

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO**

**Biomedicina**

**Larissa Vieira Bio**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-DENGUE 2 (CEPA 46) *IN*  
VITRO DE COMPOSTOS DERIVADOS DE PLANTAS, FUNGO E  
BACTÉRIA**

**São Paulo**

**2016**

**Larissa Vieira Bio**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDENGUE 2 (CEPA 46) *IN*  
VITRO DE COMPOSTOS DERIVADOS DE PLANTAS, FUNGO E  
BACTÉRIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Prof. Doutora Dyana Alves Henriques e co-orientado pela Doutora Francielle Tramontini Gomes de Sousa Cardozo como requisito parcial para obtenção do título em Bacharel em Biomedicina.

**São Paulo**

**2016**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani**

Bio, Larissa Vieira

Avaliação da atividade antidengue 2 (CEPA 46) in vitro de compostos derivados de plantas, fungo e bactéria / Larissa Vieira Bio. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2016.

62 p.

Orientação de Dyana Alves Henriques

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação),  
Centro Universitário São Camilo, 2016.

1. Compostos fenólicos 2. Dengue 3. Escina 4. Glicomanana de  
Agaricus Brasiliensis 5. Produtos biológicos 6. Própolis vermelha 7.  
Técnicas in vitro I. Henriques, Dyana Alves II. Centro Universitário

**Larissa Vieira Bio**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIDENGUE 2 (CEPA 46) *IN*  
VITRO DE COMPOSTOS DERIVADOS DE PLANTAS, FUNGO E  
BACTÉRIA**

São Paulo, 31 de outubro de 2016

---

Professora Orientadora Doutora Dyana Alves Henriques

---

Professora Mestre Jeane Bueno Facioli

*Dedico este trabalho aos meus pais Marcos e Rose,*

*meus irmãos Gabriela e Caio e*

*meu namorado Leonardo.*

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, pois sem eles nada seria possível.

Ao meu namorado Leonardo Rodrigues de Souza, pelo apoio, incentivos, conselhos e parceria.

À minha orientadora Dyana Alves Henriques pelos conselhos, dicas e puxões de orelha. Por ter confiado em mim e no meu trabalho, por estar presente quando precisei e pela amizade.

À minha co-orientadora Francielle Cardozo, pela oportunidade.

À minha querida amiga Cristina Freitas Nunes, do Instituto de Medicina Tropical, por estar sempre presente, ajudando quando podia e também quando não podia. Por estar lá por mim quando eu precisasse, pela disposição e, principalmente, pela amizade que conquistei.

Aos colegas e funcionários do IMT, pelo auxílio de sempre.

À FAPESP, pela bolsa concedida no período de Iniciação Científica.

**Muito obrigada!**

*“Só é lutador quem sabe lutar consigo mesmo”*

Carlos Drummond de Andrade

## RESUMO

BIO, L. V. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-DENGUE 2 (CEPA 46) IN VITRO DE COMPOSTOS DERIVADOS DE PLANTAS, FUNGO E BACTÉRIA.** 2016. 62f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Biomedicina, Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2016.

Dengue é uma das mais importantes doenças virais transmitidas por mosquitos no mundo, causando cerca de 100 milhões de infecções sintomáticas por ano em mais de 125 países e áreas endêmicas. De janeiro até agosto de 2016, mais de 1.42 milhões de casos prováveis de dengue foram registrados no Brasil, o que teve o maior número de vírus da dengue anual infecções (DENV) notificados nas Américas. Até agora, não existe um fármaco específico disponível comercialmente para o tratamento de infecções por dengue. Dada a importância dos recursos naturais para o desenvolvimento de novas drogas antivirais, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade anti-dengue de nove compostos derivados de produtos naturais. As amostras testadas foram: EEPV, extrato etanólico de própolis verde; EEPVM, extrato etanólico de própolis vermelha; EPS *L. plantarum*, exopolissacarídeo produzido por bactérias *Lactobacillus plantarum*; EPS *Agaricus*, exopolissacarídeo produzido pelo fungo *Agaricus brasiliensis*; MI, um glucomanano micelial [(1,3) -beta-D-gluco- (1,2) -beta-D-manano] obtida a partir do fungo *Agaricus brasiliensis*; MI-S, o derivado quimicamente sulfatada de MI; SIIb, uma  $\beta$ -glicana purificada da parede do fungo *Agaricus brasiliensis*; Escina, uma mistura natural de saponinas triterpenos isolados de sementes de castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum* L). A citotoxicidade das amostras foi avaliada em células BHK-21 pelo ensaio de MTT. A atividade potencial anti-DENV-2 (cepa 46) foi avaliada por ensaio de redução de placas de lise em duas estratégias de tratamento diferentes. O tratamento simultâneo, em que as amostras foram adicionadas ao mesmo tempo da infecção pelo vírus; e o tratamento de pós-infecção, em que as amostras foram adicionadas 1 hora após a infecção pelo vírus. Os resultados foram expressos em termos de concentração 50% citotóxica ( $CC_{50}$ ) e 50% as concentrações eficazes ( $EC_{50}$ ), a fim de calcular o índice de seletividade ( $SI = CC_{50} / EC_{50}$ ) das amostras testadas que apresentassem atividade antiviral. As quatro amostras que obtiveram atividade anti-DENV-2 tiveram o  $EC_{50}$  obtido, no tratamento simultâneo para MI, MI-S, EEPVM e escina foram 41630, 278.45, 1890 ng/mL e 0.73  $\mu$ M, respectivamente, resultando nos valores de SI: 23, 150, 8 e 23, respectivamente. E no tratamento pós-infecção, apenas a escina e MI-S apresentou atividade com valores de SI de 7 e 71, respectivamente. Em conclusão, MI-S foi a amostra mais eficaz em ambos os tratamentos dentre todas amostras testadas. Devido às suas características químicas, este polissacarídeo sulfatado provavelmente atua inibindo os passos iniciais da replicação viral (adsorção e penetração), como já foi descrito para o Herpes Simplex vírus tipo 1 e 2. Além disso, este composto foi caracterizado quimicamente e pode ser produzido em biotecnologicamente média escala (biorreator de 5 litros), que mostra o seu potencial para o desenvolvimento farmacêutico.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. Dengue. Escina. Glicomanana de *Agaricus Brasiliensis*. Produtos biológicos. Própolis vermelha. Técnicas *in vitro*.

## ABSTRACT

BIO, L. V. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-DENGUE 2 (CEPA 46) IN VITRO DE COMPOSTOS DERIVADOS DE PLANTAS, FUNGO E BACTÉRIA.** 2016. 62f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Biomedicina, Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2016.

Dengue is one of the most important viral disease transmitted by mosquito-borne in the world, causing approximately 100 million symptomatic infections per year in more than 125 countries and endemic areas. From January until August 2016, more than 1.42 millions cases of dengue were recorded in Brazil, which has had the highest number of annual dengue virus (DENV) infections reported in the Americas. So far, there is no commercially available specific drug to treat dengue infections. Given the importance of natural resources in the development of new antiviral drugs, this work aimed to evaluate the anti-dengue activity of three compounds and an extract derived from natural products. The samples tested were: EEGP, a ethanolic extract of green propolis; EERP, a ethanolic extract of red propolis; EPS *L. plantarum*, an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* bacteria; EPS *Agaricus*, an exopolysaccharide produced by *Agaricus brasiliensis* fungus; MI, a mycelial glucomannan [(1,3)-beta-D-gluco-(1,2)-beta-D-mannan] obtained from the fungus *Agaricus brasiliensis* (syn *A. subrufescens*); MI-S, the chemically sulfated derivative of MI; SIIb, a purified  $\beta$ -glucana of the wall of *Agaricus brasiliensis* fungus; and Escin, a natural mixture of triterpene saponins isolated from seeds of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.). The cytotoxicity of the samples was assessed on BHK-21 cells by the MTT assay. The potential anti-DENV-2 (strain 46) activity was evaluated by viral plaque reduction assay in two different treatment strategies. The simultaneous treatment, in which samples were added at the same time of virus infection; and the post-infection treatment, in which samples were added 1 hour after virus infection. Results were expressed as 50 % cytotoxic concentrations (CC<sub>50</sub>) and 50 % effective concentrations (EC<sub>50</sub>), in order to calculate the selectivity index (SI=CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>) of each tested sample. The obtained EC<sub>50</sub> (simultaneous treatment) for MI, MI-S, EERP and Escin were 41630, 278.45, 1890 ng/mL 0.73  $\mu$ M respectively, resulting in the respective SI values: 23, 150, 8, and 23. In the post-infection treatment, only Escin and MI-S displayed activity with SI values of 7 and 71, respectively. In conclusion, MI-S was the most effective tested sample in both treatments. Due to its chemical characteristics, this sulfated polysaccharide probably acts inhibiting the initial steps of viral replication (adsorption and penetration), as already described for Herpes Simplex Virus types 1 and 2. Furthermore, this compound has been chemically characterized and can be produced biotechnologically in medium scale (5 liters bioreactor) which shows its potential for pharmaceutical development.

Keywords: *in vitro* anti-dengue activity. Natural compounds. *Agaricus brasiliensis* glucomannans. Sulfated *Agaricus brasiliensis* glucomann. Escin. Ethanolic extract of red propolis.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 Objetivo Geral .....	16
2.2 Objetivos Específicos .....	16
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	17
3.1 Materiais.....	17
3.2 Métodos.....	18
3.2.1 Avaliação da citotoxicidade in vitro dos diferentes extratos pelo método do MTT .....	18
3.2.2 Avaliação in vitro da atividade antidengue (DENV-2, genótipo Americano/Asiático) das diferentes amostras através do ensaio de placa de lise: triagem das amostras em etapas pré e pós-infectivas .....	19
<b>4 DESENVOLVIMENTO</b> .....	23
4.1 Própolis Verde.....	23
4.2 Própolis Vermelha .....	24
4.3 Agaricus subrufescens Peck (=Agaricus brasiliensis Wasser) .....	25
4.4 Escina.....	27
4.5 Lactobacillus plantarum.....	28
<b>5 RESULTADOS</b> .....	30
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	39
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	43
<b>8 ATIVIDADES REALIZADAS</b> .....	44
8.1 Lista das publicações resultantes do trabalho referido:.....	44
8.1.1 Trabalhos apresentados em conferências internacionais:.....	44
8.1.2 Trabalhos apresentados em conferências nacionais: .....	44
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	45
<b>ANEXOS</b> .....	57

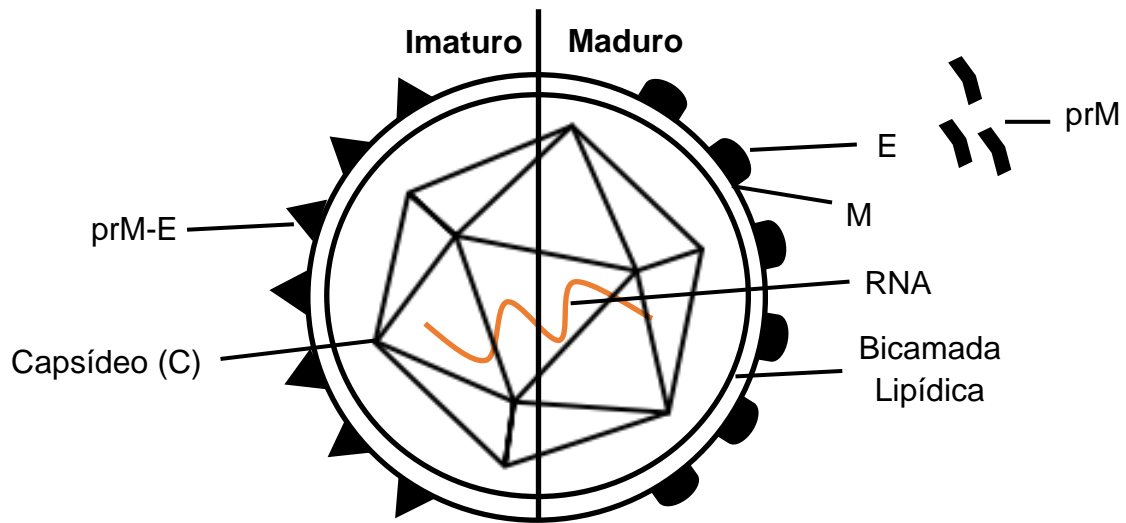
## 1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma das mais importantes doenças virais transmitidas por mosquitos, a qual atinge cerca de 2,5 bilhões de pessoas em mais de 100 países e áreas endêmicas. Anualmente, são estimados 500 mil casos de dengue hemorrágica e 22 mil mortes, ocorrendo principalmente em crianças (WHO, 2013). Um estudo realizou um levantamento epidemiológico global no período de 1960 a 2012 e estimaram que pode ocorrer cerca de 390 milhões de infecções por dengue por ano, incluindo assintomáticos, estes chegando a 75% dos casos (BHATT et al., 2013). Nas Américas, a incidência de dengue tem crescido continuamente desde a introdução do vetor, o mosquito *Aedes aegypti* na década de 1970 (KIKUTI et al., 2015).

Flavivirions são partículas esféricas de aproximadamente 50 nm de diâmetro. Cada vírion contém uma única cópia do genoma RNA polaridade positiva cercado por várias cópias da proteína do núcleo viral para formar o nucleocapsídeo viral. O nucleocapsídeo é protegido por uma bicamada lipídica com 180 cópias da proteína de envelope viral (E) disposta como uma rede bem ordenada na superfície do vírion. A glicoproteína, E, funciona na entrada viral mediando as interações do vírion com fatores de entrada e receptores, e sofrendo mudanças conformacionais. Estas alterações, catalisam a fusão de membranas virais e celulares após a exposição ao pH ácido no endossoma. Em vírions imaturos, a glicoproteína E forma trímeros em que cada monômero E é protegido por uma cópia da proteína de pré-membrana, prM (CAROCCI et al., 2015; PERERA; KUHN, 2008).

