30 diferentes propriedades ADMET foram preditas pela plataforma pkCSM (PIRES et al., 2015) que faz uma identificação inicial de problemas potenciais, priorização de *hits* e otimização de substâncias candidatas a ensaios pré-clínicos e clínicos, apontando aqueles com mais chances de sucesso. A tabela 4 mostra a descrição completa das propriedades ADMET previstas para a licorina, pretazetina, narciclasina, narciclasina-4-O- β -D-xilopiranosídeo e kalbreclasina por nós identificadas em extratos de plantas do gênero *Hippeastrum*.

Em relação ao perfil de absorção, a pretazetina teve predito o valor de $\text{Log } P_{\text{app}} > 0,90$ (permeabilidade aparente em células Caco2) indicando uma boa absorção por via oral. O modelo de absorção intestinal também indicou uma possível absorção de 95 %. Nas análises, as outras substâncias tiveram valores calculados indicando absorção intestinal intermediária ou baixa.

Curiosamente, a pretazetina também foi a molécula com a maior predição quanto ao volume de distribuição no estado estacionário (VD_{ss}) ($VD_{ss} = 0,80$), significando melhor distribuição nos tecidos do que no plasma, seguida de perto pela licorina ($VD_{ss} = 0,79$). Ainda acerca das propriedades de distribuição, nenhuma das moléculas analisadas tiveram predições de passagem imediata pela barreira hematoencefálica e entrada no SNC, com a kalbreclasina e a narciclasina-4-O- β -D-xilopiranosídeo preditas como muito mal distribuídas no cérebro ($\text{log } BB = -1,66$ e $-1,78$, respectivamente).

Para avaliar a metabolização das moléculas selecionadas, a plataforma pkCSM foi usada para prever se tais moléculas seriam prováveis inibidores/substratos de diferentes isoformas do citocromo P450. Nenhuma das moléculas mostrou potencial como inibidores do P450, sendo que a licorina e a pretazetina poderiam agir como substratos, tornando-as susceptíveis de serem metabolizadas pelo P450 e assim, terem excreção facilitada. A predição da excreção dessas duas moléculas estavam em acordo com a predição de metabolização, pois ambas apresentaram o maior clearance total ($\text{log } CL = 1,03$ para a licorina e $\text{log } CL = 0,97$ para a pretazetina).

Em relação aos perfis de toxicidade, nenhuma das moléculas foi avaliada como potencial mutagênica (toxicidade de AMES) ou com capacidade de provocar sensibilização da pele. Apenas a kalbreclasina e narciclasina-4-*O*- β -D-xilopiranosídeo foram preditas como não prejudiciais à função hepática. Embora a narciclasina e a narciclasina-4-*O*- β -D-xilopiranosídeo tenham apresentado uma dose terapêutica máxima recomendada (DTMR) alta [0,60 log (mg/kg/dia)] e intermediária (0,34 log (mg/kg/day)), respectivamente, as demais moléculas apresentaram baixas DTMR.

Tabela 4 - Predição *in silico* do perfil de toxicidade e farmacocinética (ADMET) de substâncias identificadas em frações ativas de extratos de *Hippeastrum*

Propriedades pkCSM	LIC	PTZ	NCL	NCLXP	KBCL
Solubilidade em água	-2,98	-2,93	-2,66	- 2,43	- 2,47
Permeabilidade à Caco2	0,51	1,19	0,58	- 0,47	- 0,41
Absorção intestinal em humanos	68,85	95,14	68,24	47,93	35,24
Permeabilidade cutânea	- 3,32	- 3,81	- 2,93	- 2,74	- 2,74
Substrato da glicoproteína P	Não	Não	Sim	Sim	Sim
Inibidor da glicoproteína I	Não	Não	Não	Não	Não
Inibidor da glicoproteína II	Não	Não	Não	Não	Não
VDss em humanos	0,79	0,80	- 0,56	- 0,54	- 0,54
Fração não ligada (humanos)	0,45	0,46	0,54	0,60	0,58
Permeabilidade à BBB	- 0,15	- 0,08	- 1,32	- 1,78	- 1,66
Permeabilidade ao SNC	- 2,52	- 2,50	- 3,79	- 4,65	- 4,88
Substrato do CYP2D6	Sim	Não	Não	Não	Não
Substrato do CYP3A4	Sim	Sim	Não	Não	Não
Inibidor do CYP1A2	Não	Não	Não	Não	Não
Inibidor do CYP2C19	Não	Não	Não	Não	Não
Inibidor do CYP2C9	Não	Não	Não	Não	Não
Inibidor do CYP2D6	Não	Não	Não	Não	Não
Inibidor do CYP3A4	Não	Não	Não	Não	Não
Clearance total	1,03	0,97	0,22	0,48	0,49
Substrato de OCT2 renal	Não	Sim	Não	Não	Não
Toxicidade AMES	Não	Não	Não	Não	Não
Dose máxima tolerada (humanos)	- 0,39	- 0,57	0,60	0,34	0,18
Inibidor de hERG I	Não	Não	Não	Não	Não
Inibidor de hERG II	Não	Não	Não	Não	Não
Toxicidade aguda por via oral em ratos (LD ₅₀)	2,67	2,42	1,98	2,85	2,62
Toxicidade crônica por via oral em ratos (LOAEL)	0,98	1,74	2,89	4,31	3,69
Hepatotoxicidade	Sim	Sim	Sim	Não	Não
Sensibilização da pele	Não	Não	Não	Não	Não
Toxicidade <i>T.pyriformis</i>	0,53	0,44	0,28	0,28	0,28
Toxicidade Minnow	1,88	2,58	4,66	7,01	8,77

Licorina (LIC), pretazetina (PTZ), narciclasina (NCL), kalbreclasina (KBCL), narciclasina-4-O- β -D-xilopiranosídeo (NCLXP)

7 CONCLUSÕES

- A busca de substâncias antivirais contra DENV, ZIKV e CHIKV pela triagem randomizada de extratos brutos, obtidos de plantas e fungos coletados em diferentes biomas, se mostrou uma estratégia válida para a identificação de substâncias antivirais;
- O fracionamento biomonitorado por cromatografia (HPLC/UPLC) acoplada a espectrometria de massas de extratos brutos ativos foi uma estratégia eficiente para a descoberta de substâncias antivirais contra DENV e/ou ZIKV, que possibilitou a identificação e/ou isolamento de 25 substâncias e 12 classes de compostos com propriedades antivirais;
- Várias das substâncias identificadas/isoladas neste estudo já foram descritas como ativas contra DENV, entretanto, a atividade antiviral das 37 substâncias aqui identificadas é inédita contra ZIKV e contra vários outros arbovírus;
- A combinação de pretazetina e licorina não resultou em aumento da atividade antiviral contra DENV-2 e ZIKV e tampouco na redução da citotoxicidade observada quando testadas separadamente;
- A predição das propriedades ADMET da licorina, pretazetina, narciclasina, kalbreclasina e narciclasina-4-O- β -D-xilopiranosídeo mostrou indicadores favoráveis para ensaio *in vivo* dessas substâncias em modelo animal;
- Tendo em vista a enorme diversidade de vírus causadores de doenças em humanos, a emergência e reemergência de arbovírus, assim como adaptação e as vantagens adquiridas por esses microrganismos para se disseminarem nas populações humanas, a continuidade da investigação da biodiversidade de plantas e fungos poderá trazer enormes benefícios à sociedade. Portanto, esse trabalho abre possibilidades para uma busca contínua, em extratos naturais, de moléculas antivirais contra diversos vírus causadores de doenças humanas que poderão ser utilizadas ou modificadas pela indústria farmacêutica. Acreditamos que nosso trabalho serve de fundamentação científica para a proteção da nossa biodiversidade e de alavanca para continuidade da pesquisa básica e do desenvolvimento tecnológico e inovação de drogas derivadas de produtos naturais.

8 PERSPECTIVAS

O entendimento dos diferentes mecanismos envolvidos na inibição da multiplicação de vírus pertencentes a uma mesma família poderá nos direcionar para descobertas de novos alvos terapêuticos e mecanismos de ação, portanto:

- A atividade virucida seletiva contra DENV-2 que foi verificada em extratos inativos contra ZIKV será investigada em breve por microscopia eletrônica;
- Será feita a elucidação de mecanismos envolvidos na atividade antiviral das substâncias aqui identificadas/isoladas, como a narciclasina-4-*O*- β -D-xilopiranosídeo, que mostrou atividade inédita contra DENV-2 e ZIKV. Inicialmente, serão feitos experimentos *in vitro* para a verificação do efeito no pré-tratamento e pós-tratamento de células infectadas com os respectivos vírus. E em seguida, será feito o estudo da ação antiviral destas substâncias por ferramentas de proteômica e em modelo animal;
- Substâncias identificadas como antivirais neste trabalho poderão ser estruturalmente modificadas objetivando aumentar as suas respectivas atividade antiviral e/ou diminuir a citotoxicidade, bem como otimizar outras propriedades farmacocinéticas para desenvolvimento de drogas antivirais;
- Terapias combinadas utilizando drogas antivirais com várias das substâncias antivirais aqui identificadas podem melhorar a eficácia o tratamento de pacientes e minimizar o risco de seleção de vírus resistentes.

9 REFERÊNCIAS

- ABBINK, P. et al. Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. **Science**, v. 353, n. 6304, p. 1129-1132, 2016. DOI: 10.1126/science.aah6157.
- ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Towards antivirals against chikungunya virus. **Antiviral Research**, v. 121, p. 59–68, 2015. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.06.017.
- ACOSTA, E. G.; CASTILLA, V.; DAMONTE, E. B. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. **Cell. Microbiol.**, v. 11, n. 10, p. 1533–1549, 2009. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01345.x.
- ACOSTA-AMPUDIA, Y. et al., Mayaro: an emerging viral threat? **Emerg Microbes Infect.**, v. 7, n. 1, p. 163, 2018. DOI: 10.1038/s41426-018-0163-5.
- ADCOCK, R. 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 Res.**, v. 138, p. 47-56, 2017. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.11.018.
- AHMAD, N. et al. Dengue fever treatment with Carica papaya leaves extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 4, p. 330-333, 2011. DOI: 10.1016/S2221-1691(11)60055-5.
- AHMAD, S. S.; AMIN, T. N.; USTIANOWSKI, A. Zika virus: management of infection and risk. **BMJ**, v. 352, p. i1062, 2016. DOI: 10.1136/bmj.i1062.
- ALLARD, P. M. et al. Antiviral chlorinated daphnane diterpenoid orthoesters from the bark and wood of *Trigonostemon cherrieri*. **Phytochemistry**, v. 84, p. 160–168, 2012. DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.07.023.
- AMARAL JUNIOR, A. Erythroxyllaceae. In: REITZ, R. (Ed.) **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1980.
- AMDEKAR, S.; PARASHAR, D.; ALAGARASU, K. Chikungunya Virus-Induced Arthritis: Role of Host and Viral Factors in the Pathogenesis. **Viral Immunol.**, v. 30, n. 10, p. 691-702, 2017. DOI: 10.1089/vim.2017.0052.
- AMOROS, M.; FAUCONNIER, B.; GIRRE, R. L. *In vitro* antiviral activity of a saponin from *Anagallis arvensis*, Primulaceae, against herpes simplex virus and poliovirus. **Antiviral Res.**, v. 8, n. 1, p. 13-25, 1987. DOI: 10.1016/0166-3542(87)90084-2.
- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. et al. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, v. 76, n. 3-4, p. 374–378, 2005. DOI: 10.1016/j.fitote.2005.03.010.
- ANSEL, H. C.; Jr. ALLEN, L. V. **Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. (5 ed), Williams & Wilkins 1995.
- ANTOUN, M. D. et al. Cytotoxicity of *Hymenocallis expansa* alkaloids. **J. Nat. Prod.**, v. 56, n. 8, p. 1423-1425, 1993.
- BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) atualiza a bula de Dengvaxia®. Sanofi Pasteur. 2019. Disponível em: < <https://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2019/03/PDF-5.pdf>>. Acesso em: 03/11/2019.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group classification). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.
- ASWAL, B. S. et al. Screening of Indian plants for biological activity: Part XV. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 34, n. 5, p. 444-467, 1996.

BACCHI, E. M. Alcalóides tropânicos. In: SIMÕES, M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: Ed. Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

BÄCK, A. T.; LUNDKVIST, Å. Dengue viruses – an overview. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 3, p. 10.3402, 2013.

BAG, A.; BHATTACHARYYA, S. K.; CHATTOPADHYAY, R. R. The development of *Terminalia chebula* Retz. (Combretaceae) in clinical research. **Asian Pac J Trop Biomed.**, v. 3, n. 3, p. 244-252, 2013. DOI: 10.1016/S2221-1691(13)60059-3.

BAHIA, M. V. et al. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, n. 6b, p. 1402-1405, 2005. DOI: 10.1590/S0103-50532005000800017.

BAKER, D. D. et al. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Nat. Prod. Rep.**, v. 24, n. 6, p. 1225-1244, 2007.

BALASUBRAMANIAN, A. et al. Antiviral activities of selected antimalarials against dengue virus type 2 and Zika virus. **Antiviral Res.**, v. 137, p. 141-150, 2017.

BALZARINI, J. et al. Alpha-(1-3)- and alpha-(1-6)-D-mannose-specific plant lectins are markedly inhibitory to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus infections *in vitro*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 35, p. 410-416. 1991.

BALZARINI, J. et al. The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)*n*-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication *in vitro*. **Antiviral Res.**, v. 18, p. 191-207. 1992.

BARBOSA, E. C. **Avaliação da atividade antiviral de extratos vegetais e de fungos contra Dengue virus**. Dissertação. (Ciências da Saúde) - Instituto René Rachou - Fiocruz Minas, Belo Horizonte, MG.

BARROWS, N. J. et al. A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 2, p. 259-70, 2016. DOI: 10.1016/j.chom.2016.07.004.

BASHYAL, B. P. et al. Alkylated polyketide-derived aldehydes with potent anti-HIV activity from *Alternaria tenuissima* QUE1Se, a fungal endophyte of *Quercus emoryi*. **Bioorgan. Med. Chem.**, v. 22, n. 21, p. 6112-6116, 2014. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.08.039.

BAUD, D. et al. An update on Zika virus infection. **Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2099-2109, 2017. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31450-2.

BEATTY, M. E. et al. Health Economics of Dengue: A Systematic Literature Review and Expert Panel's Assessment. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, n. 3, p. 473-488, 2011. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.10-0521.

BEAUTÉ, J.; VONG, S. Cost and disease burden of dengue in Cambodia. **BMC Public Health**, v. 10, n. 521, p. 1-6, 2010. DOI: 10.1186/1471-2458-10-521.

BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveill**, v. 19, n. 13, 2014.

BETANCUR-GALVIS, L. et al. Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 4, p. 531-535, 1999.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, p. 504-507, 2013.

BLAVATTI, M. W. et al. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, n. 2-3, p. 385-389, 2004.

BIESERT, L. et al. Inhibition of HIV and virus replication by polysulphated Polyxylan: HOE/BAY 946, a new antiviral compound. *AIDS*, v. 2, n. 6, p. 449–457, 1988. DOI: 10.1097/00002030-198812000-00007.

BODE, H. B. et al. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem*, v. 3, n. 7, p. 619-627, 2002. DOI:10.1002/1439-7633(20020703)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9.

BOGOCH, I. I. et al. Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. *Lancet*, v. 387, n. 10016, p. 335-336, 2016. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00080-5.

BOSE, M. et al. Identification of a flavonoid isolated from plum (*Prunus domestica*) as a potent inhibitor of Hepatitis C virus entry. *Scientific Reports*, v. 7, p. 3965, 2017.

BOTTING, C; KUHN, R. J. Novel approaches to flavivírus drug Discovery Expert Opin. *Drug Discov.*, v. 7, n. 5, p. 417-428, 2012. DOI: 10.1517/17460441.2012.673579.

BOURAI, M. et al. Mapping of Chikungunya virus interactions with host proteins identified nsP2 as a highly connected viral component. *J. Virol.*, v. 86, n. 6, p. 3121– 3134, 2012. DOI: 10.1128/JVI.06390-11.

BOZZA, F. A. et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect. Dis.*, v. 8, p. 86, 2008.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Ver. Microbiol.*, v. 11, n. 1, p. 21-32, 2013. DOI: 10.1038/nrmicro2916.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, Brasília, v. 50, n. 32, 2019. Disponível em: <<https://portalquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/outubro/31/Boletim-epidemiologico-SVS-32.pdf>>. Acesso em: 02/11/2019.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, Brasília, v. 50, n. 04, 2019. Disponível em: < <https://portalquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>>. Acesso em: 15/11/2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informe nº 18. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, Brasília, DEIDT/SVS/MS, 2019. Disponível em: <<https://portalquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/13/Informe-de-Monitoramento-de-Febre-Amarela-Brasil--n-18.pdf>>. Acesso em: 02/11/2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota Informativa Nº 187-SEI/2017-CGDT/DEVIT/SVS/MS. **Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis**, Brasília. SEI nº1401939, 2017. Disponível em: < https://portalquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/30/SEI_MS-1401939-Nota-Informativa-alerta-monitoramento-sazonal-fa.pdf>. Acesso em: 02/11/2019.

BRIOLANT, S. et al. *In vitro* inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: Synergistic effect of interferon- α and ribavirin combination. *Antiviral Research*, v. 61, n. 2, p. 111–117, 2004. DOI: 10.1016/j.antiviral.2003.09.005.

BRITO, C. A. A. Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 50, n. 5, p. 585-589, 2017. DOI:10.1590/0037-8682-0479-2016.

BULLARD-FEIBELMAN, K. M. et al. The FDA-approved drug sofosbuvir inhibits Zika virus infection. *Antiviral Res*, v. 137, p. 134-140, 2017. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.11.023.

BURT, F. J. et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infectious diseases*, v. 17, n. 4, p. e107-e117, 2017.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Bio. Res.*, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

- CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, v. 91, n. 3, p. 1-7, 2019. DOI: 10.1590/0001-3765201920190105.
- CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **Lancet Infect Dis**, v. 16, n. 6, p. 653-660, 2016.
- CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 21, n. 10, p. 1885-6, 2015.
- CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531-1539, 2016.
- CAO-LORMEAU, V. M. et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 20, n. 6, p. 1085-1086, 2014.
- CAO-LORMEAU, V. M.; MUSSO, D. Emerging arboviruses in the Pacific. **Lancet**, v. 384, n. 9954, p. 1571-2, 2014.
- CAPEDING, M. R. et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 384, n. 9951, p. 1358-1365, 2014. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61060-6.
- CARDOSO, C. W. et al. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 21, n. 12, p. 2274-6, 2015.
- CARNEIRO, B. M. et al. The Green Tea Molecule EGCG Inhibits Zika Virus Entry. **Virology**, v. 496, p. 215-218, 2016. DOI: 10.1016/j.virol.2016.06.012.
- CAROCCI, M. et al. The bioactive lipid 4-hydroxyphenyl retinamide inhibits flavivirus replication. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 1, p. 85-95, 2015.
- CAROLLO, C. A. et al. Alkaloids and a flavonoid from aerial parts (leaves and twigs) of *Duguetia furfuracea* – Annonaceae. **J. Chil. Chem. Soc.**, v. 51, p. 837-841, 2006a.
- CARRO, A. C.; DAMONTE, E. B. Requirement of cholesterol in the viral envelope for dengue virus infection. **Virus Res.**, v. 174, n. 1-2, p. 78-87, 2013. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.03.005.
- CASSADOU, S. Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. **Euro Surveill.**, v. 19, n. 13, pii. 20752, 2014; DOI: 10.2807/1560-7917.es2014.19.13.20752.
- CAUCHEMEZ, S. et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-2015: a retrospective study. **Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2125-2132, 2016.
- CEDRÓN, J. C. et al. Synthesis and antiplasmodial activity of lycorine derivatives. **Bioorg Med. Chem.**, v. 18, n. 13, p. 4694-4701, 2010.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Countries and territories where chikungunya cases have been reported* (as of September 17, 2019). Disponível em: <https://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/Chik_World_Map_09-17-19-P.pdf>. Acesso em: 17/11/2019.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Geographic Distribution - Where Has Chikungunya Virus Been Found? 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/>>. Acesso em: 17/11/2019.
- CERIOTTI, G. Narciclasine: an Antimitotic Substance from Narcissus Bulbs. **Nature**, v. 213, p. 595-596, 1967.
- CHAN, J. F. et al. Novel antiviral activity and mechanism of bromocriptine as a Zika virus NS2B-NS3 protease inhibitor. **Antiviral Res.**, v. 141, p. 29-37, 2017.

CHATTOPADHYAY, D.; NAIK, T. N. Antivirals of ethnomedicinal origin: structure-activity relationship and scope. **Mini Rev Med Chem**, v. 7, n. 3, p. 275-301, 2007.

CHAVAN, R. D. et al. Assessment of Anti-Influenza Activity and Hemagglutination Inhibition of *Plumbago indica* and *Allium sativum* Extracts. **Pharmacognosy Res.**, v. 8, n. 2, p. 105-111, DOI: 10.4103/0974-8490.172562.

CHEN, L. H.; WILSON, M. E. Transmission of dengue virus without a mosquito vector: nosocomial mucocutaneous transmission and other routes of transmission. **Clin. Infect. Dis.**, v. 39, n. 6, p. e56-60, 2004. DOI: 10.1086/423807.

CHOPRA, R. N. et al. **Glossary of Indian Medicinal Plants: [with] Supplement. 18. ed. New Delhi:** Council of Scientific & Industrial Research, 1956.

ÇITOGLU, G. S. et al. Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lycorine from *Sternbergia fisheriana* (Herbert) Rupr. **Fitoterapia**, v. 83, n. 1, p. 87-87, 2012.

ÇITOGLU, G.; TANKER, M.; GUMUSEL, B. Antiinflammatory effects of lycorine and haemanthidine. **Phytother. Res.**, v. 12, n. 3, p. 205–206, 1998.

CONNOR, H. Drug Discovery - A History. **J. Royal Society Medic.**, v. 98, n. 11, p. 517-518, 2005.

COOPER, A. C. et al. Management and prevention strategies for respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis in infants and young children: a review of evidence-based practice interventions. **Pediatr. Nurs.**, v. 29, n. 6, p. 452–456, 2003.

CROVETTO, R. M. Estudios Etnobotánicos. I. Nombres de plantas y su utilidad según los indios Tobas del este de Chaco. **Bonplandia**, v. 10, n. 4, p. 279-333, 1964. DOI: 10.30972/bon.141451.

CROVETTO, R. M. Las plantas utilizadas en medicina popular en el Noroeste de Corrientes. República Argentina. **Miscelánea Fundación Miguel Lillo**, v. 10, p. 7-139, 1981.

DE LAMBALLERIE, X. et al. On chikungunya acute infection and chloroquine treatment. **Vector B. Zoon. Dis. (Larchmont, N.Y.)**, v. 8, n. 6, p. 837–839, 2008. DOI: 10.1089/vbz.2008.0049.

DE LEAN, A.; MUNSON, P. J.; RODBARD, D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. **American Journal of Physiology**, v. 235, n. 2, p. 97-102, 1978.

DE PASQUALE, A. Pharmacognosy: the oldest modern science. **J. Ethnopharmacol.**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 1984.

DELOGU, I. et al. *In vitro* antiviral activity of arbidol against Chikungunya virus and characteristics of a selected resistant mutant. **Antiviral Res.**, v. 90, n. 3, p. 99-107, 2011. DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.03.182.

DELPRETE, P. G. Rubiaceae (Coffea or Quinine Family). In: SMITH, N. et al., (Ed.). **Flowering plants of the neotropics**. Princeton: Princeton University Press, 2004, p. 328-333.

DELVECCHIO, R. et al. Chloroquine, an Endocytosis Blocking Agent, Inhibits Zika Virus Infection in Different Cell Models. **Viruses**, v. 8, n. 12, 2016.

DENG, Y. Q. et al. Adenosine Analog NITD008 Is a Potent Inhibitor of Zika Virus. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. ofw175, 2016. DOI: 10.1093/ofid/ofw175.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais na Amazônia. Editora Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**, São Paulo: 1989.

