



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**  
**BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**ANA BEATRIZ SANTIAGO MOTTA**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO EXTRATO**  
**ROTAEVAPORADO DE *Schinopsis brasiliensis* ENGL. NA REPLICAÇÃO DO VÍRUS**  
**DENGUE**

**JOÃO PESSOA**

**2019**

ANA BEATRIZ SANTIAGO MOTTA

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO EXTRATO ROTA-EVAPORADO  
DE *Schinopsis brasiliensis* ENGL. NA REPLICAÇÃO DO VÍRUS DENGUE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Joelma Rodrigues de Souza.

Coorientadora: Prof. Dra. Fabíola da Cruz Nunes.

JOÃO PESSOA

2019

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

M921i Motta, Ana Beatriz Santiago.

Investigação da atividade antiviral do extrato rotaevaporado de *Schinopsis brasiliensis* Engl. na replicação do vírus da dengue / Ana Beatriz Santiago Motta. - João Pessoa, 2019.

70 f. : il.

Orientação: Joelma Rodrigues de Souza.

Coorientação: Fabíola da Cruz Nunes.

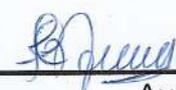
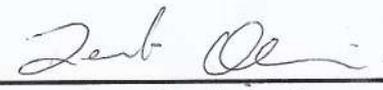
Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. *Schinopsis brasiliensis* Engl. 2. Dengue vírus. 3. Antivirais. I. Souza, Joelma Rodrigues de. II. Nunes, Fabíola da Cruz. III. Título.

UFPB/BC

### ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos dezesseis dias do mês de setembro de 2019, às 10:00h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Dra. Joelma Rodriguez de Souza (DFP/CCS/UFPB) e composta pelos avaliadores: 1. Profa. Dra. Fabíola da Cruz Nunes (DBCM/CBIOTEC/UFPB); 2. Prof. Dr. Renato Antônio dos Santos Oliveira (DFP/CCS/UFPB), a discente Ana Beatriz Santiago Motta, matrícula 11512583, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO EXTRATO ROTA-EVAPORADO DE *Schinopsis brasiliensis* ENGL. NA REPLICAÇÃO DO VÍRUS DENGUE”**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao discente e demais presentes e eu, Joelma Rodriguez de Souza, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.

 _____ Presidente da Banca Examinadora	 _____ Avaliador 1
 _____ Discente	 _____ Avaliador 2

João Pessoa/PB, 16 de setembro de 2019.

*A todas as pessoas que eu mais amo.*

*Sem vocês, eu nada seria.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me dado sanidade para conseguir chegar até aqui, permanecendo ao meu lado e me dando a luz que eu precisava nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Ivana e Landry, que sempre me apoiaram independente do curso que eu fosse escolher, por nunca ter faltado amor para comigo, por me aconselharem e incentivarem, que se eu quiser eu consigo chegar onde quer que seja. Me ensinando desde cedo a ter caráter, ser honesta, solidária, humilde e respeitosa. Obrigada por tudo, amo vocês.

À minha irmã, Carol, que me acompanhou durante minha vida toda (literalmente), sendo companheira, me dando sermões quando necessário, mas que sempre estava quando precisei. Obrigada por tudo.

A todos que fizeram e fazem parte da minha vida, especialmente minha namorada Jéssica, que foi quem acompanhou essa minha jornada de perto, por todo carinho, compreensão e incentivo. Obrigada por fazer parte da minha caminhada.

Aos meus amigos tanto de graduação como não, por terem empatia, paciência (de sobra) e por me apoiarem principalmente quando eu acho que é o fim do mundo. Obrigada a todos meus colegas e amigos da graduação (não citarei nomes, mas todos são importantes de alguma forma para mim, sempre terei um carinho enorme por vocês), por me acompanharem nesse percurso de quatro anos, sem vocês tudo seria mais difícil, com vocês tudo se torno tão mais leve.

Aos colegas do LACEC (Laboratório de Cultivo e Análise Celular da ETS/UFPB), que passaram muitos momentos comigo, experimentos em sábados e feriados, e muitas organizações de laboratório para colocar o laboratório em pleno funcionamento. Ao professor Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano coordenador do LACEC, que sempre atencioso, me incentivou nas pesquisas e que muitas vezes me deu aquela luz no fim do túnel.

À minha orientadora, Profa. Dra. Joelma Rodrigues de Souza pela oportunidade que me deu no laboratório, pela confiança em mim depositada e pela paciência. À minha coorientadora Profa. Dra. Fabíola da Cruz Nunes, pela atenção prestada e pela compreensão do projeto. Obrigada pela contribuição de vocês na minha vida acadêmica.

Ao membro da banca examinadora, Professor Dr. Renato Antonio dos Santos Oliveira, agradeço por participar e por tudo que o senhor me ensinou e contribuiu para minha formação.

Agradeço a UFPB, por possuir o bacharelado em Biotecnologia, e ter me proporcionado a cursa-lo, a todos os professores do Centro de Biotecnologia por passarem um pouco dos seus conhecimentos expendidos na ciência para mim, por se dedicarem a ciência, sempre nos

incentivando a caminhar na pesquisa, e por se doarem, por nós alunos, para que um dia consigamos ser como vocês. Obrigada por todas as trocas de ideias, sonhos e experiências.

Por fim, agradeço a todos que me ajudaram a finalizar essa etapa tão importante e marcante em minha vida.

E deixo a seguinte mensagem para os novos alunos que estão entrando no curso, nunca desistam dos seus sonhos, por mais loucos ou difíceis que eles possam ser!

*“Para se chegar à verdade,  
antes tem que se subir pelos degraus dos erros,  
é o que acontece com a ciência, em sua constante busca,  
até a exatidão dos resultados”.*

*Ivan Teorilang*

## RESUMO

A dengue é uma importante doença viral humana, endêmica em vários países e com surtos epidêmicos frequentes ocasionando um problema de saúde pública internacional. As frequentes epidemias associadas às mudanças nas cepas virais, combinadas com o *status immune* do hospedeiro podem ocasionar formas clínicas graves ou fatais. O tratamento da dengue é sintomatológico, não existindo uma terapêutica específica contra a doença. Desta forma, existe uma busca por possíveis substâncias, extratos e fármacos que apresentem uma possível atividade antiviral específica contra o vírus da dengue. Assim, o presente estudo investigou o potencial da atividade antiviral *in vitro* do extrato rotaevaporado da *Schinopsis brasiliensis* Engl. contra a replicação do vírus da dengue. Para a avaliação da citotoxicidade do extrato rotaevaporado de *S. brasiliensis* Engl., o mesmo foi testado nas concentrações 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL em células Vero, e nas concentrações 0,01 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL e 1 µg/mL em células de *Aedes albopictus* linhagem C6/36. Além disso, sua eficácia antiviral foi avaliada na concentração de 1 µg/mL nas células do inseto infectadas com o DENV4. Nossos resultados revelaram que nas células Vero, o extrato se mostrou tolerante na concentração de 1 µg/mL, e tóxico, nas concentrações de 5 µg/mL a 100 µg/mL. Nas células C6/36, o extrato não mostrou toxicidade em nenhuma das concentrações testadas. Quanto à eficácia antiviral, nas condições de estudo, o extrato não conferiu redução significativa dos títulos virais, quando comparado entre células infectadas tratadas e células infectadas não tratadas. Novos estudos são propostos buscando o entendimento do potencial antiviral do extrato rotaevaporado de *S. brasiliensis* Engl. frente à diferentes cepas virais em linhagens celulares susceptível a infecções pelo dengue visando contribuir com a formulação de fármacos específicos contra a doença.

**Palavras-Chave:** *S. brasiliensis* Engl. Dengue vírus. Antivirais.

## ABSTRACT

Dengue is an important human viral disease, endemic in many countries with frequent epidemic outbreaks causing an international public health problem. Frequent epidemics associated with changes in viral strains, which combined with host immune status can lead to severe and fatal clinical forms. The treatment of dengue is symptomatic, and there is no specific therapy against the disease. Thus, there is a search for possible substances, extracts and drugs that report a possible specific antiviral activity against dengue viral. Thus, the present study investigated the potential of in vitro antiviral activity of the rotary evaporated extract of *Schinopsis brasiliensis* Engl. against dengue virus replication. The evaluation of cytotoxicity of rotary evaporated extract *S. brasiliensis* Engl. was tested at concentrations of 1 µg / mL, 5 µg / mL, 10 µg / mL, 50 µg / mL and 100 µg / mL in Vero cells, and at concentrations of 0.01 µg / mL, 0.05 µg / mL, 0.1 µg / mL, 0.5 µg / mL and 1 µg / mL in C6 / 36 insect cells. In addition, its antiviral efficacy was evaluated at a concentration of 1 µg / mL in DENV4-infected C6 / 36 insect cells. Our results revealed that in Vero cells, the extract was tolerant at 1 µg / mL and toxic at 5 µg / mL at 100 µg / mL. In C6 / 36 cells, the extract showed no toxicity at any of the concentrations tested. As for antiviral efficacy, under the study conditions, the extract did not confer significant reduction in viral titers when compared between treated and untreated infected cells. Further studies are proposed to understand the antiviral potential of the rotavapor extract of *S. brasiliensis* Engl. against different viral strains in cell lines susceptible to dengue infections in order to contribute to the formulation of specific drugs against the disease.

**Keywords:** *S. brasiliensis* Engl. Dengue viral. Antivirals.

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1	-	Diferenças apresentadas entre as espécies vetoras do <i>Aedes</i> .....	18
Figura 2	-	Distribuição geográfica do <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i> no Brasil.....	19
Figura 3	-	Distribuição geográfica global das espécies <i>Aedes aegypti</i> e do <i>Aedes albopictus</i> .....	20
Figura 4	-	Ciclo urbano de transmissão do vírus dengue.....	21
Figura 5	-	Genoma.....	22
Figura 6	-	Ciclo de replicação da família <i>Flaviviridae</i> .....	25
Figura 7	-	Distribuição de países ou áreas de risco de transmissão da dengue no mundo – 2011.....	27
Figura 8	-	Número de casos de dengue (suspeitos ou confirmados) notificados à OMS desde 1990 até 2015.....	28
Figura 9	-	Número de casos de dengue no Brasil, 1986-2018.....	30
Figura 10	-	Classificação dos casos de dengue.....	32
Figura 11	-	Árvore de <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.....	39
Figura 12	-	Identificação dos locais de ocorrência natural de <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl. no Brasil.....	39
Figura 13	-	Placa de 24 poços do ensaio de citotoxicidade em células Vero. Células Vero foram cultivadas na presença de concentrações variando de 1µg/mL a 100µg/mL de <i>S.brasiliensis</i> .....	44
Figura 14	-	Esquema de distribuição de tratamentos e controles do ensaio de eficácia antiviral para DENV4.....	46
Figura 15	-	Esquema de distribuição de tratamentos e controles do ensaio de titulação viral.....	47
Figura 16	-	Confluência do tapete celular após 24 h do estímulo com extrato rotaevaporado da <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl. Células Vero foram cultivadas na presença de concentrações variando de 1µg/mL a 100µg/mL de <i>S. brasiliensis</i> Engl. ....	49
Figura 17	-	Percentual de Viabilidade das células Vero após tratamento com o extrato rotaevaporado <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl. por 24h.....	50

Figura 18	-	Confluência do tapete celular após 24 h do estímulo com extrato rotaevaporado da <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl. Células C6/36 foram cultivadas na presença de concentrações variando de 0,01µg/mL a 1µg/mL de <i>S. brasiliensis</i> Engl.	51
.....			
Figura 19	-	Confluência do tapete celular após 48 h do estímulo com extrato rotaevaporado da <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl. Células C6/36 foram cultivadas na presença de concentrações variando de 0,01µg/mL a 1µg/mL de <i>S. brasiliensis</i> Engl.	52
.....			
Figura 20	-	Percentual de Viabilidade das células C6/36 após tratamento com o extrato rotaevaporado <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl. por 24h.....	53
Figura 21	-	Percentual de Viabilidade das células C6/36 após tratamento com o extrato rotaevaporado <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl. por 48h.....	53
Figura 22	-	Representação do ensaio de foco infeccioso e reação da imunoperoxidase.....	54
Figura 23	-	Titulação viral por ensaio de foco infeccioso em células C6/36 infectadas por DENV4 (com a retirada do inóculo) em PFU.....	55

## LISTA DE SIGLAS

$\mu\text{L}$	Microlitro
CHIKV	Vírus Chikungunya
DENV	Dengue vírus
DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4	Dengue vírus sorotipo 1, 2, 3 e 4
MEM	Meio básico modificado (Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGCG	Galato de epigallocatequina
H1N1	Vírus influenza
HCV	Vírus causador da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSV	Herpes-vírus simples
L-15	Meio LEIBOVITZ 15
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MOI	Multiplicidade de infecção viral
NS	Proteínas não estruturais
NS1	Proteína não-estrutural 1
NS2A	Proteína não-estrutural 2A
NS2B	Proteína não-estrutural 2B
NS3	Proteína não-estrutural 3
NS4A	Proteína não-estrutural 4A
NS4B	Proteína não-estrutural 4B
NS5	Proteína não-estrutural 5
OMS	Organização Mundial da Saúde
PFU	Unidades formadoras de placas
pH	Potencial hidrogeniônico
PROTEÍNA C	Proteína do capsídeo
PROTEÍNA E	Proteína do envelope
PROTEÍNA M	Proteína de membrana
PROTEÍNA PrM	Proteína precursora de membrana
RE	Retículo endoplasmático

RNA	Ácido ribonucleico
RNA (-)	RNA polaridade negativa
RNA (+)	RNA polaridade positiva
SFB	Soro Fetal Bovino
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1	VETORES DO DENGUE.....	18
2.2	VÍRUS.....	21
<b>2.2.1</b>	<b>Ciclo replicativo</b> .....	24
2.3	EPIDEMIOLOGIA.....	26
<b>2.3.1</b>	<b>Dengue no mundo</b> .....	26
<b>2.3.2</b>	<b>Dengue no Brasil</b> .....	28
2.4	FORMAS CLÍNICAS.....	31
2.5	TÉCNICAS VIROLÓGICAS.....	32
2.6	TRATAMENTO E VACINA.....	35
2.7	<i>Schinopsis brasiliensis</i> ENGLER.....	38
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
3.1	OBJETIVO GERAL.....	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	43
4.1	CULTURA DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS (VERO).....	43
4.2	CULTIVO DE CÉLULAS DE INSETOS (C6/36).....	43
4.3	CULTIVO DE VÍRUS.....	43
4.4	OBTENÇÃO DO EXTRATO ROTAEVAPORADO DA <i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.....	43
4.5	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO.....	44
4.6	ENSAIO DE CITOTOCIXIDADE EM CÉLULAS C6/36.....	45
4.7	ENSAIO DE EFICÁCIA ANTIVIRAL.....	45
4.8	ENSAIOS DE TITULAÇÃO VIRAL.....	46
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	49
5.1	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO.....	49
5.2	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS C6/36 DE <i>Aedes albopictus</i> .....	50
5.3	ENSAIOS DE EFICÁCIA ANTIVIRAL E TITULAÇÃO VIRAL.....	54
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	56

<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma das principais arboviroses humana, causada pelo vírus dengue (DENV), pertencente ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, sendo vírus esféricos, envelopados e com cerca de 50 nanômetros de diâmetro. O RNA é envolto por um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, a proteína de capsídeo (C) e circundada por uma bicamada lipídica associada às proteínas de membrana (M) e envelope (E). Até o momento, são conhecidos quatro sorotipos antigenicamente distintos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (GUBLER, 2002). O vírus é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*, como *Aedes albopictus*, mas principalmente pelo *Aedes aegypti* (BHATT et al., 2013). Dentro do intestino do vetor artrópode, após ingestão, ocorre replicação do vírus, que pode ser encontrado em grande quantidade nas glândulas salivares do mosquito, replicando-se durante oito a doze dias. Após ser infectado pelo vírus e decorrido o período de incubação viral, o mosquito é capaz de transmitir a infecção durante o resto de sua vida (LUPI et al, 2007; GUZMAN; ISTÚRIZ, 2010; XAVIER, 2010; GUEDES, 2012).

A doença vem se consolidando como um dos maiores desafios de saúde pública do Brasil e do mundo. Atualmente, a dengue apresenta um caráter endemo-epidêmico em praticamente todos os continentes do globo, estando presente em mais de 100 países nas regiões da África, Américas, Mediterrâneo Oriental, Sudeste da Ásia e Pacífico Ocidental, sendo as regiões das Américas, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental são as mais seriamente afetadas (WHO,2019). O número real de casos de dengue é subnotificado e muitos casos são classificados erroneamente. Segundo a última estimativa global, estima-se que 390 milhões de pessoas estavam infectadas pelo DENV, com 96 milhões de casos com manifestações clínicas grave (BHATT et al., 2013). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de 20.000 mortes relacionadas à dengue ocorrem anualmente em todo o mundo (WHO, 2007; WHO 2012). No Brasil, a dengue vem apresentando alterações em diferentes configurações populacionais acometendo pessoas de diferentes idades principalmente crianças e idosos. Este ano, até a 26ª semana epidemiológica – SE - (30/12/2018 a 30/06/2019) foram registrados 1.281.759 casos prováveis de dengue no Brasil. Quando se compara ao mesmo período de 2018, em que foram registrados 183.829 casos prováveis de dengue, registra-se um aumento de 597,3% do número de casos prováveis, representando uma incidência de 614,8 casos a cada 100 mil habitantes no Brasil. Na Paraíba, esses dados representam 9.104 casos prováveis de dengue, com incidência de 227,8 casos a cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2019).

A infecção por qualquer um dos quatro sorotipos do DENV apresenta um espectro clínico variado, desde uma infecção indiferenciada a uma doença febril aguda autolimitada (dengue), ou uma doença grave com o aumento da permeabilidade vascular e choque (dengue grave), gerando quadros graves com hemorragia e choque, que podem evoluir para óbito. Clinicamente, a dengue se inicia de forma abrupta após 3-15 dias de incubação, sendo caracterizada por dois ou mais dos seguintes sintomas: febre alta, cefaleia, dor retro orbital, mialgia, artralgia e exantema com ou sem prurido (MALLHI et al., 2015). O período de convalescência pode ser acompanhado de grande debilidade física, e prolongar-se por várias semanas.

Embora existam estratégias públicas de combate ao vetor, como através do controle físico, utilizando água quente para matar os ovos do vetor *Aedes* em pequenos locais com água parada, o controle biológico, através da inserção de peixes larvófagos em locais maiores que possuem água, como bebedouros de grandes animais, fossos de elevador de obras, fontes ornamentais, piscinas abandonadas e depósitos de água não potável e o controle químico, onde se borrifa inseticidas com ação larvicida. Investimentos em diagnósticos precisos e capacitação de recursos humanos visando o correto manejo clínico dos pacientes e a diminuição dos casos graves da doença, ainda não existe nenhuma terapêutica antiviral específica contra a dengue. Desta forma, são propostas vias alternativas de combate ao vetor e fármacos antivirais específicos que possam controlar a replicação viral em humanos e/ou infecção celular no vetor, para erradicar a doença. Assim, diversas moléculas orgânicas oriundas de extratos vegetais têm sido estudadas com esses objetivos (GONZALEZ et al., 2009; LEARDKAMOLKARN et al., 2011; MAZZUCCO et al., 2015; CHAVES et al., 2015).