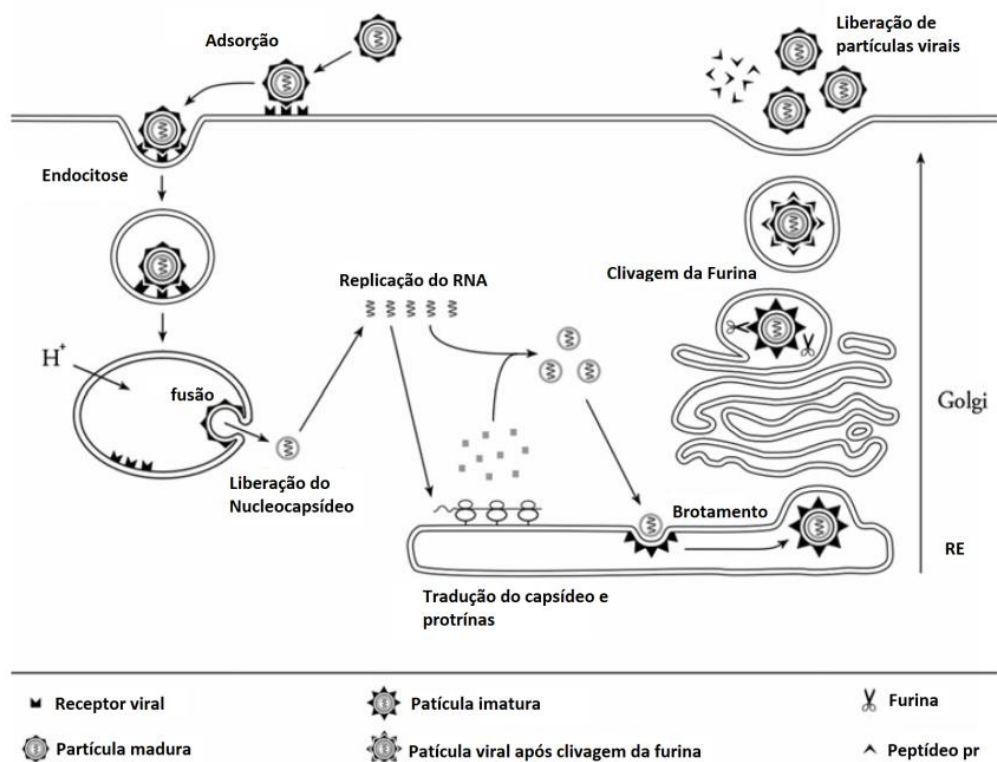
Cada trímero de heterodímeros E-prM forma um "pico" na superfície do vírion. Esta associação de E com prM impede a fusão prematura de vírions imaturos com membranas celulares no ambiente ácido do Golgi. A proteína prM é processada para pr e M pela furina e pr é liberada pelo vírion uma vez no pH neutro do espaço extracelular (Figura 1) (CAROCCI et al., 2015; CHAMBERS et al., 1990; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010).

Figura 1 - Esquemática da estrutura da partícula viral.



Fonte: Adaptado (HEINZ, F. X.; STIASNY, K, 2012).

Figura 2 - Esquemática da replicação do vírus da dengue.



Fonte: Adaptado (RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010).

O RNA viral dirige a síntese de uma poliproteína precursora. Que é processada co- e pós-traducionalmente por proteases da célula hospedeira (signalases/cisteína proteinases e furina) e uma protease codificada pelo próprio vírus (serina proteinase) para gerar as proteínas estruturais C (proteína de capsídeo), prM (precursora da proteína M) e E (proteína de envelope) e as proteínas não estruturais (NS) NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, e NS5 (CAROCCI et al., 2015). O correto processamento dessas proteínas é essencial para a replicação viral (Figura 2) e montagem do vírion infeccioso, que é composto pelas proteínas estruturais C, M e E e por uma única molécula de RNA infeccioso (CHAMBERS et al., 1990; RICE-EVANS et al., 1996; RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010)

Existe um risco de progressão da doença para a forma severa a qual ocorre particularmente na infecção cruzada de diferentes sorotipos de vírus da dengue (sorotipos 1, 2, 3 e 4). Sobre tais condições, a presença dos sintomas como sangramento, plaquetopenia, pressão arterial baixa e extravasamento plasmático, pode ser fatal (CARABALI et al., 2015).

Estudos têm focado no desenvolvimento de fármacos que atuem nas diferentes etapas do ciclo viral, em funções do hospedeiro essenciais para replicação do vírus ou ainda na patologia associada à infecção causada pelo vírus da dengue (DENV), como hemorragia e o extravasamento plasmático. Porém, até o momento ainda não há fármacos disponíveis para prevenir ou tratar infecções causadas pelo vírus da dengue, que permanecem na lista de doenças tropicais negligenciadas, e o único tratamento disponível para os pacientes é a terapia de suporte (BÄCK; LUNDKVIST, 2013; CAROCCI et al., 2015; GUZMAN et al., 2010; LAUGHLIN et al., 2012; NOISAKRAN et al., 2010; UTZINGER et al., 2012). Sendo assim, a pesquisa de agentes que possam ser desenvolvidos para o tratamento e/ou prevenção da dengue é primordial.

A utilização de produtos de origem natural com fins medicinais é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA JR et al., 2005). Dados mostram que as fontes naturais continuam sendo a principal base no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de várias doenças. Por exemplo, considerando os fármacos anti-infecciosos, que incluem antibacterianos, antifúngicos, antivirais e antiparasitários, aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA-EUA) no período de janeiro de 1981 a dezembro

de 2010, 69 % são derivados ou inspirados em produtos naturais (CRAGG; NEWMAN, 2013; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Testes de eficácia e segurança das substâncias isoladas, frações obtidas ou extratos brutos são fundamentais para a transformação de um produto natural em medicamento. A eficácia é dada pela comprovação, através de ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos, dos efeitos biológicos preconizados. A segurança é determinada pelos ensaios que comprovam a ausência de efeitos tóxicos, bem como pela inexistência de contaminantes nocivos à saúde (metais pesados, agrotóxicos, microrganismos e seus produtos de degradação) (BRASIL, 2011, 2013; KLEIN et al., 2009).

No Brasil, um país em desenvolvimento detentor de aproximadamente um terço da biodiversidade mundial, a produção de medicamentos à base de produtos naturais pode não só contribuir para a melhora das condições de saúde como também para a valorização da agrobiodiversidade nativa e fortalecimento da indústria nacional (KLEIN et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2007). Ainda, a descoberta do potencial terapêutico destes produtos certamente terá impacto nas políticas de preservação e conservação da biodiversidade nativa.

Neste contexto, a utilização de produtos de origem natural como fonte de novas moléculas é a mais importante estratégia que têm obtido sucesso na busca e desenvolvimento de novos medicamentos para tratar as mais diversas enfermidades (KADIR et al., 2013; NEWMAN; CRAGG, 2012). Logo, a própolis está entre as novas substâncias crescentemente pesquisadas para o uso terapêutico e preventivo, em várias moléstias.

A própolis é uma substância produzida por abelhas, as quais coletam materiais resinosos e balsâmicos de diferentes partes de plantas como, brotos, botões florais, folhas e cascas (BANKOVA et al., 2000; PARK et al., 2002), e com o processo de mastigação destes materiais, ocorre a adição de enzimas salivares e cera (CASTALDO; CAPASSO, 2002; PARK et al., 2002). A própolis é utilizada pelas abelhas para proteger a colmeia de insetos e microorganismos invasores, reparar frestas e manter o ambiente interno da colmeia asséptico, principalmente os locais de postura da rainha (BANKOVA et al., 2000). A própolis verde encontrada no sudeste brasileiro é produzida principalmente a partir de uma planta nativa da região sudeste a *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como alecrim do campo (PARK et al., 2002). Apresenta importantes

funções farmacológicas já demonstradas (ALENCAR et al., 2005) incluindo a ação antiviral, tanto para vírus DNA (Poxvirus aviário) quanto para RNA (Poliovírus tipo 1 e Paramixovírus tipo 1) (BÚFALO, 2009; NUNES, CRISTINA FREITAS, 2011; VILELA et al., 2011).

Já a própolis de coloração avermelhada, é proveniente da região de mangue do Estado de Alagoas, tem como origem botânica a espécie *Dalbergia ecastophyllum*, uma leguminosa conhecida popularmente como rabo-de-bugio, a qual possui um odor característico que pode variar de uma amostra para outra (ALENCAR et al., 2009; BURDOCK, G., 1998; DAUGSCH et al., 2008; MARCUCCI, 1996), ela apresenta ações antioxidante, antimicrobiana (MARCUCI, M. C. et al., 2014) e anti-inflamatória (ABREU, 2008). O fungo *Agaricus brasiliensis* é nativo no sudeste do Brasil, sendo amplamente utilizado como alimento e na medicina tradicional (LAKHANPAL; RANA, 2005), especialmente por possuir propriedades imunomodulatória (HETLAND et al., 2008; JOHNSON et al., 2008; PIRAINO, 2006; SORIMACHI; NAKAMOTO, 2011) e antitumoral (FIRENZUOLI et al., 2008; HETLAND et al., 2011; HUANG et al., 2012). Alguns extratos do fungo *Agaricus brasiliensis* mostraram ação antiviral contra o vírus da encefalite equina (WEE) (SORIMACHI et al., 2001), vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) (BRUGGEMANN et al., 2006; SORIMACHI et al., 2001), herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) (BRUGGEMANN et al., 2006) e Poliovírus 1 (PV-1) (FACCIN et al., 2007). Entretanto, a falta de determinação da sua composição química dificulta a análise destes resultados.

As enfermidades virais, as quais estão entre as principais ameaças à saúde humana e dos animais, podem ser minimizadas ou evitadas com utilização de medidas de biossegurança, bem como com emprego de agentes antivirais. Contudo, o uso indiscriminado destas substâncias pode acarretar em problemas de toxicidade e resistência, tornando necessária a utilização de doses maiores para suprimir a replicação viral (HANDEL et al., 2009; VAN ROMPAY, 2010). Deste modo, o sucesso da prevenção e tratamento de muitas infecções virais depende do desenvolvimento de novos fármacos, ou mesmo do aperfeiçoamento dos já existentes (FREESTONE, 1985).

Neste contexto o presente projeto tem como meta realizar estudos pré-clínicos (atividade antidengue *in vitro*) ainda não disponíveis na literatura de amostras derivadas de produtos nativos da biota nacional.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antidengue extratos etanólicos da própolis verde e da própolis vermelha, dos polissacarídeos e  $\beta$ - glicana do fungo *A. subrufescens* (= *A. brasiliensis*), derivados do corpo de frutificação e micélio, da Escina (saponinas triterpênicas), EPS *A. brasiliensis* e EPS *L. plantarum*

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar *in vitro* a citotoxicidade das amostras pelo método do MTT;
- b) Avaliar *in vitro* a atividade antidengue (DENV-2, genótipo Americano/Asiático) das amostras através do ensaio de placa de lise.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

Os extratos EEPV e EEPVM a serem testadas foram obtidos previamente na Universidade Bandeirante de São Paulo-UNIBAN, Laboratório de Produtos Naturais, pela MSc. Cristina Freitas Nunes sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Cristina Marcucci. E amostra do polissacarídeo (1→6)-(1→3)-β-D-glicana (FR), (1→3)-beta-D-glico-(1→2)-beta-D-manana (MI) e seu derivado sulfatado foram obtidas na Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório de Bioprocessos, pela Dr<sup>a</sup> Carla Maísa Camellini, sob a orientação do Prof. Dr. Márcio José Rossi. A nomenclatura e forma de obtenção das amostras estão compiladas na Tabela 1.

**Tabela 1 - Amostras testadas no estudo**

Amostra	Sigla	Método de obtenção	Referência (obtenção)	Referência (caracterização)
Extrato etanólico de própolis verde	EEPV	Extração com etanol, agitação, filtração da porção insolúvel, extração com etanol, agitação, evaporação.	(NUNES et al., 2012)	(NUNES et al., 2012)
Extrato etanólico de própolis vermelha	EEPVM	Extração com etanol, agitação, filtração da porção insolúvel, extração com etanol, agitação, evaporação.	(MARCUCCI, MARIA CRISTINA et al., 2014)	(MARCUCCI, MARIA CRISTINA et al., 2014)
Polissacarídeo do fungo <i>A. subrufescens</i> (= <i>A. brasiliensis</i> )	FR	Extração em água quente, precipitação com etanol e diálise.	(CARDOZO, F. T. G. S. et al., 2013a)	(CARDOZO, F. T. G. S. et al., 2013a)
Polissacarídeo do fungo <i>A. subrufescens</i> (= <i>A. brasiliensis</i> )	MI	Extração em água quente, precipitação com etanol e diálise.	(CAMELINI, 2010)	(CARDOZO, F. T. G. S. et al., 2013a)
Polissacarídeo do fungo <i>A. subrufescens</i> (= <i>A. brasiliensis</i> ) sulfatado	MI-S	Sulfatado quimicamente	(CAMELINI, 2010)	(CARDOZO, F. T. G. S. et al., 2013a; ZHANG et al., 2003)
Escina	Escina	Produto liofilizado diluído em DMSO	SIGMA®	SIGMA®
EPS <i>A. brasiliensis</i>	EPS <i>A. brasiliensis</i>	Separação por membranas em biorreator	SI <sup>1</sup>	SI <sup>1</sup>
EPS <i>L. plantarum</i> (PRDF)	EPS <i>L. plantarum</i> (PRDF)	Separação por membranas em biorreator	SI <sup>1</sup>	SI <sup>1</sup>
EPS <i>L. plantarum</i> (Gnosia)	EPS <i>L. plantarum</i> (Gnosia)	Separação por membranas em biorreator	SI <sup>1</sup>	SI <sup>1</sup>
β-Glicana purificada ( <i>A. brasiliensis</i> )	SI1b	SI <sup>1</sup>	SI <sup>1</sup>	SI <sup>1</sup>

SI<sup>1</sup>: Sem informação

## 3.2 Métodos

A metodologia a ser empregada no desenvolvimento deste projeto está descrita a seguir, de acordo com os objetivos específicos.