- DIAS, R. L. A.; CORREA, A. G. Aplicações da química combinatória no desenvolvimento de fármacos. **Quim. Nova**, v. 24, n.2, p. 236-242, 2001.
- DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.
- DOPKE, W. et al. Alkaloids from *Hippeastrum equestre*. Part I. Phamine, a new phenanthridone alkaloid. **Planta Med.**, v. 61, n. 6, p. 564-566, 1995.
- DRIGGERS, R. W. et al. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. **N. Engl. J. Med.**, v. 374, n. 22, p. 2142-51, 2016.
- DUARTE, M. G. R. Perfil fitoquímico e atividade antibacteriana *in vitro* de plantas invasoras. **Revista Lecta**, v. 20, n. 2, p. 177-182, 2002.
- DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N. Engl. J. Med.**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.
- DULBECCO, R.; VOGT, M. Some problems of animal virology as studied by the plaque technique. **Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.**, v. 18, p. 273-279, 1953.
- DUMONT, P. et al. The Amaryllidaceae isocarbostryl narciclasine induces apoptosis by activation of the death receptor and/or mitochondrial pathways in cancer cells but not in normal fibroblasts. **Neoplasia**, v. 9, n. 9, p. 766-776, 2007.
- DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. Infectious Zika viral particles in breastmilk. **Lancet**, v. 387, n. 10023, p. 1051, 2016. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00624-3.
- DUPONT-ROUZEYROL, M. et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 21, n. 2, p. 381-382, 2015. DOI: 10.3201/eid2102.141553.
- EHRESMANN, D.; DEIG, E. F.; HATCH, M. T. **Antiviral properties of algal polysaccharides and related compounds**. In: HOPPE, H.; LEVRING, T.; TANAKA, Y. (Ed.). *Marine Algae in Pharmaceutical Science*. Walter de Gruyter: Berlin, New York, 1979.
- ESTOPPEY, D. et al. The Natural Product Cavinafungin Selectively Interferes with Zika and Dengue Virus Replication by Inhibition of the Host Signal Peptidase. **Cell Rep.**, v. 19, n. 3, p. 451-460, 2017. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.03.071.
- ETIENNE, C.; SANTOS, T.; ESPINAL, M. Perspective Piece Keynote Address (November 2016): Zika Virus Disease in the Americas: A Storm in the Making. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 97, n. 1, p. 16-18, 2017.
- EVANS, W. C. The comparative phytochemistry of the genus *Erythroxyton*. **J. Ethnopharm.**, v. 3, p. 265-277, 1981.
- EYER, L. et al. Nucleoside Inhibitors of Zika Virus. **J. Infect. Dis.**, v. 214, n. 5, p. 707-711, 2016.
- FALGOUT, B. et al. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. **J. Virol.**, v. 65, n. 5, p. 2467-2475, 1991.
- FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika Virus in the Americas--Yet Another Arbovirus Threat. **N. Engl. J. Med.**, v. 374, n. 7, p. 601-604, 2016.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Arboviroses emergentes no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med.Trop.** [online], v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007. DOI: 10.1590/S0037-86822007000200016.
- FIGUEIREDO, M.; FIGUEIREDO, L.; Emerging alphaviruses in the Americas: chikungunya and Mayaro. **Rev. Soc. Bra. Med. Trop.**, v. 47, n. 6, p. 677-683, 2014.

- FIRN, R. D.; JONES, C. G. Natural products - A Simple Model to Explain Chemical Diversity. **Nat. Prod. Rep.**, v. 20, n. 4, p. 382-391, 2003. DOI: 10.1039/B208815K.
- FISCHER, D. C. H. et al. *In vitro* screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. **Acta Trop.**, v. 92, p. 261–266, 2004.
- FIVELMAN, Q. L.; ADAGU, I. S.; WARHURST, D. C. Modified Fixed-Ratio Isobologram Method for Studying *in vitro* Interactions between Atovaquone and Proguanil or Dihydroartemisinin against Drug-Resistant Strains of *Plasmodium falciparum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 11, p. 4097-4102, 2004. DOI: 10.1128/AAC.48.11.4097-4102.
- FLANAGAN, J. L. et al. Role of carnitine in disease. **Nutr. Metab.**, v. 7, n. 30, 2010.
- FOY, B. D. et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 5, p. 880-2, 2011.
- FRASER, J. E. et al. A nuclear transport inhibitor that modulates the unfolded protein response and provides *in vivo* protection against lethal dengue virus infection. **J. Infect. Dis.**, v. 210, n. 11, p. 1780-91, 2014.
- FREITAS, M. F.; CARRIJO, T. T.; LUNA, B. N. Sinopse dos gêneros de Primulaceae no Brasil. **Rodriguésia**, v. 68, n. 1, p. 129-142, 2017. DOI: 10.1590/2175-7860201768122.
- FRIEDMAN, R. M.; GRIMLEY, P. M. Inhibition of arbovirus assembly by cycloheximide. **J. Virol.**, v. 4, n. 3, p. 292-299, 1969.
- FRITZELL, C. et al. Current challenges and implications for dengue, chikungunya and Zika seroprevalence studies worldwide: A scoping review. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 12, n. 7, p. e0006533, 2018. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006533.
- FROS, J. J. et al. Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. **J. Virol.**, v. 84, p. 10877-10887, 2010.
- FURUSAWA, E. et al. Isolation of Pretazettine from *Narcissus tazetta* L. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 24, n. 2, p. 336-338, 1976.
- FURUSAWA, E. et al. Therapeutic activity of pretazettine on Rauscher leukemia: combination of antiviral activity and cellular protein inhibition. **Chemotherapy**, v. 24, n. 4, p. 259-266, 1978.
- GABRIELSEN, B. et al. Antiviral (RNA) activity of selected Amaryllidaceae isoquinoline constituents and synthesis of related substances. **J. Nat. Prod.**, v. 55, n. 11, p. 1569-1581, 1992.
- GABY, A. R. Natural remedies for Herpes simplex. **Altern. Med. Rev.**, v. 11, n. 2, p. 93-101, 2006.
- GALLEGOS, K. M. et al. Chikungunya Virus: *In vitro* Response to Combination Therapy With Ribavirin and Interferon Alfa 2a. **J. Infect. Dis.**, v. 214, n. 8, p. 1192-1197, 2016. DOI: 10.1093/infdis/jiw358.
- GANESAN, V. K.; DUAN, B.; REID, S. P. Chikungunya virus: Pathophysiology, mechanism, and modeling. **Viruses**, v. 9, n. 12, p. 368, 2017. DOI: 10.3390/v9120368.
- GARCIA F. On the hypoglycemic effect of decoction of *Lagerstroemia speciosa* (banaba) administered orally. **J. Phil. Med. Assoc.**, v. 20, p. 395-402, 1940.
- GARCIA, M. D. et al. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 4, p. 318-328, 2009. DOI: 10.1016/j.chom.2009.04.001.
- GÉRARDIN, P. et al. Estimating Chikungunya prevalence in La Réunion Island outbreak by serosurveys: two methods for two critical times of the epidemic. **BMC infectious diseases**, v. 8, n. 99, p. 1-9, 2008. DOI: 10.1186/1471-2334-8-99

- GESCHER, K. et al. Proanthocyanidin-enriched extract from *Myrothamnus flabellifolia* Welw. exerts antiviral activity against herpes simplex virus type 1 by inhibition of viral adsorption and penetration. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 468–474, 2011. DOI: 10.1016/j.jep.2010.12.038.
- GHOSAL, S. et al. Alkaloids of *Haemanthus kalbreyeri*. **Phytoch.**, v. 24, n. 8, p. 1825–1828, 1985.
- GHOSH, T. et al. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure-activity analysis to clinical evaluation. **Glycobiol.**, v. 19, n. 1, p. 2-15, 2009. DOI:10.1093/glycob/cwn092.
- GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 52-60, 2005.
- GOMATHINAYAGAM, R. et al. Anticancer mechanism of plumbagin, a natural compound, on non-small cell lung cancer cells. **Anticancer Res.**, v. 28, n. 2A, p. 785-792, 2008.
- GONZALES, T.; ROBERT-BAUDOUIY, J. Bacterial aminopeptidases: Properties and functions. **FEMS microbiology Reviews**, v. 18, p. 319–344, 1996.
- GONZALEZ, M.; ALARCON, B.; CARRASCO, L. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 31, n. 9, 1388–1393, 1987.
- GONZÁLEZ-GUEVARA, J. L. et al. Phytochemical screening and *in vitro* antiherpetic activity of four *Erythroxylum* species. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 506-509, 2004.
- GRACI, J. D.; CAMERON, C.E. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. **Rev. Med. Virol.**, v. 16, p. 37–48, 2006.
- GRAHAM, S. A; CRISCI, J. V. HOCH, P. C. Cladistic analysis of the Lythraceae *sensu lato* base on morphological characters. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 113, p. 1-33, 1993.
- GRARD, G. et al. Zika virus in Gabon (Central Africa)--2007: a new threat from *Aedes albopictus*? **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 2, p. e2681, 2014.
- GRIFFITH, R. S.; DELONG, D. C.; NELSON, J. D. Relation of arginine-lysine antagonism to Herpes simplex growth in tissue culture. **Chemotherapy**, v. 27, n. 3, p. 209-213, 1981. DOI: 10.1159/000237979.
- GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends Microbiol.**, v. 10, n. 2, p. 100-103, 2002.
- GUO, H. F. et al. Antiviral activities of cycloheximide and its derivatives. **Yao Xue Xue Bao**, v. 45, n. 2, p. 268-273, 2010.
- GUO, H. F. et al. Synthesis, structures and anti-HBV activities of derivatives of the glutarimide antibiotic cycloheximide. **J. Antib.**, v. 62, p. 639-642, 2009.
- GUTIÉRREZ, R. M. P. Orchids: A review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology. **J. Medic. Plants Res.**, v. 4, n. 8, p. 592-638, 2010.
- GUY, B. et al. Development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine: One more step forward. **Vaccine**, v. 33, n. 50, p. 7100-7111, 2015. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.09.108.
- GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, 2010.
- GUZMAN, M. G.; ALVAREZ, M.; HALSTEAD, S. B. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. **Arch. Virol.**, v. 158, n. 7, p. 1445-1459, 2013. DOI: 10.1007/s00705-013-1645-3.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. **Lancet**, v. 385, n. 9966, p. 453-65, 2015.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 476-481, 1988.

HALSTEAD, S. B.; COHEN, S. N. Dengue Hemorrhagic Fever at 60 Years: Early Evolution of Concepts of Causation and Treatment. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 79, n. 3, p. 281-291, 2015.

HARVEY, S. C. H. Antimicrobial drugs. In: REMINGTON, J. P.; GENNARO, A. R. (Ed.). **Remington's pharmaceutical sciences**. Easton: Mack, 1990, cap. 62, p. 1163-1241.

HASSAN, S. T. et al. Plumbagin, a Plant-Derived Compound, Exhibits Antifungal Combinatory Effect with Amphotericin B against *Candida albicans* Clinical Isolates and Anti-hepatitis C Virus Activity. **Phytother Res.**, v. 30, n. 9, p. 1487-1492, 2016. DOI: 10.1002/ptr.5650.

HATCH, M. et al. Further studies on the chemical composition and an initial *in vivo* evaluation of antiviral material in extracts of macroscopic algae. **J. Phycol. Suppl.**, v. 13, p. 28-35, 1977.

HAWAS, W. U. et al. Different Culture Metabolites of the Red Sea Fungus *Fusarium equiseti* optimize the Inhibition of Hepatitis C Virus NS3/4A Protease (HCV PR). **Mar Drugs**, v. 14, n. 10, p. 1-12, 2016. DOI:10.3390/md14100190.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. **Microbiol Spectr.**, v. 5, n. 4, 2017. DOI: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.

HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 9, p. 1347-50, 2009.

HE, M. et al. Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids. **RSC Advances**, v. 5, n. 21, p. 16526-16574, 2015.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. **MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.**, v. 65, n. 3, p. 55-8, 2016.

HERCIK, K. et al. Adenosine triphosphate analogs can efficiently inhibit the Zika virus RNA-dependent RNA polymerase. **Antiviral Res.**, v. 137, p. 131-133, 2017.

HERRERA, M. R. et al. Crinine and lycorane type alkaloids from *Zephyranthes citrina*. **Planta Medica**, v. 67, n. 2, p. 191-193, 2001.

HEWAGE, R. T. et al. One strain-many compounds (OSMAC) method for production of polyketides, azaphilones, and an isochromanone using the endophytic fungus *Dothideomycete* sp. **Phytochemistry**, v. 108, p. 87-94, 2014. DOI: 10.1016/j.phytochem.2014.09.013.

HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. Chikungunya virus and its mosquito vectors. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 15, n. 4, p. 231-240, 2015.

HOBBER, D. et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in dengue-infected patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 48, n. 3, p. 324-331, 1993.

HOEHNE, F.C. **Iconografia de Orchidaceas do Brasil**. Instituto de Botânica de São Paulo. 601 p. 1949.

HUANG, S. X. et al. Cycloheximide and congeners as inhibitors of eukaryotic protein synthesis from endophytic actinomycetes *Streptomyces* spp. YIM56132 and YIM56141. **J. Antibiot.**, v. 64, n. 1, p. 163-166, 2011. DOI: 10.1038/ja.2010.150.

HULEIHEL, M.; ISHANU, V.; TAL, J.; ARAD, S. (MALIS). Antiviral effect of red microalgal polysaccharides on Herpes simplex and Varicella zoster viroses. **J. Applied Phyc.**, v. 13, n. 2, p. 127-134. DOI:10.1023/a:1011178225912.

HUNSPERGER, E. A. et al. Performance of Dengue Diagnostic Tests in a Single-Specimen Diagnostic Algorithm. **J. Infect. Dis.**, v. 214, n. 6, p. 836-844, 2016.

IEVEN, M. et al. Plant antiviral agents. 3. Isolation of alkaloids from *clivia-minata* regel (Amaryllidaceae). **J. Nat. Prod.**, v. 45, n. 5, p. 564-573, 1982.

ILAVENIL, S.; KALEESWARAN, B.; RAVIKUMAR, S. Antioxidant and hepatoprotective activity of lycorine against Carbon tetrachloride-induced oxidative stress in Swiss albino mice. **Der Pharma Chemica**, v. 2, n. 6, p. 267-272, 2010.

IRVINE, J. H.; HORSFIELD, J. A.; MCKINNEY, C. Z.; TATE, W. P. A novel strategy to interfere with human immunodeficiency virus type 1 propagation. **N. Z. Med. J.**, v. 111, n. 1068, p. 222-224, 1998.

IVERSEN, P.W. et al. HTS Assay Validation. [updated 2012 Oct 1]. In: SITTAMPALAM, G. S.; GROSSMAN, A.; BRIMACOMBE, K.; et al. (Ed.) **Assay Guidance Manual [Internet]**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004, p. 945-970. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>>. Acesso em: 21/10/2019.

JAIME, M. F. V. et al. *In vitro* antiviral activity of plant extracts from Asteraceae medicinal plants. **Virologia**, v. 10, n. 245, p. 2-10, 2013. DOI: 10.1186/1743-422X-10-245.

JANBAZ, K. H.; SAEED, S. A.; GILANI, A. H. Protective effect of rutin on paracetamol and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, p. 557-563, 2002.

JASSIM, S. A.; NAJI, M. A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **J. Appl. Microbiol.**, v. 95, n. 3, p. 412-27, 2003.

JAVED, H. et al. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. **Neuroscience**, v. 17, p. 340-352, 2012.

JEONG, A. H. N. et al. Inhibition of HIV-1 integrase by galloyl glucoses from *Terminalia chebula* and flavonol glycoside gallates from *Euphorbia peginensis*. **Plant Med.**, v. 68, p. 457-459, 2002.

JI, X. et al. Synthesis and antiviral activities of synthetic glutarimide derivatives. **Chem. Pharm. Bull (Tokyo)**, v. 58, n. 11, p. 1436-1441, 2010. DOI: 10.1248/cpb.58.1436.

JOHANSSON, M. A. et al. Zika and the Risk of Microcephaly. **N. Engl. J. Med.** v. 375, n. 1, p. 1-4, 2016.

JOSSERAN, L. et al. Chikungunya disease outbreak, Reunion Island. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, n. 12, p. 1994-1995, 2006. DOI: 10.3201/eid1212.060710.

JOUANNIC, J. M. et al. Zika virus infection in French Polynesia. **Lancet**, v. 387, n. 10023, p. 1051-1052, 2016.

JUDD, W. S. et al. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sinauer Associates, Sunderland, USA: 2002.

JULANDER, J. G. et al. Efficacy of the broad-spectrum antiviral compound BCX4430 against Zika virus in cell culture and in a mouse model. **Antiviral Res.**, v. 137, p. 14-22, 2017. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.11.003

JUPP, P. G.; MCINTOSH, B. M. Chikungunya virus disease. In: MONATH, T. P., (Ed.). **The Arboviruses: Epidemiology and Ecology**. Boca Raton, FL, USA, CRC Press, 1988, p. 137-157.

KABANOV, A. S. et al. [Study of antiviral activity of extracts obtained from basidial fungi against influenza viruses of different subtypes in experiments *in vitro* and *in vivo*.] **Zh Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.**, v. 1, n. 1, p. 40-43, 2011.

- KADIR, S. L. A.; YAAKOB, H.; ZULKIFLI, R. M. Potential anti-dengue medicinal plants: a review. **J. Nat. Med.**, v. 67, n. 4, p. 677-689, 2013. DOI: 10.1007/s11418-013-0767-y.
- KAROU, S. D. et al. Sub-Saharan Rubiaceae: a review of their traditional uses, phytochemistry and biological activities. **Pak. J. Biol. Sci.**, v. 14, n. 3, p. 149-169, 2011.
- KATOCH, D. et al. Narciclasine-4-O- β -D-xylopyranoside, a new narciclasine glycoside from *Zephyranthes minuta*. **Nat Prod Res.**, v. 12, p. 1-8, 2019.
- KAUSHIK, S. et al. Antiviral and Therapeutic Uses of Medicinal Plants and Their Derivatives against Dengue Viruses. **Pharmac. Reviews**, v. 12, n. 24, p. 177-185, 2018. DOI:10.4103/phrev.phrev_2_18.
- KHAN, A. H. et al. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **J. Gen. Virol.**, v. 83, n. Pt 12, p. 3075-3084, 2002.
- KHAN, M. et al. Assessment of *in vitro* prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against Chikungunya virus in Vero cells. **J. Med. Virol.**, v. 82, n. 5, p. 817-824, 2010. DOI: 10.1002/jmv.21663.
- KHAN, M. et al. Cellular IMPDH enzyme activity is a potential target for the inhibition of Chikungunya virus replication and virus induced apoptosis in cultured mammalian cells. **Antiviral Res.**, v. 89, n. 1, p. 1-8, 2011. DOI: 10.1016/j.antiviral.2010.10.009.
- KIAT, T. S. et al. Inhibitory activity of cyclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of fingerroot, *Boesenbergia rotunda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 16, n. 12, p. 3337-3340, 2006. DOI: 10.1016/j.bmcl.2005.12.075.
- KIELIAN, M. Class II virus membrane fusion proteins. **Virology**, v. 344, p. 38-47, 2006.
- KIHARA, M. et al. Isolation and structure elucidation of a novel alkaloid, incartine, a supposed biosynthetic intermediate, from flowers of *Lycoris incarnata*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 42, p. 289-292, 1994.
- KIM, S. Y. et al. Interaction of Zika Virus Envelope Protein with Glycosaminoglycans. **Biochemistry**, v. 56, n. 8, p. 1151-1162, 2017. DOI:10.1021/acs.biochem.6b01056.
- KINDHAUSER, M. K. et al. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. **Bull. World Health Organ.**, v. 94, n. 9, p. 675-686c, 2016.
- KLAWIKKAN, N. et al. Effect of Thai medicinal plant extracts against Dengue virus *in vitro*. **J. Pharm. Science**, v. 38, n. 1, p. 13-18, 2011.
- KREFT, S.; KNAPP, M.; KREFT, I. Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds and determination by capillary electrophoresis. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, n. 11, p. 4649-4652, 1997.
- KUDI, A. C.; MYINT, S. H. Antiviral activity of some Nigerian medicinal plant extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 68, n. 1-3, p. 289-294, 1999.
- KUIVANEN, S. et al. Obatoclax, saliphenylhalamide and gemcitabine inhibit Zika virus infection *in vitro* and differentially affect cellular signaling, transcription and metabolism. **Antiviral Res.**, v. 139, p. 117-128, 2017. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.12.022.
- LA CASA, C. et al. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, n. 1-2, p. 45-53, 2000.
- LABRAÑA, J. et al. Alkaloids from *Narcissus angustifolius* subsp. *transcarpathicus* (Amaryllidaceae). **Phytoch.**, v. 60, n. 8, p. 847-852, 2002.
- LAMORAL-THEYS, D. et al. Lycorine and its derivatives for anticancer drug design. **Mini Rev Med Chem.**, v. 10, n. 1, p. 41-50.

- LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, n. 8, p. 1232-1239, 2008.
- Lani R, et al. Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. **Antiviral Res.**, v. 133, p. 50-64, 2016. DOI:10.1016/j.antiviral.2016.07.009.
- LAROCCA, R. A. et al. Vaccine protection against Zika virus from Brazil. **Nature**, v. 536, n. 7617, p. 474-478, 2016.
- LEE, C. J.; LIN, H. R.; LIAO, C. L.; LIN, Y. L. Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus. **J. Virol.**, v. 82, n. 13, p. 6470–6480, 2008. DOI: 10.1128/JVI.00117-08.
- LEE, S. H. et al. Effects of cocktail of four local Malaysian medicinal plants (*Phyllanthus* spp.) against dengue virus 2. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 13, p. 192, 2013.
- LEE-HUANG, S. et al. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. **B. B. Res. Commun.**, v. 307, n. 4, p. 1029-1037, 2003.
- LEPARC-GOFFART, I. Chikungunya in the Americas. **Lancet.**, v. 383, n. 9916, p. 514, 2014.
- LESSLER, J. et al. Assessing the global threat from Zika virus. **Science**, v. 353, n. 6300, p. aaf8160, 2016.
- LEWIS, J. R. Amaryllidaceae alkaloids. **Nat. Prod. Rep.**, v. 7, p. 549-556, 1990.
- LEWIS, J. R. Amaryllidaceae, sceletium, imidazole, oxazole, thiazole, peptide and miscellaneous alkaloids. **Nat Prod Rep.**, v. 19, n. 2, p. 223-258, 2002.
- LI, M. et al. Applications of HPLC/MS in the analysis of traditional Chinese medicines. **J. Pharm. Anal.**, v. 1, n. 2, p. 81-91, 2011. DOI: 10.1016/S2095-1779
- LI, S. Y. et al. Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. **Antiviral Res.**, v. 67, n. 1, p. 18-23, 2005.
- LIMA, G. S. et al. Triterpenos de *Guettarda grazielae*. M: R.V. Barbosa (Rubiaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 19, n. 1B, p. 284-289, 2009. DOI: 10.1590/S0102-695X2009000200017.
- LIMA, S. C. M. et al. Leishmanicidal Activity of Withanolides from *Aureliana Fasciculata* var. *Fasciculata*. **Molecules**, v. 23, n. 3160, p. 1-12, 2018. DOI:10.3390/molecules23123160.
- LIN, L. Z. et al. Lycorine alkaloids from *Hymenocallis littoralis*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 4, p. 1295-1298, 1995.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. **J. Virol.**, v. 73, n. 6, p. 4611-4621, 1999.
- LINGAPPA, V. R., HURT, C. R., GARVEY, E. Capsid assembly as a point of intervention for novel antiviral therapeutics. **Curr. Pharmac. Biotec.**, v.14, p.1-11, 2013.
- LINNAKOSKI, R. et al. Antiviral Agents From Fungi: Diversity, Mechanisms and Potential Applications. **Front Microbiol.**, v. 9, n. 2325, p. 1-18, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02325.
- LIU, J.; YANG, Y.; XU, Y.; MA, C.; QIN, C.; ZHANG, L. Lycorine reduces mortality of human enterovirus 71-infected mice by inhibiting virus replication. **Virol. J.**, v. 8, p. 483-492, 2011.
- LIU, T.; GREENSLADE, A.; YANG, S. Levels of rhizome endophytic fungi fluctuate in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* as plants age. **Plant Diversity**. v. 39, n. 1, p. 60-64, 2016.

LOCHER, C. P. et al. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 49, n. 1, p. 23-32, 1995. DOI: 10.1016/0378-8741(95)01299-0.

LOCHER, C. P. et al. **Antiviral activity of Hawaiian medicinal plants against human immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1)**. *Phytomedicine*, v. 2, n. 3, p. 259-264, 1996. DOI: 10.1016/S0944-7113(96)80052-3.

LOPEZ, A.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n.2-3, p.189-196, 2001. DOI: 10.1016/s0378-8741(01)00292-6.

LOW, Y. J. et al. Antiviral activity of emetine dihydrochloride against dengue virus infection. **J. Antivir. Antiretrovir.**, v. 1, n. 1, p. 62-71, 2009. DOI:10.4172/jaa.1000009.