O interesse pelos extratos medicinais e a busca pela produção de fitoterápicos capazes de promover o controle biológico e patológico está aumentando gradualmente nos últimos anos. O método de extração por rotaevaporação se destaca, por apresentar os extratos concentrados e os solventes recuperados em temperatura e pressão mais baixa (CELOTO, 2005; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; SANTOS, 2013). Neste contexto, merece destaque a planta medicinal *Schinopsis brasiliensis* Engler, popularmente conhecida como Braúna, disseminada entre as comunidades da região da Caatinga no Brasil, e que é utilizada para formular misturas para o tratamento da gripe, diarreia e inflamações gerais (SILVA; ALBUQUERQUE, 2005; ALBUQUERQUE; OLIVEIRA, 2007; ALMEIDA et al., 2006, 2010; CHAVES et al., 2015). Estudos científicos descrevem e comprovam que *Schinopsis brasiliensis* é uma das plantas medicinais que apresenta eficácia demonstrada contra o *Staphylococcus aureus* multirresistente, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, o extrato de *S.*

*brasiliensis* também apresentou atividade antifúngica frente ao gênero *Candida* (CHAVES et al., 2011; SILVA et al., 2012; SARAIVA et al., 2013; JOVITO, 2016).

Algumas pesquisas vêm destacando a caracterização fitoquímica de diferentes partes da braúna. Donati et al. (2014) caracterizaram o óleo essencial das folhas da *S.brasiliensis* identificando como principais componentes o estragol, o trans-anetol, o beta-cariofileno e o mirceno, sendo este um monoterpene com atividade antioxidante demonstrada. Em acréscimo, Santos et al. (2014) e Souza et al. (2015) realizaram a caracterização do extrato hidroalcoólico obtido a partir da casca da *S.brasiliensis*, onde detectaram a presença de vários compostos fitoquímicos como auronas, saponinas, catequinas e chalconas, mas principalmente taninos, flavonoides e polifenóis. Chaves et al. (2015), demonstraram que o extrato hidroalcoólico rotaevaporado da casca de *S. brasilienses* apresenta baixa toxicidade aguda em ratos nas concentrações testadas. Já Jovito et al. (2016) avaliaram a citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC), em todas as concentrações testadas, o extrato das folhas de *S. brasiliensis* não apresentou toxicidade em células humanas. Ante a esses estudos de caracterização química, os extratos rotaevaporado da *Schinopsis brasiliensis* Engl. vem apresentando efeitos antibacteriano e antifúngico (CHAVES et al., 2011; SARAIVA et al., 2013; JOVITO, 2016). Neste contexto, aos polifenóis, destacando-se os flavonoides, são atribuídos diversas atividades biológicas, tais como atividade antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória e antiviral, trazendo importância farmacológica para esses compostos (COUTINHO et al., 2009). Inúmeros flavonoides têm sido isolados e estudados ativamente como possíveis opções terapêuticas contra diferentes vírus como por exemplo *myricetin*, *hesperetin*, *chrysin*, *galangin*, *morin*, *tangeretina*, *wogonin*, silimarina, EGCG, baicaleína e quercetina. Zakaryan et al. (2017) relataram inúmeros achados positivos sobre a eficácia *in vitro* dos flavonoides contra vírus influenza, vírus da febre amarela, vírus herpes simples, vírus da hepatite C, vírus da imunodeficiência humana, vírus Chikungunya DENV-2 entre outros. Desta forma, como o extrato hidroalcoólico da casca de *Schinopsis brasiliensis* Engl. utilizado neste trabalho, apresenta grande quantidade de polifenóis totais e flavonoides, o presente trabalho teve por objetivo investigar a atividade antiviral do extrato rotaevaporado de *Schinopsis brasiliensis* Engl. na replicação *in vitro* do vírus dengue.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 VETORES DO DENGUE

Os mosquitos das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são provenientes do filo *Arthropoda*, ordem *Diptera*, família *Culicidae*, subfamília *Culicinae* são os vetores mais importantes na transmissão do DENV entre humanos. Embora essas duas espécies apresentem aspectos semelhantes com relação à biologia e ecologia, existem algumas diferenças entre elas, o *Ae. aegypti* é encontrado frequentemente em ambientes urbanos e é o principal transmissor da dengue, enquanto o *Ae. albopictus* adapta-se facilmente ao ambiente urbano, rural e peri-urbano, podendo este servir como ponte entre os ciclos urbano e silvestre (VALLE; PIMENTA; CUNHA, 2015). Tanto o *Ae. aegypti* (Linnaeus, 1762) quanto o *Ae. albopictus* (Skuse, 1894) são mosquitos de coloração enegrecida com listras brancas pelo corpo, porém eles apresentam algumas diferenças tanto morfológicas quanto comportamental e ecológica, como podemos observar na Figura 1.

**Figura 1** - Diferenças apresentadas entre as espécies vetoras do *Aedes*.

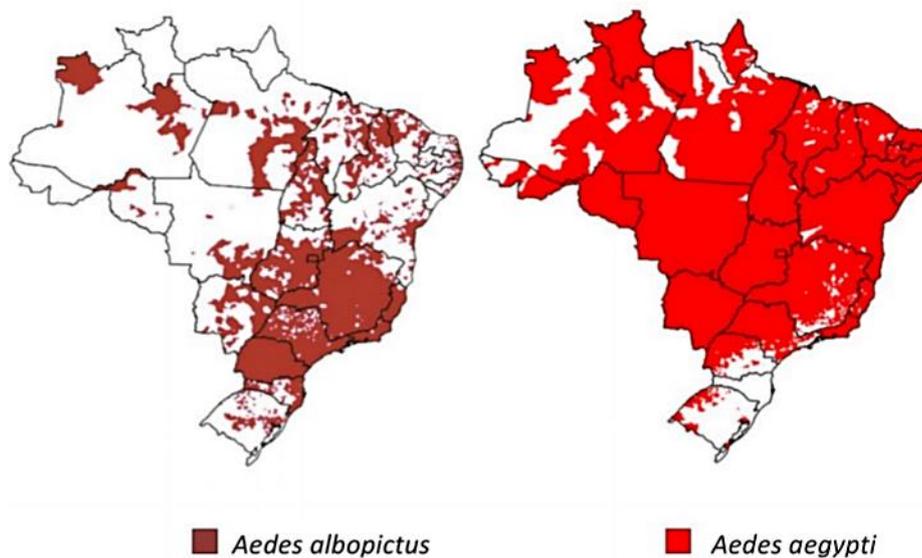
	
<i>Ae. aegypti</i>	<i>Ae. albopictus</i>
Desenho de uma lira no torso	Uma única lista branca longitudinal no dorso
Vive em áreas urbanas com ou sem vegetação	Vive em áreas com vegetação
Pica, descansa e põe ovos dentro ou em torno das casas	É principalmente um mosquito de jardim
Furtivo	Agressivo
Alta preferência pelo homem	Pica tanto o homem como uma série de mamíferos domésticos e silvestres
Principal vetor da dengue no mundo	Principal transmissor da dengue em algumas áreas, mas geralmente um vetor secundário
Criadouros artificiais principalmente	Criadouros naturais e artificiais
Preferência por criadouros dentro ou próximo das residências	Preferência por criadouros no entorno ou um pouco afastados das residências

Fonte: Fiocruz (2019).

O *Ae. aegypti* foi introduzido nas Américas durante o período colonial, provavelmente na época do tráfico de escravos (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Atualmente, essa espécie tem infestado muitos países dos continentes americanos. Já a introdução do *Ae. albopictus* nas Américas foi primeiramente registrada no Texas, Estados Unidos, em 1985, com a detecção de formas imaturas em pneus usados provenientes da Ásia (ESTRADA-FRANCO; CRAIG, 1995; BENEDICT et al. 2007). No Brasil a espécie foi detectada, pela primeira vez, em 1986, na cidade de Itaguaí, Rio de Janeiro (CONSOLI; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). A Figura 2, mostra os municípios brasileiros onde o *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* foram detectados em 2014 (Couto-Lima et al., 2017).

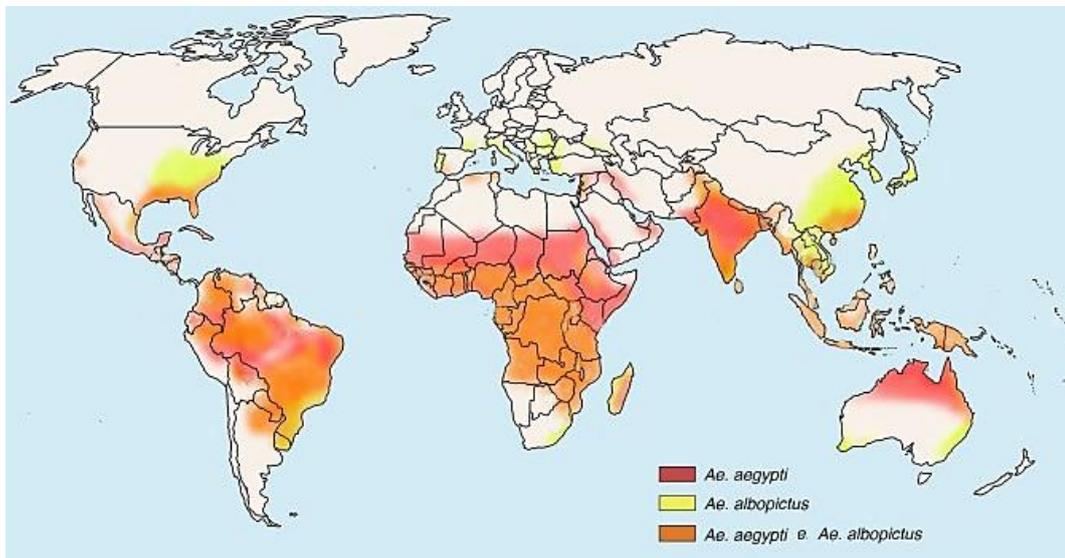
Quanto a sua área de distribuição, o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* se assemelham, distribuindo-se em áreas tropical e subtropical do globo (Figura 3), estando presente em praticamente todo o continente americano, no sudeste da Ásia, e em toda a Índia, percebemos que como *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* são espécies invasoras, elas se espalham para novas áreas através de rotas de navegação e movimento humano (TATEM HAY & ROGERS, 2006; HAWLEY et al., 1987).

**Figura 2** - Distribuição geográfica do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus* no Brasil.



Fonte: Couto-Lima et al. (2017).

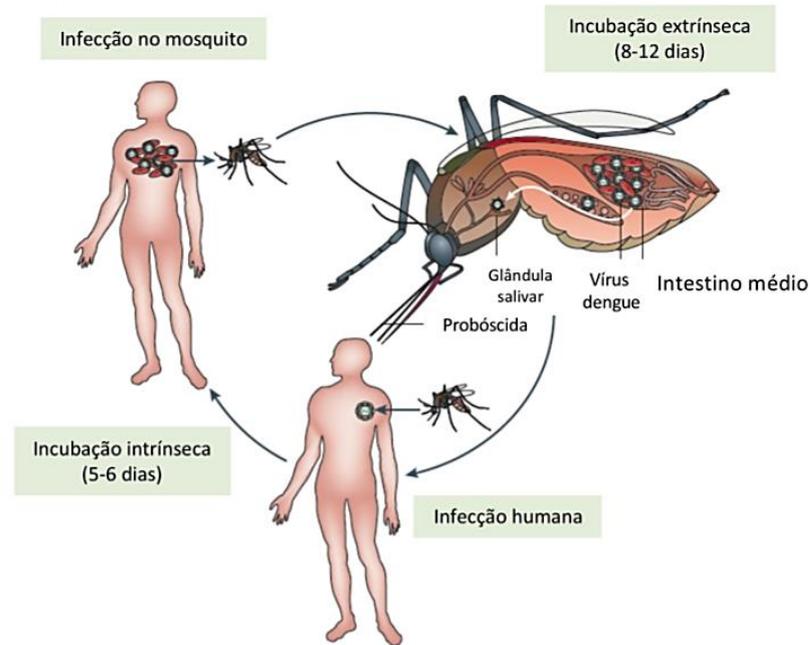
**Figura 3** - Distribuição geográfica global das espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.



Fonte: Adaptado de Silva e Dermody (2017).

O DENV apresenta dois ciclos de transmissão: o silvestre, estudos já comprovaram sua presença na África e Ásia, ocorrendo entre inseto vetor e primatas não humanos, e o ciclo urbano, encontrado nas cidades de países endêmicos, ocorrendo entre vetor e humanos (DEGALLIER et al., 2001). No ciclo urbano, o artrópode, sendo hospedeiro intermediário inicia a transmissão viral no repasto sanguíneo, quando as fêmeas *Aedes* infectadas pelo DENV inoculam o vírus em um hospedeiro humano suscetível. Após a infecção, inicia-se no humano o período de incubação intrínseco, com duração de três a 15 dias, com média de cinco a seis dias. Com o término da incubação, o humano infectado entra em viremia, a qual se estende de um dia antes do aparecimento da febre até o sexto dia da doença. Nesse período, se exposto novamente à fêmea do vetor, essa adquire o vírus, iniciando o período de incubação extrínseco, com duração de oito a 12 dias, compreendendo o tempo entre a ingestão do sangue infectado, pelo mosquito, seguindo para o intestino médio e posteriormente apresentando as partículas virais infecciosas na secreção salivar (Figura 4). Após o período de incubação extrínseco, o mosquito torna-se capaz de transmitir o vírus para um novo hospedeiro, permanecendo infectado durante toda a sua vida continuando o ciclo de transmissão do DENV e transmitindo o vírus, de forma vertical, para sua prole (HARDY et al., 1983; SALAZAR et al., 2007; TABACHNICK, 2013; BRASIL, 2002).

**Figura 4** - Ciclo urbano de transmissão do vírus dengue.



Fonte: Adaptado de Guzman *et al.* (2016).

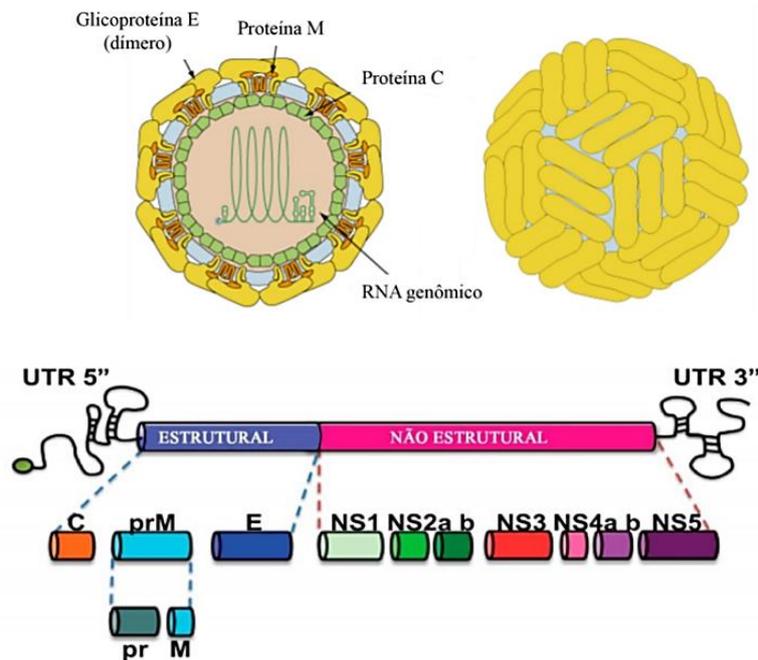
## 2.2 VÍRUS

Os vírus dengue (DENV) são classificados como arbovírus, ou seja, vírus mantidos na natureza através de um ciclo de transmissão envolvendo hospedeiros vertebrados, como primatas não humanos e humanos, e artrópodes hematófagos (GUBLER, 2002; ROUNDY *et al.*, 2017). Os DENV pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, seu vírus de RNA apresenta grande variabilidade genética, devido ao alto grau de mutação associado com a RNA polimerase e às suas rápidas taxas de replicação, devido a isso eles possuem suas propriedades antigênicas distintas, apresentam quatro sorotipos relacionados, mas antígenicamente distintos, denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (CALISHER *et al.*, 1989) e todos podem causar doença grave e fatal em humanos (GUBLER, 2006).

Sua partícula viral é esférica e tem aproximadamente 50 nanômetros (nm) de diâmetro. O vírion (partícula infecciosa) é constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, com aproximadamente 11 quilobases (Kb), sendo envolto por um nucleocapsídeo. O RNA viral trabalha como RNA mensageiro e é traduzido em uma poliproteína única, a partir da maquinaria da célula hospedeira, que adiante é clivada em três proteínas estruturais (capsídeo [C], pré-membrana [prM] e envelope [E]) que posteriormente e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (KUHN *et al.*, 2002; VASILAKIS *et al.*, 2011),

como observado na Figura 5, enquanto as 3 proteínas estruturais então envolvidas na montagem da partícula viral, as 7 proteínas não estruturais apresentam o importante papel na replicação viral, montagem e modulação da resposta imune inata (ZEIDLER et al., 2017).

**Figura 5 - Genoma.**



Fonte: Adaptado de ViralZone (2016) e Angel; Valle (2013).

A primeira proteína estrutural a ser sintetizada é a proteína C, possuindo em torno de 11 kDa e sendo carregada positivamente. Ela forma o componente estrutural do nucleocapsídeo, que consiste na proteína C e RNA genômico, e além de compor o capsídeo, a proteína contém uma região hidrofóbica C-terminal que atua como peptídeo de sinalização para translocação da prM para o retículo endoplasmático (LINDENBACH et al., 2007, 2013; JONES et al., 2003).

Segundo Nogueira et al. (2018), a proteína precursora de membrana (prM), de aproximadamente 22 kDa, sofre uma clivagem proteolítica específica durante a maturação viral, origina a proteína M com cerca de 8 kDa, envolvida na organização da estrutura viral e aumento da infectividade do vírus, a prM também pode atuar como uma chaperona para a formação da proteína E. A proteína do envelope (E) é o maior constituinte da superfície dos DENV, possuindo 53 kDa, é formado por proteínas diméricas que medeiam a ligação e fusão do vírus com a membrana celular do hospedeiro, sendo responsável pelas atividades biológicas do ciclo viral, além de apresentar atividade hemaglutinante é o principal indutor de anticorpos neutralizantes. A proteína E ainda possui 495 aminoácidos (aa), distribuídos em três domínios

(I, II, III). O domínio I, é responsável pela organização estrutural da partícula viral; domínio II está relacionado com a fusão da partícula viral e membrana celulares durante a entrada do vírus, sendo conservada entre todos os flavivírus, e o domínio III, que inclui o C terminal, está exposto na superfície do DENV e contém epitopos de ligação à células. Sendo ele o principal alvo para os anticorpos neutralizantes e intimamente relacionado com a virulência das cepas virais (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006; YACOUB; MONGKOLSAPAYA; SCREATON, 2016).

As proteínas não estruturais (NS) estimulam o processo de replicação do genoma viral dentro da célula hospedeira. A proteína NS1 de aproximadamente 48 kDa, está envolvida na morfogênese da partícula viral (MASON et al., 1987; MUYLAERT et al., 1997). A forma solúvel dessa proteína (sNS1) é formada de partículas lipoproteicas hexaméricas com aproximadamente 10nm, que durante a infecção pelo DENV, a sNS1 pode acumular-se em níveis muito elevados no soro e em tecidos humanos, detectando-se até 50µg/mL em soros de alguns pacientes, com conseqüente produção de anticorpos contra esta proteína, podendo ser utilizada para o diagnóstico da infecção por flavivírus em estágio inicial (ALCON-LEPODER et al., 2006; CHUNG; DIAMOND, 2008; LIBRATY et al., 2002a; YOUNG et al., 2000). Além disso, a NS1 também tem função de evasão da resposta imune do hospedeiro, interagindo com o sistema complemento (AVIRUTNAN et al., 2006), está relacionada com a produção de citocinas inflamatórias e imunossupressoras pela indução de células imunes (ADIKARI et al., 2016; MODHIRAN et al., 2015), além de induzir a hiperpermeabilidade endotelial *in vitro* (BEATTY et al., 2015) e extravasamento vascular *in vivo* (MALAVIGE; OGG, 2017; PUERTA-GUARDO; GLASNER; HARRIS, 2016);LINDENBACH et al., 2013).