### 3.2.1 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos diferentes extratos pelo método do MTT

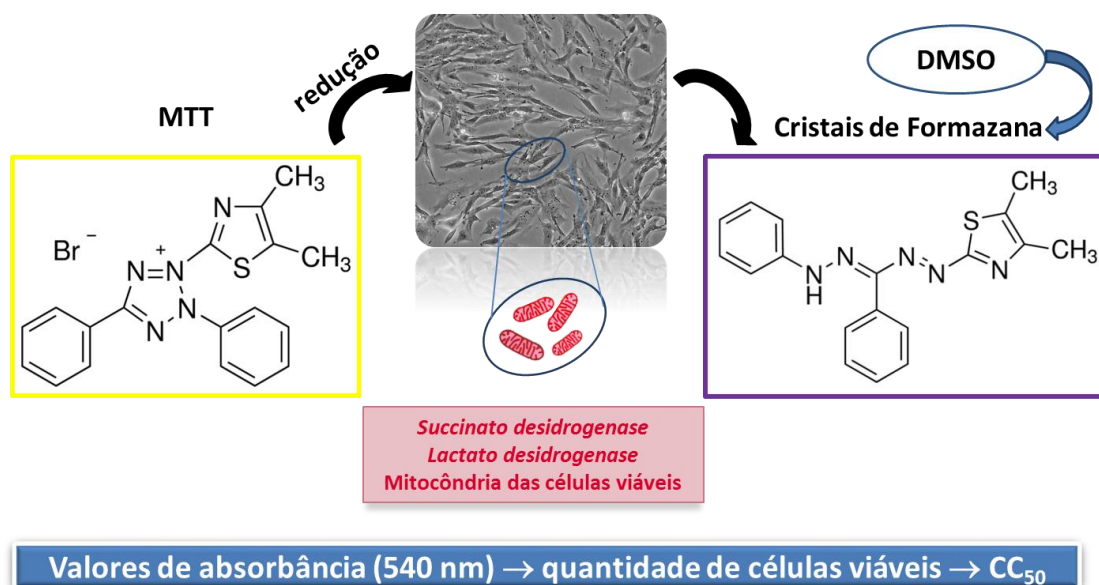
A avaliação da citotoxicidade das amostras foi efetuada através do ensaio colorimétrico com o sal de tetrazólio (MTT) (figura 3), conforme Mosmann (1983) com modificações descritas por CARDOZO et al. (2011).

Foi utilizada linhagem de células BHK-21 (C-13; ATCC CCL-10), mantida em frascos estacionários de plástico com superfície aderente de 75 cm<sup>3</sup>. O meio essencial mínimo de Eagle (MEM), com sais de Earle, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e sem antibiótico, foi utilizado para o cultivo celular, sendo os frascos mantidos a 37°C por 2-3 dias para obtenção das monocamadas confluentes. Para as suspensões celulares, as células em monocamadas confluentes dos frascos foram individualizadas com solução Tripsina-EDTA (0,2%), ressuspensas com MEM na concentração de  $8 \times 10^4$  células/mL.

Suspensões de células BHK-21 contendo  $8 \times 10^4$  células/mL, foram distribuídas em placas de 96 cavidades (100 µL/cavidade) e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24h. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por 200 µL de diferentes concentrações das amostras, preparadas em meio em diluições sucessivas (razão 1:2). Controles celulares foram realizados pela adição de meio de cultura puro. Após os tratamentos, as placas foram incubadas a 37°C por mais 72h. Posteriormente, o meio foi substituído por 15 µL da solução do MTT (1 mg/mL), e as placas novamente incubadas, por 4h. A solução do MTT foi removida e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados. A placa foi agitada e a leitura das absorbâncias realizada em espectrofotômetro a 540 nm. As porcentagens de viabilidade foram calculadas pela relação dos valores de absorbância de cada amostra com a média dos controles celulares, considerada como 100% de viabilidade. Os percentuais de viabilidade calculados, referentes às diferentes concentrações das amostras, foram inseridos no programa GraphPad Prism (versão 5.01) para o cálculo dos

valores de  $CC_{50}$ , a concentração de composto que causa redução em 50% da viabilidade celular, através da análise de regressão. Os percentuais de viabilidade calculados, referentes às diferentes concentrações das amostras, foram inseridos num gráfico de concentrações (x) versus porcentagens de citotoxicidade (y).

**Figura 3 - Esquematização da avaliação da citotoxicidade para obtenção de  $CC_{50}$  das amostras.**



Fonte: Adaptado (MOSMANN, 1983)

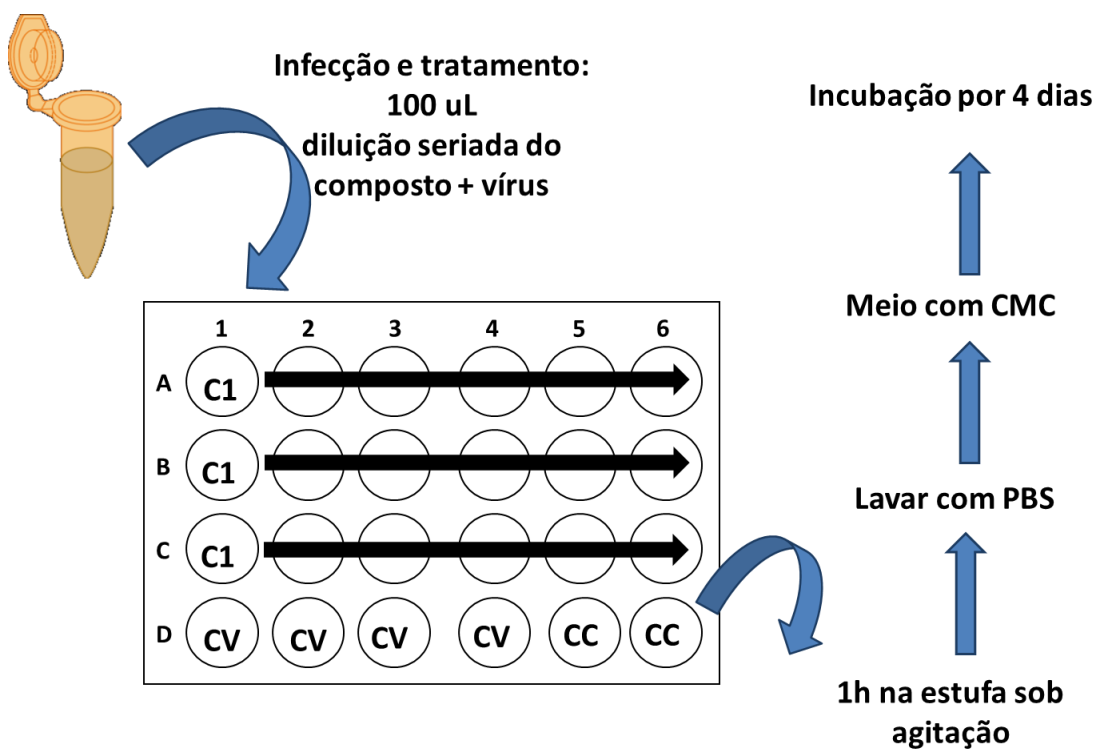
### 3.2.2 Avaliação in vitro da atividade antidengue (DENV-2, genótipo Americano/Asiático) das diferentes amostras através do ensaio de placa de lise: triagem das amostras em etapas pré e pós-infectivas

A atividade anti-DENV-2 das amostras será avaliada através do ensaio de redução da formação de placas de lise (BURLESON et al., 1992), padronizado no laboratório de Virologia do IMT da Universidade de São Paulo, conforme Amorim et al. (2012) e Cardozo et al. (2011). Nestes ensaios, será utilizado o DENV-2, que foi geneticamente caracterizado no referido Laboratório de Virologia por Romano et al. (2010).

Para tanto, as células em monocamadas confluentes dos frascos de cultivo foram individualizadas com solução Tripsina-EDTA (0,2%), ressuspensas com MEM na concentração de  $8 \times 10^4$  células/mL e adicionadas

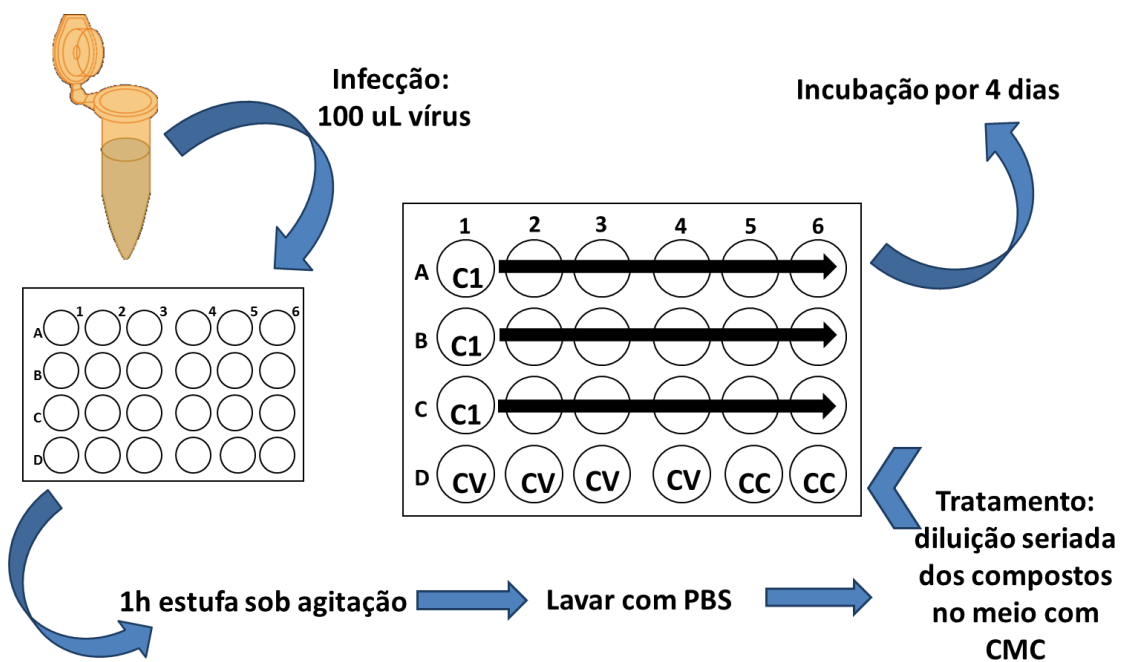
na mesma proporção em placas de 24 cavidades, e infectadas com 30 UFP (Unidades Formadoras de Placas) / cavidade. Os tratamentos foram realizados através da adição das amostras simultaneamente à infecção viral (pré-tratamento) ou depois da infecção viral (pós-tratamento). Para o pré-tratamento (figura 4), após 24 horas da semeadura das células, a monocamada celular foi infectada com uma mistura de vírus-amostra e incubadas por 1 h a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>). Em seguida, as células foram lavadas com PBS (pH 7,0) e foi adicionado meio com espessante carboximetilcelulose (CMC) a 2%. Incubadas por 4 dias, no pós-tratamento (figura 5), após 24 horas da semeadura das células, a monocamada já foi estabelecida e as células podem ser infectadas. A monocamada celular foi infectada com o DENV-2 por 1 h a 37°C (5% de CO<sub>2</sub>). Em seguida, as células foram lavadas com PBS (pH7,0) e tratadas com as diferentes concentrações das amostras diluídas em CMC a 2%. Incubadas por 4 dias. Após este período, para ambos os tratamentos, as células foram fixadas e coradas com uma solução de cristal violeta a 50% (p/v) em etanol a 50%. As placas de lise foram então contadas em microscópio estereoscópio, onde é possível visualizar as placas de lise formadas na monocamada celular (figura 6). Com os dados de porcentagem de inibição, pode-se determinar a CE<sub>50</sub> (pré e pós-tratamento), concentração do composto que inibe em 50% a replicação viral, através da análise de regressão não linear através do programa GraphPad Prism (versão 5.01). Das amostras ativas, calculou-se o índice de seletividade (IS=CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>) (COS et al., 2006). Quanto maior o IS, mais promissor é o composto testado.

Figura 4 - Esquematização dos ensaios utilizando a estratégia do pré-tratamento.



*Erro! Fonte de referência não encontrada.*

Figura 5 - Esquematização dos ensaios utilizando a estratégia do pós-tratamento.



**Figura 6 - Exemplo de placas de lise formadas após infecção com 30 PFU/mL -em células BHK-21 comparadas com o controle celular não infectado.**

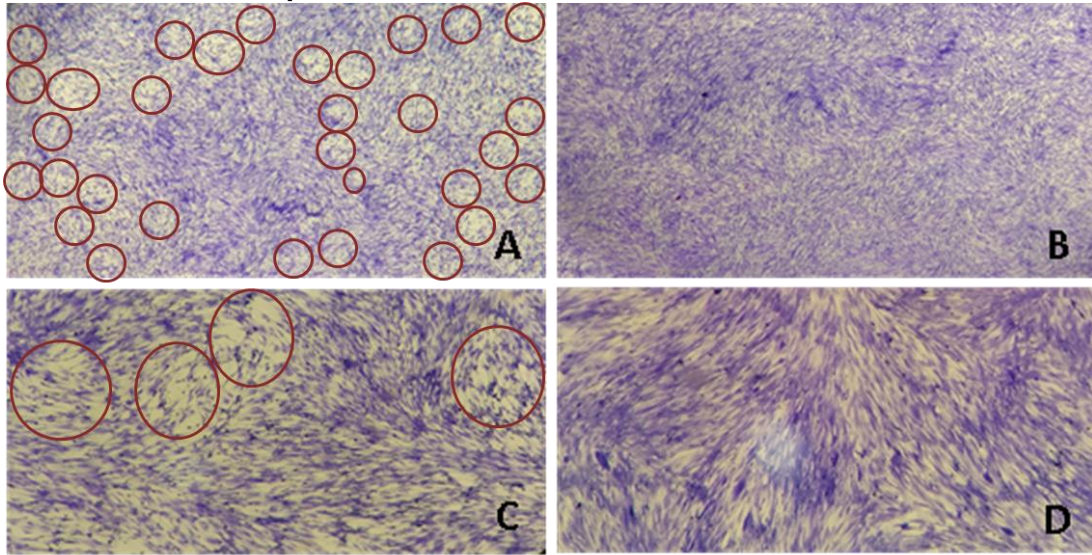


Figura 6. Observação dos resultados do ensaio de placa de lise em microscópio estereoscópico após coloração. Em A e C, o controle viral (células BHK-21 infectadas com DENV-2 (cepa 46) no menor aumento e maior aumento, respectivamente. Os círculos vermelhos indicam para placas de lise formada. Em B e D, o controle celular (células BHK-21 não infectadas) no menor e maior aumento, respectivamente.