LUCAS-HOURANI, M. et al. A phenotypic assay to identify Chikungunya virus inhibitors targeting the nonstructural protein nsP2. **J. Biomol. Screen.**, v. 18, n. 2, p. 172–179, 2013. DOI: 10.1177/1087057112460091.

LUSA, M. G.; BONA, C. Caracterização morfoanômica e histoquímica de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.f. Macbr. (Lythraceae). **Acta Bot. Bras.**, v. 25, n. 2, p. 517-527, 2011. DOI: 10.1590/S0102-33062011000200027.

MA, H. et al. A new alternative to treat swine influenza A virus infection: Extracts from *Terminalia chebula* Retz. Afr. **J. Microbiol. Res.**, v. 4, n. 6, p. 497-499, 2010.

MABBERLEY, D. J. *The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants*. Cambridge University Press, Cambridge, 1997.

MADY, M. S. et al. The indole alkaloid meleagrin, from the olive tree endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*, as a novel lead for the control of c-Met-dependent breast cancer proliferation, migration and invasion. **Bioorg Med. Chem.**, v. 24, n. 2, p. 113-122, 2016. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.11.038.

MAHENDRADAS, P.; AVADHANI, K.; SHETTY, R. Chikungunya and the eye: a review. **J. Ophthalmic. Inflamm. Infect.**, v. 3, n. 1, p. 35, 2013. DOI: 10.1186/1869-5760-3-35.

MANGIA, A. et al. Individualized treatment duration for hepatitis C genotype 1 patients: a randomized controlled trial. **Hepatology**, v. 47, p. 43–50, 2008.

MANN, J. **Murder, Magic, and Medicine**. Oxford University Press: New York, NY, USA,,: 164–170 p. 1994.

MANNS, M. P.; VON HAHN, T. Novel therapies for hepatitis C - one pill fits all? **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 12, n. 8, p. 595-610, 2013.

MARCHETTE, N. J.; GARCIA, R.; RUDNICK, A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 18, n. 3, p. 411-415, 1969.

MARK, G. E. et al. Nuclear accumulation of influenza viral RNA transcripts and the effects of cycloheximide, actinomycin D, and alpha-amanitin. **J. Virol.**, v. 29, n. 2, p. 744-752, 1979.

MARTÍNEZ-GUTIERREZ, M. et al. Lovastatin delays infection and increases survival rates in AG129 mice infected with dengue virus serotype 2. **PLOS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2014. DOI:10.1371/journal.pone.0087412.

MASLOW, J. N. Zika Vaccine Development-Current Progress and Challenges for the Future. **Trop Med Infect Dis.**, v. 4, n. 3, p. 104, 2019. DOI: 10.3390/tropicalmed4030104.

MATHERON, S. et al. Long-Lasting Persistence of Zika Virus in Semen. **Clin. Infect. Dis.**, v.63, n. 9, p. 1264, 2016.

- MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: a global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta Trop.**, v. 166, p. 155-163, 2017. DOI: 10.1016/j.actatropica.2016.11.020.
- MCNULTY, J. et al. Structure-activity studies on the lycorine pharmacophore: A potent inducer of apoptosis in human leukemia cells. **Phytoch.**, v. 70, n. 7, p. 913–919, 2009.
- MEHTA, R. et al. The neurological complications of chikungunya virus: A systematic review. **Rev. Med. Virol.**, v. 28, n. 3, p. e1978, 2018. DOI: 10.1002/rmv.1978.
- MELLOU, F. et al. Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. **Process Biochem.**, v. 41, p. 2029-3204, 2006.
- MENDONCA, D. E.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba - *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Rev. bras.**, v. 19, n. 2b, p. 577-581, 2009. DOI: 10.1590/S0102-695X2009000400012.
- MENENDEZ-ARIAS, L.; RICHMAN, D. D. Editorial overview: antivirals and resistance: advances and challenges ahead. **Curr. Opin. Virol.**, v. 8, p. iv-vii, 2014.
- MERINO-RAMOS, T. et al. Antiviral Activity of Nordihydroguaiaretic Acid and Its Derivative Tetra-O-Methyl Nordihydroguaiaretic Acid against West Nile Virus and Zika Virus. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 61, n. 8, 2017.
- MERTENS, E. Viral determinants in the NS3 helicase and 2K peptide that promote West Nile virus resistance to antiviral action of 2',5'-oligoadenylate synthetase 1b. **Virology**, v. 399, n. 1, p. 176-185, 2010. DOI: 10.1016/j.virol.2009.12.036.
- MESQUITA, M. L. et al. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **J. Ethnopharmacol.**, v. 110, p. 165-170, 2007.
- MESSINA, J. P. et al. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. **Trends Microbiol.**, v. 22, n. 3, p. 138-46, 2014.
- MILLER, C. S.; FOULKE, C. N. Use of lysine in treating recurrent oral herpes simplex infections. **Gen. Dent.**, v. 32, n. 6, p. 490-493, 1984.
- MILLER, S. et al. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 12, p. 8873-8882, 2007. DOI: 10.1074/jbc.M609919200.
- MINER, J. J. et al. Brief report: chikungunya viral arthritis in the United States: a mimic of seronegative rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatol.**, v. 67, n. 5, p. 1214-1220, 2015. DOI: 10.1002/art.39027.
- MINHO, A. P.; GASPAR, E. B.; DOMINGUES, R. Guia prático para determinação de curva dose-resposta e concentração letal em bioensaios com extratos vegetais. **Comunicado Técnico 93**. 2016, Bagé, RS.
- MIYANARI, Y. et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. **Nat. Cell Biol.**, v. 9, n. 10, p. 1089-1097, 2007. DOI: 10.1038/ncb1631.
- MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **N. Engl. J. Med.**, v. 374, n. 10, p. 951-958, 2016.
- MOELLING, K.; SCHULZE, T.; DIVINGER, H. Inhibition of human immuno-deficiency virus type 1 RNase H by sulfated polyanions. **J. Virol.**, v. 63, n. 12, p. 5489–5491, 1989.
- MONATH, T. P. Dengue: the risk to developed and developing countries. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 91, n. 7, p. 2395-2400, 1994. DOI: 10.1073/pnas.91.7.2395.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. D. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MONTEIRO, V. V. S. et al. *Aedes-Chikungunya Virus Interaction: Key Role of Vector Midguts Microbiota and Its Saliva in the Host Infection*. **Front. Microbiol.**, v. 10, p. 492, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00492.

MORAES, C. T. **Estudo fitoquímico das aéreas de Worsleya procesra (Lem.) Traub (Amaryllidaceae)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.

MOREIRA, J. et al. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 23, n. 5, p. 296-305, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOTA, M. T. O. et al. Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. **Future Virology**, v. 10, n. 9, p. 1109–1122, 2015. DOI:10.2217/fvl.15.76.

MOTTA, I. J. et al. Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion. **N. Engl. J. Med.**, v. 375, n. 11, p. 1101-1103, 2016. DOI: 10.1056/NEJMc1607262.

MUKHERJEE, S. Betaine and nonalcoholic steatohepatitis: back to the future? **World J Gastroenterol.**, v. 17, n. 32, p. 3663-3664, 2011. DOI: 10.3748/wjg.v17.i32.3663.

MULLER, B.; KRAUS, J.; FRANZ, G. Chemical Structure and Biological Activity of Water-Soluble Polysaccharides from *Cassia angustifolia* Leaves. **Planta Medica**, v. 55, n. 06, p. 536–539, 1989. DOI: 10.1055/s-2006-962088.

MULLER, V. et al. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. **Phytother. Res.**, v. 21, n. 10, p. 970-974, 2007.

MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerg Infect Dis**, v. 21, n. 2, p. 359-361, 2015.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 10, p. O595-6, 2014.

NAKAGAWA, Y.; UYEO, S.; YAYIMA, H. The double bond in lycorine. **Chemistry and industry**, p. 1238-1239, 1956.

NAKAMURA, A. T. **Morfologia e anatomia dos frutos e sementes de três espécies de Erythroxylum P. Browne (Erythroxylaceae)**. 2003. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

NAKASHIMA, H. et al. Purification and characterization of avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor, sulphated polysaccharides extracted from sea algae. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 31, n. 10, p. 1524–1528, 1987.

NARUZAWA, E.S.; PAPA, M.F.S. Antifungal activity of extracts from Brazilian Cerrado plants on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Corynespora cassicola*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.4, p.408- 412, 2011. DOI: 10.1590/S1516-05722011000400006.

NASSIRI-ASL, M. et al. The effects of rutin on the development of pentylenetetrazole kindling and memory retrieval in rats. **Epilepsy Behav.**, v. 18, p. 50-53, 2010.

NAWAWI, A. et al. Inhibitory Effects of Indonesian Medicinal Plants on the Infection of Herpes Simplex Virus Type 1. **Phytot. Research**, v. 13, p. 37-41, 1999.

- NEVES-SOUZA, P. C. et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during *in vitro* infection. **BMC Infect. Dis.**, v. 5, p. 64, 2005.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.
- NICASTRI, E. et al. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. **Euro Surveill**, v. 21, n. 32, 2016.
- NOBLE, C. G. et al. Strategies for development of Dengue virus inhibitors. **Antiviral Res**, v. 85, n. 3, p. 450-62, 2010.
- NOZAWA, K.; NAKAJIMA, S. Isolation of radicicol from *Penicillium Luteo-Aurantium*, and Meleagrins, a new metabolite, from *Penicillium Meleagrinum*. **Journal of Natural Products**, v. 42, n. 4, p. 374-377, 1979. DOI:10.1021/np50004a004.
- NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC medicine**, v. 13, n. 102, p. 1-10, 2015. DOI: 10.1186/s12916-015-0348-x.
- NUNES, P. H. M. et al. Gastric Antiulcerogenic and Hypokinetic Activities of *Terminalia fagifolia* Mart. & Zucc. (Combretaceae). **BioMed Research Internat.**, v. 2014, n. 2014, p. 1-14, 2014. DOI: 10.1155/2014/261745.
- NUTAN et al. Ellagic acid & gallic acid from *Lagerstroemia speciosa* L. inhibit HIV-1 infection through inhibition of HIV-1 protease & reverse transcriptase activity. **Indian J. Mec. Researc.**, v., 137, n. 3, p. 540-548, 2013.
- ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 52, n. 1, p. 1, 2003. DOI: 10.1093/jac/dkg301.
- OISHI, K. et al. Dengue illness: clinical features and pathogenesis. **J. Infect. Chemother.**, v. 13, n. 3, p. 125-133, 2007. DOI: 10.1007/s10156-007-0516-9.
- ONG, S. P.; CHU, J. J. H.; NG, M. L. Inhibition of West Nile virus replication in cells stably transfected with vector-based shRNA expression system. **Virus Res.**, v. 135, n. 2, p. 292-297, 2008. DOI: 10.1016/j.virusres.2008.04.014.
- OPAS (Pan American Health Organization), 2017. **Zika Case Counts**. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12390&Itemid=42090&lang=en>. Acesso em: 15/10/2019.
- OSORIO, E. J. et al. *In vitro* antiprotozoal activity of alkaloids from *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae). **Phytoch. Letters**, v. 3, n. 3, p. 161-163, 2010.
- OSUNA-RAMOS, J. F.; REYES-RUIZ, J. M.; DEL ÁNGEL, R. M. The Role of Host Cholesterol During Flavivirus Infection. **Front. Cell. Infec. Microb.**, v. 8, p. 388, 2018. DOI=10.3389/fcimb.2018.00388.
- OZDEN, S. et al. Inhibition of Chikungunya virus infection in cultured human muscle cells by furin inhibitors: impairment of the maturation of the E2 surface glycoprotein. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 32, p. 21899-21908, 2008. DOI: 10.1074/jbc.M802444200.
- PÁDUA, P.F. et al. Genotoxic, antigenotoxic and phytochemical assessment of *Terminalia actinophylla* ethanolic extract. **F. Chem. Toxic.**, v. 62, p. 521-527, 2013.
- PAIXAO, E. S. et al. History, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Zika: A Systematic Review. **Am. J. Public Health**, v. 106, n. 4, p. 606-12, 2016.

- PANG X. et al. Three new polyketides from the marine sponge-derived fungus *Trichoderma* sp. SCSIO41004. **Nat. Prod. Res.**, v. 32, n. 1, p. 105-111, 2018. DOI: 10.1080/14786419.2017.
- PAPAS, T. S. et al. Inhibition of DNA polymerase of avian myeloblastosis virus by an alkaloid extract from *Narcissus tazetta* L. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 52, n. 1, p. 88-92, 1973.
- PARIDA, M. M. et al. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on dengue virus type-2 replication. **J. Ethnopharmacol.**, v. 79, n. 2, p. 273-278, 2002. DOI: 10.1016/s0378-8741(01)00395-6.
- PASCOALINO, B. S. et al. Zika antiviral chemotherapy: identification of drugs and promising starting points for drug discovery from an FDA-approved library. **F1000Res.**, v. 5, n. 2523, p. 1-17, 2016. DOI: 10.12688/f1000research.9648.1.
- PATKAR, C. G. et al. Identification of inhibitors of yellow fever virus replication using a replicon-based high-throughput assay. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, n. 10, p. 4103-4114, 2009. DOI: 10.1128/AAC.00074-09.
- PIOZZI, F. et al. Narciclasine and narciprimine. **Tetrahedron**, v. 24, n. 3, p. 1119-1131, 1968.
- PIRES, D. E. et al. aCSM: noise-free graph-based signatures to large-scale receptor-based ligand prediction. **Bioinformatics**, v. 29, n. 7, p. 855-861, 2013. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt058.
- PIRES, D. E. et al. Cutoff Scanning Matrix (CSM): structural classification and function prediction by protein inter-residue distance patterns. **BMC Genomics**, v. 12, n. 4, p. 2-11, 2011. DOI: 10.1186/1471-2164-12-S4-S12.
- PIRES, D. E.; Blundell, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066-4072, 2015. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00104.
- PIRES, D. E.; KAMINSKAS, L. M.; ASCHER, D. B. Prediction and optimization of pharmacokinetic and toxicity properties of the ligand. **Methods Mol. Biol.**, v. 1762, p. 271-284, 2018. DOI: 10.1007/978-1-4939-7756-7_14.
- PITISUTTITHUM, P.; BOUCKENOOGHE, A. The first licensed dengue vaccine: an important tool for integrated preventive strategies against dengue virus infection. **Expert Rev Vaccines**, v. 15, n. 7, p. 795-798, 2016. DOI: 10.1080/14760584.2016.
- PITTS, J. D. et al. Antiviral activity of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR) against Zika virus. **Antiviral Res.**, v. 147, p. 124-130, 2017.
- POLAND, G. A. et al., Development of vaccines against Zika virus. **Lancet Infect. Dis.**, v. 18, n. 7, p. e211–e219, 2018. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30063-X.
- POYNARD, T. et al. Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus, International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). **Lancet**, v. 352, n. 9138, p. 1426–1432, 1998.
- PUCCIONI-SOHLER, M. et al. Dengue infection in the nervous system: lessons learned for Zika and Chikungunya. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 75, n. 2, p. 123-126, 2017. DOI: 10.1590/0004-282x20160189.
- QIN, C. F.; QIN, E. D. Capsid-targeted viral inactivation can destroy dengue 2 virus from within *in vitro*. **Arch. Virol.**, v. 151, n. 2, p. 379-385, 2006. DOI: 10.1007/s00705-005-0631-9.
- QING, M. et al. Cyclosporine inhibits flavivirus replication through blocking the interaction between host cyclophilins and viral NS5 protein. **Antimic. Ag. Chem.**, v. 53, n. 8, p. 3226-3235, 2009.

- QIU, H et al. Structure elucidation and sulfated derivatives preparation of two alpha-d-glucans from *Gastrodia elata* Bl. and their anti-dengue virus bioactivities. **Carbohydrate Res.**, v. 342, p. 2230-2236, 2007.
- QUINTERO, A. et al. Inhibition of hepatitis B virus and human immunodeficiency virus (HIV-1) replication by *Warscewiczia coccinea* (Vahl) Kl. (Rubiaceae) ethanol extract. **Nat. Prod. Res.**, v. 25, n. 16, p. 1565-1569, 2011. DOI:10.1080/14786419.2010.535164.
- RADA, B.; DRAGUN, M. Antiviral action and selectivity of 6-azauridine. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 284, p. 410–417, 1977.
- RAEKIANSYAH, M. et al. Identification of novel antiviral of fungus-derived brefeldin A against dengue viruses. **Trop. Med. Health**, v. 45, n. 32, p. 1-7, 2017. DOI:10.1186/s41182-017-0072-7.
- RAHMAN, M. A. et al. Medicinal plant diversity in the flora of Saudi Arabia 1: a report on seven plant families. **Fitoterapia**, v. 75, n. 2, p. 149-161, 2004.
- RAMPAL, S. M.; MEENA, H. Neurological complications in chikungunya fever. **J. Assoc. Physicians India**, v. 55, p. 765-769, 2007.
- RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon.**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.
- RATHORE, A. P. S. et al. Celgosivir treatment misfolds dengue virus NS1 protein, induces cellular pro-survival genes and protects against lethal challenge mouse model. **Antiviral Res.**, v. 92, n. 3, p. 453-460, 2011. DOI: 10.1016/j.antiviral.2011.10.002.
- RAUSCH, K. et al. Screening bioactives reveals nanchangmycin as a broad spectrum antiviral active against Zika virus. **Cell reports**, v. 18, n. 3, p. 804-815, 2017.
- RAVICHANDRAN, R.; MANIAN, M. Ribavirin therapy for Chikungunya arthritis. **J. Infect. Dev. Ctries**, v. 2, n. 2, p. 140–142, 2008.
- RENARD-NOZAKI, J. Effect of alkaloids isolated from Amaryllidaceae on herpes-simplex virus. **Res. Virol.**, v. 140, n. 2, p. 115-128, 1989.
- REYES-DEL VALLE, J. et al. Dengue Virus Cellular Receptors and Tropism. **Curr. Trop. Med. Rep.**, v. 1, n. 1, p. 36-43, 2014. DOI: 10.1007/s40475-013-0002-7.
- RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. **Fitofisionomias do bioma Cerrado**. In: SANO, S. M. (Ed.) *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1999.
- RICHETTI, S. K. et al. Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. **Behav. Brain Res.**, v. 217, p. 10–15, 2011.
- RISHTON, G. M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **Am. J. Cardiol.**, v. 101, n. 10a, p. 43d-49d, 2008.
- Robbrecht, E. **Tropical woody Rubiaceae**. Opera Botânica Bélgica. v. 1: p. 1-271, 1988.
- RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. X. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Cienc. Agrotec.**, v. 25, p. 102–123, 2001.
- RODRIGUEZ-BARRAQUER, I. et al. Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region. **Science**, v. 363, n. 6427, p. 607-610, 2019. DOI: 10.1126/science.aav6618.
- RODRIGUEZ-ROCHE, R.; GOULD, E. A. Understanding the dengue viruses and progress towards their control. **Biomed. Res. Int.**, v. 2013, n. 2013, p. 690835. 2013. DOI:10.1155/2013/690835.

- ROOSEDAAL, J. et al. Regulated cleavages at the West Nile virus NS4A-2K-NS4B junctions play a major role in rearranging cytoplasmic membranes and golgi trafficking of the NS4A protein. **J. Virol.**, v. 80, n. 9, p. 4623-4632, 2006. DOI: 10.1128/JVI.80.9.4623-4632.2006.
- ROQUES, P. et al. Paradoxical Effect of Chloroquine Treatment in Enhancing Chikungunya Virus Infection. **Viruses**, v. 10, n. 5, p. 268, 2018. DOI: 10.3390/v10050268.
- ROTH, A. et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. **Euro Surveill**, v. 19, n. 41, 2014.
- ROTHAN, H. A. et al. Inhibitory effect of doxycycline against dengue virus replication *in vitro*. **Arch. Virol.**, v. 159, n. 4, p. 711-718, 2014. DOI:10.1007/s00705-013-1880-7.
- ROTHAN, H. A. et al. Study the antiviral activity of some derivatives of tetracycline and non-steroid anti inflammatory drugs towards dengue virus. **Trop. Biomed.**, v. 30, n. 4, p. 681-690, 2013.
- RUFIN, M. K. T. Bioprospecting endophytic fungi from *Fusarium* genus as sources of bioactive metabolites. **Mycology**, 2019. DOI: 10.1080/21501203.2019.1645053.
- RUSCHEL, D. **O gênero Piper (Piperaceae) no Rio Grande do Sul**. 2004. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SACRAMENTO, C. Q. et al. The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40920, 2017. DOI: 10.1038/srep40920.
- SACRAMENTO, C. Q., et al. Aureonitol, a fungi-derived tetrahydrofuran, inhibits influenza replication by targeting its surface glycoprotein hemagglutinin. **PLoS One**, v. 10, n. 10, p. e0139236, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0139236.
- SAIZ, J. C.; MARTIN-ACEBES, M. A. The Race To Find Antivirals for Zika Virus. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 61, n. 6, p.e00411-17, 2017. DOI: 10.1128/AAC.00411-17.
- SALOMÃO, K. et al. Trypanosoma cruzi mitochondrial swelling and membrane potential collapse as primary evidence of the mode of action of naphthoquinone analogues. **BMC Microbiol.**, v. 13, p. 196, 2013. DOI:10.1186/1471-2180-13-196.
- SAND, J. M. et al. Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone), isolated from *Plumbago zeylanica*, inhibits ultraviolet radiation-induced development of squamous cell carcinomas. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 1, p. 184-190, 2011. DOI: 10.1093/carcin/bgr249.
- SANDS, J.; AUPERIN, D.; SNIPES, W. Extreme Sensitivity of Enveloped Viruses, Including Herpes Simplex, to Long-Chain Unsaturated Monoglycerides and Alcohols. **Antimicrob. Ag. Chemother.**, v. 15, n. 1, p. 63-67, 1979. DOI: 10.1128/AAC.15.1.67.
- SCHILTE, C. et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 3, p. e2137, 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002137.
- SCHULDT, E. Z. et al. Comparative study of radical scavenger activities of crude extract and fractions from *Cuphea carthagenensis* leaves. **Phytomedicine**, v. 11, p. 523-529, 2004.
- SCHULER-FACCINI, L. et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. **MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.**, v. 65, n. 3, p. 59-62, 2016.
- SCHULZE, I. T. Reversible inhibition of type 2 dengue virus by agar polysaccharide. **ScienceDirect**, v. 22, n. 1, p. 79-90, 1964. DOI:10.1016/0042-6822(64)90050-9.

SCHULZE, I. T.; SCHLESINGER, R. W. Inhibition of infectious and hemagglutinating properties of type 2 dengue virus by aqueous agar extracts. **ScienceDirect**, v. 19, n.1, p. 49-57, 1963. DOI:10.1016/0042-6822(63)90023-0.

SCHWARZ, M. J. et al. Activities of extract and constituents of *Banisteriopsis caapi* relevant to parkinsonism. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 75, n. 3, p. 627-633, 2003. DOI: 10.1016/s0091-3057(03)00129-1

SCHWEDHELM, E. et al. Clinical pharmacokinetics of antioxidants and their impact on systemic oxidative stress. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 42, p. 437-459, 2003.

SCOTT, R. M. et al. Isolation of dengue viruses from peripheral blood leukocytes of patients with hemorrhagic fever. **J. Infect. Dis.**, v. 141, n. 1, p. 1-6, 1980.

SEIFERT, K.; CROFT, S. L. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 50, n. 1, p. 73-79, 2006. DOI: 10.1128/AAC.50.1.73-79.2006.

SENER, B.; ORHAN, I.; SATAYAVIVAD, J. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p. 1220–1223, 2003.

SERGON, K. et al. Seroprevalence of Chikungunya virus infection on Grande Comore Island, union of the Comoros, 2005. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 76, n. 6, p. 1189–1193, 2007.

SHEN, J. W. et al. Lycorine: a potential broad-spectrum agent against crop pathogenic fungi. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, n. 3, p. 354-358, 2014.

SHIBNEV, V. A. et al. Antiviral activity of *Inonotus obliquus* fungus extract towards infection caused by hepatitis C virus in cell cultures. **Bull Exp. Biol. Med.**, v. 151, n. 5, p. 612-614, 2011.

SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. O cerrado como potencial de plantas medicinais e tóxicas. **Oréades**, v. 8, p. 15–30, 1981/82.

SILVA, A. F. S. **Hippeastrum vittatum (L'Hér.) Herbert e Hippeastrum striatum (Lam.) Moore: análise química e avaliação biológica dos alcaloides isolados.** 2005. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SILVA, D. B. et al. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. **Phytomed.**, v. 16, p. 1059–1063, 2009.

SIMMONS, C. P. et al. Recent advances in dengue pathogenesis and clinical management. **Vaccine**, v. 33, n. 50, p. 7061-7068, 2015. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.09.103.