A NS2A é uma proteína hidrofóbica, transmembrana, relativamente pequena de aproximadamente 22 kDa. Ela é responsável pela síntese do RNA viral e montagem do virion (XIE et al., 2015) e, possivelmente, antagonista de interferon (JONES et al., 2005). A NS2B também é uma pequena proteína de aproximadamente 14 kDa, está associada à membrana e forma um complexo estável com a NS3 e atua como um cofator para a serina protease NS2B-NS3, que é responsável pela clivagem na junção NS2A/NS2B (LINDENBACH et al., 2013).

A proteína NS3 é conservada entre os flavivírus, sendo uma proteína grande, de aproximadamente 70kD, com dois domínios funcionais, atua como serina protease na região N terminal e helicase na região C terminal, atuando na replicação do RNA e maturação das proteínas virais (LE BRETON et al., 2011; LINDENBACH et al., 2013; HENCHAL; PUTNAK, 1990). Além da clivagem da NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A e NS4B/NS5, a protease da NS3 gera as extremidades C-terminal da proteína C madura e NS4A, podendo decompor a NS2A e NS3 internamente (LINDENBACH et al., 2013).

A NS4A e NS4B são pequenas proteínas hidrofóbicas de aproximadamente 16 kDa e 27 kDa, respectivamente. A NS4A age na replicação do genoma através da interação com a NS1 e complexo de replicação do RNA, induzindo o rearranjo da membrana dentro da célula hospedeira, auxiliando na formação de vesículas de replicação (MILLER et al., 2007). A NS4B por sua vez, é uma proteína que interage com NS3, participando da replicação do genoma, possivelmente no sítio de replicação do RNA (LINDENBACH; RICE, 1999; LINDENBACH et al., 2013).

A NS5 é uma proteína com aproximadamente 103 kDa, e assim como a NS3, é muito conservada entre os flavivírus e multifuncional, com atividade metiltransferase/RaqueaNA capping, e o C-terminal, que apresenta a atividade de RNA polimerase RNA dependente (LE BRETON et al., 2011; LINDENBACH et al., 2013). Junto com a NS3 participa do processo de replicação viral e forma um complexo que pode estimular tanta atividade NTPase e RTPase (LINDENBACH et al., 2013).

As proteínas não estruturais além de participarem da montagem da partícula viral e da replicação do genoma do vírus, atuam também na evasão da resposta imune através inibição da via de indução ou sinalização do interferon (IFN). Em DENV as proteínas NS2A e NS3 podem degradar moléculas de sinalização celular, inibindo a indução de IFN-I. As proteínas virais NS2A, NS4A, NS4B e NS5 podem inibir a via de sinalização IFN-I ao bloquear a fosforilação das moléculas de sinalização e transdução de sinal (CASTILLO; URCUQUIINCHIMA, 2015).

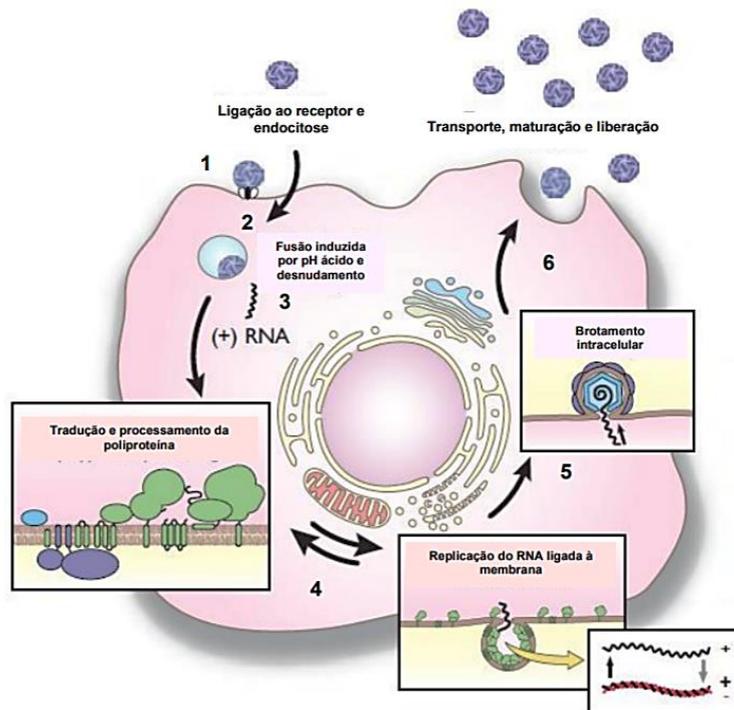
Segundo Nogueira et al. (2018), nas extremidades do genoma viral existem regiões não codificantes identificadas como 5'NC e 3'NC, com cerca 100 e 400 nucleotídeos, respectivamente. Estas regiões apresentam sequências conservadas e estruturas secundárias de RNA que conduz os processos de amplificação genômica, tradução e empacotamento.

### **2.2.1 Ciclo replicativo**

Os DENV, assim como os demais vírus, necessitam obrigatoriamente de uma célula hospedeira para realizarem seu processo de replicação do genoma viral e formação de novas partículas virais. A Figura 6 mostra o ciclo replicativo do DENV envolve as seguintes etapas: adsorção viral (1) onde o vírus se liga a receptores na membrana plasmática; Penetração (2), onde o vírus entra na célula do hospedeiro por meio da endocitose; Desnudamento (3), onde dentro do endossoma, a proteína E sofre uma mudança conformacional para mediar a fusão do envelope viral com a membrana do endossoma; Transcrição/tradução/replicação (4); Montagem do vírus (5), onde as partículas virais imaturas são transportadas através da via

secretória e, um pH mais baixo na rede trans-Golgi ativa a protease hospedeira, a furina, para então produzir partículas maduras; Maturação e liberação da partícula viral (6), após maduras as partículas vão sendo liberadas para o meio extracelular (Adaptado de SIMON; SUTHERLAND; PRYZDIAL, 2015; LINDENBACH et al., 2013).

**Figura 6** - Ciclo de replicação da família *Flaviviridae*.



Fonte: Adaptado de Lindenbach *et al.* (2013).

No ciclo replicativo, ocorre inicialmente a adsorção da partícula viral infecciosa às células hospedeiras por meio da ligação das proteínas do envelope viral (proteína E) à receptores celulares específicos encontrados na superfície celular, a interação ligante-receptor resulta na endocitose viral em vesículas recobertas por clatrina. No endossomo, devido ao baixo pH (potencial hidrogeniônico) ocorre a trimerização irreversível da proteína E, expondo o domínio III que, em seguida, o vírion tem o envelope viral fusionado com as membranas intracelulares, ocorrendo o desnudamento. Assim, o nucleocapsídeo é desencapsulado liberando o RNA genômico no citoplasma (LINDENBACH et al., 2013). A replicação dos DENV ocorre inteiramente no citoplasma das células infectadas, para que o genoma viral seja replicado é necessário a expressão e processamento da poliproteína viral, pois a célula hospedeira não codifica todos os fatores necessários para a replicação dos DENV (WELSCH et al., 2009; ALCARAZ-ESTRADA et al., 2010; MILLER et al., 2010; LINDENBACH et al., 2013).

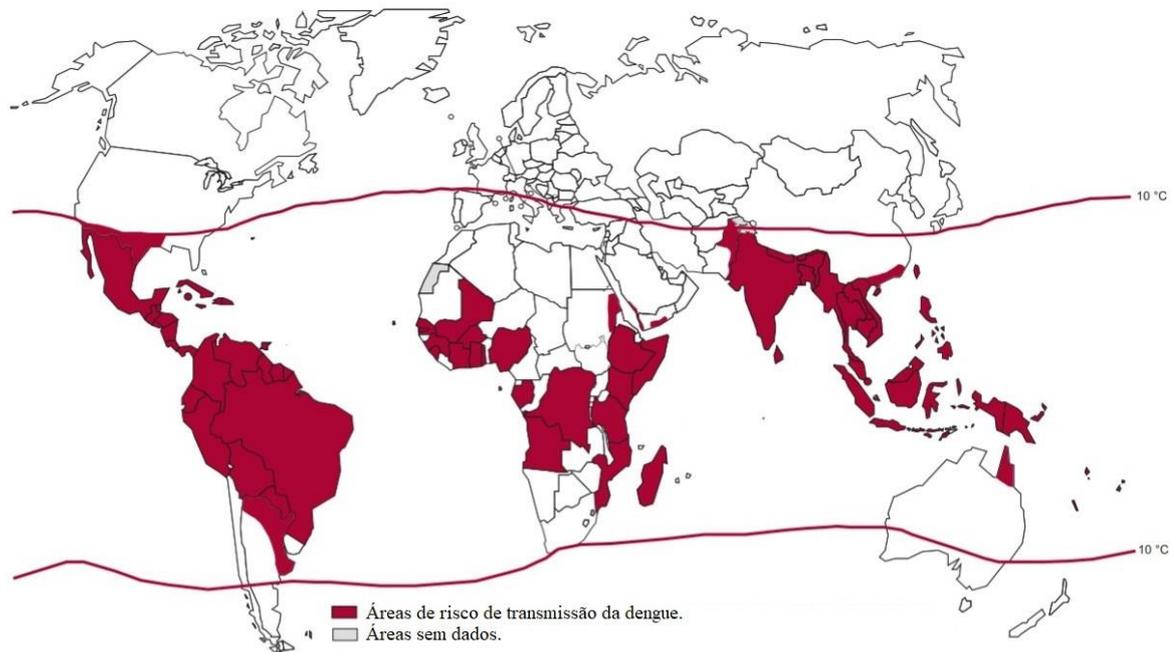
O RNA genômico se associa aos ribossomos e é traduzido no retículo endoplasmático, dando origem a um poliproteína de aproximadamente 3.400 aminoácidos, em seguida o complexo replicativo é montado, durante a replicação viral o RNA(+) serve como molde para a produção da cadeia de RNA(-) sendo utilizado para a geração das novas fitas de RNA(+) (progênie). Além do RNA (+) alguns tipos de RNA precursores do RNA (+) genômico são encontrados dentro da célula infectada, que não será detalhado. O RNA (+) recém-formado pode ser redirecionado à maquinaria de tradução para a síntese de mais proteínas virais ou para a formação das novas partículas víricas, que se formam no retículo endoplasmático. Nesse último caso, para a montagem das novas partículas virais, para formar o nucleocapsídeo, o RNA viral é empacotado pelas proteínas C. Quando as proteínas E e prM encontram o nucleocapsídeo, o vírus imaturo é formado. As proteínas prM e E formam heterodímeros e migram para dentro do lúmen do retículo endoplasmático. A partícula imatura migra pela rede trans-Golgi, que por possuir um pH entre 5,8-6,0, provoca a dissociação das proteínas prM/E e clivagem via protease celular (furina), gerando assim um vírus maduro, que é liberado no ambiente extracelular através da via secretora (ACOSTA; KUMAR; BARTENSCHLAGER, 2014; SIMON; SUTHERLAND; PRYZDIAL, 2015; STADLER et al., 1997; YU et al., 2008).

## 2.3 EPIDEMIOLOGIA

### 2.3.1 Dengue no mundo

A dengue é uma das principais arboviroses humana, sendo a doença viral transmitida por mosquito que se espalha mais rápido no mundo, causando um dos principais problemas de saúde pública, com relevante impacto social e econômico (GUZMAN; HARRIS, 2015). Com o aumento da expansão geográfica para novos países, levou ao aumento das áreas de risco de transmissão (Figura 7), elevando a incidência do vírus 30 vezes nos últimos 50 anos. O surgimento e disseminação dos quatro sorotipos na África, Américas, Sudeste da Ásia e Mediterrâneo Oriental representa uma ameaça de pandemia (WHO, 2013).

**Figura 7 - Distribuição de países ou áreas de risco de transmissão da dengue no mundo – 2011.**



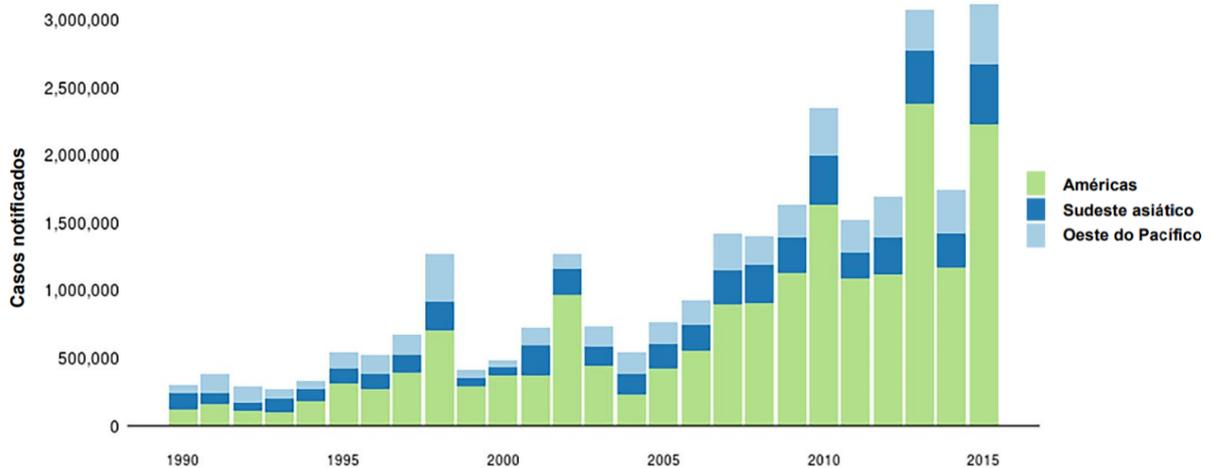
Fonte: WHO (2013).

A dengue é difundida em todos os trópicos, com fatores de risco influenciados por variações espaciais locais de precipitação, temperatura, umidade relativa, grau de urbanização e qualidade dos serviços de controle de vetores em áreas urbanas. Antes de 1970, apenas nove países haviam sofrido epidemias graves de dengue. Hoje, a doença é endêmica em mais de 100 países nas regiões da África, Américas, Mediterrâneo Oriental, Sudeste da Ásia e Pacífico Ocidental, as regiões das Américas, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental são as mais seriamente afetadas (WHO, 2016).

O número real de casos de dengue é subnotificado e muitos casos são classificados erroneamente, devido a maneira como os diagnósticos são fechados, exames laboratoriais não são obrigatórios para determinar se uma pessoa está com dengue ou não, muitas vezes só é levado em conta os aspectos clínicos do paciente, além disso os sintomas da dengue são confundidos muitas vezes com os de Zika e Chikungunya. Segundo a última estimativa global estima-se que 390 milhões de pessoas Infecções por vírus da dengue com 96 milhões de casos com manifestações clínicas grave anualmente em todo o mundo (BHATT et al., 2013). Estima que mais de 20.000 mortes relacionadas à dengue ocorrem anualmente em todo o mundo (WHO, 2012).

Após o ano de 2009 até 2015 o total de casos de dengue registrado pela OMS, provenientes das Américas, Sudeste Asiático e Oeste do Pacífico, se mantiveram acima de 1 milhão de casos. Em 2015, o número total de casos de dengue suspeitos ou confirmados por laboratório notificados à OMS para as regiões das Américas, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental excedeu três milhões, sendo o continente americano responsável pelo maior número de casos em todos os anos, como mostrado na Figura 8.

**Figura 8** - Número de casos de dengue (suspeitos ou confirmados) notificados à OMS desde 1990 até 2015.



Fonte: OMS (2018).

### 2.3.2 Dengue no Brasil

A referência mais antiga à dengue no Brasil foi feita durante o período colonial, no século XVIII, o vetor veio provavelmente nas embarcações que transportavam escravos, já que os ovos do mosquito podem resistir, sem estar em contato com a água, por até um ano. Há referências de epidemias de dengue em 1916, em São Paulo, e em 1923, em Niterói, ambas sem diagnóstico laboratorial. Em 1955, se iniciou uma grande campanha realizada pela Organização Pan-Americana de Saúde levando a erradicação o *Ae. aegypti* em 1958 no Brasil e em diversos outros países americanos (Brasil, 2010).

Embora o *Ae. aegypti* tenha sido erradicado em 1958 (MAGALHÃES, 2016), o vetor foi reintroduzido no país, resultando em 1981. Na descrição de um novo surto de dengue no Brasil na cidade de Boa Vista, Roraima, onde as primeiras amostras de DENV-1 e DENV-4 foram isoladas e um total de sete mil casos da doença foram notificados, após esse surto, o

sorotipo DENV-4 parou de circular (OSANAI et al., 1983). Em 1986, no estado do Rio de Janeiro em Nova Iguaçu, região metropolitana se teve a detecção DENV-1, após isso o número de casos de dengue cresceu de modo significativo no Brasil, devido à grande circulação de pessoas nesta região facilitando a rápida dispersão do vírus causando uma epidemia explosiva, com 92 mil casos reportados durante os anos de 1986-1987 (SCHATZMAYR et al., 1986; DIETZ et al., 1990; FIGUEIREDO, 1996; NOGUEIRA et al., 1999; NOGUEIRA et al., 2002).

Após emergir no Rio de Janeiro, o DENV-1 passou a se disseminar com surpreendente força de transmissão atingindo vários estados da região nordeste, todos com infestação elevada do vetor, em especial Alagoas, Pernambuco e Ceará (SCHATZMAYR; CABRAL, 2012). Após a entrada do DENV1 em 1986 no Rio de Janeiro, com a infecção de mais de um milhão de pessoas (FIGUEIREDO et al, 1991), sendo o DENV-1 o único sorotipo circulante no país até 1990, quando o DENV-2 foi introduzido em Niterói, na Região Metropolitana do Rio de Janeiro com os primeiros casos relatados de dengue hemorrágica. A partir de 1994, a circulação do vírus expandiu-se para mais de 600 municípios distribuídos em 18 estados do Brasil, com um aumento da incidência da doença na população país. (TEIXEIRA et al., 2005;).