## 4 DESENVOLVIMENTO

### 4.1 Própolis Verde

A própolis verde encontrada no sudeste brasileiro é produzida principalmente a partir de uma planta nativa da região sudeste a *Baccharis dracunculifolia* conhecida popularmente como alecrim-do-Campo, é encontrada nas regiões sul e sudeste do Brasil e também no cerrado matogrossense (FAGUNDES et al., 2001). É um arbusto dioico, com pico de floração no mês de novembro, finalizando nos períodos chuvosos (ESPÍRITO-SANTO et al., 1999). A *Baccharis dracunculifolia* é a principal fonte natural da própolis verde (ALENCAR et al., 2005), substância amplamente utilizada em função de suas propriedades farmacológicas, como atividade antimicrobiana (MARCUCCI et al., 2001), anti-inflamatória (MONTPIED et al., 2003), cicatrizante (GHISALBERTI, 1979), anestésica (BURDOCK, G. A., 1998), antitripanossoma (SILVA CUNHA et al., 2004), anticariogênica (DUARTE et al., 2003), antiviral (BURDOCK, G. A., 1998), anticarcinogênica (ISHIHARA et al., 2009), antioxidante (KUMAZAWA et al., 2004) e fitotóxica (ALENCAR et al., 2005). Essas atividades são relacionadas principalmente à presença de flavonoides, ácidos aromáticos e éteres presentes na resina (BURDOCK, G. A., 1998).

Búfalo et al. (2009) realizaram ensaios *in vitro* com células HEp-2 (célula humana de carcinoma epidermoide de laringe) e verificaram a ação antiviral, contra o Poliovírus tipo 1, dos extratos etanólicos da *B. dracunculifolia* e do EEPV. NUNES (2011), verificaram a atividade antiviral *in vitro* e *in vivo* contra o vírus da doença de Newcastle (cepa La Sota) de um EEPV. As atividades antivirais foram atribuídas principalmente, à presença de flavonoides, tais como a crisina e o canfenol (HULEIHEL; ISANU, 2002; MATSUO et al., 2005) e ésteres de ácido cinâmico, como o ferulato de isopentila (MARCUCCI, 1996).

**Figura 7 - Atividade virucida contra um Paramixovirus aviário, com destruição total do vírion**

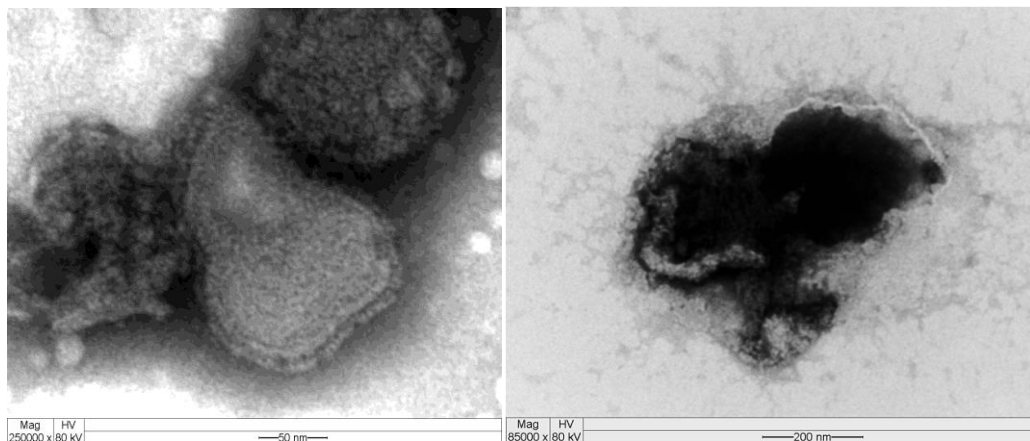


Figura 7. (a) Partículas virais esféricas medindo entre 125 a 250 nanômetros de diâmetro, apresentando um nucleocapsídeo envolto por um delicado envelope com cerca de 10 nanômetros. Controle negativo. (b) Partículas virais após incubação com o T1. Desorganização do envelope viral, projeções de hemaglutinina no formato de “corda desenrolada”. Ácido nucléico em forma de uma massa disforme, com posterior retração. Coloração negativa. Fonte: (NUNES, C. F., 2011).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de própolis, produzindo aproximadamente 160 toneladas por ano. Apesar disso, o número de patentes brasileiras de própolis é baixo. Estima-se que mais de 43% das patentes mundiais com própolis brasileiras tenham sido depositadas por instituições japonesas (ARANTES, 2014). Este cenário mostra a importância do investimento nacional em P&D deste produto, que apresenta um mercado promissor.

## 4.2 Própolis Vermelha

A própolis de coloração avermelhada, é proveniente da região de mangue do Estado de Alagoas, tem como origem botânica a espécie *D. ecastophyllum* e conhecida popularmente como rabo-de-bugio (MARCUCCI, MARIA CRISTINA et al., 2014; TRUSHEVA et al., 2006) Verificando-se a semelhança dos perfis cromatográficos de amostras de exsudatos desta espécie de planta e da própolis vermelha, verificou-se que a *D. ecastophyllum* origina esse tipo de própolis (DAUGSCH et al., 2008; MARCUCCI, MARIA CRISTINA et al., 2014).

Através do conhecimento tradicional de uso desse produto natural pelo povoado nativo, a própolis tem despertado interesse de pesquisadores na realização de estudos farmacológicos visando a sua aplicação terapêutica.

Trabalhos de TRUSHEVA et al. (2006), Abreu (2008), LUSTOSA et al. (2008), ALENCAR et al. (2009) e MARCUCCI et al. (2014) relatam ensaios *in vitro* que confirmam as ações anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana da própolis vermelha.

Estudos relacionados à caracterização química da própolis vermelha brasileira verificaram que esta possui composição diferente da própolis verde e de outras própolis conhecidas (LUSTOSA et al., 2008; MARCUCCI, MARIA CRISTINA et al., 2014). Por isso, acredita-se que esses compostos possam demonstrar atividades biológicas ainda não descritas em outras amostras de própolis previamente testadas.

#### 4.3 *Agaricus subrufescens* Peck (= *Agaricus brasiliensis* Wasser)

No Brasil, este fungo basidiomiceto é conhecido popularmente como cogumelo-do-sol e amplamente utilizado devido às suas propriedades medicinais (LAKHANPAL; RANA, 2005). Este cogumelo foi descoberto na cidade de Piedade-SP em 1960, pelo produtor e pesquisador japonês, Takatoshi Furumoto. Sua primeira identificação foi como *A. blazei* Murrill pelo botânico belga Heinemann. Com a morte de Furumoto, o cultivo deste cogumelo foi abandonado. Em 1990 o interesse pela espécie retornou e ocorreu um intenso cultivo e ampla utilização deste fungo na culinária e na medicina tradicional, atuando contra o estresse físico e mental, estimulando o sistema imune, aumentando a qualidade de vida de diabéticos, reduzindo o colesterol e auxiliando no tratamento do câncer (DIAS et al., 2008; FIRENZUOLI et al., 2008).

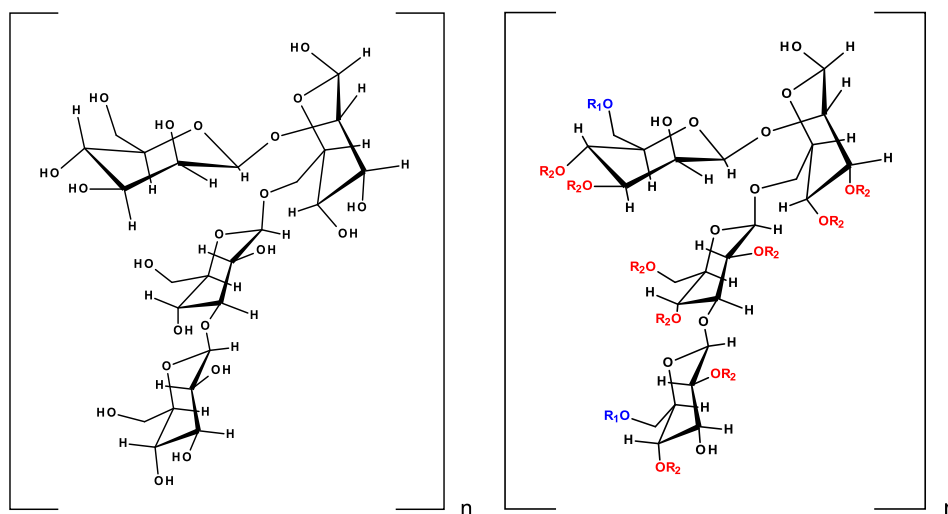
Embora alguns usos populares deste fungo tenham sido confirmados, a sua atividade antiviral foi pouco pesquisada. Trabalhos anteriores que testaram diferentes extratos de *Agaricus subrufescens* Peck (*Agaricus brasiliensis* Wasser), demonstram *in vitro* a inibição da multiplicação do vírus da encefalite equina (SORIMACHI et al., 2001), do herpesvírus simples tipo 1 (BRUGGEMANN et al., 2006; SORIMACHI et al., 2001), do herpesvírus bovino tipo 1 (BRUGGEMANN et al., 2006; MINARI et al., 2011) e do poliovírus tipo 1 (FACCIN et al., 2007). Além disso, um estudo realizado em camundongos, que receberam uma vacina de DNA recombinante contra o vírus da hepatite B, e

também extratos deste cogumelo, detectou um aumento de 3-4 vezes na produção de anticorpos específicos contra o vírus (anti-HBc), em relação aos controles (CHEN et al., 2004). Nas últimas décadas, vários estudos têm mostrado as propriedades citotóxicas e antitumorais dos polissacarídeos de *A. brasiliensis*, que age principalmente no mecanismo imunomodulador, mas também por efeitos citotóxicos diretos nas células tumorais (CARDOZO, F. et al., 2013; ZHANG et al., 2007).

Polissacarídeos são uma classe estruturalmente diversa de macromoléculas para o qual propriedades físico-químicas e biológicas são dependentes de uma combinação de fatores, como a composição sacarídica, peso molecular e conformação de cadeia (CARDOZO, F. T. G. S. et al., 2013a; YANG; ZHANG, 2009). Cardozo et al (2011), avaliou a atividade anti-herpética (HSV-1 e HSV-2) de polissacarídeos obtidos dos corpos de frutificação (cogumelos) do *A. subrufescens* (FR) e seus derivados sulfatados (FR-S) em ensaios *in vitro*. Avaliou também a atividade anti-herpética (Herpes Simplex Virus tipo 1 - HSV-1 e Herpes Simplex Virus tipo 2 - HSV-2) de polissacarídeos do micélio (MI) e do respectivo derivado sulfatado em ensaios *in vitro* (CARDOZO et al., 2011) e *in vivo* (CARDOZO, F. T. G. S. et al., 2013b). Os resultados demonstraram uma atividade anti-HSV-1 e HSV-2 promissora para os derivados sulfatados (FR-S, *in vitro*; MI-S *in vitro* e *in vivo*).

Alguns estudos prévios verificaram a atividade biológica de polissacarídeos isolados do corpo de frutificação do *A. subrufescens*. Por exemplo, foi demonstrada a atividade imunomoduladora *in vitro* em células THP-1 dos polissacarídeos 1,6- $\beta$ -glicana, 1,6-1,4- $\alpha$ -glicana, e manogalactana (SMIDERLE et al., 2013; SMIDERLE et al., 2011). Yamanaka et al. (2012) isolaram o polissacarídeo 1,6- $\beta$ -glicana com traços de 1,3- $\beta$ -glicana e demonstraram a atividade imunoestimulante *in vitro* em esplenócitos murinos e células dendríticas derivadas de medula óssea. Kozarski et al. (2014) verificaram a atividade imunoestimulatória e o efeito antioxidante *in vitro* em PBMCs (células mononucleares do sangue periférico humano) da 1,6- $\beta$ -glicana.

**Figura 8 - Estrutura molecular do MI e MI-S.**



Fonte: (CARDOZO, F. T. G. S. et al., 2013a)

#### 4.4 Escina

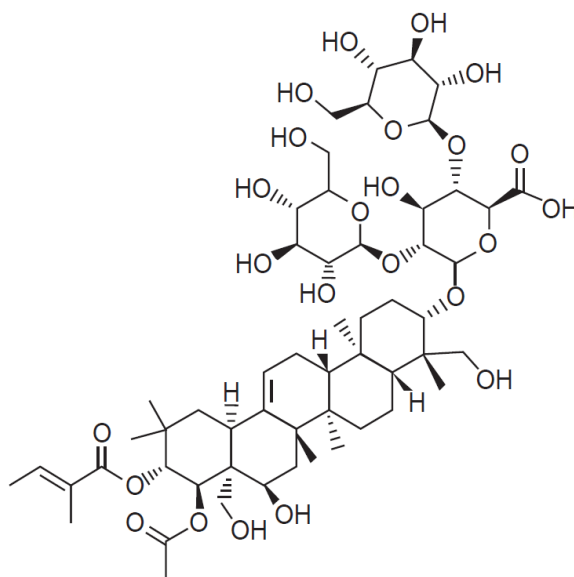
Escina é uma mistura de saponinas triterpênicas (SIRTORI, 2001; VAN DYCK et al., 2010), que são encontradas em dicotiledôneas (VAN DYCK et al., 2010), como a *Aesculus hippocastanum* (*Hippocastanaceae*), popularmente conhecida como castanha-da-índia, amplamente distribuída pelo mundo por conta da sua adaptabilidade as condições ambientais (SIRTORI, 2001). Essa mistura de saponinas é extraída das sementes de *A. hippocastanum* (SIRTORI, 2001). Saponinas são glicosídeos do metabolismo secundário vegetal, caracterizados pela formação de espuma, tendo propriedades de detergentes e surfactantes (VAN DYCK et al., 2010).