SIMOES, L. R. et al. Antiviral activity of *Distictella elongata* (Vahl) Urb. (Bignoniaceae), a potentially useful source of anti-dengue drugs from the state of Minas Gerais, Brazil. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 53, n. 6, p. 602-607, 2011.

SOMMER, G. V., FERRUCCI, M. S.; ACEVEDO-RODRIGUES, P. Sapindaceae. In: FORZZA, R. C. et al. (Org.). **Lista de espécies da flora do Brasil.** Jardim botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SOTO-ACOSTA, R. et al. The increase in cholesterol levels at early stages after dengue virus infection correlates with an augment in LDL particle uptake and HMG-CoA reductase activity. **Virology**, v. 442, n. 2, p. 132-147, 2013. DOI: 10.1016/j.virol.2013.04.003.

SPINDOLA, K. C. W.; et al. Anti-Mayaro virus activity of *Cassia australis* extracts (Fabaceae, Leguminosae). **Parasites Vectors**, v. 7, n. 537, p. 1-7, 2014. DOI: 10.1186/s13071-014-0537-z.

STAMETS, P. Novel Antimicrobials from mushrooms. **HerbalGram.**, 2002, v. 54, p. 28-33.

- STANAWAY, J. D. et al. The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet Infectious Diseases**, v. 16, p. 712-723, 2016.
- STRAUSS, J.; REYES-DOMINGUEZ, Y. Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. **Fungal Genet.**, v. 48, n. 1, p. 62-69, 2011. DOI:10.1016/j.fgb.2010.07.009.
- SUHRBIER, A.; JAFFAR-BANDJEE, M. C.; GASQUE, P. Arthritogenic alphaviruses—an overview. **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 8, p. 420-429, 2012.
- SUN, C. P. et al. Physalins V-IX, 16,24-cyclo-13, 14-seco withanolides from *Physalis angulata* and their antiproliferative and anti-inflammatory activities. **Scientific Reports**, v. 7, n. 4057, 2017.
- SUTTLEWORTH, F.C.; ZIM, H.S.; DILLON, G.W. **Orquídeas: Guia dos orquidófilos**. Editora Expressão e Cultura, 158 p. 1982.
- SWAMINATHAN, S. et al. Fatal Zika Virus Infection with Secondary Nonsexual Transmission. **N. Engl. J. Med.**, v. 375, n. 19, p. 1907-1909, 2016.
- TAKAHASHI, J. A. et al. Classical and epigenetic approaches to metabolite diversification in filamentous fungi. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 4, p. 773–789. DOI:10.1007/s11101-013-9305-5.
- TALLARIDA, R. J. Drug Synergism: Its Detection and Applications. **J. Pharmacol. Ther.**, v. 298, p. 865–872, 2001.
- TALLARIDA, R. J.; KIMMEL, H. L.; HOLTZMAN, S. G. Theory and statistics of detecting synergism between two active drugs: cocaine and buprenorphine. **Psychopharm.**, v. 133, p. 378-382, 1997.
- TALLARIDA, R.J. Revisiting the Isobole and Related Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 342, p. 2-8, 2012.
- TANG, L. I. et al. Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 12, n. 3, p. 2-10, 2012. DOI: 10.1186/1472-6882-12-3
- TANKER, M. et al. Alkaloids of *Sternbergia clusiana* and their analgesic effects. **Pharmaceutical Biology**, v. 34, n. 3, p. 194-197, 1996.
- TEISSIER, E.; PENIN, F.; PÉCHEUR, E. I. Targeting cell entry of enveloped viruses as an antiviral strategy. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 221–250, 2011. DOI: 10.3390/molecules16010221.
- TEIXEIRA, R. R. et al. Natural products as source of potential dengue antivirals. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 8151-8176, 2014.
- THI-NGOC-TRAM, N. et al. *Crinum L.* (Amaryllidaceae). **Fitoterapia**, v. 73, n. 3, p. 183-208, 2002.
- THORMAR, H. et al. Inactivation of Enveloped Viruses and Killing of Cells by Fatty Acids and Monoglycerides **Antimic. Ag. Chemoth.**, v. 31, n. 1, p. 27-31, 1987. DOI: 10.1128/AAC.31.1.27.
- TOGNARELLI, J. et al. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Arch. Virol.**, v. 161, n. 3, p. 665-668, 2016.
- TOLEDO, M. R. S. et al. Fitotoxicidade do extrato aquoso de *Duguetia furfuraceae* (St. Hill) B et H em ratas (*Rattus norvegicus*). **RBPM**, v. 8, p. 218–222, 2006.
- TORIIZUKA, Y. et al. New lycorine-type alkaloid from *Lycoris traubii* and evaluation of antitrypanosomal and antimalarial activities of lycorine derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, n. 24, p. 10182-10189, 2008.
- TOURSARKISSIAN, M. **Plantas medicinales de la Argentina: sus nombres botánicos, vulgares, usos y distribución geográfica**. Buenos Aires: Ed: Hemisferio Sur; 1980.

- TRUMBECKAITE, S. et al. The effect of flavonoids on rat heart mitochondrial function. **Biomed. Pharmacother.**, v. 60, p. 245-248, 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. e201, 2007. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030201.
- TSUKUDA, Y. et al. Anti-adipogenic and antiviral effects of l-carnitine on hepatitis C virus infection. **J. Med. Virol.**, v. 89, n. 5, p. 857-866, 2017. DOI: 10.1002/jmv.24692.
- VAN BORTEL, W. et al. Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe. **Euro Surveill.**, v. 19, n. 13, pii. 20759, 2014. DOI: 10.2807/1560-7917.es2014.19.13.20759.
- VAN DUIJL-RICHTER, M. Early events in chikungunya virus infection—from virus cellbinding to membrane fusion. **Viruses**, v. 7, p. 3647–3674, 2015. DOI: 10.3390/v7072792.
- VAN GOIETSENOVEN, G. et al. Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells. **J. Nat. Prod.**, v. 73, n. 7, p. 1223-1227, 2010.
- VICTORA, C. G. et al. Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers? **Lancet**, v. 387, n. 10019, p. 621-614, 2016.
- VILLAR, L. et al. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. **N. Engl. J. Med.**, v. 372, n. 2, p. 113-123, 2015. DOI: 10.1056/NEJMoa1411037.
- WANG, P. et al. Anti-dengue-virus activity and structure-activity relationship studies of lycorine derivatives. **ChemMedChem.**, v. 9, n. 7, p. 1522-1533, 2014.
- WATANABE, Y.; KUDO, H.; GRAHAM, A. F. Selective inhibition of reovirus ribonucleic acid synthesis by cycloheximide. **J. Virol.**, v. 1, n. 1, p. 36-44, 1967.
- WATRIN, L. et al. Guillain-Barre Syndrome (42 Cases) Occurring During a Zika Virus Outbreak in French Polynesia. **Medicine (Baltimore)**, v. 95, n. 14, p. e3257, 2016.
- WEAVER, S. C. Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 8, n. 6, p. e2921, 2014.
- WEAVER, S. C.; FORRESTER, N. L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral research**, v. 120, p. 32-39, 2015. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.04.016.
- WHO (World Health Organization). Outbreak news: chikungunya and dengue, south-west Indian Ocean. **Wkly Epidemiol Rec.**, v. 81, p.81 106-108, 2006.
- WHO Scientific Group on Arthropod-Borne and Rodent-Borne Viral Diseases & World Health Organization. **Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases: report of a WHO scientific group** [meeting held in Geneva - 1983]. World Health Organisation Technical Report Series, v. 719, p. 1–114, 1985. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/39922>>. Acesso em: 20/10/2019.
- WHO. Global strategy for dengue prevention and control. 2012–2020. Geneva 2012.
- WIEGREBE, W.; KRAMER, W. J.; SHAMMA, M. The emetine alkaloids. **J. Nat. Prod.**, v. 47, n. 3, p. 397-408, 1984. DOI: 10.1021/np50033a001.
- WIELANEK, A. C. et al. Guillain-barre syndrome complicating a chikungunya virus infection. **Neurology**, v. 69, n. 22, p. 2105-2107, 2007. DOI: 10.1212/01.wnl.0000277267.07220.88.
- WILDMAN, W. C.; BROWN, C. L. Mass spectra of 5,11-methanomorphanthridine alkaloids. The structure of pancracine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 90, n. 23, p. 6439–6446, 1968.

- WINTACHAI, P. et al. Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein. **J. Med. Virol.**, v. 84, n. 11, p. 1757–1770, 2012. DOI: 10.1002/jmv.23403.
- XIAO, Z.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, K. H. Strategies for the Optimization of Natural Leads to Anticancer Drugs or Drug Candidates. **Medicinal research reviews**, v. 36, n. 1, p. 32-91, 2016.
- XIE, X. et al. Inhibition of dengue virus by targeting viral NS4B protein. **J. Virol.**, v. 85, n. 21, p. 11183-11195, 2011. DOI: 10.1128/JVI.05468-11.
- XIE, X. et al. Two distinct sets of NS2A molecules are responsible for dengue virus RNA synthesis and virion assembly. **J. Virol.**, v. 89, n. 2, p. 1298–1313, 2015. DOI: 10.1128/JVI.02882-14.
- XU, M. et al. Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen. **Nat. Med.**, v. 22, n. 10, p. 1101-1107, 2016. DOI: 10.1038/nm.4184.
- YAMADA, K. et al. Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. **Antiviral Res.**, v. 83, n. 1, p. 35-44, 2009.
- YANG, L. et al. Cycloheximide congeners produced by *Streptomyces* sp. SC0581 and photoinduced interconversion between (E)- and (Z)-2,3-dehydroanhydrocycloheximides. **Beilstein J. Org. Chem.**, v. 13, p. 1039-1049, 2017. DOI: 10.3762/bjoc.13.103.
- YIN, M. et al. Cycloheximide and actiphenol production in *Streptomyces* sp. YIM56141 governed by single biosynthetic machinery featuring an acyltransferase-less type I polyketide synthase. **Org. Lett.**, v. 16, n. 11, p. 3072-3075, 2014. DOI: 10.1021/ol501179w.
- YOSHIDA S. et al. Leuhistin, a new inhibitor of aminopeptidase M, produced by *Bacillus laterosporus* BMI156-14F1. II. Structure determination of leuhistin. **J. Antibiot.**, v. 44, n. 6, p. 579-581, 1991.
- YOUNG, P. R. et al. Arbovirus infections. In: FARRAR, et al. (Ed.) **Manson's tropical diseases**. 23 ed., Amsterdam: Elsevier, 2014. p. 129-161.
- YUN, S. I.; LEE, Y. M. Zika virus: An emerging flavivirus. **J. Microbiol.**, v. 55, n. 3, p. 204-219, 2017.
- YUNES, R.; CALIXTO, J. B. O. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1. ed. Chapecó: Argos, 2001.
- ZAMMARCHI, L. et al. Zika virus infection in a traveller returning to Europe from Brazil, March 2015. **Euro Surveill**, v. 20, n. 23, 2015.
- ZANDI, K. et al. *In vitro* antiviral activity of fisetin, rutin and naringenin against dengue virus type-2. **J. Med. Plant Res.**, v. 5, n. 23, p. 5534-5539, 2011.
- ZANDI, K. et al., Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. **Virol. J.**, v. 8, n. 560, p. 1-11, 2011. DOI: 10.1186/1743-422X-8-560, 2011.
- ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of *Zika virus* in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.
- ZAPPI, D. C. et al. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015. DOI: 10.1590/2175-7860201566411.
- ZHANG, M. et al. Betaine Inhibits Hepatitis B Virus with an Advantage of Decreasing Resistance to Lamivudine and Interferon α . **J. Agric. Food. Chem.**, v. 64, n. 20, p. 4068-4077, 2016. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b01180.
- ZHAO, J. et al. Stachybotrysams A-E, prenylated isoindolinone derivatives with anti-HIV activity from the fungus *Stachybotrys chartarum*. **Phytochem. Lett.**, v. 20, p. 289–294, 2017. DOI:10.1016/j.phytol.2017.04.031.

ZHENG, C. J. et al. Meleagrins, a New FabI Inhibitor from *Penicillium chrysogenum* with at Least One Additional Mode of Action. **PLOS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1-9, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0078922.

ZHU, W. et al. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against *Herpes simplex virus* type 2. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.24, n. 3, p.279-283, 2004. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2004.02.022.

ZHU, W. et al. Antiviral property and mechanisms of a sulphated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* against *Herpes simplex virus* type 1. **Phytomedicine**, v. 13, n. 9-10, p. 695-701, 2006.

ZJAWIONY, J. K. Biologically active compounds from Aphyllophorales (polypore) fungi. **J. Nat. Prod.**, v. 67, n. 2, p. 300-310, 2004.

ZMURKO, J. et al. The Viral Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine Is a Potent Inhibitor of in vitro Zika Virus Replication and Delays Disease Progression in a Robust Mouse Infection Model. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, n. 5, p. e0004695, 2016.

ZOU, G. et al. A single-amino acid substitution in West Nile virus 2K peptide between NS4A and NS4B confers resistance to lycorine, a flavivirus inhibitor. **Virology**, v. 384, n. 1, p. 242-252, 2009.

10 APÊNDICES

LISTA DE FIGURAS

FIGURA I1 - DETERMINAÇÃO DO NÚMERO IDEAL DE CÉLULAS VERO PARA O ENSAIO ANTIVIRAL CONTRA ZIKV.....	201
FIGURA I2 - DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO E M.O.I. IDEAIS PARA OS ENSAIOS ANTIVIRAIS COM ZIKV.....	202
FIGURA I3 - VIABILIDADE DAS CÉLULAS VERO INFECTADAS COM ZIKV, NA PRESENÇA DE IFN E DMSO.....	204
FIGURA I4 - MAPA DAS PLACAS USADO PARA OS ENSAIOS DE VALIDAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL CONTRA DENV-2 E ZIKV.	206
FIGURA I5 - RESULTADO DO DIA 1 DO ENSAIO DE VALIDAÇÃO DA TRIAGEM CONTRA ZIKV.	208
FIGURA I6 - RESULTADO DO DIA 2 DO ENSAIO DE VALIDAÇÃO DA TRIAGEM CONTRA ZIKV.	209
FIGURA I7 - RESULTADO DO DIA 3 DO ENSAIO DE VALIDAÇÃO DA TRIAGEM CONTRA ZIKV.	210
FIGURA I8 - ANÁLISE DOS DADOS, DIAS 1, 2 E 3, DA VALIDAÇÃO DO ENSAIO ANTIVIRAL CONTRA ZIKV.	211
FIGURA I9 – RESULTADO DO DIA 1 DO ENSAIO DE VALIDAÇÃO DA TRIAGEM CONTRA DENV-2.....	212
FIGURA I10 - RESULTADO DO DIA 2 DO ENSAIO DE VALIDAÇÃO DA TRIAGEM CONTRA DENV-2.	213
FIGURA I11 - RESULTADO DO DIA 3 DO ENSAIO DE VALIDAÇÃO DA TRIAGEM CONTRA DENV-2.	214
FIGURA I12 - ANÁLISE DOS DADOS, DIAS 1, 2 E 3, DA VALIDAÇÃO DO ENSAIO ANTIVIRAL CONTRA DENV-2.	215

LISTA DE TABELAS DO APÊNDICE

TABELA A - EXTRATOS VEGETAIS ATIVOS EM TRIAGEM CONTRA DENV-2 (2013-2015)	185
TABELA A - EXTRATOS VEGETAIS ATIVOS EM TRIAGEM CONTRA DENV-2 (2013-2015), CONT.	186
TABELA B - EXTRATOS FÚNGICOS ATIVOS EM TRIAGEM CONTRA DENV-2 (2013-2015)	187
TABELA B - EXTRATOS FÚNGICOS ATIVOS EM TRIAGEM CONTRA DENV-2 (2013-2015) CONT.....	188
TABELA C - EXTRATOS VEGETAIS ATIVOS CONTRA DENV-2 (2015-2019)	189
TABELA C - EXTRATOS VEGETAIS ATIVOS CONTRA DENV-2 (2015-2019) CONT.	190
TABELA D - EXTRATOS FÚNGICOS ATIVOS CONTRA DENV-2 (2015-2019).....	191
TABELA D - EXTRATOS FÚNGICOS ATIVOS CONTRA DENV-2 (2015-2019) CONT.	192
TABELA D - EXTRATOS FÚNGICOS ATIVOS CONTRA DENV-2 (2015-2019) CONT.	193
TABELA D - EXTRATOS FÚNGICOS ATIVOS CONTRA DENV-2 (2015-2019) CONT.	194
TABELA D - EXTRATOS FÚNGICOS ATIVOS CONTRA DENV-2 (2015-2019) CONT.	195
TABELA E - EXTRATOS VEGETAIS ATIVOS CONTRA ZIKV (2015-2019)	196
TABELA F - EXTRATOS FÚNGICOS ATIVOS CONTRA ZIKV (2015-2019)	197
TABELA G - EXTRATOS VEGETAIS ATIVOS CONTRA CHIKV (2015-2019)	198
TABELA H - EXTRATOS FÚNGICOS ATIVOS CONTRA CHIKV (2015-2019)	199
TABELA I - CÉLULAS VERO INFECTADAS E NÃO INFECTADAS COM DMSO E SEM DMSO TRATADAS COM IFN	203
TABELA J - COMPARAÇÃO DA AMOSTRA PRETAZETINA ISOLADA COM OS DESCRITOS POR MORAES, 2016	216
TABELA L1 - FIC DE COMBINAÇÕES LICORINA-PRETAZETINA CONTRA ZIKV.....	217
TABELA L2 - FIC DE COMBINAÇÕES LICORINA-PRETAZETINA EM CÉLULAS VERO	217
TABELA L3 - FIC DE COMBINAÇÕES LICORINA-PRETAZETINA CONTRA DENV-2.....	218
TABELA L4 - FIC DE COMBINAÇÕES LICORINA-PRETAZETINA EM CÉLULAS BHK-21	218

10.1 APÊNDICE A – Extratos vegetais ativos contra DENV-2 na triagem de 2013 a 2015

Tabela A - Extratos vegetais ativos em triagem contra DENV-2 (2013-2015)

Família	Espécie	Voucher # HUFSJ	Parte	Cod. EX	ECP	Proteção (%) DENV-2	
Amaryllidaceae	<i>Hippeastrum glaucescens</i>	2914	Flor	13356	1+	59	55
			Bulbo	13358	1+	3	0
	<i>Hippeastrum</i> sp.	3007	Bulbo	13418	1+	92	69
Annonaceae	<i>Duguetia furfuracea</i>	2345	Fruto	12829	2+	40	42
Asteraceae	<i>Pterocaulon</i> sp.	1982	Raiz	11087	2+	31	22
	<i>Miconia</i> sp.	2678	Fruto	13194	2+	26	30
Begoniaceae	<i>Begonia</i> sp.	2616	Fruto	13097	1+	59	73
Calophyllaceae	<i>Kielmeyera</i> sp.	1293	Caule	10307	2+	35	29
Combretaceae	<i>Terminalia</i> sp.	1295	Caule	10312	2+	1	14
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum</i> sp.	2580	Caule	13023	2+	35	34
Fabaceae	<i>Chamaecrista</i> sp.	2193	Fruto	11279	2+	0	14
			Caule	11280	2+	0	33
	<i>Piptadenia</i> sp.	1304	Folha	10333	2+	17	18
	<i>Inga</i> sp.	1333	Flor	10437	2+	5	45
Lythraceae	<i>Diplusodon</i> sp.	2210	Flor	11320	1+	0	23
			Flor e caule	11321	2+	3	28
Malpighiaceae	<i>Banisteriopsis membranifolia</i>	2206	Caule	11311	1+	80	81
	<i>Byrsonima intermediaa</i>	2683	Flor	13203	2+	48	45
	<i>Byrsonima sericea</i>	2685	Caule	13211	2+	39	38
	<i>Banisteriopsis laevifolia</i>	2201	Fruto	11296	2+	22	23
			Caule	11298	1+	100	100
	<i>Banisteriopsis membranifolia</i>	2211	Folha	11323	2+	37	39
		-	Caule	11324	1+	26	34
	<i>Banisteriopsis</i> sp.	1995	Flor + frutos	11115	2+	62	45
	1995	Caule	11117	2+	61	51	
Malvaceae	<i>Melochia</i> sp.	1329	Raiz	10426	2+	3	0

Cinquenta e dois extratos vegetais que apresentaram pelo menos 50 % de proteção em um ou ambos os métodos utilizados na triagem contra DENV-2 no período de 2015-2019 (BARBOSA, 2015). Tais extratos foram selecionados para os ensaios de CE₅₀, CC₅₀ e IS para serem investigados quanto à atividade antiviral. Extratos com resultados de (+) apresentaram 75 % de proteção antiviral contra DENV-2 e extratos com resultados de (++) apresentaram proteção de 50 % do efeito citopático viral (ECP).

Tabela A - Extratos vegetais ativos em triagem contra DENV-2 (2013-2015), cont.

Família	Espécie	Voucher # HUFSJ	Parte	Cod. EX	ECP	Proteção DENV-2	(%)
Melastomataceae	<i>Alternanthera</i> sp.	2207	Folha	11303	2+	0	0
	<i>Trembleya parviflora</i>	2204	Caule	11305	2+	0	6
Myrtaceae	<i>Eugenia klotzshiana</i>	2577	Caule	13015	2+	32	28
	<i>Eugenia</i> sp.	2014	Folha	11158	2+	29	23
Ochnaceae	<i>Ouratea</i> sp.	-	Caule	11159	1+	41	39
Primulaceae	<i>Ardisia</i> sp.	2555	Flor	12969	1+	49	51
	<i>Palicourea</i> sp.	2368	Caule	12875	1+	79	86
Rubiaceae	<i>Palicourea</i> sp.	2360	Flor	12860	1+	55	51
	<i>Amaioua</i> sp.	1998	Folha	11125	2+	43	19
	-	-	Caule	11126	2+	63	66
	<i>Ixora</i> sp.	1999	Folha	11128	1+	41	66
	-	-	Caule	11129	1+	69	42
	<i>Galianthe</i> sp.	2004	Flor	11135	1+	53	63
	-	-	Folha	11136	2+	42	17
	-	-	Caule	11137	2+	49	55
Sapindaceae	<i>Serjania</i> sp.	2550	Folha	12956	1+	31	34
	-	-	Caule	12957	1+	22	25
	<i>Matayba juglandifoli</i>	2587	Caule	13039	1+	61	65
	<i>Serjania</i> sp.	1966	Caule	11046	2+	38	32
	-	1992	Flor	11106	1+	55	62
	<i>Cupania</i> sp.	-	Folha	11107	1+	79	100
Vitaceae	<i>Urvillea</i> sp.	-	Caule	11108	1+	74	94
	<i>Urvillea</i> sp.	1997	Folha	11122	2+	64	50
	-	-	Caule	11123	1+	78	74
Vitaceae	<i>Cissus</i> sp.	1974	Fruto	11067	2+	23	28
Vochysiaceae	<i>Qualea</i> sp.	1346	Folha	10463	2+	28	33

Cinquenta e dois extratos vegetais que apresentaram pelo menos 50 % de proteção em um ou ambos os métodos utilizados na triagem contra DENV-2 no período de 2015-2019 (BARBOSA, 2015). Tais extratos foram selecionados para os ensaios de CE₅₀, CC₅₀ e IS para serem investigados quanto à atividade antiviral. Extratos com resultados de (+) apresentaram 75 % de proteção antiviral contra DENV-2 e extratos com resultados de (++) apresentaram proteção de 50 % do ECP viral.