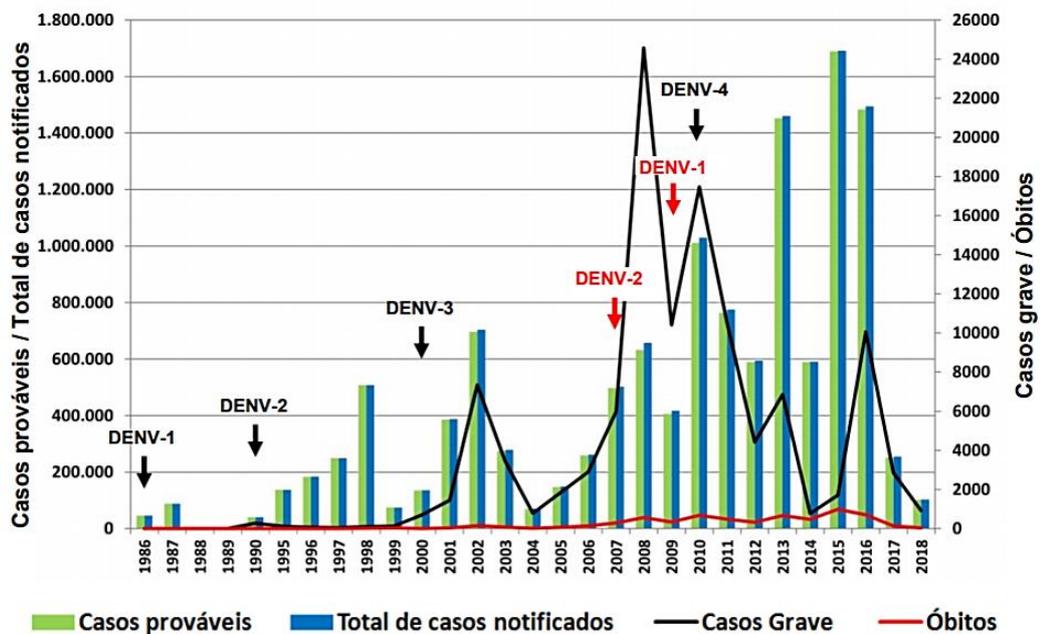
No final do ano 2000, houve a detecção de um novo sorotipo (DENV-3) no município de Nova Iguaçu, estado do Rio de Janeiro (NOGUEIRA et al., 2000), resultando em 2001 na cocirculação dos três sorotipos (DENV-1, DENV-2 e DENV-3), e na maior e, até então, a mais grave epidemia do país, no ano de 2002 com cerca de 446,2 casos por 100 mil habitantes (DE SIMONE et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2005). O sorotipo DENV-3 se espalhou rapidamente para a maioria do território brasileiro, praticamente deslocando os sorotipos DENV-1 e DENV-2 de várias cidades e estados do país nos anos subsequentes (TEIXEIRA et al., 2005). Até o ano de 2007 o sorotipo predominante no estado do Rio de Janeiro era o DENV-3, porém o DENV-2 ressurgiu em 2007 ocasionando uma extensa epidemia no ano de 2008, com 632.680 casos notificados, um total de 24.571 casos graves e 561 óbitos no Brasil (DOS SANTOS et al., 2013).

Em 2010, aproximadamente 29 anos após a primeira detecção deste sorotipo no país ocorrida em Boa Vista (RR) em 1982, o DENV-4 reemergiu no estado de Roraima (RR), com menos de 20 casos de DENV-4 confirmados ao longo do segundo semestre de 2010, e os primeiros casos decorrentes da dispersão do vírus foram detectados somente a partir de 2011 no Amazonas e Pará (Região Norte), seguida por uma rápida dispersão para diversos estados da Região Nordeste e Sudeste. Em 2014, o número elevado de notificações com mais 1.4 milhões de casos registrados, com predominância do DENV-4, que correspondendo em torno de 60% dos casos confirmados laboratorialmente. Em 2015 o DENV-4 ficou em segundo lugar,

como sorotipo viral existente da dengue, perdendo apenas para sorotipo DENV-1 (BRASIL, 2016).

Nos últimos anos, extensas epidemias de dengue ocorreram no Brasil, caracterizadas por emergências e re-emergências dos diferentes sorotipos, gerando mudança no perfil epidemiológico e aumento no número de casos graves e fatais (Figura 9). A introdução consecutiva e a cocirculação dos quatro sorotipos resultaram em um cenário hiperendêmico. A doença vem se consolidando como um dos maiores desafios de saúde pública no país apresentando alterações em diferentes portes populacionais acometendo pessoas de diferentes idades principalmente crianças e idosos.

**Figura 9** - Número de casos de dengue no Brasil, 1986-2018.



Fonte: Nogueira *et al.* (2018).

Este ano, até a 26ª Semana Epidemiológica (SE) -30/12/2018 a 30/06/2019- foram registrados 1.281.759 casos prováveis de dengue no Brasil. Quando se compara ao mesmo período de 2018, em que foram registrados 183.829 casos prováveis de dengue, registra-se um aumento de 597,3% do número de casos prováveis, representando uma incidência de 614,8 casos a cada 100 mil habitantes no Brasil. Na Paraíba, esses dados representam 9.104 casos prováveis de dengue, com incidência de 227,8 casos a cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2019).

## 2.4 FORMAS CLÍNICAS

A dengue tem um amplo espectro de apresentações clínicas, muitas vezes com imprevisibilidade clínica evolução e resultado. Enquanto a maioria dos pacientes se recupera após uma doença não severa curso clínico, onde as manifestações clínicas incluem febre, normalmente de início súbito (podendo alcançar 40°C, persistindo em média por 2 a 7 dias), seguida de cefaleia, dor retroorbital, mialgia, artralgia, náuseas, vômitos, prurido cutâneo, exantema e/ou prostração. A doença tem duração de 5 a 7 dias, mas o período de convalescência pode ser acompanhado de grande debilidade física, e prolongar-se por várias semanas (SOUZA et al., 2008; BRASIL, 2010).

Uma pequena proporção dos pacientes progride para doença grave, com manifestações clínicas caracterizada principalmente por extravasamento de plasma com ou sem hemorragia, podendo levar ao choque hipovolêmico. Outras manifestações hemorrágicas incluem petéquias, equimoses, epistaxe, gengivorragia, hemorragia em diversos órgãos (gastrointestinais, intracraniana, dentre outras) e hemorragia espontânea pelos locais de punção venosa. Nos casos graves, o choque geralmente ocorre entre o 3º e 7º dia de doença, geralmente precedido por dor abdominal. O choque é decorrente do aumento da permeabilidade vascular, seguida de extravasamento plasmático (evidenciado por hemoconcentração, derrames cavitários e hipoalbuminemia) e falência respiratória. É de curta duração podendo levar ao óbito em 12 a 24 horas ou à recuperação rápida após terapia antichoque apropriada (BRASIL, 2010).

O grupo que progride de doença não grave para doença grave é difícil de definir, mas essa é uma preocupação importante, pois o tratamento adequado pode impedir que esses pacientes desenvolvam condições clínicas mais severas. Triagem, tratamento adequado e decisão sobre onde este tratamento deve ser administrado são influenciados pela classificação dengue, os serviços de saúde precisam ser adaptados para mudanças na epidemiologia da dengue (WHO, 2009). Neste cenário, em 2009 a OMS recomendou uma nova forma de classificação dos casos de dengue (Figura 10) onde seria possível definir os casos de dengue como: dengue sem sinais de alerta (DSSA), dengue com sinais de alerta (DCSA) e dengue grave (DG). Tal proposta foi desenvolvida a partir de um estudo prospectivo multicêntrico em várias regiões endêmicas da doença, utilizando critérios de gravidade (OMS, 2009; BRASIL, 2002;) O Brasil adotou essa nova classificação, à partir de Janeiro de 2014 (Brasil, 2016).

**Figura 10** - Classificação dos casos de dengue.



Fonte: WHO (2009).

Os quatro sorotipos podem causar um espectro clínico variável, entretanto, um estudo realizado por Halsey et al, (2012) fez uma avaliação abrangente das manifestações clínicas nos quatro sorotipos de DENV nas Américas, e foi observado diferenças clínicas dentro dos sorotipos. O sorotipo DENV-3 apresentou maior prevalência de manifestações musculoesqueléticas e gastrointestinais, enquanto no sorotipo DENV-4, as manifestações respiratórias e cutâneas foram mais prevalentes. Essa variabilidade e inespecificidade de sinais e sintomas são ainda mais evidentes em crianças. Grupos de especialistas sugerem que dengue é uma mesma doença com diferentes apresentações clínicas e que os pacientes infectados têm uma gradação que varia desde assintomáticos até as formas graves (HADINEGORO, 2012).

## 2.5 TÉCNICAS VIROLÓGICAS

Segundo Santos et al, (2015) o diagnóstico da dengue depende de fatores clínicos e possível exposição ao vírus, como é o caso de pessoas residentes em áreas endêmicas ou que para lá viajam. Neste caso, o diagnóstico deve ser confirmado pois as manifestações clínicas da dengue são semelhantes às de outras doenças, como aquelas causadas por outros arbovírus como, por exemplo, chikungunya, Zika, Sindbis, Mayaro, Ross River, entre outros.

O diagnóstico laboratorial de DENV é realizado com base em 4 parâmetros:

- Isolamento e identificação do vírus;
- Sorologia para detecção de antígenos e/ou anticorpos;
- Detecção direta da partícula viral;
- Amplificação de ácidos nucleicos virais.

Para o isolamento e a identificação do vírus dengue, é utilizado sistemas vivos nos quais os vírus são propagados. Sendo o material de escolha para o isolamento o sangue, soro ou plasma, colhido nos primeiros 3 a 5 dias da doença. A inoculação pode ser feita via injeção intratorácica em mosquitos, inoculação no cérebro de camundongos ou em culturas de células de mosquito, geralmente são utilizadas culturas celulares de *Aedes albopictus*, linhagem C6/36, seguida da identificação por imunofluorescência ou imunoperoxidase empregando anticorpos monoclonais tipo-específicos. As culturas celulares são utilizadas com fim de amplificar a quantidade de vírus, O isolamento viral quando comparado a outros métodos de diagnóstico apresenta algumas vantagens como a fácil detecção e identificação viral e a possível a produção de partículas infecciosas que após serem caracterizadas podem ser estocadas para estudos futuros.

A sorologia utiliza métodos para detecção de antígenos virais e/ou anticorpos específicos, produzidos pelo hospedeiro em resposta à infecção viral. A sorologia de DENV produz resultados bem definidos quando realizada em pacientes expostos pela primeira vez a um flavivírus. No entanto, quando a pessoa foi exposta anteriormente a outro flavivírus, a reação é rápida e intensa em função da memória imunológica prévia, pois os anticorpos heterólogos podem ser iguais ou mais elevados que os anticorpos específicos, dificultando a interpretação das reações sorológicas. São realizadas sorologia pareada empregando TN (teste de neutralização), HI (inibição da hemoaglutinação) ou FC (fixação de complemento), assim como a pesquisa de anticorpos específicos da classe IgM por Imunofluorescência ou imunoenensaio enzimático. A sorologia e utilizada geralmente para confirmar a suspeita clínica, diagnosticando laboratorialmente.

A detecção direta da partícula viral (antígeno), o antígeno deralmente procurado é a proteína NS1 por ser altamente conservado entre os quatro sorotipos. Essa proteína pode ser detectada no soro dos pacientes por meio de imunoensaio, porém quando a infecção é secundária esse método perde a sensibilidade, devido à interferência dos anticorpos heterólogos, sendo necessária a utilização de outra forma de diagnóstico.

Vários métodos imunológicos de diagnóstico podem ser empregados para a detecção da partícula viral ou do ácido nucleico viral, os métodos mais utilizados são o de

imunofluorescência, imunoperoxidase, ensaio imunoenzimático (ELISA) e métodos moleculares como a PCR. A técnica de imunofluorescência (IF) utiliza anticorpos marcados com corantes fluorescentes para revelar a formação de um imunocomplexo vírus-anticorpo. Os anticorpos marcados são chamados de conjugados. O teste da reação de imunoperoxidase, envolve o uso de anticorpos conjugados com a enzima peroxidase, esta técnica requer uma etapa adicional, que consiste na adição de um substrato. Nas áreas em que o conjugado se liga ao imunocomplexo, ocorrerá mudança de coloração devido à ação da enzima peroxidase no substrato.

Já o teste de reação imunoenzimática (EIA ou ELISA) envolve anticorpos conjugados com enzimas. O sistema envolve a detecção do imunocomplexo fixo em um suporte, usando para isso um anticorpo conjugado a uma enzima. O resultado do teste é determinado pela observação ou medida espectrofotométrica da coloração produzida pela reação da enzima sobre o substrato. O teste envolve as seguintes etapas: formação do imunocomplexo (antígeno-anticorpo); adição do conjugado (anticorpo-enzima); e revelação (adição do substrato-reação colorida).

Já a amplificação de ácidos nucleicos virais, é feita a detecção do ácido nucleico viral de DENV utilizando a reação em cadeia da polimerase associada à reação de transcrição reversa (RT-PCR) podendo ser convencional ou em tempo real, esse método pode ser aplicado para o diagnóstico rápido da infecção.

Para quantificação viral, onde é realizada a titulação viral por PFU em placas existem duas técnicas que são amplamente utilizadas, uma delas empregando a reação de imunoperoxidase já descrita anteriormente, a outra empregando o uso do corante cristal violeta para revelação dos focos. O corante cristal violeta também é utilizado para determinar a viabilidade celular devido a sua habilidade de ligação ao DNA, desta forma as células que foram infectadas pelo vírus não estando mais viáveis, quando entram em contato com o corante cristal violeta elas não adquirem a coloração violeta, podendo desta forma contar os focos nas placas, esse método é um método mais simples em termos de etapas e mais barato quando comparado a o empregando a reação de imunoperoxidase.

## 2.6 TRATAMENTO E VACINA

Até o momento não há tratamento específico licenciado para controlar a replicação do DENV, conseqüentemente, a estratégia terapêutica usada é de suporte e sintomática, dessa forma o tratamento recebido pelos pacientes e inclui repouso, hidratação, antitérmicos e analgésicos e em casos mais graves deve ser ministrada a reposição de fluidos e eletrólitos para correção de fluidos perdidos e acidose (OMS, 2009). Fármacos como paracetamol e anti-inflamatórios não esteroides são indicados para alívio do quadro febril e dores decorrentes da artralgia, assim aliviando o desconforto, reduzindo a morbidade do processo patológico e prevenindo convulsões febris. É importante que medicamentos que atuem secundariamente nas plaquetas ou nos mecanismos de coagulação, como aspirina devem ser evitados, pois esses fármacos podem gerar complicações hemorrágicas, pois causam uma maior redução no número de plaquetas. (TIMERMAN et al. 2012).

Desde a década de 40 inúmeros estudos e esforços foram desenvolvidos para produção de uma vacina anti-DENV, então em 2015, a primeira vacina contra DENV, fabricada pela Sanofi Pasteur (Lyon, França), a CYD-TVD (ChimeriVax-Dengue) conhecida como Dengvaxia®, foi aprovada e licenciada em diversos países endêmicos. A Dengvaxia é baseada na cepa atenuada do vírus da febre amarela que está em uso desde 1930, onde as proteínas do envelope de cada um dos 4 sorotipos da dengue foram expressas pelo vírus da febre amarela do qual os genes das proteínas do envelope da febre amarela foram excluídos, formando assim quatro quimeras virais (GUY; JACKSON, 2016). Essa estratégia foi bastante bem-sucedida, para produção de uma vacina quadrivalente, porém a diferença entre a dengue e os outros flavivírus é a relação imunológica entre os sorotipos individuais. Assim, uma infecção primária por um dos sorotipos causa uma doença febril, mas geralmente não é acompanhada de manifestações graves, como hemorragias. Porém uma segunda infecção por outro sorotipo pode resultar em uma doença hemorrágica grave e até fatal. A razão é que o anticorpo homotípico da primeira infecção é acompanhado por algum grau de anticorpo heterotípico para a segunda infecção, que em vez de neutralizar a entrada do vírus nos macrófagos, na verdade aumenta sua entrada (KATZELNICK et al., 2017).

Segundo Plotkin, (2019) como as reações à vacina foram mínimas nas populações testadas, parecia seguro dar a populações nas quais a dengue era comum e nas quais os idosos já haviam sido infectados. As observações sobre eficácia foram realizadas durante um período de 4 anos após a vacinação, e a eficácia foi mantida em indivíduos mais velhos, porém em crianças menores de 5 anos, após 3 a 4 anos após a vacinação a eficácia desapareceu e o risco

de infecção por dengue aumentou quando comparado as crianças que receberam o placebo, mas como em crianças maiores de 9 anos não apresentaram risco, a Organização Mundial da Saúde (OMS) concluiu em 2016 que o Dengvaxia® era seguro para crianças a partir dos 9 anos.

Então em abril de 2016, o governo das Filipinas lançou um programa de imunização de Dengvaxia® baseado em escolas públicas, com gasto de US \$ 67 milhões, devido a alta prevalência de dengue nas Filipinas, porém em novembro de 2017, a Sanofi Pasteur™ anunciou que a vacina poderia de fato exacerbar os casos de dengue em crianças nunca infectadas anteriormente, então as Filipinas interromperam a campanha imediatamente porém cerca de 830.000 crianças em idade escolar que já haviam recebido uma ou mais doses de Dengvaxia®, deixando os pais assustados. Então em setembro de 2018, repórteres anunciaram que 130 crianças vacinadas haviam morrido e que 19 delas já tinham tido dengue, o caso provocou "histeria em massa" (ARKIN, 2019)

Assim, uma primeira infecção raramente é fatal, mas uma segunda com um tipo diferente de vírus pode levar a doenças muito mais graves, devido ao chamado infectividade viral dependente de anticorpos (ADE), em que a resposta imune ao primeiro vírus amplifica o efeito do segundo tipo. Mesmo a Sanofi Pasteur™ tendo grande esforço para produzir uma vacina que protegesse contra a infecção pela dengue, o sucesso foi parcial. Hoje a Dengvaxia® deve ser administrada apenas em indivíduos de 9 aos 45 anos com histórico de infecção prévia pelo vírus dengue.

No Brasil, os estudos de fases II e III demonstraram um aumento de casos de dengue grave e hospitalização nos indivíduos previamente expostos ao DENV, então em 28/11/2017, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) recomendou que a vacina Dengvaxia® não seja administrada em indivíduos sem exposição prévia ao DENV e que novos estudos sejam realizados (ANVISA, 2017). Em setembro de 2018, a ANVISA atualizou a bula de Dengvaxia® reconhecendo o benefício da vacina em indivíduos com história de infecção prévia por dengue e permitindo que a vacina seja direcionada para este grupo, que está sob risco de uma nova infecção pela doença, podendo ser potencialmente mais grave. Abordando a Dengvaxia® como única vacina aprovada no mundo que demonstrou segurança e eficácia em cerca de 80% na redução de hospitalizações e na redução de casos graves ao longo dos 6 anos de acompanhamento na prevenção dos sorotipos da dengue (com exceção do DENV-2, que a vacina não induziu proteção) em indivíduos com infecção prévia por dengue.

Devido as dificuldades do Dengvaxia® em imunizar indivíduos sem histórico de infecção, e por não induzir uma imunidade equilibrada contra todos os quatro sorotipos de DENV, assim a busca por uma vacina melhor contra a dengue ainda continuou. Desta forma,

foram desenvolvidos outros candidatos à vacina contra a dengue, sendo um deles pelos Instituto Nacional de Saúde dos EUA (NIH) e Instituto Butantan (SP/Brasil). A vacina NIH/Butantan é baseada na mutagênese dirigida, induzindo atenuação sem perder imunogenicidade. Ela contém duas formulações, TV003 e TV005, consistem em DENV-1, cepas 3 e 4 que foram atenuadas pela exclusão de 30 aminoácidos na 3ª região não traduzida e um DENV-2 quimérico produzido substituição dos genes das proteínas prM e E do DENV-4 atenuado, pelos do DENV-2 (GALULA et al., 2019).