Hoje é utilizada clinicamente como uma droga anti-edema e anti-exsudação. Foi demonstrado o efeito de melhora na microcirculação, no início da inflamação, a escina age bloqueando o efeito na arteríola o que leva a um decaimento da permeabilidade endotelial, portanto pode inibir a exsudação. Em um estágio avançado de inflamação, a escina pode inibir a reação inflamatória mediada pela histamina, prostaglandina e bradicinina. E ainda mais, a escina pode interferir na bomba de Sódio/Potássio ATPase. E todos esses efeitos ajudam na eliminação do edema (LIU et al., 2008).

Em um estudo realizado na Universidade Chinesa de Hong Kong, pesquisadores utilizaram os ácidos oleicos das saponinas triterpênicas para

inibir a replicação do vírus HIV-1, isso se deu provavelmente pela inibição da protease do vírus (MENGONI et al., 2002). A atividade antiviral da escina também já foi descrita contra o coronavírus Sars-CoV, vírus causador da Síndrome respiratória aguda severa (SARS) (BAIBADO; CHEUNG, 2010).

**Figura 9 - Estrutura molecular da Escina (constituente primário das sementes de *Aesculus hippocastanum*).**



Fonte: (BAIBADO; CHEUNG, 2010).

#### 4.5 *Lactobacillus plantarum*

É uma bactéria ácido-láctica gram positiva, não formadora de esporo, fermentadora, que cresce anaerobicamente e é tradicionalmente aplicada a conservação de uma variedade de produtos de alimentos fermentados (DE VRIES et al., 2006).

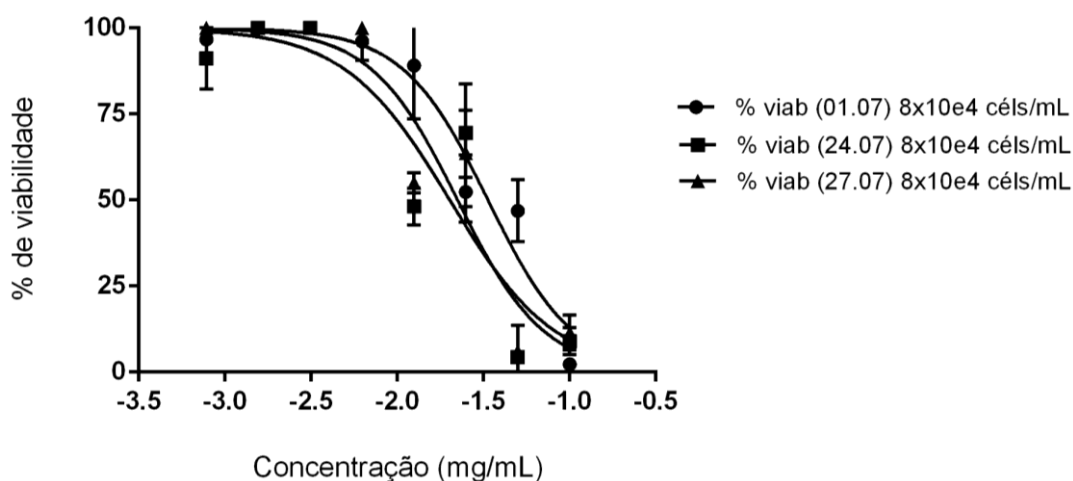
Algumas bactérias ácido-láticas produzem o exopolissacarídeo (EPS), que geralmente desempenha o papel principal como um texturizador natural na produção industrial de iogurte, queijo, sobremesas a base de leite, etc. O EPS produzido por essas bactérias tem recebido uma maior atenção, principalmente por causa dos seus benefícios à saúde. Alguns estudos investigam a estimulação do sistema imune, antimutagenicidade e atividade antitumoral, a partir do consumo diário de produtos fermentados preparados com EPS de bactérias ácido-láticas (HARUTOSHI, 2013; TALLON et al., 2003). O grupo

fosfato contido no EPS desempenha um papel importante na ativação dos macrófagos e linfócitos (TALLON et al., 2003). Macrófagos são os principais operadores da imunidade inata devido a suas funções de sentinela. É a população mais abundante de fagócitos no intestino onde entram em contato com as bactérias ingeridas, incluindo Lactobacilos. Os macrófagos possuem receptores de membrana que reconhecem os micro-organismos, através de sinais citoplasmáticos e agem de acordo com a periculosidade dos mesmos (MIETTINEN et al., 2012).

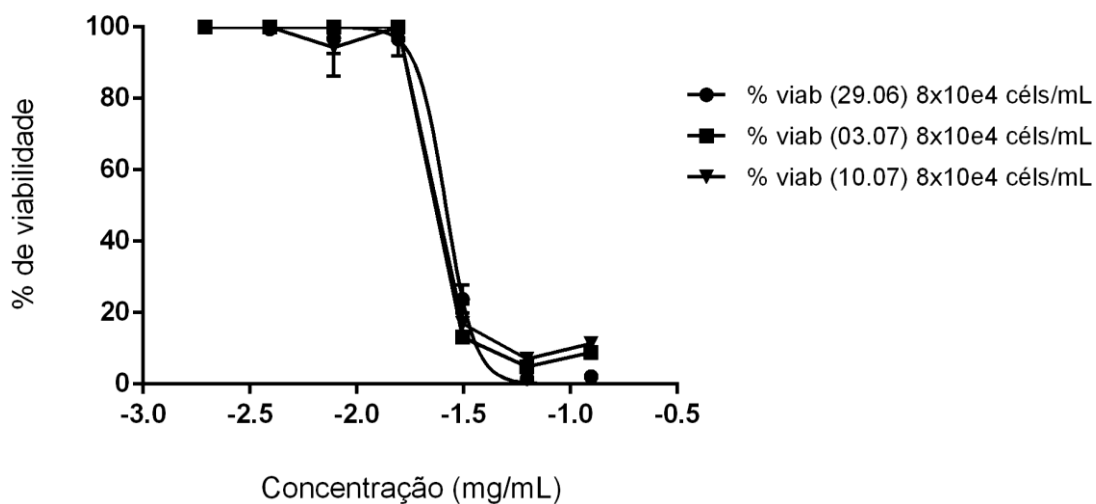
## 5 RESULTADOS

Com a obtenção de três curvas concentração vs % viabilidade obtidas em dias diferentes, foi possível determinar a média  $\pm$  desvio padrão da  $CC_{50}$  para os 9 compostos testados: EEPV (gráfico 1), EEPVM (gráfico 2), FR (gráfico 3), MI (gráfico 4), MI-S (gráfico 5), Escina (gráfico 6), EPS *Agaricus* (gráfico 7), EPS *Plantarum* PRDF (gráfico 8), EPS *Plantarum* Gnosia (gráfico 9) e SIIb (gráfico 10).

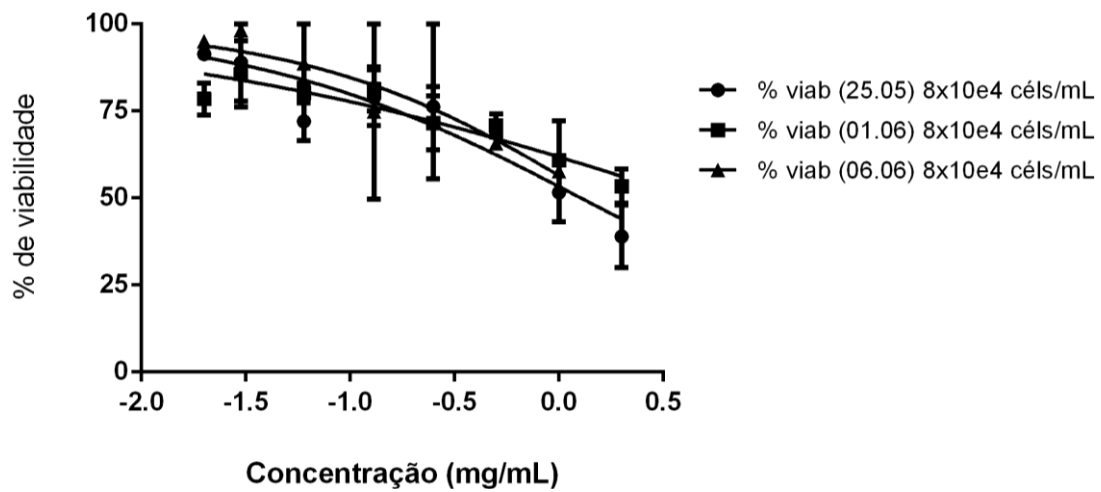
**Gráfico 1 - Citotoxicidade do EEPV em células BHK-21 em três diferentes experimentos em três dias distintos.**



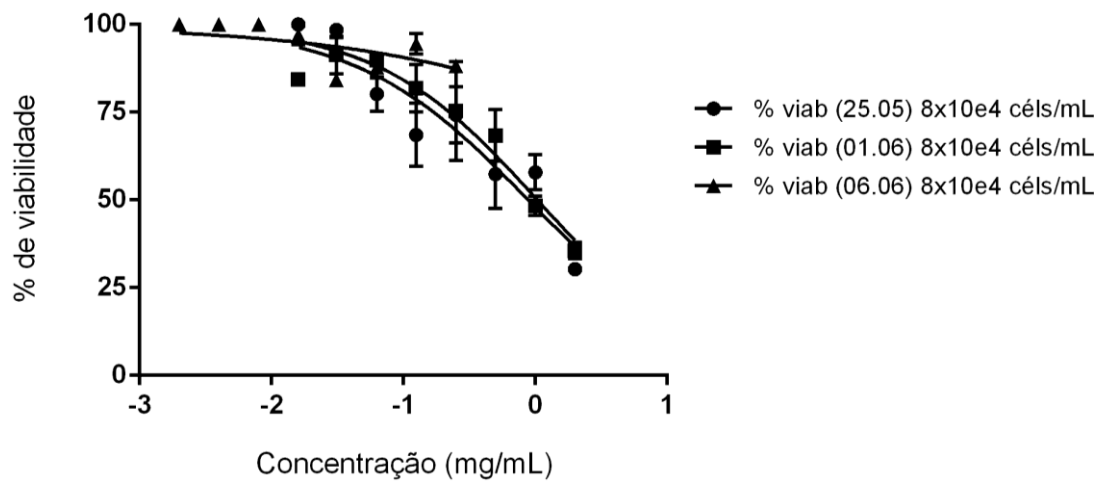
**Gráfico 2 - Citotoxicidade do EEPVM em células BHK-21 em três diferentes experimentos em três dias distintos.**



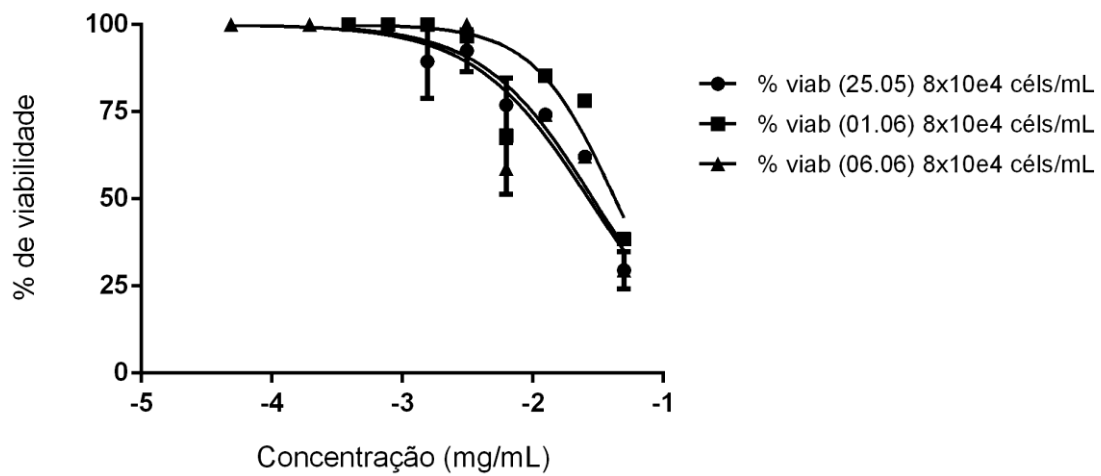
**Gráfico 3 - Citotoxicidade do FR em células BHK-21 em três diferentes experimentos em três dias distintos.**



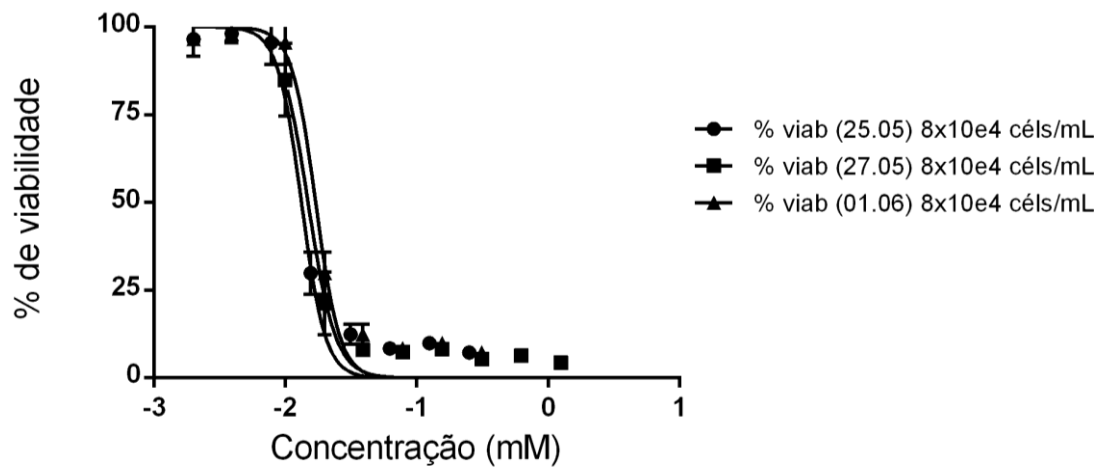
**Gráfico 4 - Citotoxicidade do MI em células BHK-21 em três diferentes experimentos em três dias distintos.**