10.2 APÊNDICE B – Extratos fúngicos ativos contra DENV-2 na triagem de 2013 a 2015

Tabela B - Extratos fúngicos ativos em triagem contra DENV-2 (2013-2015)

Família/Espécie	Voucher	Hospedeiro/Parte	Cod. EX	ECP	Proteção (%) DENV-2	
Trichocomaceae <i>Penicillium citrinum</i>	UFMGCB9771	<i>Vellozia gigantea</i> Raiz	14240	1+	87	62
Xylariaceae <i>Hypoxylon</i> sp.	UFMGCB8020	Rocha	13985	2+	17	17
Trichocomaceae <i>P. chrysogenum</i>	UFMGCB6126	Alga 1	11596	1+	26	25
-	UFMGCB2837	<i>Bowdichia nitida</i>	12073	1+	44	36
-	UFMGCB2912	<i>B. nitida</i>	12148	2+	23	18
-	UFMGCB2984	<i>Xylopiia aromatica</i>	12220	2+	0	0
-	UFMGCB4006	<i>Acanthospermum australe</i>	12278	2+	2	2
-	Ant282	<i>Colobanthus quitensis</i>	10343	2+	45	47
-	Ant300	<i>C. quitensis</i>	10347	2+	61	63
-	UFMGCB5846	<i>M. ernestii</i>	11656	2+	38	29
-	UFMGCB5658	<i>M. ernestii</i>	11657	2+	39	33
-	UFMGCB5797	<i>M. ernestii</i>	11658	1+	48	51
-	UFMGCB5779	<i>M. ernestii</i>	11659	2+	55	38
-	UFMGCB6034	Alga 1	11513	1+	27	34
-	UFMGCB5710	<i>M. ernestii</i>	11748	2+	46	24
-	UFMGCB5744	<i>M. ernestii</i>	11751	2+	41	35
-	UFMGCB5847	<i>M. ernestii</i>	11764	2+	65	53
-	UFMGCB5740	<i>M. ernestii</i>	11768	2+	48	38
-	UFMGCB5759	<i>M. ernestii</i>	11802	2+	34	45
-	UFMGCB5799	<i>M. ernestii</i>	11817	2+	48	43
-	UFMGCB5802	<i>M. ernestii</i>	11667	2+	41	41
-	UFMGCB5840	<i>M. ernestii</i>	11670	2+	32	17
-	UFMGCB5755	<i>M. ernestii</i>	11673	2+	36	33
-	UFMGCB5743	<i>M. ernestii</i>	11674	2+	50	52
-	UFMGCB5889	<i>M. ernestii</i>	11679	2+	10	14
-	UFMGCB5793	<i>M. ernestii</i>	11682	2+	45	51
-	UFMGCB5750	<i>M. ernestii</i>	11683	2+	50	61
-	UFMGCB5821	<i>M. ernestii</i>	11684	2+	48	35
-	UFMGCB5792	<i>M. ernestii</i>	11685	2+	31	22
-	UFMGCB5644	<i>M. ernestii</i>	11688	2+	64	45
-	UFMGCB5810	<i>M. ernestii</i>	11689	1+	55	62

Sessenta e três extratos fúngicos positivos que apresentaram pelo menos 50 % de proteção em um ou ambos os métodos utilizados na triagem contra DENV-2 no período de 2015-2019 (BARBOSA, 2015). Tais extratos foram selecionados para os ensaios de CE₅₀, CC₅₀ e IS para serem investigados quanto à atividade antiviral. Extratos com resultados de (+) apresentaram 75 % de proteção antiviral contra DENV-2 e extratos com resultados de (++) apresentaram proteção de 50 % do ECP viral.

Tabela B - Extratos fúngicos ativos em triagem contra DENV-2 (2013-2015), cont.

Família/Espécie	Voucher	Hospedeiro/Parte	Cod. EX	ECP	Proteção (%) DENV-2	
	UFMGCB5657	<i>M. Ernestii</i>	11696	2+	46	43
-	UFMGCB5882	<i>M. Ernestii</i>	11697	2+	17	20
-	UFMGCB5877	<i>M. Ernestii</i>	11698	1+	68	70
-	UFMGCB5813	<i>M. Ernestii</i>	11699	1+	83	76
-	UFMGCB5775	<i>M. Ernestii</i>	11700	2+	38	38
-	UFMGCB5842	<i>M. Ernestii</i>	11705	1+	71	57
-	UFMGCB5754	<i>M. Ernestii</i>	11706	1+	88	81
-	UFMGCB5879	<i>M. Ernestii</i>	11707	1+	87	54
-	UFMGCB5651	<i>M. Ernestii</i>	11711	2+	42	25
-	UFMGCB5857	<i>M. Ernestii</i>	11716	1+	60	57
-	UFMGCB5838	<i>M. Ernestii</i>	11719	2+	62	48
-	UFMGCB5839	<i>M. Ernestii</i>	11721	2+	31	13
-	UFMGCB5851	<i>M. Ernestii</i>	11726	2+	11	9
-	UFMGCB5837	<i>M. Ernestii</i>	11730	2+	65	51
-	UFMGCB5654	<i>M. Ernestii</i>	11735	2+	31	13
-	UFMGCB5661	<i>M. Ernestii</i>	11736	2+	62	36
-	UFMGCB5655	<i>M. Ernestii</i>	11737	2+	19	15
-	UFMGCB5749	<i>M. Ernestii</i>	11738	1+	100	68
-	UFMGCB5892	<i>M. Ernestii</i>	11740	2+	31	27
-	UFMGCB5756	<i>M. Ernestii</i>	11742	2+	23	13
-	UFMGCB5808	<i>M. Ernestii</i>	11744	2+	56	31
-	UFMGCB5789	<i>M. Ernestii</i>	11745	2+	46	31
-	UFMGCB5762	<i>M. Ernestii</i>	11746	2+	55	50
-	UFMGCB5779	<i>M. Ernestii</i>	14810	2+	11	13
-	UFMGCB5802	<i>M. Ernestii</i>	14813	2+	42	38
-	UFMGCB5775	<i>M. Ernestii</i>	14809	2+	38	68
-	UFMGCB9445	Solo	13864	1+	48	56
-	UFMGCB9446	Solo	13865	1+	33	45
-	UFMGCB9451	Solo	13870	2+	38	46
-	UFMGCB9478	Solo	13897	2+	27	25
-	UFMGCB9480	Solo	13899	2+	13	17
-	UFMGCB9538	Solo	13957	2+	47	74

Sessenta e três extratos fúngicos positivos que apresentaram pelo menos 50 % de proteção em um ou ambos os métodos utilizados na triagem contra DENV-2 no período de 2015-2019 (BARBOSA, 2015). Tais extratos foram selecionados para os ensaios de CE₅₀, CC₅₀ e IS para serem investigados quanto à atividade antiviral. Extratos com resultados de (+) apresentaram 75 % de proteção antiviral contra DENV-2 e extratos com resultados de (++) apresentaram proteção de 50 % do ECP viral.

10.3 APÊNDICE C - Extratos vegetais ativos contra DENV-2 na triagem de 2015 a 2019

Tabela C - Extratos vegetais ativos contra DENV-2 (2015-2019)

Família	Espécie	Voucher # HUFSJ	Parte	Cod. EX	ECP	Proteção (%) DENV-2	
Amaranthaceae	<i>Alternanthera</i> sp.	5945	Parte inteira	14729	1+	52	46
Apocynaceae	<i>Forsteronia</i> sp.	1993	Folha	11110	2+	29	21
	-	-	Caule	11111	1+	52	41
	<i>Peltastes</i> sp.	5942	Folha	14721	2+	44	43
	<i>Mandevilla</i> sp.	6028	Flor	14766	2+	53	30
	-	-	Parte aérea	14767	2+	46	35
Asteraceae	<i>Chromolaena</i> sp.	1996	Flor	11118	1+	69	72
	<i>Lessingianthus</i> sp.	2000	Parte inteira	11130	2+	34	10
	<i>Baccharis oblongifolia</i>	4433	Folha	14556	2+	54	63
	-	-	Caule	14557	2+	57	65
	<i>Fleischmannia</i> sp.	5962	Folha	14658	1+	50	47
Boraginaceae	<i>Tournefortia</i> sp.	5959	Folha	14756	2+	31	25
Campanulaceae	<i>Siphocampylus</i> sp.	5947	Folha	14732	1+	69	60
	<i>Lobelia</i> sp.	5952	Folha	14744	2+	58	42
Convolvulaceae	<i>Evolvulus</i> sp.	4667	Parte inteira	14589	1+	43	32
Cyperaceae	<i>Cyperus pohlii</i>	4624	Caule	14583	2+	38	49
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum</i> sp.	5917	Caule	14701	2+	51	50
Euphorbiaceae	<i>Alchornea sidifolia</i>	5943	Folha	14724	2+	41	36
Fabaceae	<i>Andira</i> sp.	4325	Folha	14516	2+	34	43
	-	-	Caule	14517	2+	25	28
	<i>Lonchocarpus</i> sp.	4431	Caule	14555	2+	50	24
Hypericaceae	<i>Vismia</i> sp.	4427	Flor	14547	2+	43	24
	<i>Vismia</i> sp.	4695	Caule	14621	1+	34	41
Lauraceae	<i>Cryptocarya</i> sp.	5586	Flor	14663	1+	25	87
	-	-	Folha	14664	1+	79	63
	-	-	Caule	14665	2+	48	48
Malpighiaceae	<i>Banisteriopsis</i> sp.	1995	Folha	11116	2+	25	14
Melastomataceae	<i>Leandra</i> sp.	5953	Caule	14747	2+	46	41
Moraceae	<i>Ficus</i> sp.	1994	Folha	11113	2+	20	2
	-	-	Caule	11114	1+	73	9
Myrtaceae	<i>Eugenia</i> sp.	2014	Fruto	11157	2+	23	29

Sessenta e um extratos vegetais positivos que apresentaram pelo menos 50 % de proteção em um ou ambos os métodos utilizados na triagem contra DENV-2 no período de 2015-2019. Tais extratos foram selecionados para os ensaios de CE₅₀, CC₅₀ e IS para serem investigados quanto à atividade antiviral. Extratos com resultados de (+) apresentaram 75 % de proteção antiviral contra DENV-2 e extratos com resultados de (++) apresentaram proteção de 50 % do ECP viral.

Tabela C - Extratos vegetais ativos contra DENV-2 (2015-2019), cont.

Família	Espécie	Voucher # HUFSJ	Parte	Cod. EX	ECP	Proteção (%) DENV-2	
Myrtaceae	<i>Eugenia</i> sp.	2014	Fruto	11157	2+	23	29
	<i>Myrciaria glanduliflora</i>	5903	Caule	14687	1+	30	36
	<i>Marlierea laevigata</i>	5905	Folha	14691	2+	45	49
	-	-	Caule	14692	1+	25	44
	-	5906	Fruto	14693	1+	39	42
	<i>Myrcia</i> sp.	-	Folha	14694	2+	41	46
Onagraceae	<i>Ludwigia</i> sp.	5523	Flor	14653	2+	34	35
		-	Folha	14654	2+	54	57
	<i>Fuchsia</i> sp.	5924	Flor + frutos	14705	1+	35	34
	-	-	Folha	14706	2+	27	32
Rhamnaceae	<i>Colubrina</i> sp.	4606	Folha	14562	2+	59	75
Rubiaceae	<i>Amaioua</i> sp.	1998	Fruto	11124	1+	56	58
	<i>Ixora</i> sp.	1999	Fruto	11127	1+	60	63
	<i>Psychotria</i> sp.	4418	Caule	14532	2+	50	46
	-	5527	Fruto	14638	2+	39	47
	<i>Galianthe</i> sp.	-	Folha	14639	2+	54	60
Rutaceae	<i>Zanthoxylum</i> sp.	5904	Flor	14688	1+	59	57
		-	Folha	14689	1+	56	70
Santalaceae	<i>Phoradendron</i> sp.	5588	Folha	14670	2+	59	69
		-	Caule	14671	1+	64	66
Sapindaceae	<i>Serjania</i> sp.	5529	Flor	14641	1+	63	51
		-	Folha	14642	2+	81	76
Solanaceae	<i>Solanum diploconos</i>	5950	Folha	14740	2+	41	33
	<i>Solanum</i> sp.	5951	Folha	14742	1+	55	52
	-	-	Caule	14743	2+	50	44
Symplocaceae	<i>Symplocos</i> sp.	2019	Flor	11170	1+	68	56
Verbenaceae	<i>Lantana</i> sp.	5940	Folha	14715	1+	48	32
Xyridaceae	<i>Xyris</i> sp.	2003	Planta inteira	11134	2+	35	29

Sessenta e um extratos vegetais positivos que apresentaram pelo menos 50 % de proteção em um ou ambos os métodos utilizados na triagem contra DENV-2 no período de 2015-2019. Tais extratos foram selecionados para os ensaios de CE₅₀, CC₅₀ e IS para serem investigados quanto à atividade antiviral. Extratos com resultados de (+) apresentaram 75 % de proteção antiviral contra DENV-2 e extratos com resultados de (++) apresentaram proteção de 50 % do ECP viral.

10.4 APÊNDICE D - Extratos fúngicos ativos contra DENV-2 na triagem de 2015 a 2019

Tabela D - Extratos fúngicos ativos contra DENV-2 (2015-2019)

Família/Espécie	Voucher	Hospedeiro/Parte	Cod. EX	ECP	Proteção (%) DENV-2	
Xylariaceae <i>Muscodor</i> sp.	UFMGCB9832	<i>Vellozia gigantea</i> folha	14301	2+	71	30
Trichocomaceae <i>Penicillium citrinum</i>	UFMGCB9771	<i>V. gigantea</i> raiz	14240	1+	87	62
Didymellaceae <i>Phoma</i> sp.	UFMGCB8788	<i>Usnea</i> sp.	15438	2+	87	98
Didymellaceae <i>Phoma</i> sp.	UFMGCB4439	<i>Baccharis trimera</i> folha	12639	2+	60	62
Pseudeurotiaceae <i>Pseudogymnoascus</i> sp.	UFMGCB12518	Solo	16655	1+	82	78
Trichocomaceae <i>Aspergillus chevalieri</i>	BRM047709	Solo	16792	2+	62	67
Trichocomaceae <i>Aspergillus chevalieri</i>	BRM047709	Solo	16793	1+	83	71
Trichocomaceae <i>Talaromyces calidicanus</i>	BRM047712	Solo	16795	1+	93	71
Trichocomaceae <i>Talaromyces calidicanus</i>	BRM047712	Solo	16796	1+	97	66
Trichocomaceae <i>Talaromyces calidicanus</i>	BRM047712	Solo	16797	1+	99	79
Nectriaceae <i>Fusarium nygamai</i>	BRM047712	Solo	16798	1+	74	66
Nectriaceae <i>Fusarium nygamai</i>	BRM047711	Solo	16799	1+	86	87
Nectriaceae <i>Fusarium nygamai</i>	BRM047711	Solo	16800	1+	100	82
Bionectriaceae <i>Clonostachys rogersoniana</i>	BRM047708	Solo	16803	1+	81	69
Trichocomaceae <i>Penicillium</i> sp.	BRM047710	Solo	16804	1+	82	61
Trichocomaceae <i>Penicillium</i> sp.	BRM047710	Solo	16805	1+	83	63
Trichocomaceae <i>Penicillium</i> sp.	BRM047710	Solo	16806	1+	67	57
Hypocreaceae <i>Trichoderma caribaeum</i>	UFMGCB15291	Solo	17731	1+	72	92
NI	UFMGCB9884	<i>Vellozia gigantea</i> folha	14345	1+	89	72
NI	UFMGCB8688	<i>Usnea antarctica</i>	15112	2+	24	30
NI	UFMGCB8692	<i>U. Antarctica</i> talo, liquen	15116	1+	93	97

Cento e vinte e nove extratos fúngicos que apresentaram pelo menos 50 % de proteção em um ou ambos os métodos utilizados na triagem contra DENV-2 no período de 2015-2019. Tais extratos foram selecionados para os ensaios de CE₅₀, CC₅₀ e IS para em seguida serem investigados quanto à atividade antiviral. Extratos com resultados de (+) apresentaram 75 % de proteção antiviral contra DENV-2 e extratos com resultados de (++) apresentaram proteção de 50 % do ECP viral.

Tabela D - Extratos fúngicos ativos contra DENV-2 (2015-2019), cont.

Família/Espécie	Voucher	Hospedeiro/Parte	Cod. EX	ECP	Proteção (%) DENV-2	
NI	UFMGCB8712	<i>U. antarctica</i>	15136	1+	25	37
NI	UFMGCB8719	<i>U. antarctica</i>	15143	2+	36	32
NI	UFMGCB8735	<i>U. antarctica</i>	15159	2+	21	40
NI	UFMGCB8746	<i>U. antarctica</i>	15170	2+	27	41
NI	UFMGCB8754	<i>U. antarctica</i>	15178	2+	26	20
NI	51_60	<i>U. antarctica</i>	15187	1+	8	8
NI	61_70	<i>U. antarctica</i>	15188	2+	38	30
NI	UFMGCB8608	<i>U. antarctica</i>	15032	2+	29	29
NI	UFMGCB8653	<i>U. antarctica</i>	15077	2+	42	31
NI	UFMGCB8787	<i>Usnea</i> sp.	15437	2+	100	100
NI	UFMGCB9327	<i>Usnea</i> sp.	15298	2+	76	92
NI	UFMGCB9411	<i>Usnea</i> sp.	15382	1+	77	72
NI	UFMGCB9421	<i>Usnea</i> sp.	15392	2+	62	39
NI	AT 03	<i>Usnea</i> sp.	15408	2+	56	45
NI	UFMGCB8762	<i>Usnea</i> sp.	15418	2+	46	33
NI	UFMGCB9262	<i>Usnea</i> sp.	15233	2+	45	47
NI	UFMGCB9266	<i>Usnea</i> sp.	15237	2+	48	60
NI	UFMGCB9273	<i>Usnea</i> sp.	15244	2+	53	70
NI	UFMGCB9281	<i>Usnea</i> sp.	15252	2+	51	33
NI	UFMGCB9288	<i>Usnea</i> sp.	15259	2+	31	24
NI	UFMGCB9294	<i>Usnea</i> sp.	15265	2+	34	44
NI	UFMGCB8778	<i>Usnea</i> sp.	15430	2+	74	67
NI	UFMGCB8794	<i>Usnea</i> sp.	15444	2+	68	70
NI	UFMGCB8953	<i>Usnea</i> sp.	15534	2+	48	55
NI	UFMGCB4462	<i>Baccharis trimera</i> Folha	12662	2+	48	62
NI	UFMGCB4473	<i>B. trimera</i>	12673	2+	65	55
NI	UFMGCB4474	<i>B. trimera</i>	12674	2+	42	40

Cento e vinte e nove extratos fúngicos que apresentaram pelo menos 50 % de proteção em um ou ambos os métodos utilizados na triagem contra DENV-2 no período de 2015-2019. Tais extratos foram selecionados para os ensaios de CE₅₀, CC₅₀ e IS para em seguida serem investigados quanto à atividade antiviral. Extratos com resultados de (+) apresentaram 75 % de proteção antiviral contra DENV-2 e extratos com resultados de (++) apresentaram proteção de 50 % do ECP viral.

Tabela D - Extratos fúngicos ativos contra DENV-2 (2015-2019), cont.

Família/Espécie	Voucher	Hospedeiro/Parte	Cod. EX	ECP	Proteção (%) DENV-2	
NI	UFMGCB4512	<i>Baccharis trimera</i>	12712	2+	63	55
NI	UFMGCB4513	<i>B. trimera</i>	12713	2+	68	65
NI	UFMGCB4534	<i>B. trimera</i>	12734	2+	51	46
NI	UFMGCB4540	<i>B. trimera</i>	12740	2+	69	52
NI	UFMGCB15355	<i>Piper</i> sp.	17794	2+	57	39
NI	UFMGCB15375	<i>Piper</i> sp.	17803	2+	49	34
NI	UFMGCB15429	<i>Piper</i> sp.	17842	2+	57	32
NI	UFMGCB15461	<i>Piper</i> sp.	17869	1+	78	71
NI	UFMGCB15463	<i>Piper</i> sp.	17871	2+	35	66
NI	UFMGCB15467	<i>Piper</i> sp.	17875	2+	53	72
NI	UFMGCB15468	<i>Piper</i> sp.	17876	2+	35	40
NI	UFMGCB15472	<i>Piper</i> sp.	17878	2+	49	42
NI	UFMGCB15475	<i>Piper</i> sp.	17880	1+	60	83
NI	UFMGCB15479	<i>Piper</i> sp.	17883	2+	40	42
NI	UFMGCB15480	<i>Piper</i> sp.	17884	2+	67	58
NI	UFMGCB15481	<i>Piper</i> sp.	17885	2+	69	51
NI	UFMGCB15485	<i>Piper</i> sp.	17889	2+	50	20
NI	UFMGCB15486	<i>Piper</i> sp.	17890	2+	68	43
NI	UFMGCB15493	<i>Piper</i> sp.	17896	2+	46	44
NI	UFMGCB15503	<i>Piper</i> sp.	17905	2+	52	30
NI	UFMGCB15503	<i>Piper</i> sp.	17906	2+	46	47
NI	UFMGCB15506	<i>Piper</i> sp.	17907	2+	55	50
NI	UFMGCB15508	<i>Piper</i> sp.	17909	2+	53	57
NI	UFMGCB15510	<i>Piper</i> sp.	17911	2+	39	42
NI	UFMGCB15512	<i>Piper</i> sp.	17913	2+	80	33
NI	UFMGCB15513	<i>Piper</i> sp.	17915	2+	67	82
NI	UFMGCB15516	<i>Piper</i> sp.	17917	1+	77	95
NI	UFMGCB15517	<i>Piper</i> sp.	17918	2+	32	44
NI	UFMGCB15522	<i>Piper</i> sp.	17921	2+	41	90
NI	UFMGCB15523	<i>Piper</i> sp.	17922	2+	51	44

Cento e vinte e nove extratos fúngicos que apresentaram pelo menos 50 % de proteção em um ou ambos os métodos utilizados na triagem contra DENV-2 no período de 2015-2019. Tais extratos foram selecionados para os ensaios de CE₅₀, CC₅₀ e IS para em seguida serem investigados quanto à atividade antiviral. Extratos com resultados de (+) apresentaram 75 % de proteção antiviral contra DENV-2 e extratos com resultados de (++) apresentaram proteção de 50 % do ECP viral.

Tabela D - Extratos fúngicos ativos contra DENV-2 (2015-2019), cont.

Família/Espécie	Voucher	Hospedeiro/Parte	Cod. EX	ECP	Proteção (%) DENV-2	
NI	UFMGCB15525	<i>Piper</i> sp.	17923	2+	71	42
NI	UFMGCB15526	<i>Piper</i> sp.	17924	2+	54	43
NI	UFMGCB15532	<i>Piper</i> sp.	17930	2+	54	49
NI	UFMGCB15533	<i>Piper</i> sp.	17931	1+	61	72
NI	UFMGCB15534	<i>Piper</i> sp.	17932	2+	37	41
NI	UFMGCB15540	<i>Piper</i> sp.	17938	1+	70	100
NI	UFMGCB15544	<i>Piper</i> sp.	17941	1+	63	90
NI	UFMGCB15545	<i>Piper</i> sp.	17942	2+	40	72
NI	UFMGCB15549	<i>Piper</i> sp.	17946	2+	33	45
NI	UFMGCB15555	<i>Piper</i> sp.	17952	2+	30	76
NI	UFMGCB15557	<i>Piper</i> sp.	17954	2+	29	48
NI	UFMGCB15563	<i>Piper</i> sp.	17960	2+	44	60
NI	UFMGCB15566	<i>Piper</i> sp.	17963	2+	51	60
NI	UFMGCB15570	<i>Piper</i> sp.	17965	2+	28	82
NI	UFMGCB15585	<i>Piper</i> sp.	17973	2+	45	68
NI	UFMGCB15588	<i>Piper</i> sp.	17975	2+	55	35
NI	UFMGCB15589	<i>Piper</i> sp.	17976	2+	46	54
NI	UFMGCB15592	<i>Piper</i> sp.	17978	2+	56	29
NI	UFMGCB15593	<i>Piper</i> sp.	17979	2+	48	67
NI	UFMGCB15594	<i>Piper</i> sp.	17980	2+	54	45
NI	UFMGCB15598	<i>Piper</i> sp.	17982	1+	86	80
NI	UFMGCB15603	<i>Piper</i> sp.	17986	1+	70	82
NI	UFMGCB15604	<i>Piper</i> sp.	17987	1+	44	36
NI	UFMGCB15606	<i>Piper</i> sp.	17988	2+	36	45
NI	UFMGCB15607	<i>Piper</i> sp.	17989	2+	48	39
NI	UFMGCB15617	<i>Piper</i> sp.	17997	2+	46	53
NI	UFMGCB15619	<i>Piper</i> sp.	17998	2+	32	44
NI	UFMGCB15625	<i>Piper</i> sp.	18003	2+	45	61
NI	UFMGCB15630	<i>Piper</i> sp.	18006	2+	56	74

Cento e vinte e nove extratos fúngicos que apresentaram pelo menos 50 % de proteção em um ou ambos os métodos utilizados na triagem contra DENV-2 no período de 2015-2019. Tais extratos foram selecionados para os ensaios de CE₅₀, CC₅₀ e IS para em seguida serem investigados quanto à atividade antiviral. Extratos com resultados de (+) apresentaram 75 % de proteção antiviral contra DENV-2 e extratos com resultados de (++) apresentaram proteção de 50 % do ECP viral.

Tabela D - Extratos fúngicos ativos contra DENV-2 (2015-2019), cont.