Em um pequeno ensaio clínico do NIH / Vacina contra a dengue Butantan LATV, uma dose única com TV003 entre aqueles com exposição prévia a YFV ou DENV foi associado a um anticorpo neutralizante significativamente mais alto, títulos para DENV-2 a -4, particularmente DENV-2, mas não para DENV-1, quando comparada a população não infectada pelos sorotipos de DENV. Uma fase 2 em Taiwan e fase 3 estão em andamento no Brasil pelo Butantan. O mais recente estudo da TV005 entre 50 e 70 anos adultos demonstraram que a vacina é bem tolerada e altamente imunogênico na população idosa. A vacina já foi licenciada por vários fabricantes e os resultados preliminares de eficácia são esperados no final deste ano de 2019 (PROMPETCHARA et al., 2019). Com a ocorrência de casos graves da doença é indiscutível a necessidade do desenvolvimento de modalidades terapêuticas eficazes frente às infecções por DENV e, neste contexto, diferentes classes de fármacos-candidatos têm sido aplicadas na última década (BOTTA et al., 2018), porém ainda não existe nenhuma terapêutica antiviral específica eficiente contra a dengue. Assim são propostas vias alternativas de combate ao vetor e o desenvolvimento de fármacos antivirais específicos que possam controlar com alta eficiência a replicação viral em humanos e/ou infecção celular no vetor são desejados para erradicar as infecções causadas por estes vírus. Assim, diversas moléculas orgânicas oriundas de extratos vegetais têm sido estudadas com esses objetivos (GONZALEZ et al., 2009; LEARDKAMOLKARN et al., 2011; MAZZUCCO et al., 2015; CHAVES et al., 2015).

Diante da problemática da segurança e eficácia da vacina Dengvaxia® em indivíduos sem histórico de infecção prévia por dengue, principalmente crianças e ausência de fármacos antivirais, foram desenvolvidas várias estratégias preventivas sob a forma de controle vetores, englobando a vigilância, programas comunitários e a eliminação de possíveis fontes de criadouro (DEROECK et al., 2003; RATHER et al., 2017). Porém para que se tenha em prática as medidas de eliminação dos criadouros de mosquitos nas comunidades, requer o conhecimento e educação da população, com isso programas de controle voltados para comunidade são desenvolvidos. Além disso com foco na eliminação do mosquito, se tem

utilizado cada vez mais de inseticidas químicos, o vetor vem desenvolvendo resistência a esses inseticidas não sendo uma maneira eficaz de eliminação do vetor (VU et al., 2005).

## 2.7 *Schinopsis brasiliensis* ENGLER

Segundo o relatório da Organização Mundial da Saúde, cerca de 80% dos população mundial depende de plantas medicinais para satisfazer seus requisitos de saúde (EKOR, 2014). O Brasil representa a nação com a maior diversidade de espécies vegetais no mundo tendo aproximadamente 46.546 espécies atualmente conhecidas no país (FLORA DO BRASIL, 2017). E o interesse pelos extratos medicinais e a busca pela produção de fitoterápicos capazes de promover o controle biológico e patológico está aumentando gradualmente nos últimos anos. Dentro desse contexto, os extratos vegetais podem ser hidroetanólico, metanólico e hidrometanólico e submetidos ao processo de extração por percolação, turbólise, arraste de vapor, rotaevaporação, nebulização, entre outros. Dentre esses métodos o extrato rotaevaporado vem ganhando destaque, ele é concentrado pela retirada do solvente em forma de vapor pela agitação e aquecimento em banho-maria e a vantagem desse método é que os extratos podem ser concentrados e os solventes recuperados em temperatura e pressão mais baixa (CELOTO, 2005; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; SANTOS, 2013).

No Brasil, o Ministério da Saúde em 2006 apresentou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde. Esta política atende à necessidade de se apoiar, conhecer, incorporar e implementar experiências que já vem sendo desenvolvidas na rede pública de diversos municípios, dentre as quais, a fitoterapia, mostrando assim a valorização de se utilizar plantas medicinais na saúde (BRASIL, 2006). Neste contexto, merece destaque a planta medicinal *Schinopsis brasiliensis* Engl. sendo uma árvore da família *Anacardiaceae*, de comportamento decíduo, podendo atingir até 15m de altura. Sua casca externa é cinzenta, quase negra, áspera com espessura de até 30 mm (Figura 11).

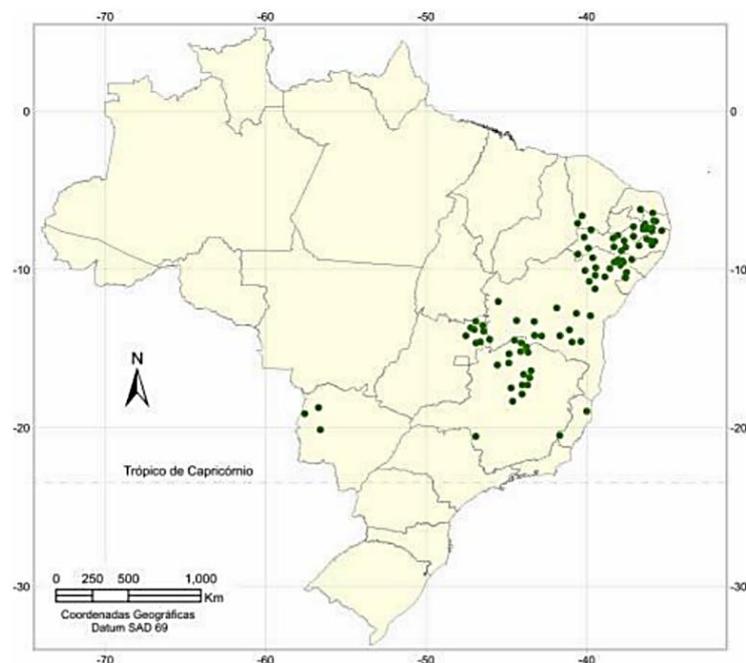
**Figura 11** – Árvore de *Schinopsis brasiliensis* Engl.



Fonte: Carvalho (2009).

A *Schinopsis brasiliensis* Engl, é encontrada no Brasil desde a latitude 5° S no Ceará e Rio Grande do Norte, até 20° S em Mato Grosso e Minas Gerais, de acordo com os dados demonstrados na Figura 12 (CARVALHO, 2009).

**Figura 12** - Identificação dos locais de ocorrência natural de *Schinopsis brasiliensis* Engl, no Brasil.



Fonte: Carvalho (2009).

A *S. brasiliensis* é popularmente conhecida como braúna, quebracho ou chamacoco. É disseminada popularmente entre as comunidades da região da Caatinga no Brasil, sendo utilizada para formular misturas para o tratamento da gripe, diarreia e inflamações gerais (ALBUQUERQUE et al., 2005, 2007, 2011; ALBUQUERQUE et al., 2005; DE ALBUQUERQUE et al., 2007; CHAVES et al., 2015). Estudos científicos descrevem e comprovam que *Schinopsis brasiliensis* é uma das plantas medicinais que apresenta eficácia demonstrada contra o *Staphylococcus aureus* multirresistente, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* (CHAVES et al., 2011; SILVA et al., 2012; SARAIVA et al., 2013; JOVITO, 2016). Além disso, o extrato de *S. brasiliensis* também apresentou atividade antifúngica frente ao gênero *Candida* (JOVITO, 2016). A *S. brasiliensis* também é utilizada como analgésico pelos índios kariri-xocó e xocó, sendo sua casca triturada e cozida é usada para aliviar dores de dente, e o chá da casca é usado no combate à dor de ouvido (CARVALHO, 2009).

Atualmente, se tem centenas de medicamentos modernos à base de compostos ativos isolados das plantas. As plantas têm a capacidade de produzir uma ampla gama de compostos, os compostos primários em geral são responsáveis pelas principais funções do crescimento e desenvolvimento das plantas. Os flavonóides sendo uma classe de polifenóis, compreende o maior grupo de metabólitos secundários encontrados em vegetais, frutas, sementes, nozes, especiarias, caules, bem como em vinho tinto e chá. Esses compostos são sintetizados em resposta a várias condições de estresse abiótico, como a radiação ultravioleta, e desempenham um papel importante como agentes de defesa contra patógenos e insetos das plantas (ZAKARYAN et al., 2017).

A diversidade estrutural dos flavonoides pode ser atribuída ao nível de oxidação e às variações no esqueleto carbônico básico, promovidas por reações de alquilação, glicosilação ou oligomerização. Os flavonoides podem ser encontrados de diversas formas, o que leva a diferenciação em subclasses distintas são as modificações que ocorrem no anel central dessas substâncias, tais subclasses são: chalconas, flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavan-3-ols e antocianidinas. Diversas atividades biológicas são atribuídas a essa classe de polifenóis, tais como atividade antitumoral, antioxidante, anti-inflamatória e antiviral, trazendo importância farmacológica para esses compostos (COUTINHO et al., 2009).

As atividades relatadas podem estar relacionadas com a presença de alguns fitoconstituintes na planta. Cardoso et al (2005) elucidaram a estrutura de um novo fenol alquil, isolado na fração hexânica do extrato metanólico da casca de *S. brasiliensis*, além de evidenciar a presença de derivados esteroides de ergosterol. A caracterização fitoquímica do óleo essencial

das folhas desta planta mostrou uma forte presença de mirceno, um monoterpene com atividade antioxidante (DONATI et al, 2014). Já Santos et al (2014) realizaram a triagem fitoquímica do extrato hidroalcolico da casca da *S.brasiliensis*, sendo possível detectar qualitativamente alguns fitocompostos. Quando feito a partição do extrato hidroalcolico, submetendo em alguns solventes para extração liquido-liquido, se obteve na fração hidrometanol (HMF) flavanonas, flavanonóis, flavonóis, taninos e xantonas, bem como a ausência de toxicidade; Já na fração acetato de etila (EAF), foi encontrado auronas, catequinas, chalconas, flavanonas, saponinas e taninos, na fração de hexano (HxF) apresentou apenas triterpenos enquanto na fração clorofórmio (ChlF) apenas esteróides. Souza et al, (2015) quantificaram taninos, flavonoides e polifenóis presentes nos extratos da casca de *S. brasiliensis* e concluíram que em todas as amostras testadas, há uma predominância de polifenóis totais.

Assim, os extratos rotaevaporado da *Schinopsis brasiliensis* Engl. vem desempenhando efeitos antibacteriano e antifúngico (CHAVES et al., 2011; SARAIVA et al., 2013; JOVITO, 2016). O extrato hidroalcoólico da casca *Schinopsis brasiliensis* Engl. utilizado neste trabalho, apresenta grande quantidade de polifenóis totais e flavonoides. Assim, o presente trabalho teve por objetivo investigar a atividade antiviral do extrato rotaevaporado da casca de *Schinopsis brasiliensis* Engl. na replicação *in vitro* do vírus dengue.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a atividade antiviral *in vitro* dos extratos rotaevaporado da casca de *Schinopsis brasiliensis* Engl. em células infectadas com o vírus dengue.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a atividade antiviral do extrato rotaevaporado da casca de *S. brasiliensis* Engl. na replicação do vírus dengue em células de *Aedes albopictus* linhagem C6/36.
- Avaliar a citotoxicidade do extrato rotaevaporado da casca de *S. brasiliensis* Engl. em células Vero e em células de *Aedes albopictus*, linhagem C6/36.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CULTURA DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS (VERO)

Linhagem de células Vero foram cultivadas em meio MEM – Modified Eagle's Medium - (Gibco) suplementado com 10% de SFB (Gibco), L-Glutamina 2mM (Gibco) e penicilina/estreptomicina/anfotericinaB 100U/mL (Gibco), incubadas na estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Estoques de células foram mantidos a -80°C até sua utilização para cultura.

### 4.2 CULTIVO DE CÉLULAS DE INSETOS (C6/36)

Células de *Aedes albopictus* linhagem C6/36 foram mantidas em meio de cultura Leibovitz 15 - L-15 - (Sigma) suplementado com 5% soro bovino fetal –SFB (Gibco), incubadas a 28°C. Estoques de células foram mantidos a -80°C até sua utilização para cultura.

### 4.3 CULTIVO DE VÍRUS

Isolados virais foram mantidos acondicionados a -80°C. Os vírus foram obtidos de amostras de pacientes infectados na cidade de João Pessoa – PB, mediante execução de projeto anterior desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (CAEE 17921713.2.1001.5188). Os estoques virais foram crescidos em células de *Aedes albopictus* linhagem C6/36 e após a observação do efeito citopático induzido pelos vírus, os sobrenadantes foram coletados, suplementados com 20% de soro bovino fetal e utilizados nos ensaios de titulação.

### 4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO ROTAEVAPORADO DA *Schinopsis brasiliensis* Engl.

O extrato rotaevaporado da *Schinopsis brasiliensis* Engl. foi gentilmente cedido pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Dantas Medeiros da Universidade Estadual da Paraíba – Campina Grande-PB. Toda caracterização, extração e isolamento dos extratos seguem publicados em Chaves et al. (2015).

A extração etanólica do material vegetal foi realizada utilizando as cascas de cinco espécimes diferentes de *S. brasiliensis* Engl. coletadas na região semiárida do estado da Paraíba, com um comprovante de amostra preparado e depositado no herbário Professor Jayme Coelho

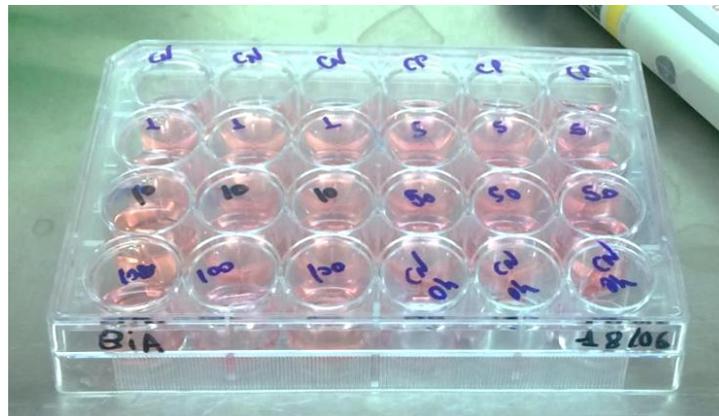
de Moraes (Código de Herbário EAN), Universidade Federal da Paraíba, sob o número EAN-14049.

O material vegetal foi seco em estufa de circulação de ar a  $40 \pm 1$  ° C, posteriormente foi triturado em fatiador com um tamanho de partícula de 10 malhas. As partículas de plantas em pó (100 g) foram extraídas exaustivamente com etanol a 96% por percolação e subsequentemente o extrato foi concentrado por um rotaevaporador (CHAVES et al, 2015).

#### 4.5 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO

As células Vero foram semeadas em placas de 24 poços ( $5 \times 10^4$  células/poço) conforme ilustrado na Figura 13, e incubadas por 24 h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> após o plaqueamento. Após a primeira incubação, o meio de cultura MEM foi aspirado e repostado em um volume de 1000µL juntamente com os tratamentos de extratos de planta nas concentrações: 1µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL. Foi utilizado como controle negativo as células sem estímulo em meio de cultura, e meio com DMSO a10% como controle positivo. As placas foram então incubadas na presença do estímulo por 24h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi aspirado e as células tripsinizadas. Após a tripsinização, a suspensão das células em meio de cultura foi diluída (1:4) e em trypan blue (método colorimétrico) e a viabilidade celular determinada em câmara de Neubauer. Todos os testes foram realizados em triplicata.

**Figura 13** – Placa de 24 poços do ensaio de citotoxicidade em células Vero. Células Vero foram cultivadas na presença de concentrações variando de 1µg/mL a 100µg/mL de *S.brasiliensis*.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

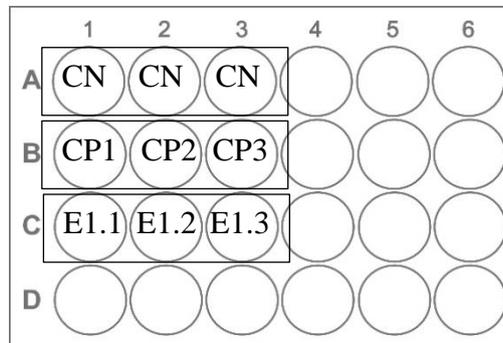
#### 4.6 ENSAIO DE CITOTOCIXIDADE EM CÉLULAS C6/36

As células C6/36 foram semeadas em 2 placas de 24 poços ( $8 \times 10^4$  células/poço) por 24 h a  $28^\circ\text{C}$  após o plaqueamento. Uma placa foi utilizada para o ensaio de citotoxicidade de 24 h e a outra placa para o ensaio de citotoxicidade de 48h incubada. Após a primeira incubação, o meio de cultura L15 foi aspirado e repostado em um volume de  $1000\mu\text{L}$  juntamente com os tratamentos de extratos de planta nas concentrações:  $0,01\mu\text{g/mL}$ ,  $0,05\mu\text{g/mL}$ ,  $0,1\mu\text{g/mL}$ ,  $0,5\mu\text{g/mL}$  e  $1\mu\text{g/mL}$ . Foi utilizado como controle negativo as células sem estímulo em meio de cultura, e meio com DMSO a 10% como controle positivo. As placas foram então incubadas na presença do estímulo por 24h e 48h a  $28^\circ\text{C}$ . O meio de cultura foi aspirado e as células foram suspensas por choque mecânico, a suspensão das células em meio de cultura foi diluída (1:4) e em trypan blue (método colorimétrico) e a viabilidade celular determinada em câmara de Neubauer. Todos os testes foram realizados em triplicata.

#### 4.7 ENSAIO DE EFICÁCIA ANTIVIRAL

As células C6/36 foram cultivadas em meio L-15 (Sigma) suplementado com 5% soro bovino fetal –SFB (Gibco) a  $28^\circ\text{C}$  e  $100\text{ U/mL}$  de penicilina/estreptomicina, em estufa a  $28^\circ\text{C}$ . Placas de 24 poços ( $8 \times 10^4$  células/poço) foram preparadas com cultura de células C6/36 e incubadas por 24 h. Em seguida, o meio das placas foi removido e adicionado  $200\mu\text{L}$  da suspensão viral DENV4- MOI 0,1. As placas foram incubadas por 1 h para internalização viral, agitando lentamente a cada 15 minutos para melhor distribuir o inóculo. Após, o inóculo foi removido e as placas foram lavadas duas vezes com PBS 1X ( $500\mu\text{L/poço}$ ). Em seguida, foi adicionado  $1\text{mL/poço}$  do extrato rotaevaporado de *S. brasiliensis* Engl. na concentração de  $1\mu\text{g/mL}$  diluído em meio L-15, assim como o meio L15 nos controles negativo (não infectado) e positivo (infectado não tratado), sendo incubados por 24h –  $28^\circ\text{C}$ . Após este período, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior determinação do título viral (método: foco infeccioso com imunoperoxidase). Todas as amostras foram realizadas em triplicata, conforme esquema delineado na Figura 14.

**Figura 14** - Esquema de distribuição de tratamentos e controles do ensaio de eficácia antiviral para DENV4. CN – Controle Negativo (Meio L - 15 e células C6/36 não infectadas); CP – Controle Positivo (Meio L - 15 e células C6/36 infectadas por DENV-4 e não tratado com extrato); E – Extrato (Meio L - 15 e células C6/36 infectadas e tratadas com extrato rotaevaporado da *S. brasiliensis* Engl. Na concentração de 1µg/mL).



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

#### 4.8 ENSAIOS DE TITULAÇÃO VIRAL

Os vírus foram titulados por ensaio do foco infeccioso e reação da imunoperoxidase em células C6/36 em meio L15 (5% SFB). Brevemente, as células foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de  $3 \times 10^5$  células/poço, 48 horas antes do ensaio, incubadas a 28°C. No dia do ensaio, o meio foi removido da placa e as células foram infectadas com diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) dos sobrenadantes dos ensaios de eficácia antiviral infectados e tratados e infectados e não tratados. Adicionalmente, poços com controle negativo deste ensaio apenas com a concentração celular e meio de cultura foram delineados (Figura 15). As placas então foram homogeneizadas por 15 min a temperatura ambiente em homogeneizador orbital (*shaker*). Em seguida, incubadas a 28°C por 45 min. Após a adsorção, as diluições dos poços foram removidas e adicionados 1ml de meio semi-sólido (contendo 1% *Carboxymethyl cellulose* (CMC) 1% Soro fetal bovino (SFB) e meio L15) em cada poço. As placas foram incubadas a 28°C por 5 dias.