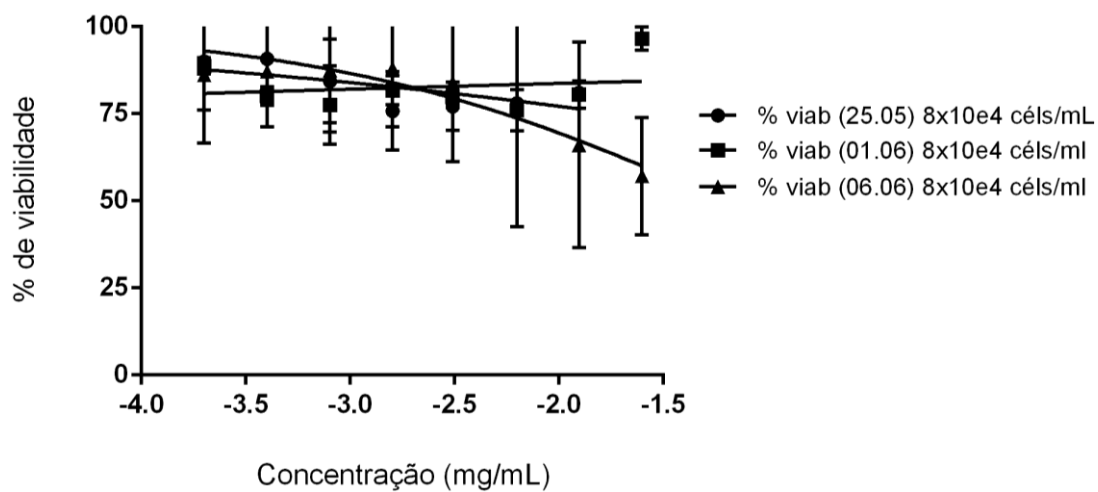
**Gráfico 5 - Citotoxicidade do MI-S em células BHK-21 em três diferentes experimentos em três dias distintos.**



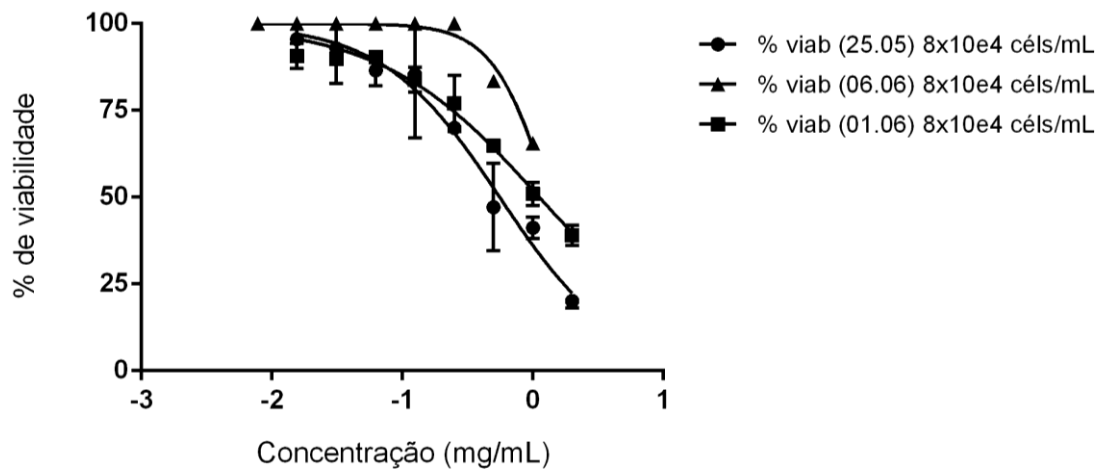
**Gráfico 6 - Citotoxicidade do MI-S em células BHK-21 em três diferentes experimentos em três dias distintos.**



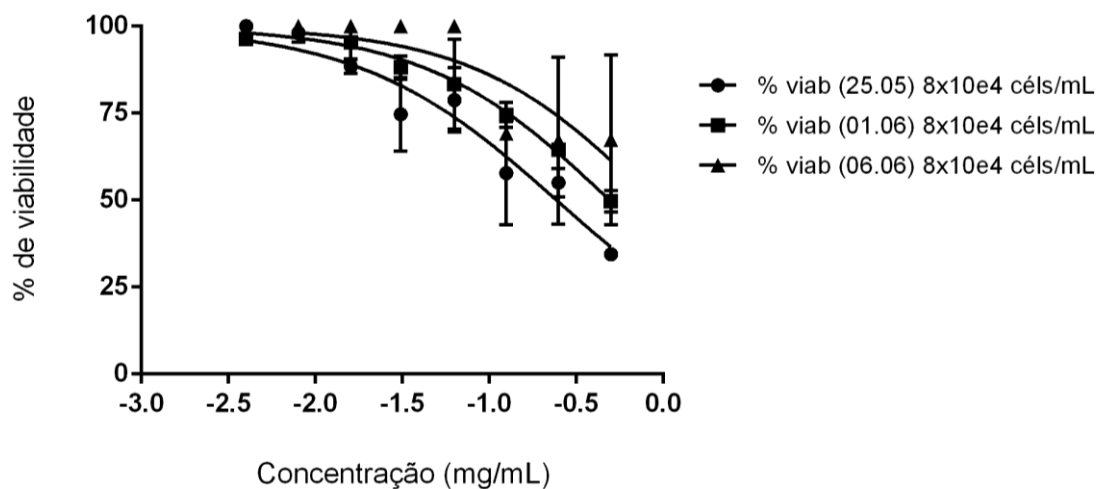
**Gráfico 7 - Citotoxicidade da EPS *Agaricus* em células BHK-21 em três diferentes experimentos em três dias distintos.**



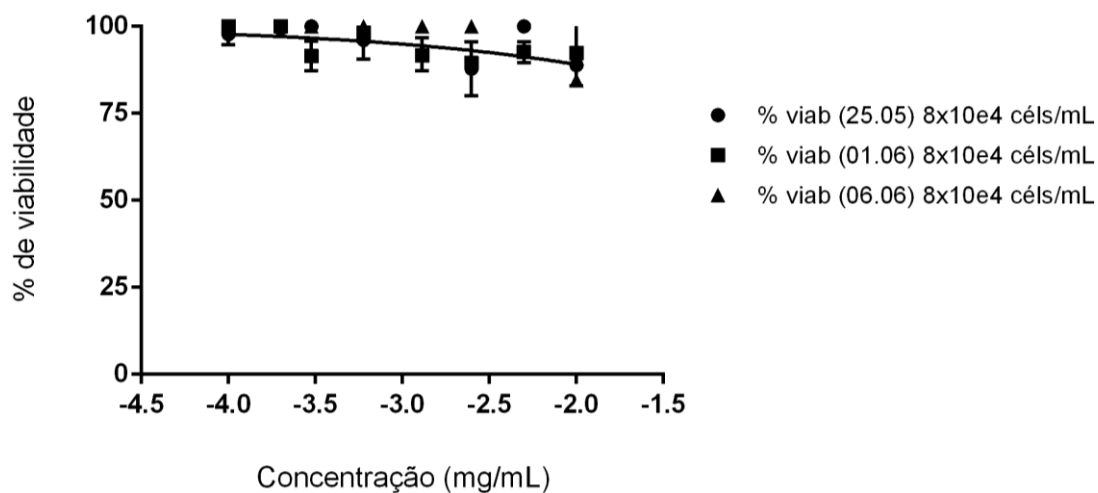
**Gráfico 8 - Citotoxicidade da EPS *L. plantarum* PRDF em células BHK-21 em três diferentes experimentos em três dias distintos.**



**Gráfico 9 - Citotoxicidade da EPS *L. plantarum* Gnosia em células BHK-21 em três diferentes experimentos em três dias distintos.**



**Gráfico 10 - Citotoxicidade da SI1b em células BHK-21 em três diferentes experimentos em três dias distintos.**



Com três curvas de concentração vs % de inibição, foi possível determinar a média  $\pm$  desvio padrão da CE<sub>50</sub> dos compostos que tiveram atividade anti-DENV-2 (cepa 46) no pré e pós-tratamento. Os resultados estão compilados na tabela 2.

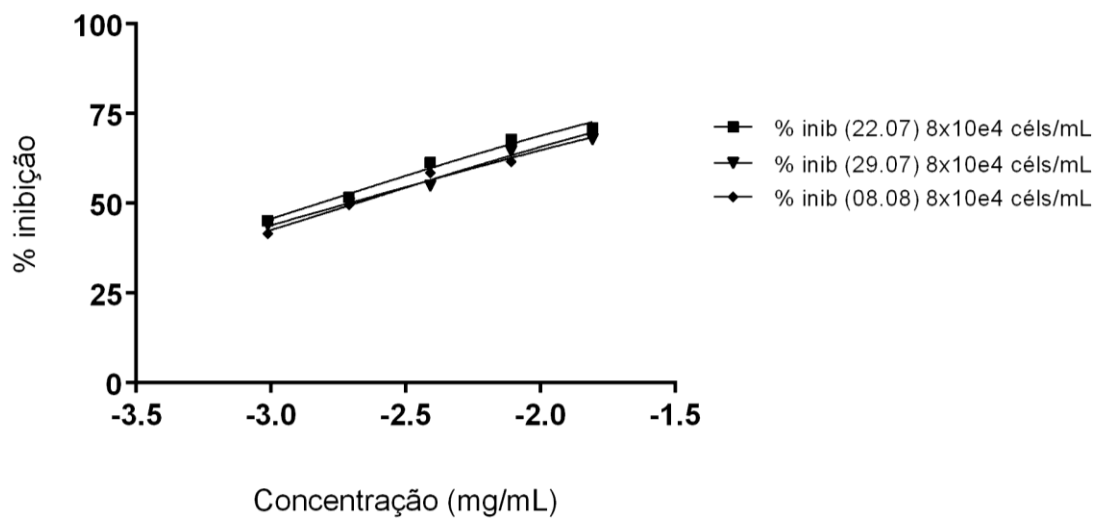
**Tabela 2: Resultados de citotoxicidade e atividade antidengue de diferentes compostos.**

Composto	Citotoxicidade CC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	Atividade antidengue			
		Pré-tratamento CE <sub>50</sub> <sup>b</sup>	IS <sup>c</sup>	Pós-tratamento CE <sub>50</sub> <sup>b</sup>	IS <sup>c</sup>
1. EEPV	69910 ± 24310	SA <sup>d</sup>	-	SA <sup>d</sup>	-
2. EEPVM	15710 ± 900	1890±420	8	SA <sup>d</sup>	-
3. FR	20980 ± 12344	SA <sup>d</sup>	-	SA <sup>d</sup>	-
4. Escina	16,98 ± 2,08	0,73 ± 0,20	23	2,59 ± 0,48	7
5. MI	966900 ± 100550	41630 ± 1120	23	SA <sup>d</sup>	-
6. MI-S	41540 ± 353,55	278,45 ± 137,56	150	585,5 ± 11,59	71
	12,49 ± 3,52				
7. EPS <i>A. brasiliensis</i>		SA <sup>d</sup>	-	SA <sup>d</sup>	-
8. EPS <i>L. plantarum</i> (PRDF)	839850 ± 400430	SA <sup>d</sup>	-	SA <sup>d</sup>	-
9. EPS <i>L. plantarum</i> (Gnosia)	372250 ± 182220	SA <sup>d</sup>	-	SA <sup>d</sup>	-
10. SI1b	162865 ± 89850	SA <sup>d</sup>	-	SA <sup>d</sup>	-

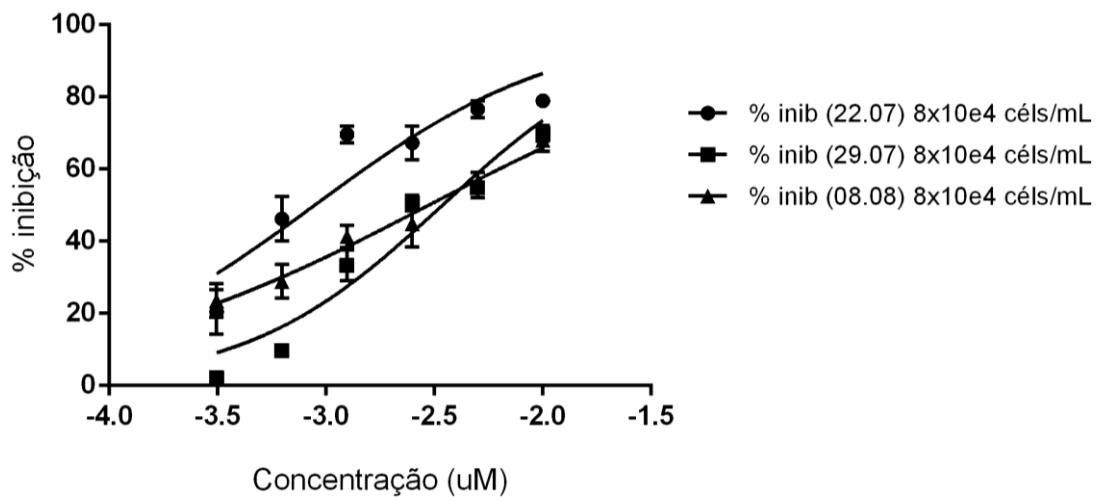
<sup>a</sup>CC<sub>50</sub>: concentração 50% citotóxica; <sup>b</sup>EC<sub>50</sub>: Concentração 50% inibitória; <sup>c</sup>IS: índice de seletividade (IS=EC<sub>50</sub>/CC<sub>50</sub>); <sup>d</sup>SA: Sem atividade. Os valores representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes, expressos em µM para Escina e ng/mL para os demais compostos.