Família/Espécie	Voucher	Hospedeiro/Parte	Cod. EX	ECP	Proteção (%) DENV-2	
NI	UFMGCB15643	<i>Piper</i> sp.	18015	2+	45	68
NI	UFMGCB15653	<i>Piper</i> sp.	18022	1+	70	70
NI	UFMGCB15661	<i>Piper</i> sp.	18029	2+	44	58
NI	UFMGCB15663	<i>Piper</i> sp.	18031	2+	53	77
NI	UFMGCB15668	<i>Piper</i> sp.	18035	2+	73	46
NI	UFMGCB15669	<i>Piper</i> sp.	18036	2+	47	66
NI	UFMGCB15672	<i>Piper</i> sp.	18037	2+	37	63
NI	UFMGCB15673	<i>Piper</i> sp.	18038	2+	43	64
NI	UFMGCB15674	<i>Piper</i> sp.	18039	2+	47	37
NI	UFMGCB15675	<i>Piper</i> sp.	18040	2+	44	56
NI	UFMGCB15681	<i>Piper</i> sp.	18046	2+	48	44
NI	UFMGCB15682	<i>Piper</i> sp.	18047	2+	76	60
NI	UFMGCB15688	<i>Piper</i> sp.	18053	2+	62	44
NI	UFMGCB15695	<i>Piper</i> sp.	18059	2+	56	51
NI	UFMGCB15698	<i>Piper</i> sp.	18062	2+	42	42
NI	UFMGCB15699	<i>Piper</i> sp.	18063	2+	43	37
NI	UFMGCB15700	<i>Piper</i> sp.	18064	2+	61	42
NI	UFMGCB15703	<i>Piper</i> sp.	18067	2+	74	78
NI	UFMGCB15706	<i>Piper</i> sp.	18070	2+	46	46
NI	UFMGCB15710	<i>Piper</i> sp.	18074	2+	60	70
NI	UFMGCB15712	<i>Piper</i> sp.	18076	2+	55	45
NI	UFMGCB15730	<i>Piper</i> sp.	18089	2+	69	46

Cento e vinte e nove extratos fúngicos que apresentaram pelo menos 50 % de proteção em um ou ambos os métodos utilizados na triagem contra DENV-2 no período de 2015-2019. Tais extratos foram selecionados para os ensaios de CE₅₀, CC₅₀ e IS para em seguida serem investigados quanto à atividade antiviral. Extratos com resultados de (+) apresentaram 75 % de proteção antiviral contra DENV-2 e extratos com resultados de (++) apresentaram proteção de 50 % do ECP viral.

10.5 APÊNDICE E - Extratos vegetais ativos contra ZIKV na triagem de 2015 a 2019

Tabela E - Extratos vegetais ativos contra ZIKV (2015-2019)

Família	Espécie	Voucher HUFJSJ	Parte	Cod. EX	Proteção (%) ZIKV	
Amaryllidaceae	<i>Hippeastrum glaucescens</i>	BHZB4494	Bulbo	17006*	77	83
		HUFJSJ2914	Bulbo	13358*	89	81
	<i>Hippeastrum puniceum</i>	BHZB12069	Flor	17007**	95	77
		-	Raiz	17010**	85	85
		-	Flor	18117	50	52
-	Bulbo	17011****	56	61		
Asteraceae	<i>Chrysolaena</i> sp.	HUFJSJ2686	Caule	13211	67	69
Begoniaceae	<i>Begonia</i> sp.	HUFJSJ2616	Fruto	13097	58	69
Calophyllaceae	<i>Kielmeyera</i> sp.	HUFJSJ1293	Caule	10307***	69	78
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum</i> sp.	HUFJSJ2580	Caule	13023	47	42
Fabaceae	<i>Chamaecrista</i> sp.		Fruto	11279	74	38
		HUFJSJ2210	Flor	11320	54	53
Lythraceae	<i>Diplusodon</i> sp.	-	Folha + Caule	11321	59	52
		HUFJSJ1995	Flor + Fruto	11115	33	41
Malpighiaceae	<i>Banisteriopsis</i> sp.	HUFJSJ2201	Caule	11298	56	67
	<i>Banisteriopsis membranifolia</i>	HUFJSJ2206	Caule	11311	54	65
	<i>Byrsonima intermedia</i>	HUFJSJ2683	Flor	13203	75	75
Myrsinaceae	<i>Ardisia</i> sp.		Caule	12875	41	24
Myrtaceae	<i>Eugenia</i> sp.	HUFJSJ2014	Caule	11159*	46	60
Ochnaceae	<i>Ouratea</i> sp.	HUFJSJ2555	Folha	12969	57	43
Orchidaceae	<i>Habenaria petalodes</i> Lindl.	BHCB64578		748****	93	64
	<i>Galianthe</i> sp.	HUFJSJ5527	Caule	14640	42	27
Rubiaceae	<i>Amaioua</i> sp.	HUFJSJ1998	Caule	11126	38	40
	<i>Ixora</i> sp.	HUFJSJ1999	Caule	11129	28	40
	<i>Palicourea</i> sp.	HUFJSJ2360	Flor	12860	83	60
Sapindaceae	<i>Cupania</i> sp.	HUFJSJ1992	Caule	11108	77	89
	<i>Urvillea</i> sp.	HUFJSJ1997	Caule	11123	38	40
	<i>Matayba juglandifolia</i>	HUFJSJ2587	Caule	13039	92	85

Vinte e oito extratos fúngicos que apresentaram pelo menos 40 % de proteção contra ZIKV na concentração de 20 µg/mL. Esses extratos foram selecionados para os ensaios de CE₅₀, CC₅₀ e IS para em seguida serem investigados quanto a atividade antiviral. (*) atividade antiviral detectada a 10 µg/mL; (**) atividade antiviral detectada a 5 µg/mL; (***) atividade antiviral detectada a 2,5 µg/mL; (****) atividade antiviral detectada a 1,25 µg/mL.

10.6 APÊNDICE F - Extratos fúngicos ativos contra ZIKV na triagem de 2015 a 2019

Tabela F - Extratos fúngicos ativos contra ZIKV (2015-2019)

Família/Espécie	Voucher	Hospedeiro	Cod. EX	Proteção (%) ZIKV	
Aspergillaceae <i>Penicillium chrysogenum</i>	UFMGCB6034	Alga 1	11513	51	49
Aspergillaceae <i>P. chrysogenum</i>	UFMGCB6126	Alga 1	11596	32	35
Aspergillaceae <i>P. chrysogenum</i>	UFMGCB6126	Alga 1	17314	54	52
Pseudeurotiaceae <i>Pseudogymnoascus</i> sp.	UFMGCB12518	Molusco	16655	54	45
NI	UFMGCB9445	Solo da Antártica	13864	55	53
NI	UFMGCB9446	Solo da Antártica	13865	64	56
NI	UFMGCB9451	Solo da Antártica	13870	49	55
NI	UFMGCB9478	Solo da Antártica	13897	47	51
NI	UFMGCB9480	Solo da Antártica	13899	44	48
NI	UFMGCB9538	Solo da Antártica	13957	62	59
NI	UFMGCB2912	<i>Bowdichia nitida</i>	12148	49	42
NI	UFMGCB8608	<i>Usnea antarctica</i>	15032	56	56
NI	UFMGCB8653	<i>U. antarctica</i>	15077	60	58
NI	UFMGCB15461	<i>Piper</i> sp.	17869	45	28
NI	UFMGCB15475	<i>Piper</i> sp.	17880	54	45
NI	UFMGCB15540	<i>Piper</i> sp.	17938	47	41
NI	UFMGCB15545	<i>Piper</i> sp.	17942	41	34
NI	UFMGCB15563	<i>Piper</i> sp.	17960	52	48
NI	UFMGCB15643	<i>Piper</i> sp.	18015	45	41
NI	UFMGCB15653	<i>Piper</i> sp.	18022	41	37

Vinte extratos fúngicos que apresentaram pelo menos 40 % de proteção contra ZIKV na concentração de 20 µg/mL. Esses extratos foram selecionados para os ensaios de CE₅₀, CC₅₀ e IS para em seguida serem investigados quanto à atividade antiviral.

10.7 APÊNDICE G - Extratos vegetais ativos contra CHIKV na triagem de 2015 a 2019

Tabela G - Extratos vegetais ativos contra CHIKV (2015-2019)

Família	Espécie	Voucher HUFSJ	Parte	Cod. EX	Proteção (%) CHIKV	
Amaryllidaceae	<i>H. glaucescens</i>	BHZB4494	Bulbo	17006	43	39
	<i>H. puniceum</i>	BHZB12069	Flor	17007*	39	41
		-	Bulbo	17011***	62	84
Begoniaceae	<i>Begonia</i> sp.	HUFSJ2616	Fruto	13097	29	73
Calophyllaceae	<i>Kielmeyera</i> sp.	HUFSJ1293	Caule	10307**	51	42
Fabaceae	<i>Chamaecrista</i> sp.	HUFSJ2193	Fruto	11279	53	47
Lauraceae	<i>Criptocarya</i> sp.	HUFSJ5586	Caule	14665	49	52
		HUFSJ2210	Flor	11320	45	53
Lythraceae	<i>Diplusodon</i> sp.	-	Caule + folha	11321	49	30
Malpighiaceae	<i>Banisteriopsis</i> sp.	HUFSJ1995	Flor + fruto	11115	37	77
	<i>Byrsonima intermedia</i>	HUFSJ2683	Flor	13203	81	72
Malvaceae	<i>Melochia</i> sp.	HUFSJ1329	Raiz	10426	33	41
Melastomataceae	<i>Trembleya parviflora</i>	HUFSJ2204	Caule	11305	38	41
	<i>Fuchsia</i> sp.	HUFSJ1524	Folha	14706	57	49
Rubiaceae	<i>Galianthe</i> sp.	HUFSJ2004	Caule	11137	38	75
		-	Folha	11136	51	60
Sapindaceae	<i>Cupania</i> sp.	HUFSJ1992	Folha	11107	49	34
		-	Caule	11108	10	87
	<i>Serjania</i> sp.	HUFSJ1966	Caule	11046	41	43
	<i>Urvillea</i> sp.	HUFSJ1997	Folha	11122	42	60

Vinte extratos vegetais que apresentaram pelo menos 30 % de proteção contra CHIKV na concentração de 20 µg/mL. (*) atividade antiviral detectada a 10 µg/mL; (**) atividade antiviral detectada a 5 µg/mL; (***) atividade antiviral detectada a 1,25 µg/mL.

10.8 APÊNDICE H - Extratos fúngicos ativos contra CHIKV na triagem de 2015 a 2019

Tabela H - Extratos fúngicos ativos contra CHIKV (2015-2019)

Família/Espécie	Voucher	Hospedeiro	Cod. EX	Proteção (%) CHIKV	
Aspergillaceae <i>Penicillium chrysogenum</i>	UFMGCB6034	Alga 1	11513	46	55
Aspergillaceae <i>P. chrysogenum</i>	UFMGCB6126	Alga 1	11596	39	43
Aspergillaceae <i>P. chrysogenum</i>	UFMGCB6126	Alga - Antártica	17314	86	80
Aspergillaceae <i>P. chrysogenum</i>	UFMGCB6126	Alga - Antártica	17337**	52	65
Xylariaceae <i>Muscodor</i> sp.	UFMGCB9832	<i>Vellozia gigantea</i>	14301	76	46
NI	UFMGCB8608	<i>Usnea antarctica</i>	15032	77	67
NI	UFMGCB8653	<i>U. antarctica</i>	15077	76	64
NI	UFMGCB9445	Solo - Antártica	13864	65	56
NI	UFMGCB9446	Solo - Antártica	13865*	50	50
NI	UFMGCB9451	Solo - Antártica	13870	59	62
NI	UFMGCB9478	Solo - Antártica	13897	62	59
NI	UFMGCB9480	Solo - Antártica	13899	60	59
NI	UFMGCB9538	Solo - Antártica	13957	69	61

Treze extratos fúngicos que apresentaram pelo menos 30 % de proteção contra o CHIKV na concentração de 20 µg/mL. (*) atividade antiviral detectada a 10 µg/mL; (**) atividade antiviral detectada a 5 µg/mL.

10.9 APÊNDICE I – Padronização e validação de ensaios com DENV-2 e ZIKV

10.9.1 Padronização para os ensaios antivirais contra ZIKV

Inicialmente, para os ensaios antivirais contra o ZIKV, fez-se necessária a padronização das várias etapas/parâmetros, a saber: (i) a quantidade de células Vero semeadas por poço nas placas de 96 poços; (ii) a curva de crescimento/viabilidade das células (de acordo com o volume de meio de cultura no poço; (iii) a concentração de SFB do meio de incubação do ensaio), (iv) a m.o.i. do ZIKV adequada para provocar 90 % de morte celular no tempo especificado para o ensaio, (v) e a escolha da substância a ser usada como controle positivo da atividade antiviral contra o ZIKV.

O objetivo da padronização foi estabelecer as condições ideais para a realização de um ensaio confiável e válido, assim como conhecer as possíveis variáveis que poderiam afetar a robustez e a confiabilidade do processo.

Para determinar a quantidade ideal de células Vero/poço na placa de 96 poços, para os ensaios contra ZIKV, foram plaqueadas diferentes densidades de células/poço com meio MEM suplementado com 5 % de SFB. Após primeiro período de incubação em estufa a 37 °C com 5 % de CO₂, para formação da monocamada celular, todos os poços foram observados ao microscópio óptico para a escolha da monocamada que apresentasse pelo menos 80 % de confluência. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por MEM suplementado com 2 % de SFB e 1 % de antibióticos e as placas foram reincubadas por diferentes tempos: 24, 48, 72, 96 e 120h para serem avaliadas quanto ao perfil de crescimento e viabilidade celular.

O inóculo de $1,0 \times 10^4$ células foi escolhido como a melhor opção, já que após 24h de incubação, a monocamada apresentou 80 % de confluência, densidade ideal para os ensaios antivirais. Nessas condições, as células continuaram viáveis tanto ao exame visual feito pela observação ao microscópio óptico quanto no ensaio MTT após 120h de incubação (Figura I1).

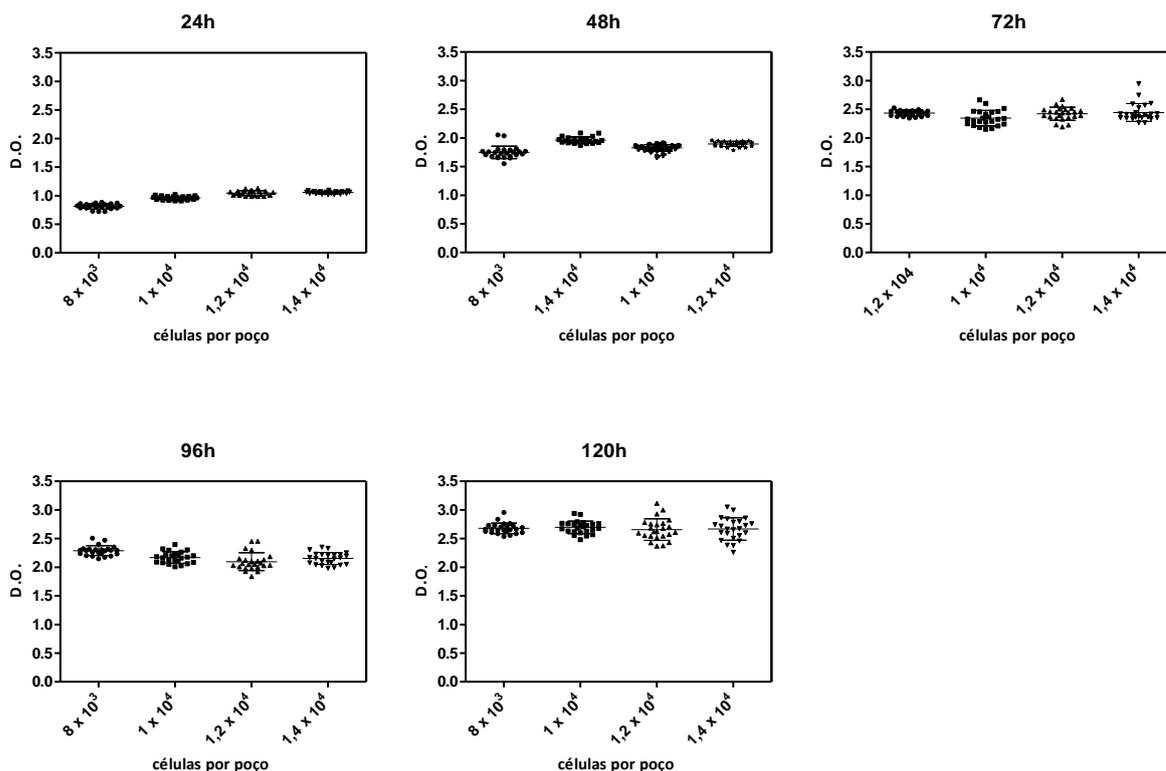


Figura 11 - Determinação do número ideal de células Vero para o ensaio antiviral contra o ZIKV. A viabilidade de células Vero medida pelo ensaio de metabolização do MTT após incubação por 24, 48, 72, 96 e 120h na etapa de padronização da quantidade de células Vero/poço em placa de 96 poços para condução dos ensaios antivirais e de citotoxicidade. A escolha da quantidade do número ideal de células/poço ($1,0 \times 10^4$ células/poço) foi definida utilizando-se de dois critérios: i) pela observação da densidade celular feita ao microscópio óptico após as primeiras 24h de incubação; ii) Pela viabilidade a se manter até o período de 120h com meio de cultura suplementado com 2 % de SFB. DO (densidade óptica)

Para a definição da m.o.i. de ZIKV adequada para o ensaio, placas de 96 poços foram inoculadas com $1,0 \times 10^4$ células por poço e incubadas por 24h até a formação da monocamada celular. No dia seguinte, as placas contendo as monocamadas de Vero foram infectadas com as m.o.i.: 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6, 7; 8; 9 e 10 e incubadas por 24, 48, 72, 96 e 120h.

Foi observado que 48 horas pós-infecção (pi) com diferentes m.o.i. nitidamente houve uma perda significativa na viabilidade celular. Quanto maior a m.o.i., menor foi a viabilidade celular em densidade óptica. Após esse experimento, a m.o.i. = 1 foi considerada ideal para realização dos ensaios antivirais contra o ZIKV, uma vez que no tempo de 72h pi, já foi possível observar aproximadamente 100 % de morte celular (Figura 12).

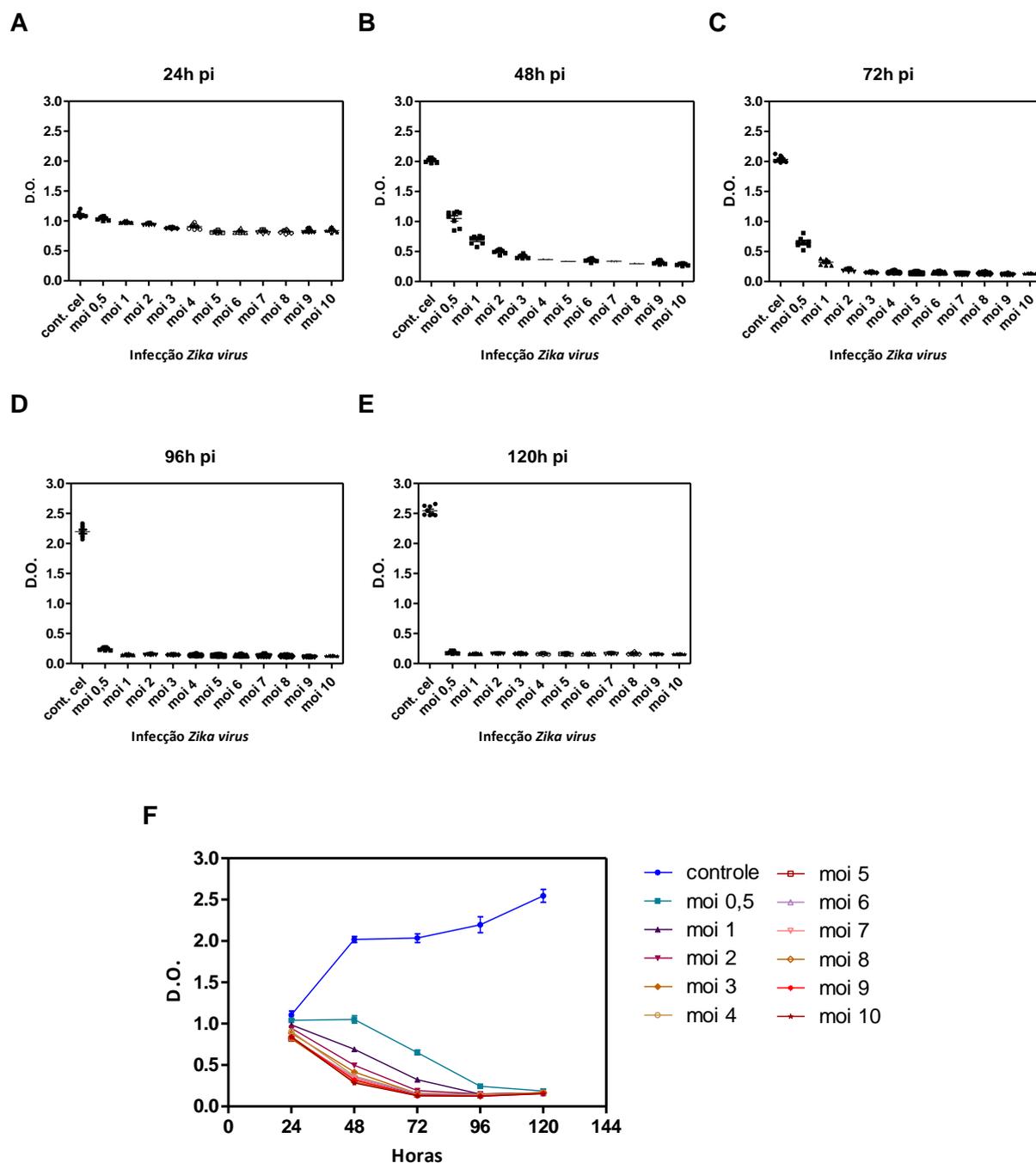


Figura I2 - Determinação do tempo de incubação e m.o.i. ideal para os ensaios antivirais com ZIKV em células Vero. Em (A) valores de densidade óptica a 540 nm (DO_{540}) medidos pelo ensaio do MTT após 24h pós-infecção (pi); (B) 48h pi; (C) 72h pi; (D) 96h pi; (E) 120h pi e em (F) é mostrada a viabilidade celular para todos os grupos nos respectivos tempos pós-infecção (pi).

Para a determinação da concentração ideal de IFN- α 2b a ser usada nos ensaios antivirais contra o ZIKV, considerando a não toxicidade em células Vero e a presença do DMSO, foram plaqueadas $1,0 \times 10^4$ células Vero/poço em placas de 96 poços contendo meio MEM suplementado com 5 % de SFB e 1 % de antibióticos, seguidas de 24h de incubação. No dia seguinte, células com e sem DMSO, infectadas e não infectadas, foram tratadas com o IFN- α 2b conforme tabela abaixo (tabela I).

Tabela I - Células Vero infectadas e não infectadas com DMSO e sem DMSO, tratadas com IFN

	Células não infectadas	Células não infectadas e tratadas (IFN)	Células infectadas com ZIKV	Células infectadas com ZIKV e tratadas com IFN	
Sem DMSO	Vero	Vero	Vero (m.o.i.=1)	Vero (m.o.i.=0,5)	Vero (m.o.i.=1)
Com 0,45 % de DMSO	Vero	Vero	Vero (m.o.i.=1)	Vero (m.o.i.=0,5)	Vero (m.o.i.=1)

O IFN- α 2b foi utilizado em concentrações que variaram de 8.000 a 0,2 unidades internacionais (UI) por mL, totalizando 16 diferentes concentrações. A concentração de SFB utilizada foi de 2 % e a incubação das placas foi feita por 5 dias a 37 °C em estufa com 5 % de CO₂. O tratamento com o IFN- α 2b foi avaliado em diferentes tempos de incubação pi com o ZIKV. Não foi observado toxicidade em células Vero nas concentrações de 8.000 a 0,2 UI/mL. Observou-se alta proteção com o IFN- α 2b demonstrado pela alta densidade óptica das células infectadas e tratadas nas diferentes concentrações (Figura I3).