Após o período de incubação, o meio semi-sólido foi removido e as placas mantidas invertidas para a retirada do excesso de meio, então os poços foram lavados uma vez com PBS 1X e foi adicionado 1 ml do fixador (30% acetona em PBS 1x) para cada poço e mantido a 4°C por 13 min. O fixador foi removido, os poços foram lavados uma vez com PBS 1X, e as placas foram deixadas para secar na estufa durante 24 h antes da revelação dos *foci* pela reação da imunoperoxidase. Após isso, foi adicionado 200 µL de anticorpo primário monoclonal anti-E em cada poço (diluído na proporção de 1:100 em tampão de ligação (1000 mL PBS 1x; 29.5 g

NaCl e 100  $\mu$ L Tween-20), sendo incubado a 37°C por 1 h. Os poços então foram lavados três vezes com o tampão de lavagem (1000 mL PBS 1x e 500  $\mu$ L Tween-20) e foi adicionado 200  $\mu$ L de anticorpo secundário *HRP-rec-Protein G* em cada poço (diluído na proporção de 1:500 em tampão de ligação) e foi incubado a 37°C por 1 h e depois os poços foram lavados três vezes com o tampão de lavagem. Então foi adicionado 200  $\mu$ L do substrato AEC (1 comprimido de AEC diluído em 6 mL de N,N-dimetilformamida; 93,8 mL de tampão do substrato e 200  $\mu$ L 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em cada poço e as placas foram cobertas com papel alumínio e incubadas a 37°C até o aparecimento dos *foci*, que durou entre 10 a 60 min. Após o aparecimento dos *foci*, os poços foram lavados com água destilada e as placas deixadas para secar para então se realizar a contagem dos *foci*, para a determinação do título viral (média do número de *foci* na diluição em que se contou os poços X fator de diluição x diluição em que poços foram contados, afim de expressar o título viral em PFU/mL).

**Figura 15** - Esquema de distribuição de tratamentos e controles do ensaio de titulação viral utilizando os sobrenadantes virais do ensaio de eficácia antiviral. CN – Controle Negativo (Meio L - 15 e células C6/36 não infectadas); CP – Controle Positivo (sobrenadante viral do CP); E – Extrato (Sobrenadante viral das células tratadas com extrato).

#### PLACA 1

	1	2	3	4	5	6	
A	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	Extrato 1.1
B	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	
C	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	Extrato 1.2
D	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	CN	

#### PLACA 2

	1	2	3	4	5	6	
A	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	Extrato 1.3
B	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	
C	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	CP1
D	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	CN	

**PLACA 3**

	1	2	3	4	5	6	
<b>A</b>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	CP2
<b>B</b>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	
<b>C</b>	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN
<b>D</b>							

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

**4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Análises estatísticas foram realizadas a partir da avaliação das diferenças de viabilidade celular, tanto em células Vero quanto em células C6/36, comparando as células tratadas com o extrato rotaevaporado da *Schinopsis brasiliensis* Engl. nas concentrações e em tempos determinados anteriormente, células tratadas com DMSO e as células não tratadas, utilizando-se o software GraphPad Prism v.07 para Windows (La Jolla, CA). Os dados foram compilados e analisados através de teste ANOVA oneway e a diferença das médias analisadas através do teste Tukey.

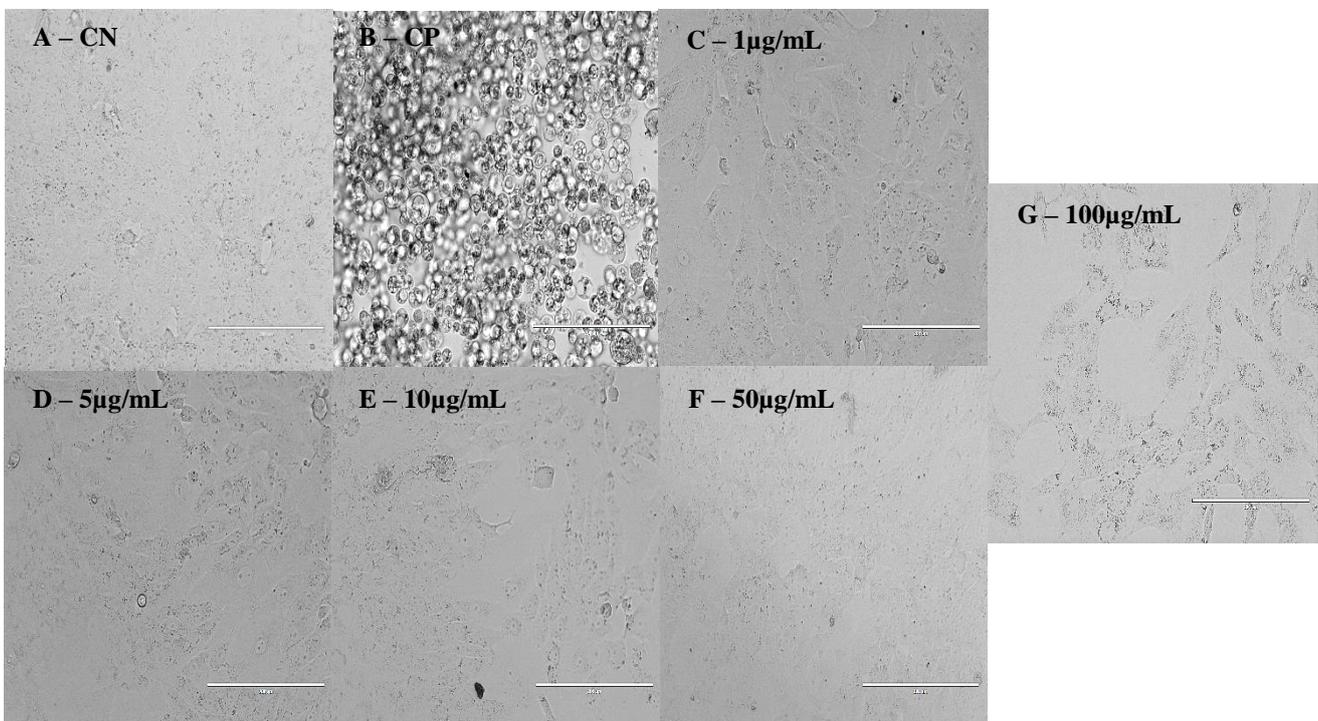
Para realizar a avaliação da diferença de titulação viral entre as células tratadas com o extrato rotaevaporado da *Schinopsis brasiliensis* Engl. nas concentrações e tempos de incubação determinados e as células não tratadas, os dados foram compilados e a diferença das médias analisadas através do teste Mann-Whitney. Em todos os casos, o erro alfa de 5% foi adotado.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS VERO

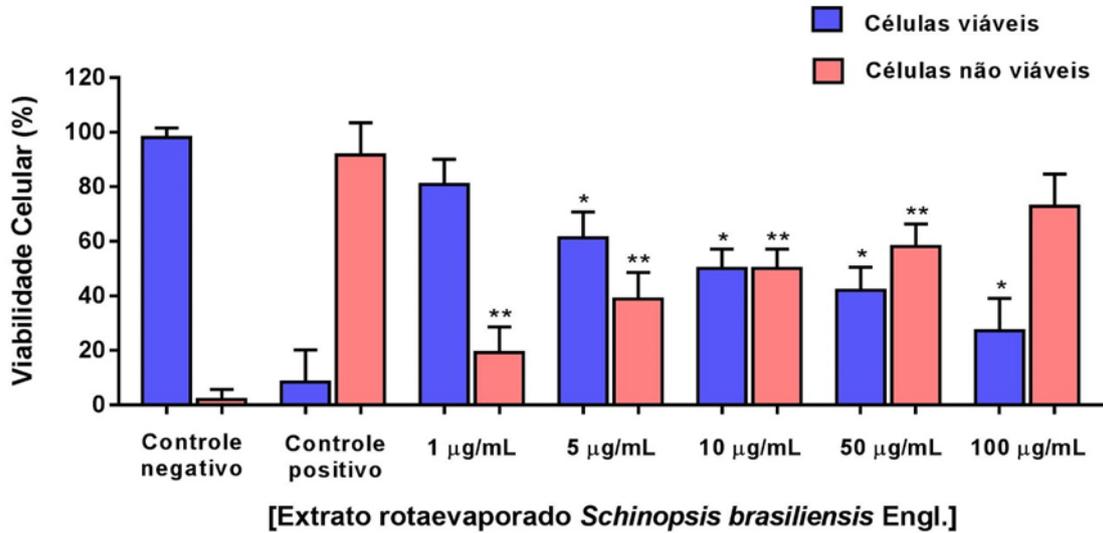
Nossos resultados revelaram que o extrato rotaevaporado *Schinopsis brasiliensis* Engl. nas concentrações 5µg/mL, 10µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL foram tóxicos às células Vero após um período de incubação de 24h (Figura 16). Convém mencionar que a citotoxicidade aumentou conforme o aumento da concentração do extrato, (Figura 17) e que na menor concentração utilizada de 1µg/mL a viabilidade celular ficou em torno de 80% enquanto na concentração de 100µg/mL a viabilidade celular ficou em torno de 30%, indicando tamanha citotoxicidade do extrato.

**Figura 16** – Confluência do tapete celular após 24 h do estímulo com extrato rotaevaporado da *Schinopsis brasiliensis* Engl. Células Vero foram cultivadas na presença de concentrações variando de 1µg/mL a 100µg/mL de *S. brasiliensis* Engl. A – Controle Negativo (Meio MEM); B – Controle Positivo (DMSO 10%); C – Concentração de 1µg/mL; D – Concentração de 5µg/mL; E – Concentração de 10µg/mL; F – Concentração de 50µg/mL; G – Concentração de 100µg/mL.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

**Figura 17** – Percentual de Viabilidade das células Vero após tratamento com o extrato rotaevaporado *Schinopsis brasiliensis* Engl. por 24h.



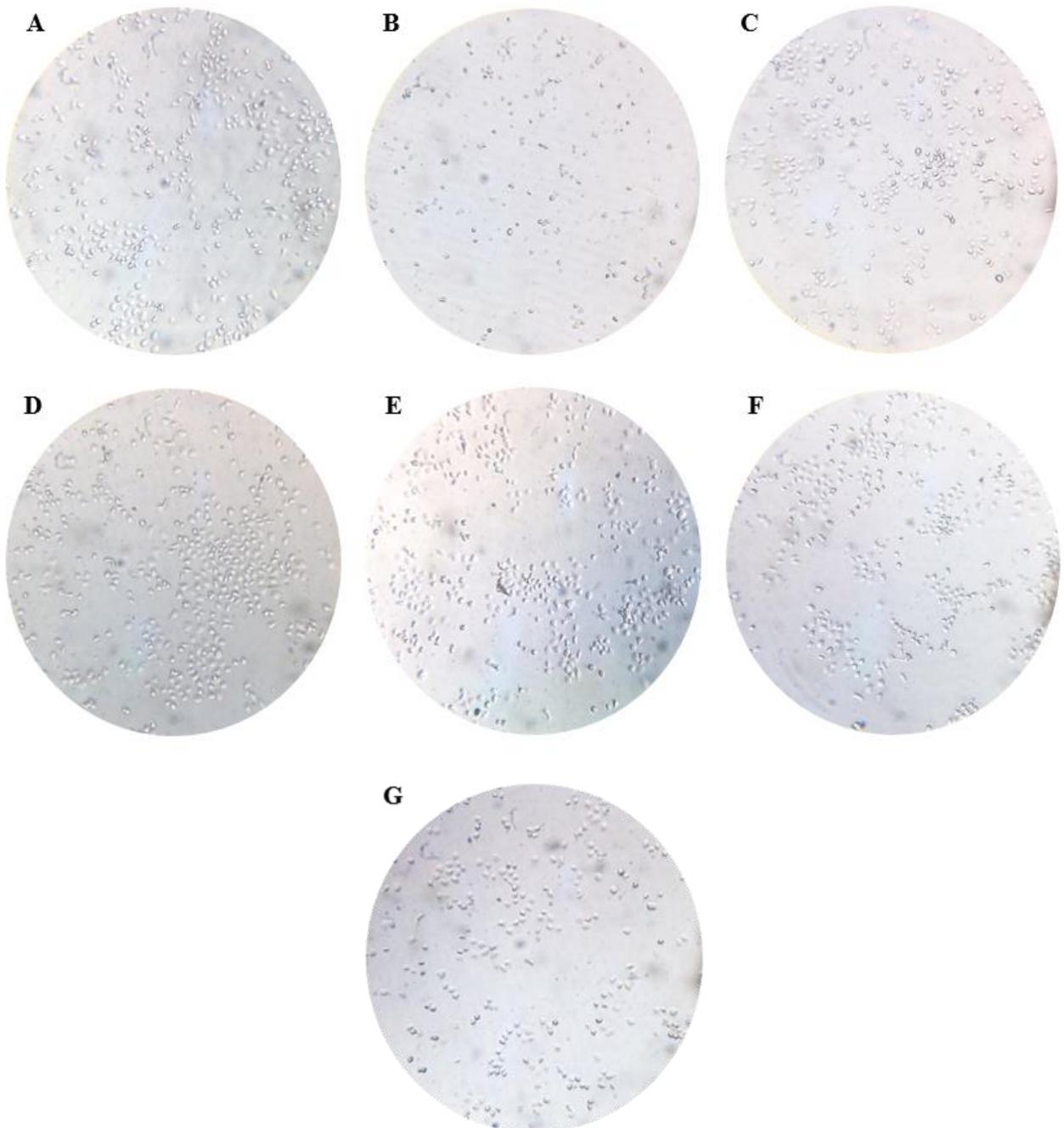
\* =  $p < 0,05$  comparando com células viáveis do controle negativo, \*\*  $p < 0,05$  comparando com células não viáveis do controle positivo.

Fonte: Elaborado pela autora (2019).

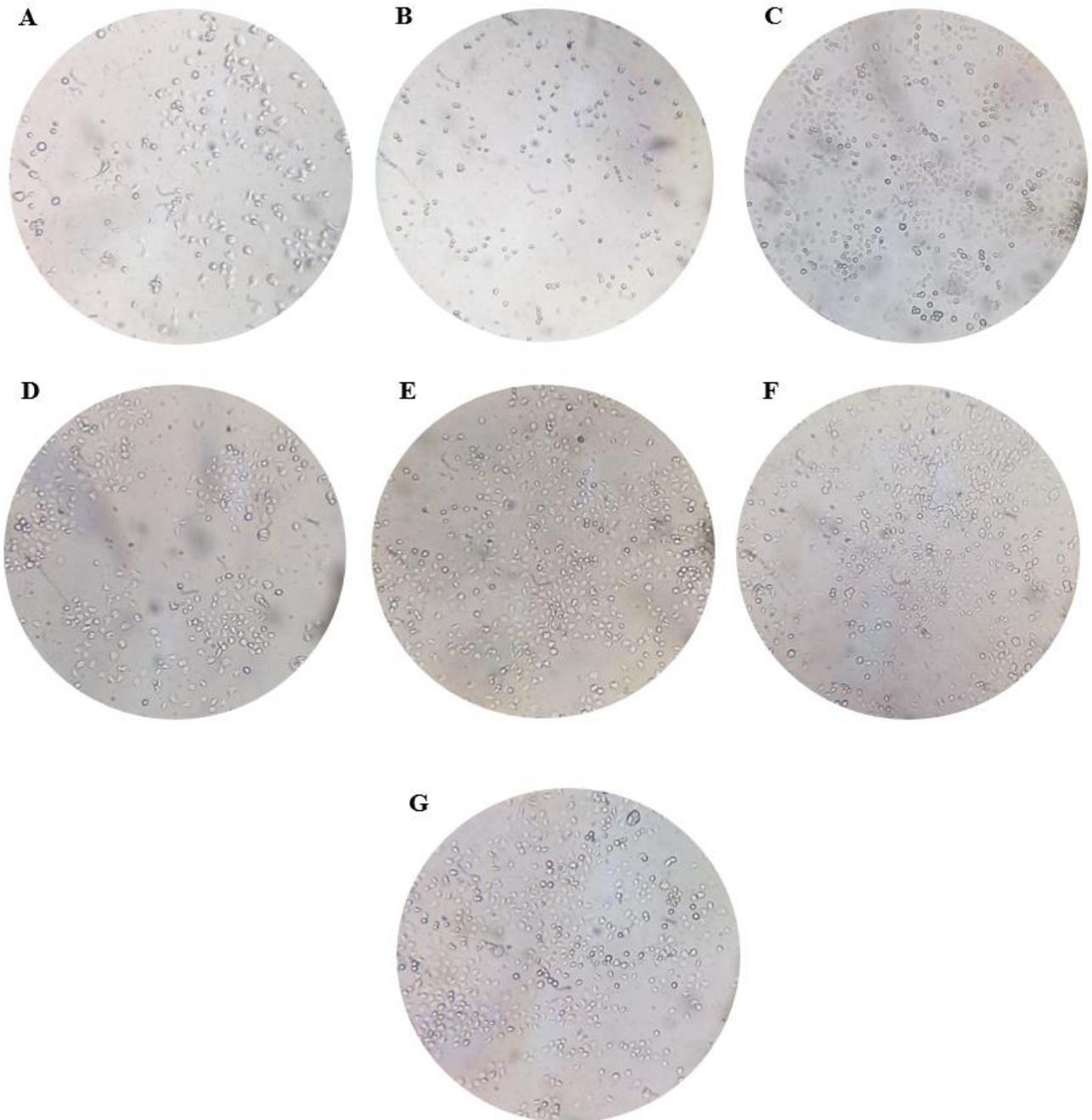
## 5.2 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS C6/36 DE *Aedes albopictus*

Nossos resultados revelaram que o extrato rotaevaporado *Schinopsis brasiliensis* Engl. nas concentrações 0,01µg/mL, 0,05µg/mL, 0,1µg/mL, 0,5µg/mL e 1µg/mL não foram tóxicos às células c6/36 de *Aedes albopictus* após incubação por 24h (Figura 18) e por 48h (Figura 19), mostrando que mesmo em diferentes concentrações ou prolongando-se o tempo de contato com o extrato, a viabilidade celular foi mantida (Figuras 20 e 21).

**Figura 18** – Confluência do tapete celular após 24 h do estímulo com extrato rotaevaporado da *Schinopsis brasiliensis* Engl. Células C6/36 foram cultivadas na presença de concentrações variando de  $0,01\mu\text{g/mL}$  a  $1\mu\text{g/mL}$  de *S. brasiliensis* Engl. A – Controle Negativo (Meio L15); B – Controle Positivo (DMSO 10%); C – Concentração de  $0,01\mu\text{g/mL}$ ; D – Concentração de  $0,05\mu\text{g/mL}$ ; E – Concentração de  $0,1\mu\text{g/mL}$ ; F – Concentração de  $0,5\mu\text{g/mL}$ ; G – Concentração de  $1\mu\text{g/mL}$ .