As curvas de CE<sub>50</sub> (tabela 1), estão representadas nos gráficos 11, 12, 13, 14 e 15.

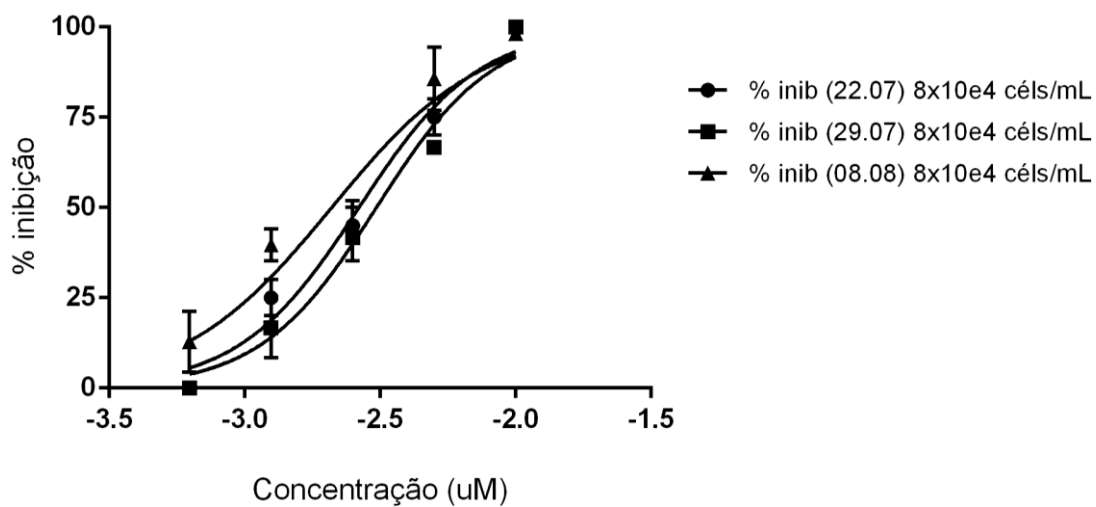
**Gráfico 11 - Atividade anti-DENV-2 do EEPVM no pré-tratamento em três diferentes experimentos em três dias distintos.**



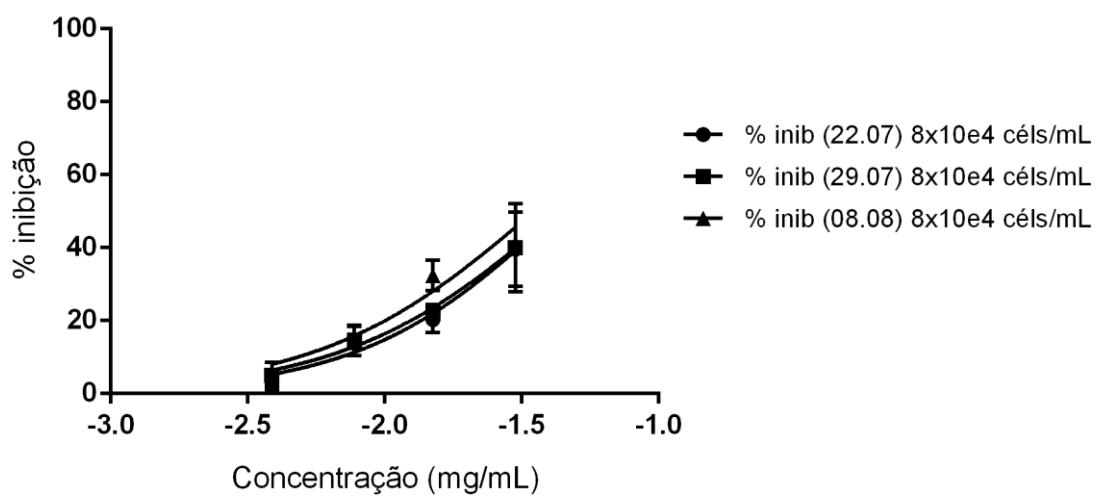
**Gráfico 12 - Atividade anti-DENV-2 da Escina no pré-tratamento em três diferentes experimentos em três dias distintos.**



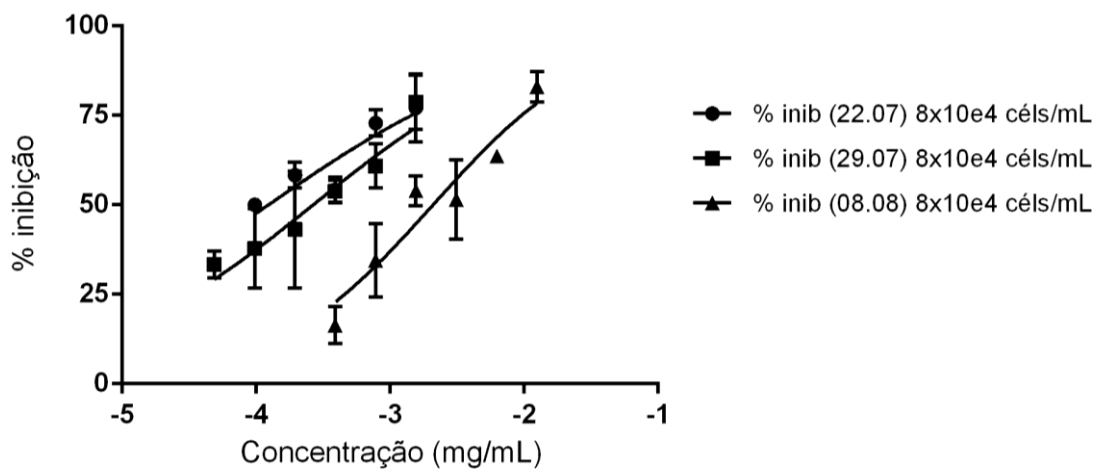
**Gráfico 13 - Atividade anti-DENV-2 do Escina no pós-tratamento em três diferentes experimentos em três dias distintos.**



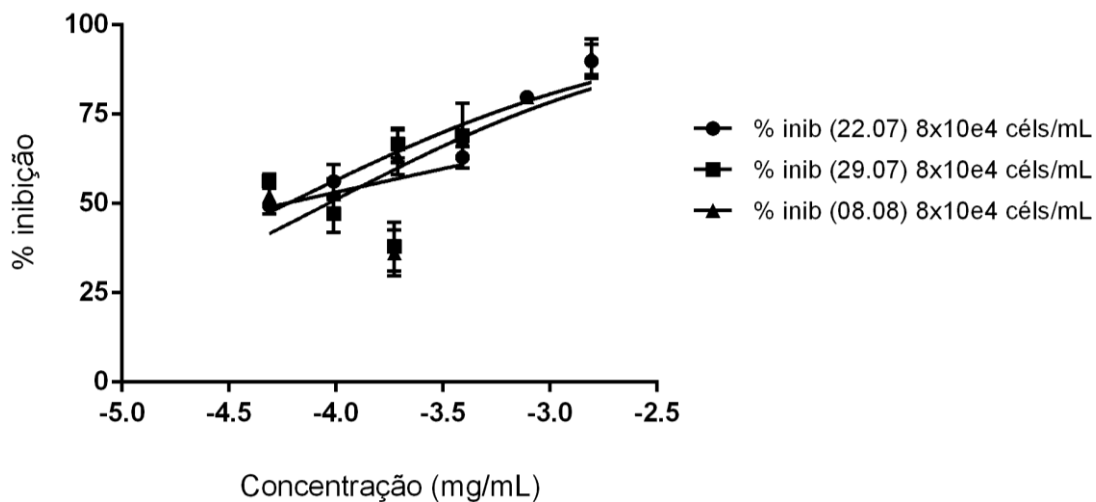
**Gráfico 14 - Atividade anti-DENV-2 do MI no pré-tratamento em três diferentes experimentos em três dias distintos.**



**Gráfico 15 - Atividade anti-DENV-2 do MI-S no pré-tratamento em três diferentes experimentos em três dias distintos.**



**Gráfico 16 - Atividade anti-DENV2 do MI-S no pós-tratamento em três diferentes experimentos em três dias distintos.**



## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo, a atividade antidengue *in vitro* não foi observada para todas as amostras testadas. Dentre as que demonstraram atividade, foi possível notar resultados mais satisfatórios utilizando a estratégia de pré-tratamento, onde o composto testado fica em contato com o vírus no momento da infecção das células durante uma hora. A ausência do efeito antiviral das amostras testadas pode se dar devido as concentrações testadas, uma vez que se faz necessário realizar um ensaio de citotoxicidade das amostras, para posteriormente efetuar os ensaios antivirais. Com isso as concentrações não citotóxicas testadas podem não apresentar efetividade contra o vírus estudado, pois a diluição do composto que não apresentou citotoxicidade para as células utilizadas neste estudo, é muito alta.

Foi reportado que a própolis possui atividade biológica valiosa, como atividades antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral (VIUDA-MARTOS et al., 2008). Essas várias atividades biológicas são atribuídas aos vários componentes da própolis, como os flavanoides, ácidos aromáticos, ésteres, aldeídos, quetonas, ácidos graxos, terpenas, esteroides, amino ácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, álcoois e hidrobzeno (PIRAINO, 2006). Os flavonoides na própolis são considerados por serem os responsáveis pela atividade antiviral (ZANDI et al., 2011, 2012, 2014).

Neste trabalho, a amostra EEPV não apresentou atividade anti-DENV-2, não corroborando com os dados da literatura demonstrados acima. Um recente estudo confirma a ação antiviral de extratos etanólicos de própolis verde que obtiveram efetividade contra HSV-1, e, acredita-se que o extrato testado aja principalmente em etapas de replicação e adsorção viral (MAZIA et al., 2016).

Já a amostra de EEPVM, apresentou uma pequena atividade anti-DENV-2 com IS de 8 (Tabela 2) no pré-tratamento, sendo favorável as publicações literárias que confirmam a existência de atividade antiviral. ZANDI et al. (2011), testou quatro bioflavonoides, dentre eles três são componentes descritos para própolis vermelha (MARCUCCI, MARIA CRISTINA et al., 2014) que são: quercetina, naringenina e daidzeína. Uma pesquisa demonstrou que a

quercetina foi o principal flavonoide a apresentar uma consistente atividade anti-DENV-2, acredita-se que o composto afete replicação viral intracelular (ZANDI et al., 2011).

Possivelmente a atividade antiviral da própolis não seja causada por apenas um composto químico, mas por um conjunto sinérgico entre seus constituintes (NOLKEMPER et al., 2010).

A atividade observada neste estudo, provavelmente está vinculada aos altos níveis de compostos fenólicos e flavonoides presentes na própolis vermelha testada (MARCUCCI, M. C. et al., 2014), os quais podem atuar sobre o envelope viral (BRUM, 2006; FORMICA; REGELSON, 1995). Há sugestão de autores, de que a ação da própolis cause sobre o vírus uma degradação e desorganização das glicoproteínas do envelope viral, e proteínas que compõe o nucleocapsídeo, expondo o material genético (NOLKEMPER et al., 2010) por possuírem altas concentrações de compostos flavonóides, como os ácidos cinâmico e ácidos cafeicos.

As propriedades físico-químicas dos extratos de própolis, variam de acordo com a sazonalidade, região, vegetação, o período em que os materiais utilizados para a produção da própolis (brotos e partes das folhas das plantas) são coletados pelas abelhas, além da variabilidade genética das abelhas rainhas (PARK et al., 1998; PARK et al., 2002; DOS SANTOS, et al., 2003). Isso pode explicar o motivo pelo qual não houve atividade antidengue na amostra de EEPV e pouca atividade na amostra de EEPVM diferente do que relataram outros autores.

Segundo Búfalo et al. (2009) foram realizados ensaios *in vitro* com células HEp-2 (célula humana de carcinoma epidermoide de laringe) e verificou-se a ação antiviral, contra o Poliovírus tipo 1, dos extratos etanólicos da *B. dracunculifolia* e da própolis verde. NUNES et al. (2011), verificaram a atividade antiviral *in vitro* e *in vivo* contra o vírus da doença de Newcastle (cepa La Sota) de um extrato etanólico da própolis verde. As atividades antivirais foram atribuídas principalmente, à presença de flavonoides, tais como a crisina e o canfenol (HULEIHEL; ISANU, 2002; MATSUO et al., 2005) e ésteres de ácido cinâmico, como o ferulato de isopentila (MARCUCCI, 1996).

Os exopolissacarídeos (EPS) são macromoléculas compostas de monossacarídeos e derivados e a sua função e aplicação são principalmente dependentes da composição desses monossacarídeos, peso molecular e ramificações (DILNA et al., 2015; HARUTOSHI, 2013; RUAS-MADIEDO et al., 2002). Os EPS são produzidos por plantas, algas, fungos e bactérias (DILNA et al., 2015). No caso da bactéria, a camada mais externa do EPS as protege da dissecação, ataque de fagócitos e ajuda a formação de biofilme (DILNA et al., 2015; HARUTOSHI, 2013; RUAS-MADIEDO et al., 2002).

Além disso, o EPS dessas bactérias tem benefícios para a saúde como antioxidante, antitumor e atividades imunomoduladoras. A atividade imunomoduladora consiste em indução da IL-6, IL-1b e produção de TNF- $\alpha$  e desse modo, fagocitose (LIU et al., 2011). DILNA et al., (2015) estudou o EPS da bactéria *Lactobacillus plantarum* RJF4 e reportou que essa bactéria produz heteropolissacarídeo composto de glicose e manose. E esse EPS mostrou propriedades antioxidantes que puderam ser comparadas com a do potente antioxidante, ácido ascórbico. E, também, reduziu os níveis de colesterol naturais e habilidade de inibir a enzima  $\alpha$ -amilase.