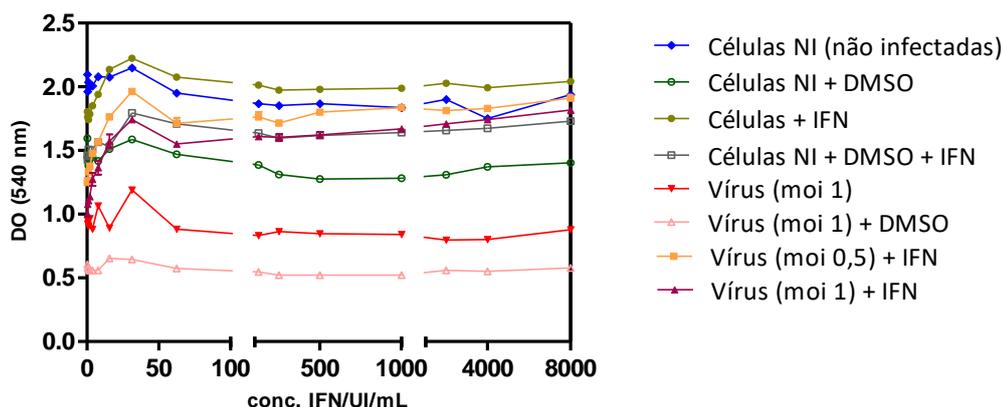


Figura I3 - Viabilidade de células Vero infectadas com ZIKV, na presença e ausência de IFN- α 2b e DMSO. Valores de densidade óptica a 540 nm (DO₅₄₀), medidos pelo ensaio do MTT, de células Vero, com e sem DMSO, tratadas ou não com IFN- α 2b em diferentes concentrações (0,2 a 8.000 UI/mL) e infectadas ou não com ZIKV. A concentração de DMSO utilizada foi de 0,45 %.

Portanto, para a realização dos ensaios contra o ZIKV, foi definido a quantidade de $1,0 \times 10^4$ células Vero por poço em um volume de 200 μ L de meio MEM [Gibco] adicionado de 2 % de SFB e 1 % de antibióticos. As células foram simultaneamente infectadas e tratadas apenas após incubação de 24h em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO₂, etapa necessária para a formação da monocamada celular com ~80 % de confluência. Ressalta-se que o ensaio antiviral foi feito incubando as células nas mesmas condições anteriores por 96h, sendo utilizada a m.o.i. de 2 e o tratamento com IFN- α 2b foi feito nas concentrações de 300 e 600 UI/mL para controle positivo do ensaio antiviral.

10.9.2 Validação dos ensaios de triagem contra ZIKV e DENV-2

Os experimentos para a validação dos ensaios antivirais para a triagem contra o ZIKV e contra o DENV foram feitos de acordo com o manual de validação de ensaios HTS publicado pelo National Institutes of Health (NIH). Trata-se de uma etapa essencial e de grande relevância biológica e farmacológica para a avaliação da performance dos ensaios em questão assim como para robustez dos dados obtidos (IVERSEN, 2012).

Desse modo, após a determinação do método do ensaio, várias placas contendo ambos os controles, positivo e negativo, são ensaiadas pelo menos em 3 dias

alternados a fim de avaliar a uniformidade do ensaio e/ou a variação dos sinais entre os poços, entre as colunas e entre os dias.

A variabilidade do ensaio antiviral foi avaliada utilizando 3 níveis de sinais medidos por espectrofotometria, a saber: (i) H (*High* ou máximo) referente à absorbância nos poços contendo apenas células; (ii) L (*Low* ou mínimo) referente à absorbância dos poços contendo células infectadas com os respectivos vírus e o (iii) M (*Medium* ou médio) referente à absorbância nos poços contendo células infectadas e tratadas com a CE₅₀ da droga antiviral, no caso, o IFN- α 2b.

Como preconizado, os requisitos gerais para estabelecer o ensaio antiviral são: (i) que os sinais sejam suficientemente estáveis; (ii) que haja uma separação significativa entre os sinais "Máximo" e "Mínimo" e que as médias, desvios padrões e o fator Z' estejam dentro de limites aceitáveis. O fator Z' é um indicador de qualidade no ensaio de triagem. É uma ferramenta útil para a comparação e avaliação, otimização e validação dos ensaios. Resumidamente, é um índice obtido a partir das análises das médias e desvios padrões determinados para os sinais "*High*" e "*Low*". Assumindo que o desvio padrão do sinal "*High*" é tão alto quanto o desvio padrão do sinal "Min", o fator Z' deverá estar dentro de um intervalo específico numa determinada janela de sinal.

Neste ensaio de validação também foi possível avaliar a uniformidade espacial, que pode revelar efeitos de erros sistemáticos de pipetagem ou de borda.

Para a validação dos ensaios foi utilizado o esquema de placas de 96 poços demonstrado na Figura I4, como sugerido pelo manual de validação de ensaios de HTS citado acima.

Para os ensaios de validação da atividade antiviral contra ZIKV foram semeadas $1,0 \times 10^4$ células Vero/poço em 3 placas de 96 poços, sendo essas incubadas por 24h em meio MEM com 5 % de SFB. No dia seguinte, o meio foi descartado e adicionou-se, conforme a Figura I4, em colunas intercaladas para gerar os 3 sinais (H, M e L): 200 μ L de MEM com DMSO a 0,25 % aos poços de sinal H, 100 μ L de suspensão de ZIKV para m.o.i. = 2 + 100 μ L de IFN- α 2b aos poços de sinal M e aos poços de sinal L foram adicionados 100 μ L de suspensão de ZIKV para m.o.i. = 2 + 100 μ L de meio MEM.

Na validação do ensaio antiviral contra DENV-2, $8,0 \times 10^3$ células BHK-21/poço foram semeadas em 3 placas de 96 poços e incubadas por 24h em meio DMEM com

5 % de SFB. Do mesmo modo feito nos ensaios com o ZIKV, o meio foi descartado no dia seguinte e o ensaio foi realizado para gerar os 3 sinais (H, M e L), em colunas intercaladas. Assim, aos poços de sinal H foram adicionados 200 μ L de DMEM contendo DMSO a 0,25 %, aos poços de sinal M foram adicionados 100 μ L de suspensão de DENV-2 com m.o.i. = 2 + 100 μ L de IFN- α 2b e aos poços de sinal L foram adicionados 100 μ L de suspensão de DENV-2 para m.o.i. = 2 e 100 μ L de meio DMEM.

A concentração final de SFB e de IFN- α 2b em ambos os ensaios foi de 2 % e 100 UI/mL, respectivamente. Após, as 3 placas foram incubadas por 72h (DENV-2) ou 120h (ZIKV) a 37 °C e a 5 % de CO₂ e, em seguida, a avaliação foi feita utilizando o ensaio do MTT.

A													B												
Placa 1													Placa 2												
Row	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	Row	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
1	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	1	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M
2	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	2	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M
3	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	3	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M
4	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	4	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M
5	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	5	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M
6	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	6	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M
7	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	7	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M
8	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	8	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M
C																									
Placa 3																									
Row	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12													
1	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H													
2	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H													
3	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H													
4	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H													
5	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H													
6	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H													
7	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H													
8	M	L	H	M	L	H	M	L	H	M	L	H													

Figura I4 - Mapa das placas usado para os ensaios de validação da atividade antiviral contra DENV-2 e ZIKV. Os ensaios foram feitos conforme o manual de ensaios de HTS descrito por Iversen et al., 2012. O modelo mostra uma combinação dos poços que produzem os diferentes sinais intercalados, a saber: células não infectadas (H), células infectadas (L) e células infectadas e tratadas (M), apropriado para a análise estatística das leituras de absorbância do produto da redução do MTT pelas células.

Nas figuras I5 a I8 estão representados os resultados das análises dos testes para a validação do ensaio antiviral contra o ZIKV em células Vero. E as figuras I9 a I12 são os resultados da validação do ensaio contra DENV-2 em células BHK-21. As figuras mostram os valores de absorbância das células, analisados utilizando a planilha do programa Excel desenvolvida pelos autores e disponível no site do NIH juntamente com o manual do ensaio publicado por Iversen, 2012.

Nos testes de validação dos ensaios com ZIKV e DENV não foram observados efeitos de erros sistemáticos, já que não houve uma diferença de acima de 20 % nos valores de cada coluna e nem na distribuição dos pontos (cada ponto equivale à leitura de um poço).

Os efeitos de borda geralmente são devidos à evaporação do meio de cultivo nos poços das laterais das placas, especialmente quando o ensaio requer incubação por períodos muito longos. Notamos que houve um efeito de borda considerável tanto no ensaio com o ZIKV, mais evidente, quanto com o DENV-2. Isso pode ser observado pela distribuição em “U” dos pontos nos gráficos. Para diminuir essa variação, o tempo de incubação do ensaio contra o ZIKV foi reduzido para 72h.

Para a avaliação do teste e das variabilidades, entre poços, entre placas e entre dias, os critérios aceitáveis foram que o coeficiente de variação dos sinais L ou MIN (células infectadas e não tratadas), dos sinais H ou MAX (células não infectadas e não tratadas) e dos sinais M ou MED (células infectadas e tratadas com o IFN- α 2b), não ultrapassasse 20 %; e o fator Z' tenha se mantido acima de 0,4. Os critérios elencados na análise estática foram preenchidos, exceto pela variação entre dias. Embora os resultados estejam satisfatórios, o ideal é que se repita o experimento para diagnosticar o motivo dessa variação. Os fatores técnicos no preparo do ensaio, no manuseio dos reagentes, dos vírus, da droga controle e mesmo no procedimento do executante, são os mais comuns que podem afetar na variabilidade observada entre os dias.

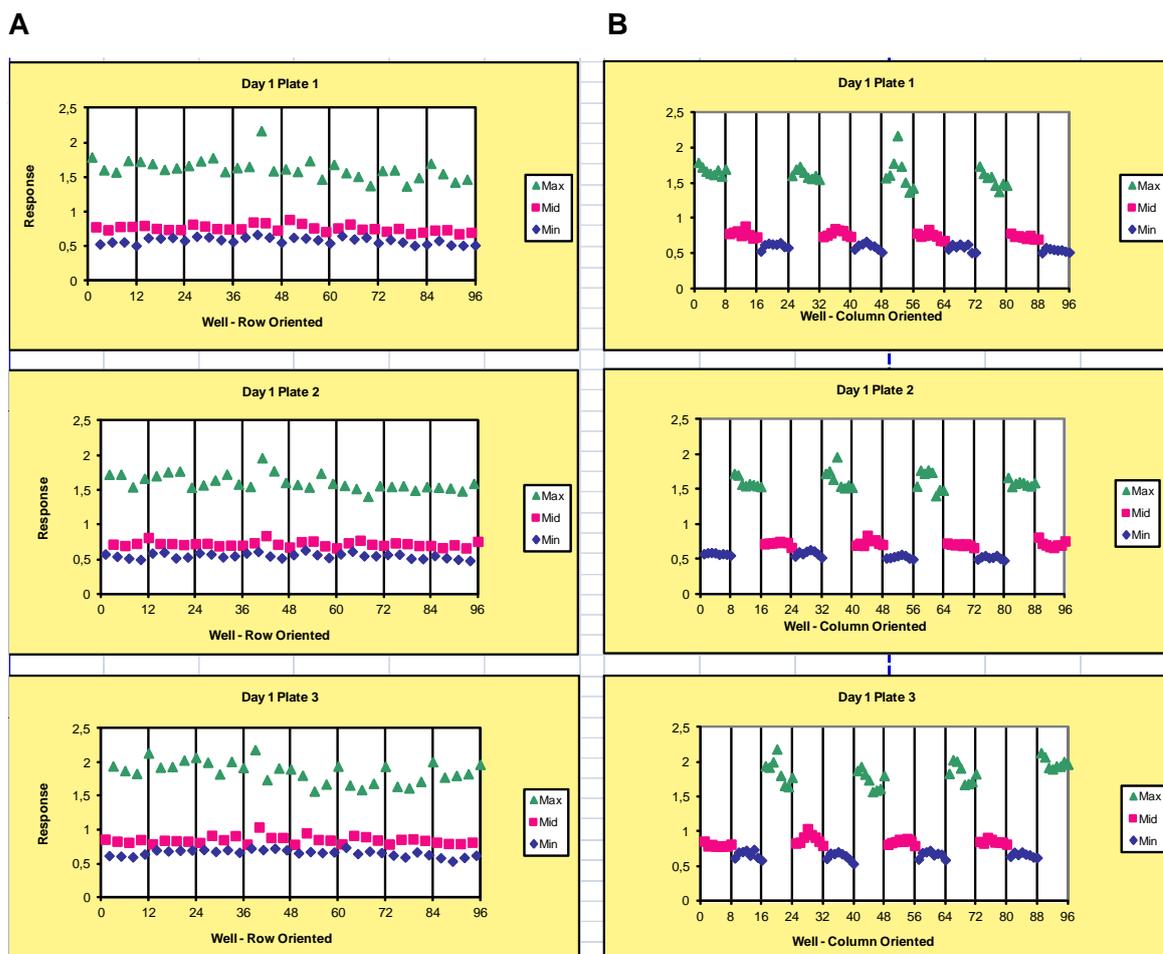


Figura I5 - Resultado do dia 1 do ensaio de validação da triagem contra o ZIKV. Valores de dados brutos analisados em planilha de Excel para 3 placas no estudo de uniformidade de placas com distribuição intercalada dos sinais MIN, MED e MAX. Na análise por linha (A), coluna à esquerda, há uma variabilidade entre os poços do sinal MAX (controle de células), mas os sinais MED (células tratadas e infectadas) e MIN (células infectadas) estão muito próximos. Em (B), coluna à direita é a análise por colunas das placas, mostrando o mesmo que a análise por linha. Também mostra uma leve dispersão entre os sinais MAX.

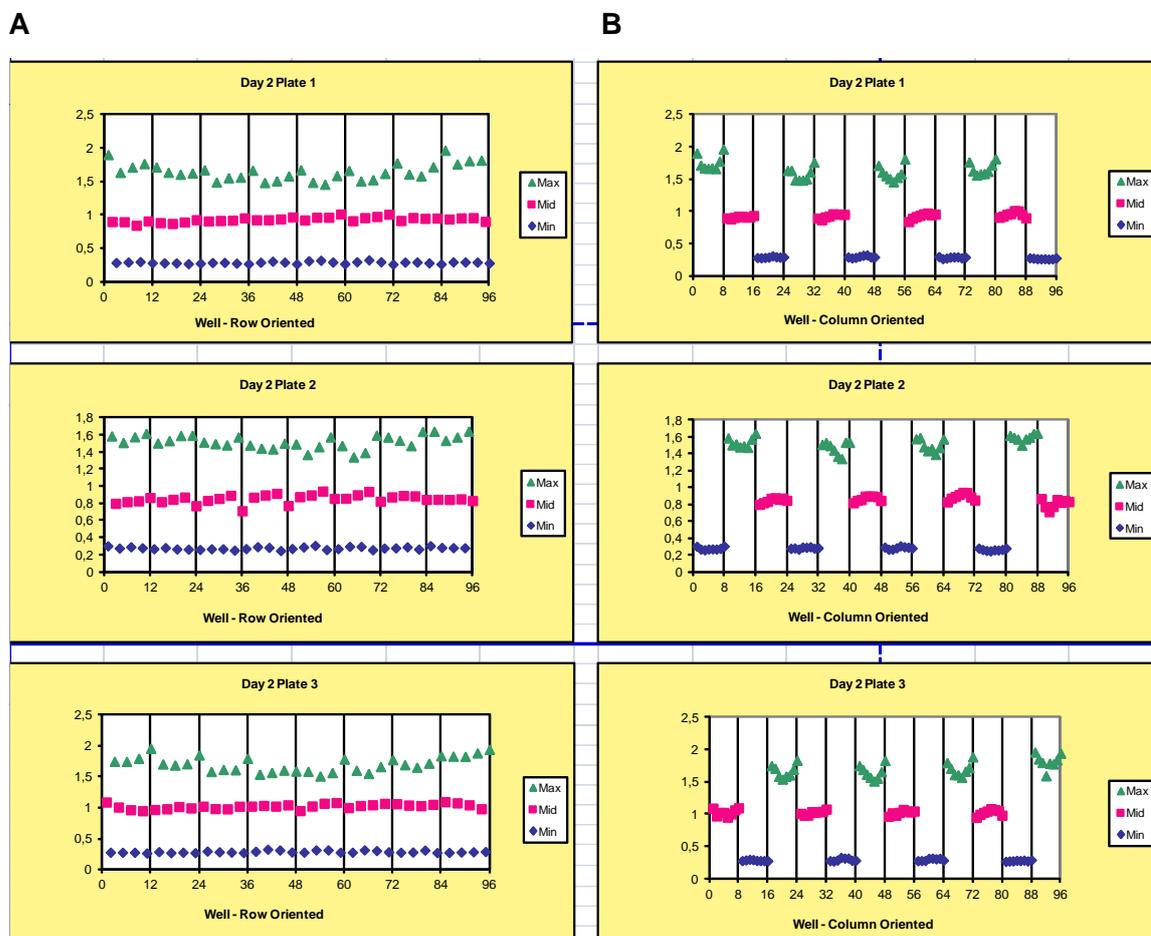


Figura I6 - Resultado do dia 2 do ensaio de validação da triagem contra ZIKV. Valores de dados brutos analisados em planilha de Excel para 3 placas no estudo de uniformidade de placas com distribuição intercalada dos sinais MIN, MED e MAX. Na análise por linha (A), coluna à esquerda, há uma baixa variação entre os poços do sinal MAX (controle de células). Os sinais MED (células tratadas e infectadas) e MIN (células infectadas) estão bem definidos. Em (B), coluna à direita, é a análise por colunas da placa mostrando o mesmo que a análise por linha e um discreto efeito de borda principalmente no sinal MAX. Observa-se uma leve formação em U dos sinais MAX.

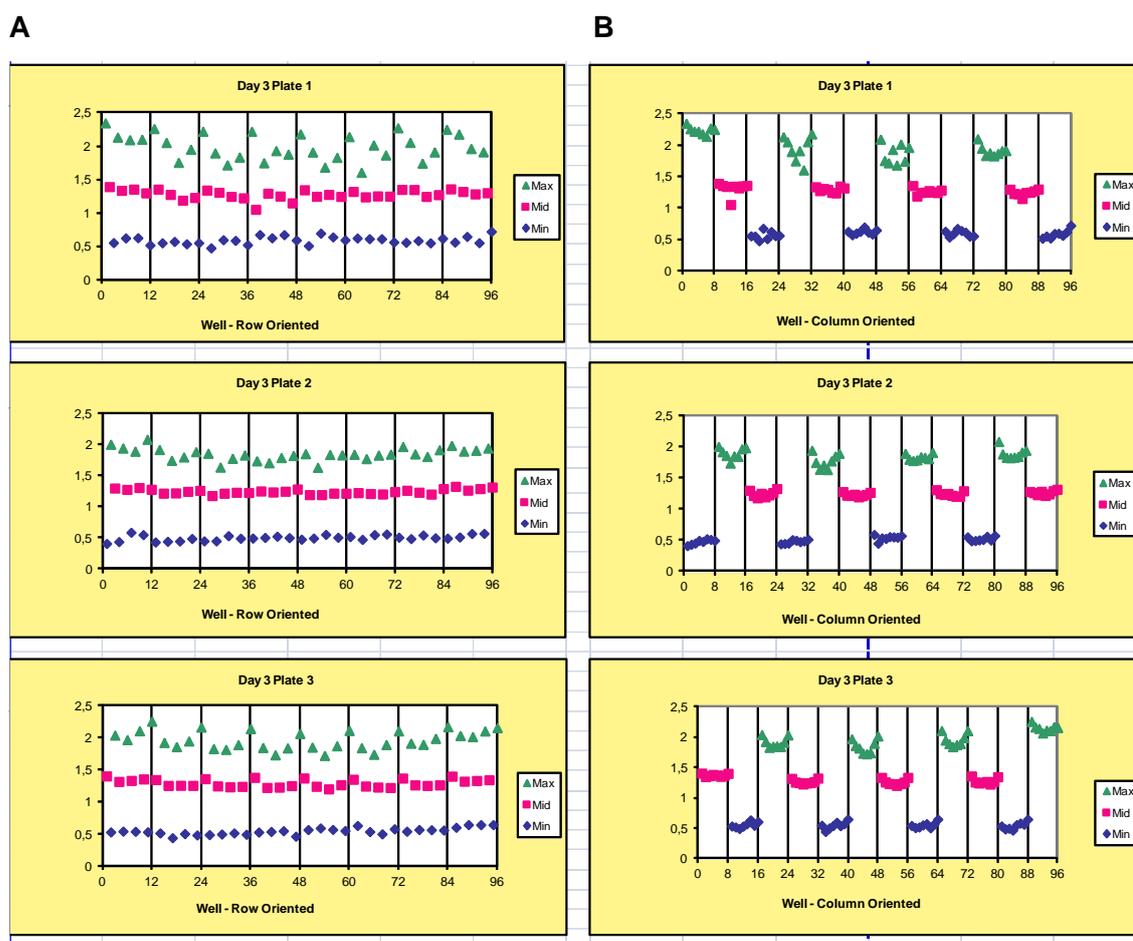
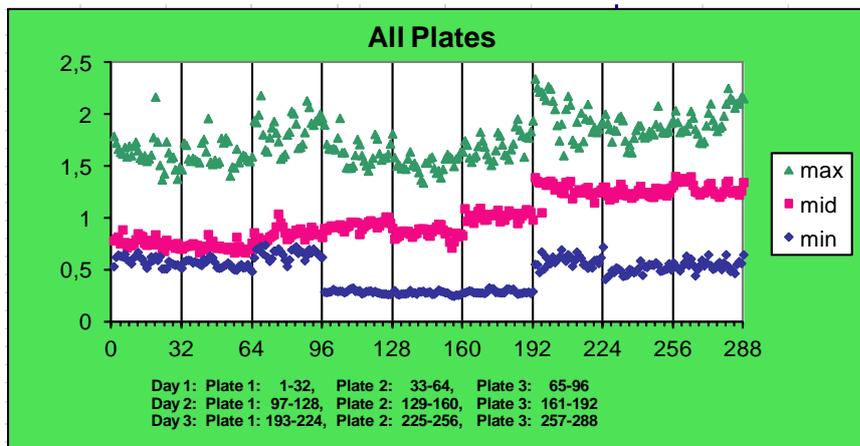


Figura I7 - Resultado do dia 3 do ensaio de validação da triagem contra ZIKV. Valores de dados brutos analisados em planilha de Excel para 3 placas no estudo de uniformidade de placas com distribuição intercalada dos sinais MIN, MED e MAX. Na análise por linha (A), coluna à esquerda, há uma variação importante entre os poços do sinal MAX (controle de células) da placa 1, que diminuem bastante nas placas 2 e 3. Essa variação aparentemente randômica é conhecida como efeito drift. Os sinais MED (células tratadas e infectadas) e MIN (células infectadas) estão bem definidos. Em (B), coluna à direita, na análise por colunas da placa, há um discreto efeito de borda, já que os sinais dos poços mais centrais estão mais baixos que os demais, levando à formação em U, acentuado no sinal MAX e mais discreto nos demais sinais.

A



B

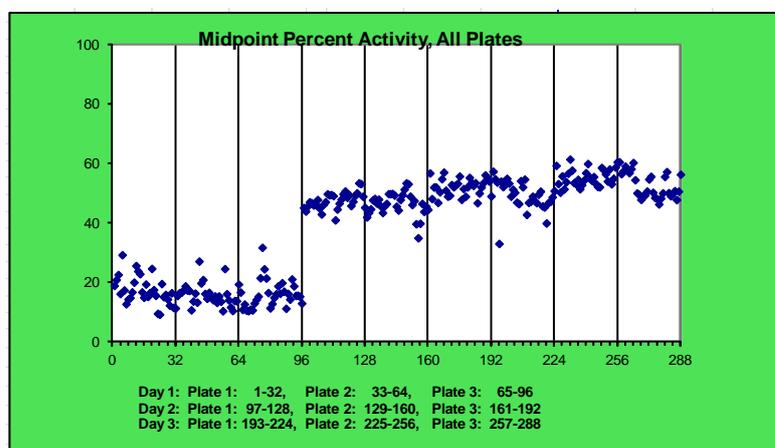


Figura I8 - Análise dos dados, dias 1, 2 e 3, da validação do ensaio antiviral contra o ZIKV. Valores de dados brutos analisados em planilha de Excel para 3 placas no estudo de uniformidade de placas com distribuição intercalada dos sinais MIN, MED e MAX. Na análise global de todas as placas (A), percebe-se que no sinal MAX há uma maior variabilidade comparada ao MED e ao MIN. Embora esses últimos estejam muito próximos no dia 1, esses sinais estão bem separados nos dias 2 e 3. Em (B) é mostrado o ponto médio do sinal MED, ou seja, obtido das células que foram infectadas e tratadas com a CE_{50} da droga controle. Cada coluna corresponde a 1 placa, sendo que as placas do dia 1 nas 3 primeiras colunas mostram que o sinal MED está bem baixo, e nos dias 2 e 3, há aparentemente uma normalização do que era esperado.