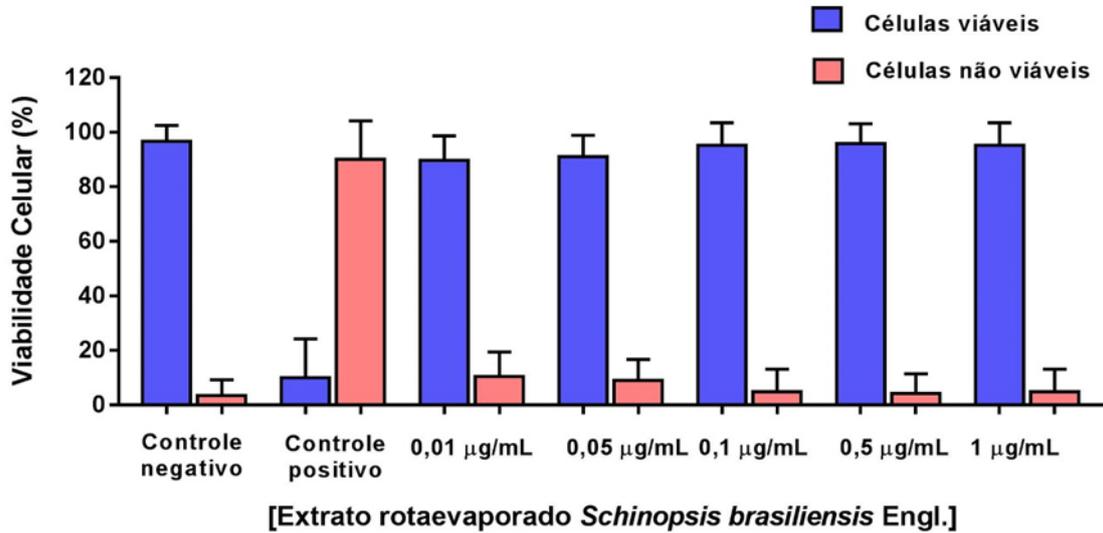


**Figura 19** – Confluência do tapete celular após 48 h do estímulo com extrato rotaevaporado da *Schinopsis brasiliensis* Engl. Células C6/36 foram cultivadas na presença de concentrações variando de 0,01µg/mL a 1µg/mL de *S. brasiliensis* Engl. A – Controle Negativo (Meio L15); B – Controle Positivo (DMSO 10%); C – Concentração de 0,01µg/mL; D – Concentração de 0,05µg/mL; E – Concentração de 0,1µg/mL; F – Concentração de 0,5µg/mL; G – Concentração de 1µg/mL.



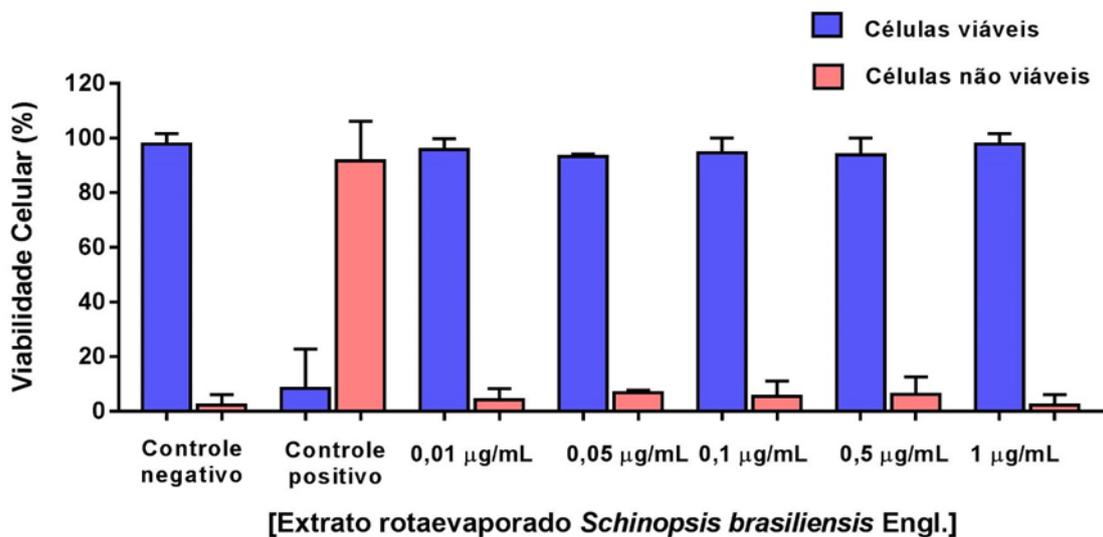
Fonte: Elaborado pela autora (2019).

**Figura 20** – Percentual de Viabilidade das células C6/36 após tratamento com o extrato rotaevaporado *Schinopsis brasiliensis* Engl. por 24h.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

**Figura 21** – Percentual de Viabilidade das células C6/36 após tratamento com o extrato rotaevaporado *Schinopsis brasiliensis* Engl. por 48h.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

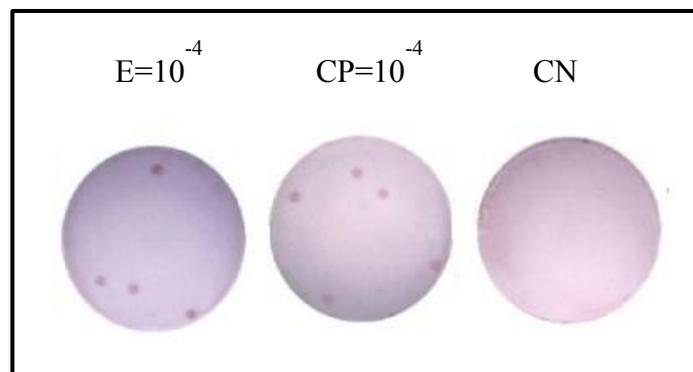
### 5.3 ENSAIOS DE EFICÁCIA ANTIVIRAL E TITULAÇÃO VIRAL

Diante dos resultados prévios sobre a viabilidade das células Vero, somados as inúmeras limitações de manter esta cultura (como a presença frequente de infiltrações na sala de cultura, contaminações, queda de energia elétrica no *campus*, perfurações na mangueira do cilindro de CO<sub>2</sub>, demora na entrega de insumos como placas e meio de cultura), refizemos os ensaios de citotoxicidade utilizando-se as células C6/36 do *Aedes albopictus* e diminuimos as concentrações utilizadas, variando-as entre 1µg/mL, 0,05µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, e 0,01 µg/mL nos tempos de 24h e 48h.

Frente aos resultados satisfatórios de viabilidade das células do inseto, realizamos o ensaio de eficácia antiviral do extrato rotaevaporado de *Schinopsis brasiliensis* Engl. na concentração de 1 µg/mL em células C6/36 de *Aedes albopictus*. Preliminarmente, visando a obtenção de focos nítidos e de um título adequado no estoque dos vírus, realizamos o teste de eficácia do extrato frente a uma cepa de DENV4 que apresentava um título inicial satisfatório ( $7,6 \times 10^4$  PFU/mL) e indutora de focos nítidos, porém com quantidade limitada.

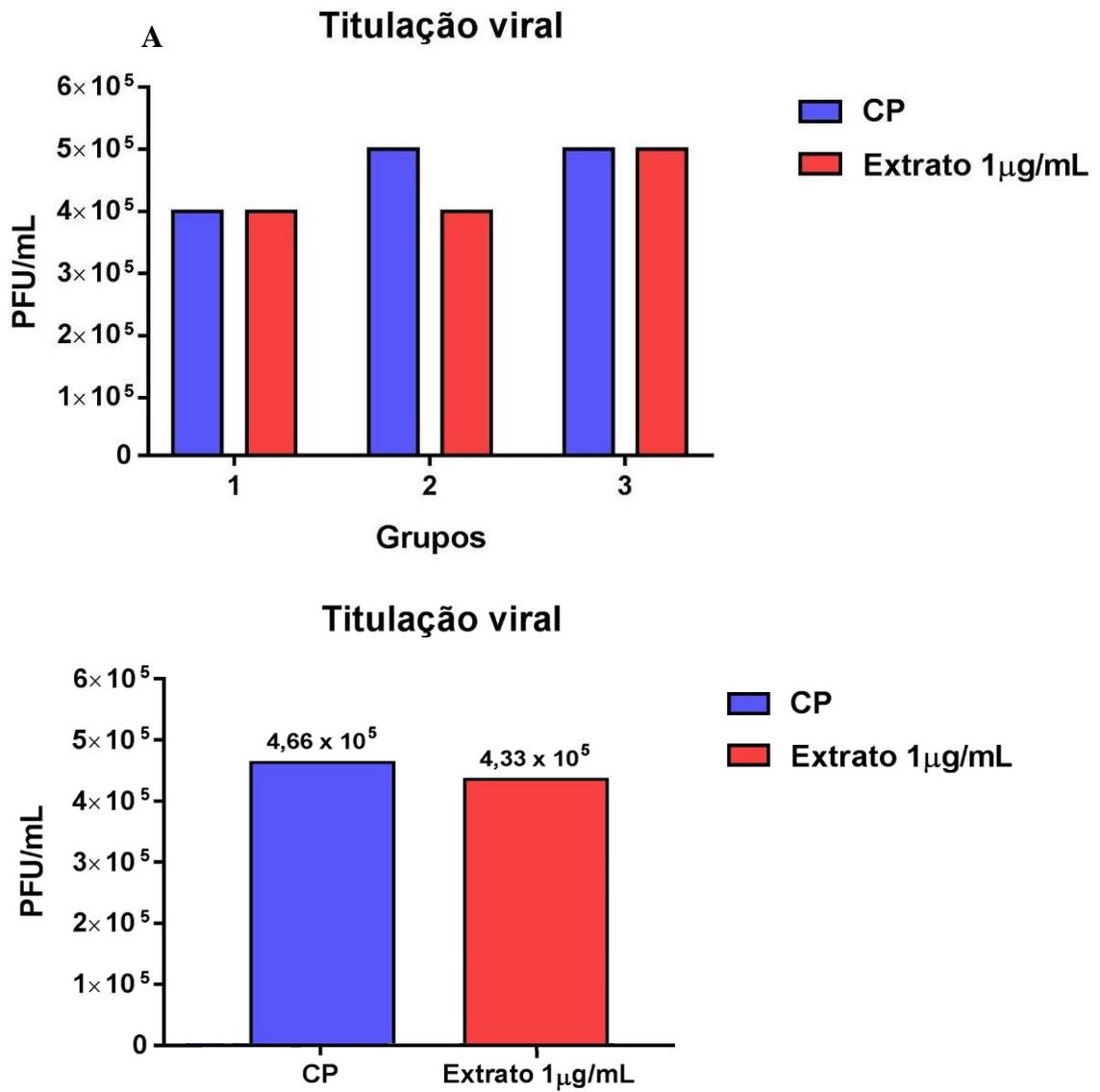
Nossos resultados revelaram que o extrato rotaevaporado *Schinopsis brasiliensis* Engl. na concentração de 1µg/mL não apresentou redução significativa ( $p > 0,05$ ) do título viral contra o DENV4, em ensaio *in vitro* nas células C6/36 durante infecção por cinco dias e tratamento por 24h (Figuras 22 e 23).

**Figura 22** – Representação do ensaio de foco infeccioso e reação da imunoperoxidase. E – Extrato; CP – Controle Positivo; CN – Controle Negativo.



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

**Figura 23** – Titulação viral por ensaio de foco infeccioso em células C6/36 infectadas por DENV4 (com a retirada do inóculo) em PFU. Em A: valores da triplicata de cada média da diluição  $10^{-4}$ . Em B: Comparação das médias das triplicatas ( $p > 0,05$ ).



Fonte: Elaborado pela autora (2019).

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar o possível efeito antiviral do extrato hidroalcoólico rotaevaporado da casca de *Schinopsis brasiliensis* Engl. na replicação *in vitro* do vírus dengue 4 em células *Aedes albopictus* linhagem C6/36. Para isso, avaliamos seu possível efeito citotóxico nessa linhagem celular bem como em células Vero em diferentes concentrações do extrato. Nas condições de estudo, observamos que o extrato em questão foi bem tolerado nas linhagens - celulares Vero e C6/36 de *Ae. albopictus* nas concentrações menores ou igual a 1 µg/mL, apresentando-se citotóxico nas demais concentrações testadas ( $p < 0,05$ ).

De fato, Silva et al, (2012) avaliaram a toxicidade dos extratos hidroalcoólico obtido a partir da casca de *S. brasiliensis* Engl. frente a concentração letal (LC50) das substâncias para as larvas de *Artemia salina*. Os resultados indicaram que o extrato testado é tóxico, tendo LC50 = 428 µg/mL. Este achado foi relatado como possível elevada concentração de polifenóis (taninos, flavonóides e outros compostos fenólicos) presentes nesta planta e que são bem conhecidos por sua toxicidade contra *A. salina*.

A toxicidade aguda *in vivo* também foi avaliada por Chaves et al, (2015), mostrando que extrato hidroalcoólico rotaevaporado da casca de *S. brasilienses* apresenta baixa toxicidade aguda em ratos tratados com extrato na concentração de 2.000 mg/kg dose única, via oral, não sendo observados danos aos tecidos ou morte, considerando o extrato de baixa toxicidade. Silva et al, (2013) avaliaram o possível efeito mutagênico e/ou antimutagênico do extrato etanólico das folhas *S. brasilienses* nas doses de 500 mg, 1.000 mg e, 2.000 mg, administrado dose única no aparelho digestório, via gavagem em camundongos. Através do teste de micronúcleo em sangue periférico de camundongos, os resultados obtidos revelaram que o extrato não manifestou nenhum efeito mutagênico e antimutagênico nas doses testadas.

Jovito et al, (2016) avaliaram a citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico humano, onde foi observado a indução e proliferação dessas células pelo extrato das folhas de *S. brasiliensis* testadas nas concentrações de interesse do estudo 78,12 µg/mL, 156,25 µg/mL, 312,5 µg/mL, 625 µg/mL e 1250 µg/mL, comparado com tratamento controle dimetilsulfóxido (DMSO), no teste de citotoxicidade. O extrato nas concentrações testadas não apresentou toxicidade em células humanas.

Tanto os extratos obtidos a partir da casca como o óleo obtido a partir da folha de *Schinopsis brasiliensis* Engl. têm mostrado na literatura, inúmeros efeitos antimicrobianos, antifúngico e antioxidante. Silva et al. (2012) avaliaram a atividade antifúngica e antibacteriana do extrato hidroalcoólico obtido a partir da casca de *S. brasiliensis*, utilizada as concentrações

de 250 µg/mL a 2000 µg/mL, mostrando atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* respectivamente. A atividade contra *S. aureus* foi obtida com MIC 0,250 µL/µL.

O potencial antifúngico, anti-biofilme e citotóxico do extrato rotaevaporado da folha de *S. brasilienses* sobre *Candida spp* foram avaliados por Jovito et al, (2016). Na concentração de 125 µg/mL o extrato mostrou ser significativamente fungicida após 6 horas, contra as cepas testadas (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis*), com valores de MIC e MFC variando entre 31,25 e 250 µg/mL, sendo as cepas de *C.albicans* com os maiores valores de MIC e MFC entre 0,375 e 3 µg/mL. Houve também redução na formação e nos biofilmes maduros uni e multiespécie para os períodos de 24 e 48h.

Como já relatado, existe relevância nas diversas propriedades biológicas dos polifenóis e flavanoides para as indústrias. Alguns estudos já demonstraram que compostos isolados a partir de polifenóis e flavanoides presentes em extratos de plantas medicinais apresentam atividade antiviral *in vitro* frente a DENV e outros vírus. Carneiro et al., (2016) demonstraram que um polifenol, galato de epigallocatequina (EGCG) presente em grandes quantidades no chá verde, inibiu a entrada de 1 log de vírus nas células Vero, e outros estudos relatados por ele demonstrou que o EGCG tem uma atividade antiviral intensa para muitos vírus, incluindo o vírus da imunodeficiência humana (HIV), o vírus herpes simplex (HSV), vírus da gripe (FLU) e vírus da hepatite C (HCV).

Moghaddam et al, (2014) realizaram estudos *in vitro* em células Vero, demonstrando que a baicaleína, um flavonóide pertencente ao subgrupo de flavonas exerceu atividade virucida significativa sobre as partículas virais extracelulares, mostrando efeito anti-adsorção, interferindo nas diferentes etapas da replicação de DENV-2.

Zandi et al, (2011) realizaram estudo *in vitro* em células C6/36, com alguns flavanoides, que foram testados após a absorção do vírus às células, tratadas as células antes da infecção pelo vírus por 5 h e até 4 dias após a infecção. Foi visto que a quercetina apresentou uma atividade inibitória contra DENV-2 reduzindo os níveis de RNA do DENV-2 em 67%.

Ante ao exposto quanto a demonstração de alguns compostos de classes de polifenóis e flavanoides na atividade antiviral e, considerando-se que o extrato hidroalcoólico da casca de *S. brasiliensis* utilizado neste estudo apresentam esses compostos em grande quantidade, sugere-se que novos estudos sejam realizados visando a investigação do efeito desta planta contra a replicação do vírus dengue. Assim, novas linhagens celulares, diferentes concentrações do extrato bem caracterizado em sua composição fitoquímica e o uso de diferentes cepas virais podem relevar um possível efeito antiviral deste extrato.

## 7 CONCLUSÃO

Nosso estudo é um relato pioneiro na avaliação do possível efeito do extrato rotaevaporado da *S. brasiliensis* Engl. na inibição da replicação do vírus da dengue. Nele, verificou-se que o extrato estudado, mostrou-se tóxico em células Vero na maioria das concentrações avaliadas, sendo tolerável na concentração de 1µg/mL. Quanto à viabilidade em células do inseto, nenhuma toxicidade foi verificada entre as concentrações testadas. A avaliação da eficácia antiviral revelou que não houve redução significativa dos títulos virais nas condições de cultura utilizadas. Porém, novos estudos visando delinear o possível efeito tóxico e antiviral dos extratos rotaevaporado de *S. brasiliensis* Engl. variando-se as condições de cultura e se testando as demais cepas virais, devem ser realizados visando um possível desenvolvimento de fármacos específicos contra dengue.

## 8 PERSPECTIVAS

Novos ensaios buscando determinar o possível efeito antiviral da *S. brasiliensis* Engl. podem ser realizados em diferentes condições de cultura. Em acréscimo, pode-se atrelar o extrato de *S. brasiliensis* Engl. ou a sua fração acetato de etila, onde se encontra principalmente flavonoides e polifenóis, à nanopartículas para fins de liberação de fármacos. As nanopartículas quando comparadas a outros sistemas carreadores de fármacos, destacam-se na vetorização de ativos nos seus sítios de ação, bem como no controle da liberação destes, podendo diminuir a toxicidade e aprimorar a estabilidade, a fim de reduzir seus efeitos colaterais Além disso em comparação com outros sistemas de entrega, a compatibilidade com os tecidos vivos do organismo, menor toxicidade, produção viável em grande escala, efetiva estabilidade durante a estocagem, como também o uso de uma concentração reduzida do ativo (MARCATO, 2009; PARK et al., 2013; PUGLIA & BONINA, 2012).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, E. G.; KUMAR, A.; BARTENSCHLAGER, R. Revisiting dengue virus-host cell interaction: new insights into molecular and cellular virology. **Advances in Virus Research**, v. 88, p. 1–109, 2014.
- ADIKARI, T. N. *et al.* Dengue NS1 antigen contributes to disease severity by inducing interleukin (IL)- 10 by monocytes. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 184, n. 1, p. 90–100, abr. 2016.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C.; SILVA, A. C. O. Use of plant resources in a seasonal dry forest (Northeastern Brazil). **Acta botânica brasílica**, v. 19, n. 1, p. 27-38, 2005.
- \_\_\_\_\_. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.
- \_\_\_\_\_. Rapid ethnobotanical diagnosis of the Fulni-ô Indigenous lands (NE Brazil): floristic survey and local conservation priorities for medicinal plants. **Environment, development and sustainability**, v. 13, n. 2, p. 277-292, 2011.
- \_\_\_\_\_; OLIVEIRA, R. F. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants?. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 1, p. 156-170, 2007.
- ALCARAZ-ESTRADA, S. L. *et al.* Construction of a dengue virus type 4 reporter replicon and analysis of temperature-sensitive mutations in non-structural proteins 3 and 5. **J Gen Virol**, v. 91, n. 11, p. 2713-8, nov. 2010.
- ALCON-LEPODER, S. *et al.* Secretion of flaviviral non-structural protein NS1: from diagnosis to pathogenesis. **Novartis Foundation Symposium**, v. 277, p. 233–247; discussion 247-253, 2006.
- ANVISA. **Nota Informativa - Vacina Dengue Dengvaxia®**. 2017.
- ARKIN, F. Dengue researcher faces charges in vaccine fiasco. **Science**, v. 264, pp. 320, apr. 2019.
- AVIRUTNAN, P. *et al.* Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 8, p. 1078–1088, 15 abr. 2006.
- BENEDICT, M. Q. *et al.* Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. **Vector-borne and zoonotic Diseases**, v. 7, n. 1, p. 76-85, 2007.
- BHATT, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 25 abr. 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília: FUNASA, p. 201-230, 2002.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Dengue - Situação Epidemiológica / Dados**, 2019. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/dengue/situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em: 21 ago. 2019.