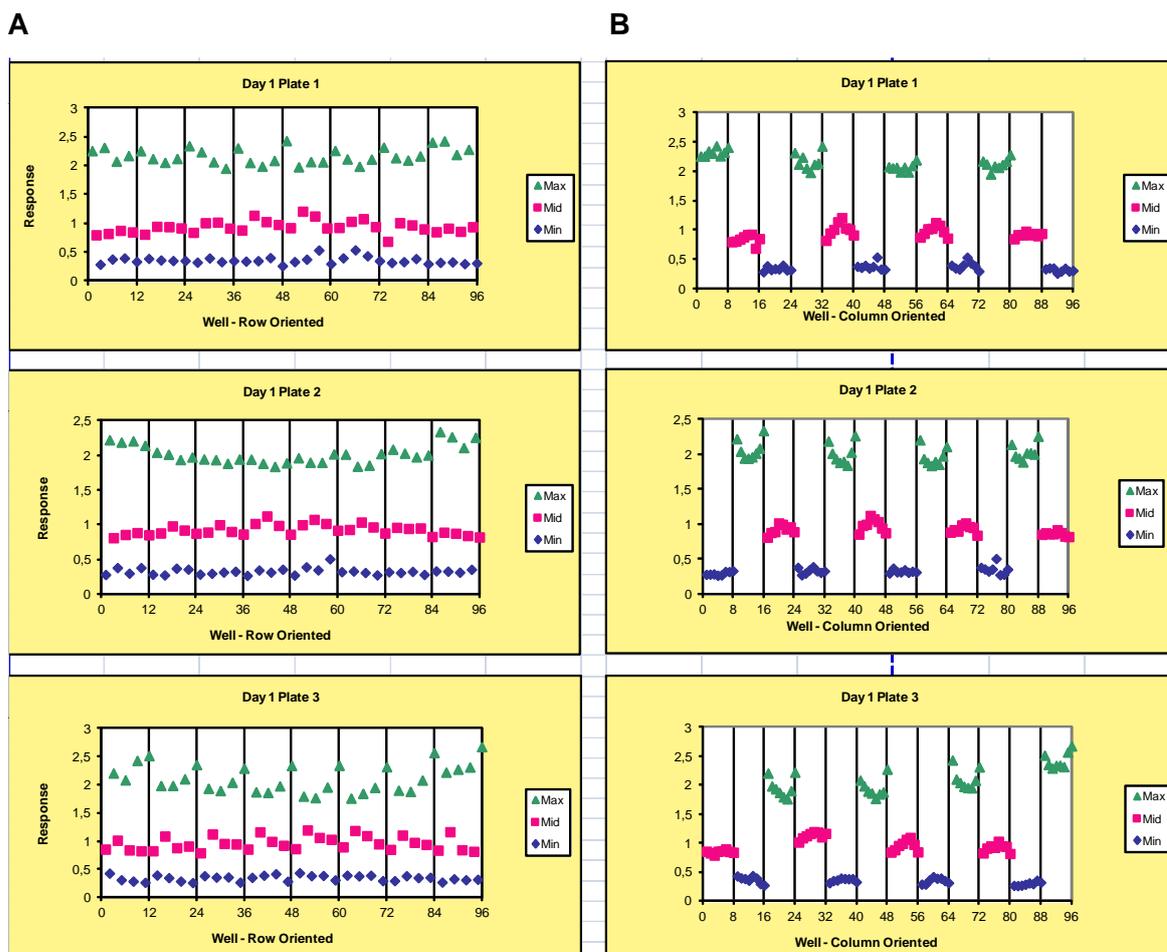


Figura I9 – Resultado do dia 1 do ensaio de validação da triagem contra DENV-2. Valores de dados brutos analisados em planilha de Excel no estudo de uniformidade de placas com distribuição intercalada dos sinais MIN, MED e MAX. Na análise por linha (A), coluna à esquerda, há uma variabilidade entre os poços do sinal MAX (células não infectadas) que diminui na placa 2 mas se acentua na placa 3. Em (B), coluna à direita, a análise é feita por colunas e mostra ausência de efeito de borda ou efeitos randômicos. Os poços do sinal MED que estão na extremidade estão com a densidade óptica (DO) mais baixa, enquanto que no sinal MAX, os poços da extremidade exibem uma DO mais alta.

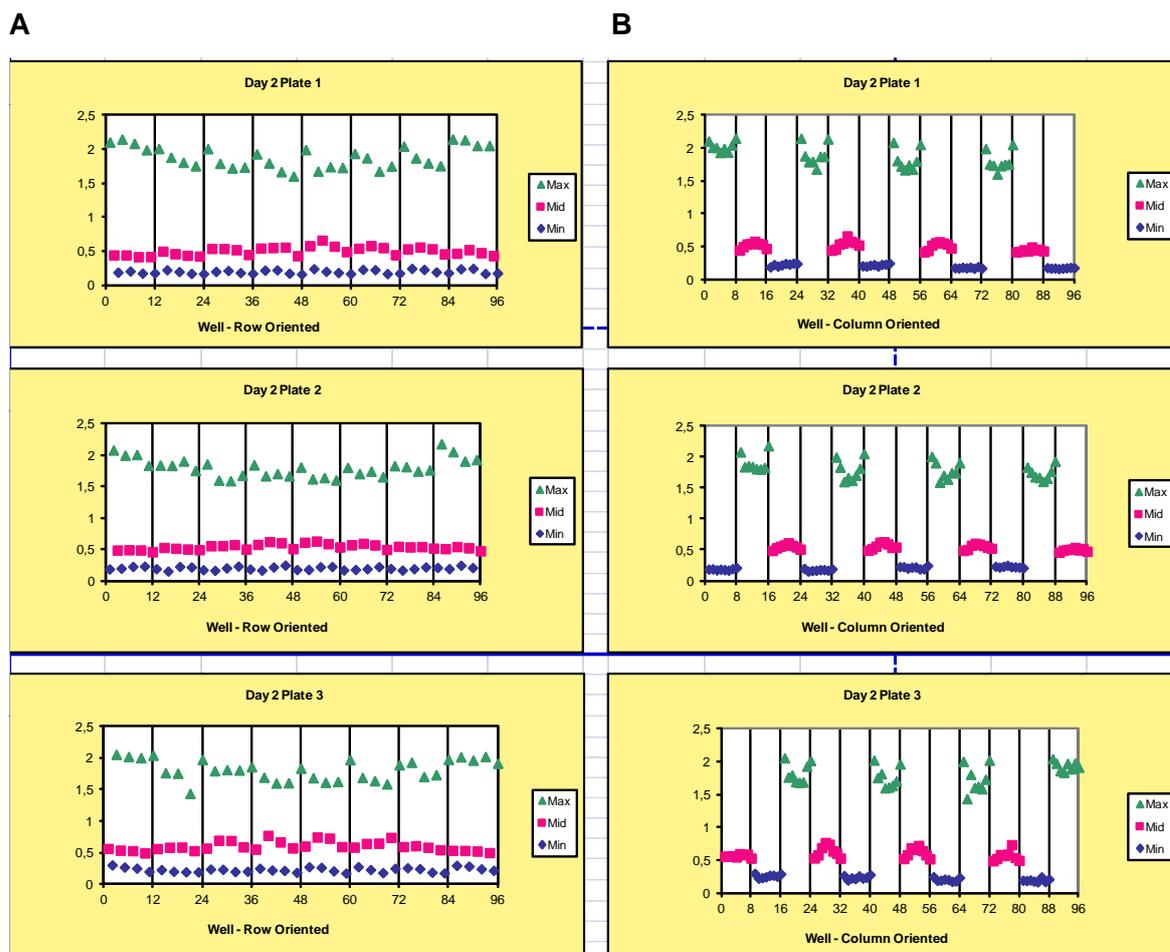


Figura 110 - Resultado do dia 2 do ensaio de validação da triagem contra DENV-2.

Valores de dados brutos analisados em planilha de Excel no estudo de uniformidade de placas com distribuição intercalada dos sinais MIN, MED e MAX. Na análise por linha (A), coluna à esquerda, há uma pequena variabilidade entre os poços do sinal MAX (células não infectadas) principalmente na placa 1. Em (B), coluna à direita, a análise é por colunas e mostra um efeito de borda nos sinais MAX (células não infectadas). Em ambas as análises, nas colunas a e b, observa-se que os sinais MIN e MED estão mais próximos do que o desejável para um ensaio de triagem.

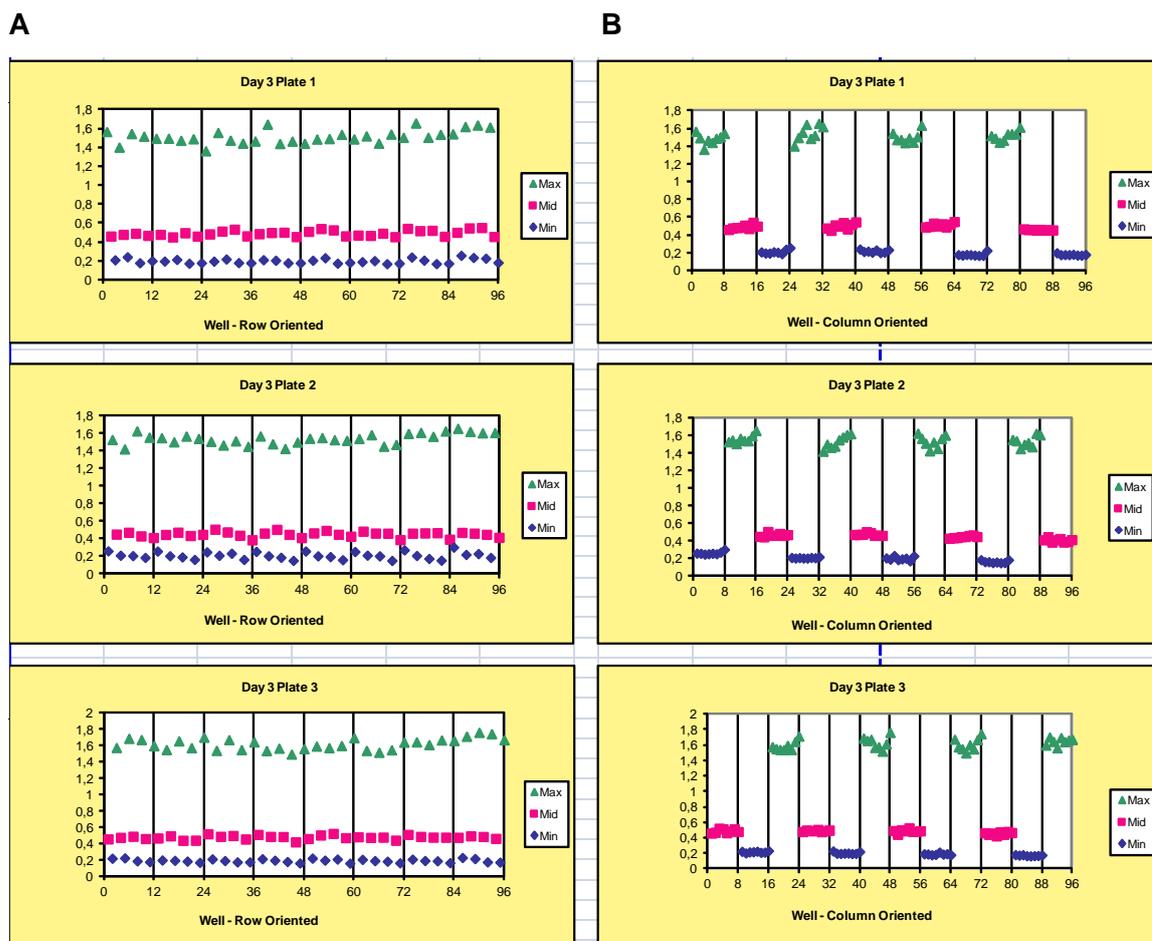
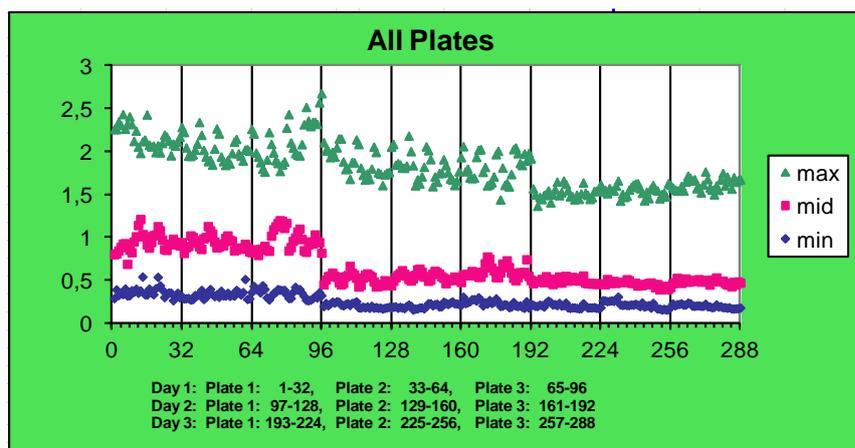


Figura I11 - Resultado do dia 3 do ensaio de validação da triagem contra DENV-2. Valores de dados brutos analisados em planilha de Excel no estudo de uniformidade de 3 placas com distribuição intercalada dos sinais MIN, MED e MAX. Na análise por linha (A), coluna à esquerda, há uma variabilidade muito sutil entre os poços do sinal MAX (células não infectadas) ao comparar com sinais MED e MIN. Os sinais MED e MIN também estão bem próximos entre si. Em (B), coluna à direita, a análise é por colunas e mostra um leve efeito de borda nos sinais MAX (células não infectadas) em relação aos sinais MED e MIN. Em ambas as análises, nas colunas a e b, observa-se que os sinais MIN e MED estão mais próximos do que o desejável para um ensaio de triagem.

A



B

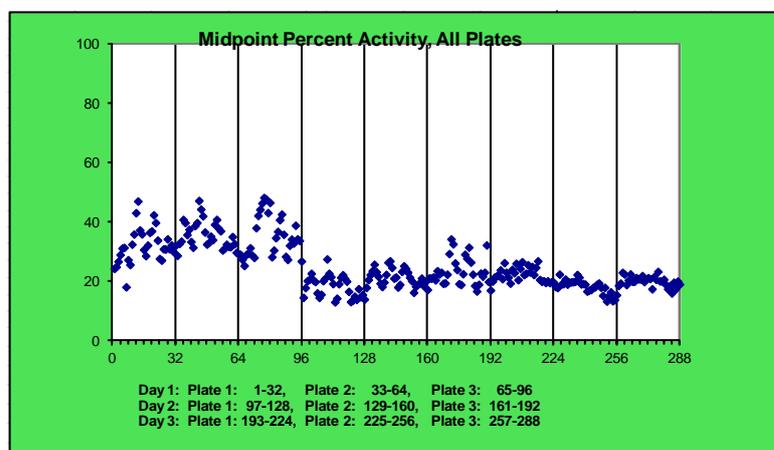
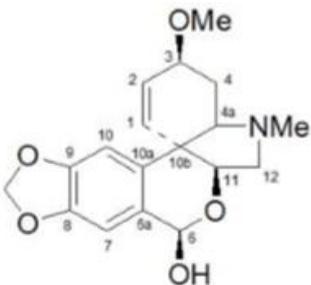


Figura I12 - Análise dos dados, dias 1, 2 e 3, da validação do ensaio antiviral contra DENV-2. Valores de dados brutos analisados em planilha de Excel para 3 placas no estudo de uniformidade de placas com distribuição intercalada dos sinais MIN, MED e MAX. Na análise global de todas as placas (A), percebe-se que no sinal MAX há uma maior variabilidade comparada aos sinais MED e MIN, embora essa variabilidade esteja bem discreta nas placas do dia 3. O sinal MIN está bem homogêneo em todas as placas e dias testados. Há uma oscilação do sinal MED principalmente entre os dias 1 e 3 do ensaio. Em (B) é mostrado o ponto médio do sinal MED, ou seja, das células que foram infectadas e tratadas com a droga controle na concentração de CE_{50} . Cada coluna corresponde a 1 placa. Embora seja observado uma variação randômica (efeito drift) entre os poços das placas do dia 1, essa variação diminui progressivamente ao se observar os sinais das placas do dia 2 e dia 3.

10.10 APÊNDICE J – Comparação e confirmação da estrutura da pretazetina

Tabela J - Comparação dos dados de 1H RMN da amostra de pretazetina isolada neste projeto com aqueles descritos por Moraes, 2016.

Numeração	δ H (ppm) pretazetina conforme Moraes, 2016.	δ H (ppm) fração CL115-1*
		
H - 1	5,50	5,52
H - 2	5,85	5,88
H - 3	4,12 – 4,18	4,14
H - 4a	2,91 – 2,99	2,96
H - 4 α	2,48 – 2,53	2,54
H - 4 β	1,75	1,80
H - 6	6,07	6,11
H - 7	6,74	6,76
H - 10	6,83	6,86
H - 11	4,32	4,34
H - 12 α	2,91 – 2,99	2,99
H - 12 β	2,63	2,66
NMe	2,47	2,50
OCH ₂ O	5,90	5,91
OMe	3,41	3,42

A amostra foi eluída aos 21,1min no fracionamento do extrato EX13356 obtido de flores de *H. glaucescens* (item 6.5.2.3)

10.11 APÊNDICE L – Determinação de FIC de combinações da licorina:pretazetina testadas contra DENV-2, ZIKV, e toxicidade em células BHK-21 e Vero.

Tabela L1 - FIC de combinações licorina-pretazetina contra ZIKV

Proporções	Combinações		CE ₅₀		FIC		ΣFIC
	Lic	Prz	Lic	Prz	Lic	Prz	
1:0	1	0	0,77	-	-	-	-
	0	1	-	2,62	-	-	-
1:2	1	1	0,62	0,62	0,81	0,24	1,05
1:3	1	2	0,46	0,91	0,60	0,35	0,95
	2	1	0,68	0,34	0,88	0,13	1,01
1:5	1	4	0,35	1,40	0,45	0,53	0,98
	4	1	0,68	0,15	0,88	0,06	0,94
1:10	1	9	0,18	1,62	0,23	0,62	0,85
	9	1	0,58	0,06	0,75	0,02	0,77
						FICI	0,94

Soluções de mesma molaridade foram combinadas v/v, pretazetina:licorina e licorina:pretazetina, nas seguintes proporções 1:0, 1:2, 1:3, 1:5 e 1:10. Em seguida, as combinações foram diluídas 1:2 e testadas em ensaios de CE₅₀ contra o ZIKV. A CE₅₀ de cada substância em cada combinação foi determinada para obtenção de cada FIC. As FIC de cada combinação foram somadas, sendo o FICI obtido pela média entre elas ($x\Sigma FIC$). O FICI foi utilizado para denominar as interações das substâncias quanto à atividade antiviral contra o ZIKV, a saber: interações sinérgicas ($x\Sigma FIC \leq 0,5$), indiferentes ($x\Sigma FIC$ entre 0,5 e $\leq 4,0$) ou antagonistas ($x\Sigma FIC$ foi $\geq 4,0$). FIC (concentração inibitória fracionada); ΣFIC (soma das concentrações inibitórias fracionadas); FICI (índice das concentrações inibitórias fracionadas).

Tabela L2 - FIC de combinações licorina-pretazetina em células Vero

Proporções	Combinações		CC ₅₀		FIC		ΣFIC
	Lic	Prz	Lic	Prz	Lic	Prz	
1:0	1	0	4,24	-	-	-	-
	0	1	-	9,38	-	-	-
1:2	1	1	3,37	3,37	0,79	0,36	1,15
1:3	1	2	2,48	4,96	0,58	0,53	1,11
	2	1	4,30	2,15	1,01	0,23	1,24
1:5	1	4	1,75	6,99	0,41	0,75	1,16
	4	1	4,57	1,14	1,07	0,12	1,19
1:10	1	9	0,96	8,68	0,23	0,93	1,16
	9	1	4,77	0,53	1,13	0,06	1,19
						FICI	1,17

Soluções de mesma molaridade foram combinadas v/v, pretazetina:licorina e licorina:pretazetina, nas seguintes proporções 1:0, 1:2, 1:3, 1:5 e 1:10. Em seguida, as combinações foram diluídas 1:2 e testadas em ensaio de toxicidade em células Vero. A CC₅₀ de cada substância em cada combinação foi determinada para obtenção de cada FIC. As FIC de cada combinação foram somadas, sendo o FICI obtido pela média entre elas ($x\Sigma FIC$). O FICI foi utilizado para denominar as interações das substâncias quanto à toxicidade em células Vero, a saber: interações sinérgicas ($x\Sigma FIC \leq 0,5$), indiferentes ($x\Sigma FIC$ entre 0,5 e $\leq 4,0$) ou antagonistas ($x\Sigma FIC$ foi $\geq 4,0$). FIC (concentração inibitória fracionada); ΣFIC (soma das concentrações inibitórias fracionadas); FICI (índice das concentrações inibitórias fracionadas).

Tabela L3 - FIC de combinações licorina-pretazetina contra DENV-2

Proporções	Combinações		CE ₅₀		FIC		ΣFIC
	Lic	Prz	Prz	Lic	Lic	Prz	
1:0	1	0	0,51	-	-	-	-
	0	1	-	1,39	-	-	-
1:2	1	1	0,32	0,32	0,63	0,23	0,86
1:3	1	2	0,32	0,63	0,63	0,45	1,08
	2	1	0,34	0,17	0,66	0,12	0,78
1:5	1	4	0,21	0,83	0,41	0,60	1,01
	4	1	0,39	0,10	0,76	0,07	0,83
1:10	1	9	0,10	0,86	0,20	0,62	0,82
	9	1	0,33	0,04	0,65	0,03	0,68
						FICI	0,87

Soluções de mesma molaridade foram combinadas v/v, pretazetina:licorina e licorina:pretazetina, nas seguintes proporções 1:0, 1:2, 1:3, 1:5 e 1:10. Em seguida, as combinações foram diluídas 1:2 e testadas em ensaios de CE₅₀ contra o DENV-2. A CE₅₀ de cada substância em cada combinação foi determinada para obtenção de cada FIC. As FIC de cada combinação foram somadas, sendo o FICI obtido pela média entre elas ($x\Sigma FIC$). O FICI foi utilizado para denominar as interações das substâncias quanto à atividade antiviral contra DENV-2, a saber: interações sinérgicas ($x\Sigma FIC \leq 0,5$), indiferentes ($x\Sigma FIC$ entre 0,5 e $\leq 4,0$) ou antagonistas ($x\Sigma FIC$ foi $\geq 4,0$). FIC (concentração inibitória fracionada); ΣFIC (soma das concentrações inibitórias fracionadas); FICI (índice das concentrações inibitórias fracionadas).

Tabela L4 - FIC de combinações licorina-pretazetina em células BHK-21

Proporções	Combinações		CC ₅₀		FIC		ΣFIC
	Lic	Prz	Prz	Lic	Lic	Prz	
1:0	1	0	3,97	-	-	-	-
	0	1	-	7,40	-	-	-
1:2	1	1	2,98	2,98	0,75	0,40	1,15
1:3	1	2	2,04	4,08	0,51	0,55	1,06
	2	1	3,37	1,69	0,85	0,23	1,08
1:5	1	4	1,30	5,20	0,33	0,70	1,03
	4	1	4,23	1,06	1,07	0,14	1,21
1:10	1	9	0,69	6,24	0,17	0,84	1,01
	9	1	3,68	0,41	0,93	0,06	0,99
						FICI	1,08

Soluções de mesma molaridade foram combinadas v/v, pretazetina:licorina e licorina:pretazetina, nas seguintes proporções 1:0, 1:2, 1:3, 1:5 e 1:10. Em seguida, as combinações foram diluídas 1:2 e testadas em ensaios de toxicidade em células BHK-21. A CC₅₀ de cada substância em cada combinação foi determinada para obtenção de cada FIC. As FIC de cada combinação foram somadas, sendo o FICI obtido pela média entre elas ($x\Sigma FIC$). O FICI foi utilizado para denominar as interações das substâncias quanto à toxicidade em células BHK-21, a saber: interações sinérgicas ($x\Sigma FIC \leq 0,5$), indiferentes ($x\Sigma FIC$ entre 0,5 e $\leq 4,0$) ou antagonistas ($x\Sigma FIC$ foi $\geq 4,0$). FIC (concentração inibitória fracionada); ΣFIC (soma das concentrações inibitórias fracionadas); FICI (índice das concentrações inibitórias fracionadas).