\_\_\_\_\_. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe – 23 Julho**: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 28 de 2019. Brasília: MDS, 2019.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde: Dengue. **Diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis**. 5. ed. Brasília: MDS, 2016.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Caderno 9 Dengue, Febre Amarela, Febre do Nilo Ocidental. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

CALISHER, C. H. *et al.* Antigenic relationships between flaviviruses as determined by crossneutralization tests with polyclonal antisera. **The Journal of General Virology**, v. 70 (Pt 1), p. 37–43, jan. 1989.

CARDOSO, M. P.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. A new alkyl phenol from *Schinopsis brasiliensis*. **Natural product research**, v. 19, n. 5, p. 431-433, 2005.

CARNEIRO, B. M. *et al.* The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry. **Virology**, v. 496, p. 215-218, 2016.

CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho. *Braúna-do-Sertão-Schinopsis brasiliensis*. **Embrapa Florestas-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2009.

CASTILLO RAMIREZ, J. A.; URCUQUI-INCHIMA, S. Dengue Virus Control of Type I IFN Responses: A History of Manipulation and Control. **J. Interferon Cytokine Res.**, Nova Iorque; v. 35, n. 6, p. 421-430, 2015.

CELOTO, M. I. B. **Atividade antifúngica de extratos de Melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.) sobre *Colletotrichum musae* (Berk. & Curtis)** *Arx.* 2005. 73 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2005.

CHAVES, T. P. *et al.* Atividade antimicrobiana das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engler. **Biofar**, v. 5, n. 2, p. 11-17, 2011.

\_\_\_\_\_. Evaluation of the potential modulator of bacterial resistance, acute toxicity and chemical composition of *Schinopsis brasiliensis* Engler. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 33, p. 843-849, 2015.

CHEN, R.; VASILAKIS, N. Dengue--quo tu et quo vadis? **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1562–1608, 2011.

CHUNG, K. M.; DIAMOND, M. S. Defining the levels of secreted non-structural protein NS1 after West Nile virus infection in cell culture and mice. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 3, p. 547–556, mar. 2008.

- CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 23, p. 11418–11431, dez. 2006.
- CONSOLI, R. A.G.B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994. 228p.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.
- COUTO-LIMA, D. *et al.* Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. **Sci. Rep.**, Londres, v. 7, n. 4848, 2017.
- DEGALLIER, N. *et al.* Avaliação do Risco de Transmissão Silvestre da Dengue no Brasil. **Inf. Epidemiol. Sus.**, Brasília, v. 10, p. 13-15, 2001.
- DEL ANGEL, R. M.; REYES-DEL VALLE, J. Dengue vaccines: strongly sought but not a reality just yet. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003551, 2013.
- DEROECK, D.; DEEN, J.; CLEMENS, J. D. Policymakers' views on dengue fever/dengue haemorrhagic fever and the need for dengue vaccines in four southeast Asian countries. **Vaccine**, v. 22, n. 1, p. 121-129, 2003.
- DLETZ, V. J. *et al.* Epidemic dengue 1 in Brazil, 1986: evaluation of a clinically based dengue surveillance system. **American journal of epidemiology**, v. 131, n. 4, p. 693-701, 1990.
- DONATI, M. *et al.* Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: estragole, trans-anethole,  $\beta$ -caryophyllene and myrcene. **Natural product research**, v. 29, n. 10, p. 939-946, 2015.
- EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in pharmacology**, v. 4, p. 177, 2014.
- ESTRADA-FRANCO, J. G.; CRAIG, G. B. **Biology, disease relationships, and control of *Aedes albopictus***. Washington, D.C: Organización Panamericana de la Salud, 1995.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil I: history, epidemiology and research. **Virus Reviews & Research**, v. 1, n. 1-2, p. 9-16, 1996.
- GALULA, J. U. *et al.* Does structurally-mature dengue virion matter in vaccine preparation in post-Dengvaxia era?. **Human vaccines & immunotherapeutics**, p. 1-9, 2019.
- GONZALEZ, O. *et al.* The heat shock protein inhibitor Quercetin attenuates hepatitis C virus production. **Hepatology**, v. 50, n. 6, p. 1756-1764, 2009.

GUBLER, D. J. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. **Novartis Foundation Symposium**, v. 277, p. 3–16; discussion 16-22, 71–73, 251–253, 2006.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of medical research**, v. 33, n. 4, p. 330-342, 2002.

GUEDES, D. R. D. **Análise da competência vetorial para o vírus Dengue em populações naturais de Aedes aegypti e Aedes albopictus de Pernambuco**. 2012. 102 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2012.

GUY, B.; JACKSON, N. Dengue vaccine: hypotheses to understand CYD-TDV-induced protection. **Nature reviews Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 45, 2016.

GUZMAN, A.; ISTÚRIZ, R. E. Update on the global spread of dengue. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, suppl. 1, p. S40-S42, 2010.

GUZMAN, M. G. *et al.* Dengue infection. **Nat. Rev. Dis. Primers**, Londres, v. 2, p. 16055, 2016.

HADINEGORO, S. R. S. The revised WHO dengue case classification: does the system need to be modified?. **Paediatrics and international child health**, v. 32, n. sup1., p. 33-38, 2012.

HALSEY, E. S. *et al.* Correlation of serotype-specific dengue virus infection with clinical manifestations. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 5, p. 1638, 2012.

HARDY, J. L. *et al.* Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. **Annual Review of Entomology**, v. 28, p. 229–262, 1983.

HAWLEY, W. A. *et al.* Aedes albopictus in North America: probable introduction in used tires from northern Asia. **Science**, v. 236, n. 4805, p. 1114-1116, 1987.

HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The dengue viruses. **Clin Microbiol Rev.**, v. 3, n. 4, p. 376-96, oct. 1990.

IN VIVO. Diferenças entre A. aegypti e A. albopictus. **Fiocruz**, 2019. Disponível em: <http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1413&sid=2>. Acesso em: 21 ago.

JONES, C. T. *et al.* Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. **Journal of virology**, v. 77, n. 12, p. 7143-7149, 2003.

JONES, M. *et al.* Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. **Journal of Virology**, v. 79, n. 9, p. 5414–5420, mai. 2005.

JOVITO, V. C. **Atividades anti-Candida e análise da citotoxicidade do extrato da folha da Schinopsis brasiliensis Engl**. 2016. 47 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

KATZELNICK, L. C. *et al.* Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. **Science**, v. 358, n. 6365, p. 929-932, 2017.

KUHN, R. J. *et al.* Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, v. 108, n. 5, p. 717–725, 8 mar. 2002.

LE BRETON, M. *et al.* Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a highthroughput yeast two-hybrid screen. **BMC Microbiol.**, Londres, v. 11, 2011.

LEARDKAMOLKARN, V. *et al.* The inhibitory actions of houttuynia cordata aqueous extract on dengue virus and dengue- infected cells. **Journal of food biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 86-92, 2012.

LIBRATY, D. H. *et al.* Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 9, p. 1213–1221, 1 mai. 2002a.

LINDENBACH, B. D. *et al.* Flaviviridae. In: KNIPE, D. M. e HOWLEY, P. M. (Ed.). Fields virology. Sixth. **Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins**, v. 1, cap. 25, p. 712-746, 2013.

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. 4611-21, jun. 1999

LINDENBACH, B. D.; THIEL, H.-J.; RICE, C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). Fields Virology. 5th. **Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers**, cap. 33, p.1101-1113, 2007.

MAGALHÃES, R. C. S. **A erradicação do Aedes aegypti: febre amarela, Fred Soper e saúde pública nas Américas (1918-1968)**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2016.

MALAVIGE, G. N.; OGG, G. S. Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. **Immunology**, v. 151, n. 3, p. 261–269, jul. 2017.

MARCATO, P. "Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas." **Revista Eletrônica de farmácia**, v. 6, n. 2, 2009.

MASON, P. W. *et al.* Sequence of the dengue-1 virus genome in the region encoding the three structural proteins and the major nonstructural protein NS1. **Virology**, v. 161, n. 1, p. 262-7, nov. 1987.

MAZZUCCO, M. B. *et al.* Antiviral activity of an N-allyl acridone against dengue virus. **Journal of biomedical science**, v. 22, n. 1, p. 29, 2015.

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. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 12, p. 8873–8882, 23 mar. 2007.

MILLER, S.; ROMERO-BREY, I.; BARTENSCHLAGER, R. The Dengue Virus Replication Complex. *In*: HANLEY, K. A.; WEAVER, S. C. (Ed.). **Frontiers in Dengue Virus Research**. Caister Academic Press, 2010.

Ministério da Saúde. Combate à dengue, histórico. 2010. Acesso em em: 21 ago. 2019.

MODHIRAN, N. *et al.* Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 304, p. 304ra142, 9 set. 2015.

MOGHADDAM, E. *et al.* Baicalin, a metabolite of baicalein with antiviral activity against dengue virus. **Scientific reports**, v. 4, p. 5452, 2014.

MUYLAERT, I. R.; GALLER, R.; RICE, C. M. Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: identification of a temperature-sensitive mutation which blocks RNA accumulation. **J Virol**, v. 71, n. 1, p. 291-8, jan. 1997.

NAM, V. S. *et al.* Elimination of dengue by community programs using Mesocyclops (Copepoda) against *Aedes aegypti* in central Vietnam. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n. 1, p. 67-73, 2005.

NOGUEIRA, F. B. **História evolutiva, caracterização e vigilância molecular das diferentes linhagens do vírus dengue tipo 1 no Brasil**. 2018. 194 f. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

NOGUEIRA, R. M. *et al.* Dengue virus infection of the central nervous system (CNS): a case report from Brazil. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 33, n. 1, p. 68-71, 2002.

NOGUEIRA, R. M. R. *et al.* Dengue in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 3, p. 297-304, 1999.

\_\_\_\_\_.; MIAGOSTOVICH, M. P.; SCHATZMAYR, H. G. Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 16, p. 205-211, 2000.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista brasileira de farmacognosia**, São Paulo, SP. Vol. 20, n. 4, p. 641-650, ago./set., 2010.

OSANAI, C. H. *et al.* Outbreak of dengue in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, n. 1, p. 53-54, 1983.

PARK, M. J.; BALAKRISHNAN, P.; YANG, S. G. Polymeric nanocapsules with SEDDS oil-core for the controlled and enhanced oral absorption of cyclosporine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, p. 757-764, 2013.

PLOTKIN, S. A. Dengue Vaccine, A Double-Edged Sword. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, 2019.

PROMPETCHARA, E. et al. Dengue vaccine: Global development update. **Asian Pacific journal of allergy and immunology**, 13 jan. 2019.

PUERTA-GUARDO, H.; GLASNER, D. R.; HARRIS, E. Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 7, p. e1005738, jul. 2016.

PUGLIA, C.; BONINA, F. Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 4, p. 429-441, 2012.

RATHER, Irfan A. *et al.* Prevention and control strategies to counter dengue virus infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 336, 2017.

REFLORA. **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 22 ago. 2019.

ROUNDY, C. M. *et al.* Insect-specific viruses: a historical overview and recent developments. *In: Advances in virus research*. Academic Press, p. 119-146, 2017.

SABIN, A. B.; SCHLESINGER, R. W. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. **Science**, v. 101, n. 2634, p. 640-642, 1945.

SALAZAR, M. I. *et al.* Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. **BMC microbiology**, v. 7, p. 9, 30 jan. 2007.

SANTOS, N. S. O. *et al.* Virologia humana. **Guanabara Koogan**, 2015.

SANTOS, C. C. S. *et al.* Evaluation of the toxicity and molluscicidal and larvicidal activities of *Schinopsis brasiliensis* stem bark extract and its fractions. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 3, p. 298-303, 2014.

SANTOS, F. *et al.* A review on dengue diagnosis and epidemiology by a regional reference laboratory from 1986 to 2011, Rio de Janeiro, Brazil. **Dengue Bulletin World Health Organization South-East Region Western Pacific Region**, v. 37, p. 61-76, 2013.

SANTOS, R. L. **Desenvolvimento de um dentifrício a partir de extrato nebulizado de *Schinopsis brasiliensis* Engler**. 2013. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

SARAIVA, A. M. *et al.* Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 199-207, 2013.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 245-6, apr./jun. 1986.

SCHATZMAYR, H.; CABRAL, M. **A virologia no Estado do Rio de Janeiro: uma visão global**. 2. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2012. 176 p.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 3, p. 737-749, 2017.

SILVA, M. S. P. *et al.* Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid northeast: contribution to the control of oral microorganisms. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

SILVA, M. B. **Avaliação in vivo do potencial mutagênico e antimutagênico do extrato obtido das folhas de *Schinopsis Brasiliensis* Engl. através do teste de micronúcleo em camundongos.** 2013. 24f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2013.

SIMON, A. Y.; SUTHERLAND, M. R.; PRYZDIAL, E. L. G. Dengue virus binding and replication by platelets. **Blood**, v. 126, n. 3, p. 378–385, 16 jul. 2015.

SIMONE, T. S. *et al.* Dengue virus surveillance: the co-circulation of DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 9, p. 553-562, 2004.

SOUZA, L. J. *et al.* Tratamento da Dengue. In: SOUZA, L. J. D. (ed.). **Dengue - diagnóstico, tratamento e prevenção.** 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2008.

SOUZA, P. H. S. **Potencial de extratos da *Schinopsis brasiliensis* Engl. para desenvolvimento de produtos odontológicos.** 2015. 132 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Odontologia - PPGO) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2015.

STADLER, K. *et al.* Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. **Journal of Virology**, v. 71, n. 11, p. 8475–8481, nov. 1997.

TABACHNICK, W. J. Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 1, p. 249–277, 11 jan. 2013.

TATEM, A. J.; HAY, S. I.; ROGERS, D. J. Global traffic and disease vector dispersal. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 16, p. 6242-6247, 2006.

TEIXEIRA, M. G. *et al.* Dengue and dengue hemorrhagic fever epidemics in Brazil: what research is needed based on trends, surveillance, and control experiences?. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, p. 1307-1315, 2005.

TYAGIA, B. K. *et al.* Association of dengue symptoms with haematological parameters: a retrospective study of 10 hospitals in India. **Dengue**, v. 39, p. 62, 2016.

TIMERMAN, A.; NUNES, E.; LUZ, K. **Dengue no Brasil-Doença Urbana.** São Paulo: Limay, 2012.

VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; CUNHA, R. V. **Dengue: teorias e práticas.** Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2015. 458 p.

VIRALZONE. **Flavivirus**, 2016. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/24>. Acesso em: 30 ago. 2019.

WELSCH, S. *et al.* Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. **Cell Host Microbe**, v. 5, n. 4, p. 365-75, apr. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012–2020**. Geneva: WHO, 2012.

\_\_\_\_\_. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases**. Geneva: WHO, 2013.

\_\_\_\_\_. *et al.* **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva: WHO, 2009.

\_\_\_\_\_. Dengue control. **Epidemiology**, 2016. Disponível em: <https://www.who.int/denguecontrol/epidemiology/en/>. Acesso em: 21 ago. 2019.

\_\_\_\_\_. **Report of the Scientific Working Group on Dengue, 1–5 October 2006**. Geneva: WHO, 2007.

XAVIER, E. A. **Avaliação de um modelo animal para estudo de infecção pelo vírus da dengue**. 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

XIE, X. *et al.* Two distinct sets of NS2A molecules are responsible for dengue virus RNA synthesis and virion assembly. **Journal of Virology**, v. 89, n. 2, p. 1298–1313, 15 jan. 2015.

YACOUB, S.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCREATON, G. Recent advances in understanding dengue. **F1000Research**, v. 5, 2016.

YOUNG, P. R. *et al.* An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1053–1057, mar. 2000.

YUE, Y. *et al.* Epidemiological dynamics of dengue fever in mainland China, 2014–2018. **International Journal of Infectious Diseases**, abr. 2019.

YU, I.-M. *et al.* Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 319, n. 5871, p. 1834–1837, 28 mar. 2008.

ZAKARYAN, H. *et al.* Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. **Archives of virology**, v. 162, n. 9, p. 2539-2551, 2017.

ZANDI, K. *et al.* Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. **Virology journal**, v. 8, n. 1, p. 560, 2011.

ZEIDLER, J. D. *et al.* Non-Canonical Roles of Dengue Virus Non-Structural Proteins. **Viruses**, v. 9, n. 3, 13 2017.

## GLOSSÁRIO

**ARBOVIROSE** – Termo derivado da expressão inglesa “Arthropod Borne Viruses”, utilizado para designar grupo de doenças virais, transmitidas para o homem por meio de artrópodes (insetos e aracnídeos).

**ARBOVÍRUS** – Trata-se de vírus essencialmente transmitido por vetores artrópodes, como, por exemplo, os mosquitos.

**CHOQUE HIPOVOLÊMICO** – Forma de choque; uma condição onde o coração é incapaz de fornecer sangue suficiente para o corpo devido a perda de sangue, distúrbio circulatório ou volume sanguíneo inadequado.

**ENVELOPE** – Membrana que envolve o nucleocapsídeo de alguns vírus, composta basicamente de glicoproteínas e fosfolípidos provenientes da membrana da célula hospedeira e proteínas virais.

**EPÍTOPO** – Determinante antigênico. Parte da molécula imunogênica que é reconhecida pelo sistema imune. É a menor porção do antígeno com potencial de gerar a resposta imune.

**GAVAGE** – Substância é introduzida no aparelho digestório através de um tubo esofágico ou estomacal.

**INFECÇÃO** – Contaminação ou invasão do corpo por um microrganismo parasita, que pode ser um agente patogênico ou não, principalmente vírus, bactérias, fungos, protozoários ou helmintos.

**MOI** – Multiplicidade de infecção.

**NUCLEOCAPSÍDEO** – Genoma viral recoberto por proteína capsidial.

**PREVALÊNCIA** – Designa a medida da frequência de determinada doença, pelo número de casos existentes em período de tempo estabelecido, independentemente de serem novos ou antigos.

REPASTO SANGUÍNEO – Atividade alimentar realizada por insetos hematófagos.

VIRULÊNCIA – Capacidade patogênica de um microorganismo, medida pela gravidade dos sintomas que produzem ou por seu poder de invadir os tecidos do hospedeiro.