GROBEN et al., (1997) realizou estudos e relatou que diferentes composições de exopolissacarídeos podem ser sintetizados a partir de uma mesma espécie de bactéria ácido-láctica, dependendo das condições de fermentação utilizadas e técnicas de isolamento e purificação. Os meios de cultura e as condições de crescimento da bactéria, influenciam nas ligações glicosídicas e, conseqüentemente, na composição dos heteropolissacarídeos (DE VUYST; DEGEEST, 1999).

Dentre as atividades reportadas e conhecidas para o EPS, não existia ainda a propriedade antiviral, e neste estudo confirmamos a não existência dessa atividade biológica.

As propriedades antivirais de extratos completos ou de compostos isolados dos cogumelos têm sido amplamente descrito. Eles podem causar inibição direta de enzimas virais, síntese de ácidos nucleicos virais e/ou adsorção e liberação de vírus da célula hospedeira (CARDOZO, F. et al., 2013; PIRAINO, 2006). Há a hipótese de que a ação antiviral dos polissacarídeos sulfatados ocorra pelo fato de que esta molécula possui semelhança estrutural com as proteoglicanas heparan-sulfato, estas macromoléculas estão associadas à

superfície celular e matriz extracelular de uma ampla variedade de células de tecidos de vertebrados e invertebrados, sendo cofatores essenciais nos processos da ligação viral. Com isso o vírus acaba se ligando ao polissacarídeo sulfatado inibindo a entrada do vírus na célula (PUJOL et al., 2012).

Os resultados compilados na tabela 2, claramente mostraram que o MI-S (polissacarídeo sulfatado) foi o composto mais promissor que apresentou atividade anti-DENV-2 nas duas estratégias de tratamento testadas com índices de seletividade de 150 e 71 no pré e pós-tratamento, respectivamente. A continuação dos estudos se faz necessária, a fim de investigar o mecanismo da atividade detectada. Devido às suas características químicas e a alta efetividade no pré-tratamento, suspeita-se que esse polissacarídeo sulfatado aja principalmente como um inibidor de entrada. De fato, o MI-S demonstrou previamente, inibição da adsorção e penetração dos HSV-1 e HSV-2, como também, síntese de proteína viral do HSV-1 (CARDOZO, F. et al., 2013; CARDOZO et al., 2011; CARDOZO, F. T. G. S. et al., 2013b).

## 7 CONCLUSÃO

Após a avaliação da atividade antidengue de extratos etanólicos da própolis verde e da própolis vermelha, dos polissacarídeos e  $\beta$ - glicana do fungo *A. subrufescens* (= *A. brasiliensis*), derivados do corpo de frutificação e micélio, da Escina (saponinas triterpênicas), EPS *A. brasiliensis* e EPS *L. plantarum*, conclui-se que o MI-S (polissacarídeo derivado do micélio de *A. brasiliensis*) foi o mais efetivo dentre as amostras testadas, nas duas estratégias de tratamento. Devido a sua característica química, esse polissacarídeo sulfatado provavelmente age inibindo os estágios iniciais da replicação viral, como adsorção e penetração. Além disso, esse composto foi quimicamente caracterizado e pode ser produzido biotecnologicamente em média escala (biorreator de 5 litros) o que mostra seu potencial no desenvolvimento farmacêutico.

## 8 ATIVIDADES REALIZADAS

### 8.1 Lista das publicações resultantes do trabalho referido:

#### 8.1.1 Trabalhos apresentados em conferências internacionais:

a) Trabalho apresentado no XXIII Congresso Latinoamericano de Microbiologia, Rosário – Argentina, Setembro de 2016: BIO, L. V.; NUNES, C. F.; ROMANO, C. M.; SABINO, E. C.; CARDOZO, F. T. G. S. In vitro activity of natural products derivatives. Categoria: Pôster (Anexo A).

b) Trabalho apresentado no 23º SIICUSP (Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP), São Paulo, Setembro de 2015: BIO, L. V.; ROMANO, C. M.; SABINO, E. C.; CARDOZO, F. T. G. S. Atividade Antidengue in vitro de Compostos Naturais Derivados de Plantas e Fungo. 2015. Categoria: Oral (Anexo D).

#### 8.1.2 Trabalhos apresentados em conferências nacionais:

a) Trabalho aceito para apresentação no XXVI Congresso Brasileiro de Virologia, Florianópolis, Outubro de 2015: BIO, L. V.; ROMANO, C. M.; SABINO, E. C.; CARDOZO, F. T. G. S. In vitro Anti-Dengue Activity Of Natural Compounds From Plant And Fungus. 2015. Categoria: Pôster (Anexo C).

b) Trabalho apresentado na XVII Jornada Científica, São Paulo, Novembro de 2015: BIO, L. V.; CARDOZO, F. T. G. S.; CARVALHO, A. V. C.; ROMANO, C. M.; SABINO, E. C. Atividade antidengue in vitro de Compostos Naturais Derivados de Planta e Fungo. 2015. Categoria: Oral (Anexo B).

## REFERÊNCIAS

ABREU, A. P. L. D. **Estudo Comparativo da Atividade Anti-inflamatória e Antifúngica de Extratos de Própolis Vermelha e Verde**. 2008. 71 f. Mestrado (Pós-graduação) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; BEZERRA, R. M. N.; CABRAL, I. S. R.; PRADO, A.; OLDONI, T. L. C.; ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, 2009.

ALENCAR, S. M. D.; AGUIAR, C. L. D.; PAREDES-GUZMÁN, J.; PARK, Y. K. Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.909-915, 2005.

AMORIM, J. H.; BIZERRA, R. S. P.; ALVES, R. P. D. S.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; LEVI, J. E.; CAPURRO, M. L.; FERREIRA, L. C. D. S. A genetic and pathologic study of a DENV2 clinical isolate capable of inducing encephalitis and hematological disturbances in immunocompetent mice. **PLoS ONE**, v.7, n.9, p.e44984, 2012.

ARANTES, J. T. Estudo comprova atividades antioxidante e antimicrobiana da própolis orgânica brasileira. **Agência FSPESP**. São Paulo 2014.

BÄCK, A. T.; LUNDKVIST, Å. Dengue viruses an overview. **Infection Ecology and Epidemiology**, v.3, p.1-21, 08/30/, 2013.

BAIBADO, J. T.; CHEUNG, H. Y. Seed Extract of Horse Chestnut (*Aesculus hippocastanum* L., 七葉樹) as Effective Medication for Chronic Venous Insufficiency and Other Health Benefits. **Looking Back on 2010: A Year Strived for A Higher Standard**, p.156, 2010.

BANKOVA, V.; DE CASTRO, S.; MARCUCCI, M. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, n.1, p.3-15, 2000.

BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M.; BROWNSTEIN, J. S.; HOEN, A. G.; SANKOH, O. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v.496, n.7446, p.504-507, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira

1 Brasília: ANVISA. 2011

BRASIL. Medicamentos fitoterápicos. ANVISA: Brasília. 2013. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/definicao.htm>>. Acesso em: 30 Jun 2014.

BRUGGEMANN, R.; MATSUO ORLANDI, J.; BENATI, F. J.; FACCIN, L. C.; MANTOVANI, M. S.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Antiviral activity of *Agaricus blazei* Murrill ss. Hei nem extract against human and bovine herpesviruses in cell culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.4, p.561-565, 2006.

BRUM, L. P. Atividade antiviral dos compostos fenólicos (ácidos ferúlico e transcinâmico) e dos flavonóides (quercetina e Kaempherol) sobre os Herpesvirus bovino 1, Herpesvirus bovino 5 e vírus da cinomose canina. 2006.

BÚFALO, M. C. Efeito da Própolis e de extratos obtidos de *Baccharis dracunculifolia* sobre a replicação do Poliovírus Tipo 1 em células HEP-2. 2009. 76 f. Mestrado (Pós-graduação) - Patologia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Medicina-UNESP, Botucatu, 2009.

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

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

BURLESON, R. C.; CHAMBERS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. **Virology: a laboratory manual**. San Diego: Academic. 1992. 250 p.

CAMELINI, C. M. Produção de biomassa do fungo *Agaricus subrufescens* por processos fermentativos sólido e submerso para obtenção de polissacarídeos bioativos. 2010.

CARABALI, M.; HERNANDEZ, L. M.; ARAUZ, M. J.; VILLAR, L. A.; RIDDE, V. Why are people with dengue dying? A scoping review of determinants for dengue mortality. **BMC Infectious Diseases**, v.15, n.1, p.1, 2015.

CARDOZO, F.; LARSEN, I.; CARBALLO, E.; JOSE, G.; STERN, R.; BRUMMEL, R.; CAMELINI, C.; ROSSI, M.; SIMÕES, C.; BRANDT, C. In vivo anti-herpes simplex virus activity of a sulfated derivative of *Agaricus brasiliensis* mycelial polysaccharide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.57, n.6, p.2541-2549, 2013.

CARDOZO, F. T. G. S.; CAMELINI, C. M.; CORDEIRO, M. N. S.; MASCARELLO, A.; MALAGOLI, B. G.; LARSEN, I.; ROSSI, M. J.; NUNES, R. J.; BRAGA, F. C.; BRANDT, C. R.; SIMÕES, C. M. O. Characterization and cytotoxic activity of sulfated derivatives of polysaccharides from *Agaricus brasiliensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.57, p.265-272, 2013a.

CARDOZO, F. T. G. S.; CAMELINI, C. M.; MASCARELLO, A.; ROSSI, M. J.; NUNES, R. J.; BARARDI, C. R. M.; MENDONÇA, M. M.; SIMÕES, C. M. O. Antiherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. **Antiviral Research**, v.92, p.108-114, 2011.

CARDOZO, F. T. G. S.; LARSEN, I. V.; CARBALLO, E. V.; JOSE, G.; STERN, R. A.; BRUMMEL, R. C.; CAMELINI, C. M.; ROSSI, M. J.; SIMÕES, C. M. O.; BRANDT, C. R. In vivo anti-HSV activity of a sulfated derivative of *Agaricus brasiliensis* mycelial polysaccharide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.57, p.2541 - 2549, 2013b.

CAROCCI, M.; KUHN, J. H.; YANG, P. L. Flaviviruses: Introduction to Dengue Viruses. In: (Ed.). **Global Virology I-Identifying and Investigating Viral Diseases**. ed.: Springer, 2015. p. 403-424.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v.73, p.S1-S6, 2002.

CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R.; RICE, C. M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Reviews in Microbiology**, v.44, n.1, p.649-688, 1990.

CHEN, L.; SHAO, H. J.; SU, Y. B. Coimmunization of *Agaricus blazei* Murill extract with hepatitis B virus core protein through DNA vaccine enhances cellular and humoral immune responses. **International Immunopharmacology**, v.4, n.3, p.403-409, 2004.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v.106, n.3, p.290-302, 2006.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v.1830, n.6, p.3670-3695, 2013.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.4, p.435-441, 2008.

DE VRIES, M. C.; VAUGHAN, E. E.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W. M. *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal**, v.16, n.9, p.1018-1028, 2006.

DE VUYST, L.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v.23, n.2, p.153-177, 1999.

DIAS, E. S.; LABORY, C.; HERRERA, K.; ALVES, A.; TORRES, G.; RINKER, D. Cytological studies of *Agaricus brasiliensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, n.11, p.2473-2479, 2008.

DILNA, S. V.; SURYA, H.; ASWATHY, R. G.; VARSHA, K. K.; SAKTHIKUMAR, D. N.; PANDEY, A.; NAMPOOTHIRI, K. M. Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF 4. **LWT-Food Science and Technology**, v.64, n.2, p.1179-1186, 2015.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological and pharmaceutical bulletin**, v.26, n.4, p.527-531, 2003.

ESPÍRITO-SANTO, M.; FERNANDES, G. W.; ALLAIN, L. R.; REIS, T. R. F. Tannins in *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae): effects of seasonality, water availability and plant sex. **Acta Botanica Brasilica**, v.13, p.167-174, 1999.

FACCIN, L.; BENATI, F.; RINCÃO, V.; MANTOVANI, M.; SOARES, S.; GONZAGA, M.; NOZAWA, C.; CARVALHO LINHARES, R. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, n.1, p.24-28, 2007.

FAGUNDES, M.; FARIA, M. L.; FERNANDES, G. W. Efeitos da distribuição de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) na abundância e no parasitismo de

galhas de *Neopelma baccharidis* (homóptera: *Psyllidae*). **Unimontes Científica**, v.1, n.1, p. 97-104, 2001.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei* murrill: Review of literature and pharmaco-toxicological problems. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.1, p.3-15, 2008.

FORMICA, J.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and chemical toxicology**, v.33, n.12, p.1061-1080, 1995.

FREESTONE, D. S. The need for new antiviral agents. **Antiviral Research**, v.5, n.6, p.307-324, 1985.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review [honey-bees]. **Bee world**, 1979.

GROBEN, G.; VAN CASTEREN, W.; SCHOLS, H.; OOSTERVELD, A.; SALA, G.; SMITH, M.; SIKKEMA, J.; DE BONT, J. Analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in continuous culture on glucose and fructose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.48, n.4, p.516-521, 1997.

GUZMAN, M. G.; HALSTEAD, S. B.; ARTSOB, H.; BUCHY, P.; FARRAR, J.; GUBLER, D. J.; HUNSPERGER, E.; KROEGER, A.; MARGOLIS, H. S.; MARTÍNEZ, E.; NATHAN, M. B.; PELEGRINO, J. L.; SIMMONS, C.; YOKSAN, S.; PEELING, R. W. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, n.12, p.S7-16, 2010.

HANDEL, A.; LONGINI JR, I. M.; ANTIA, R. Antiviral resistance and the control of pandemic influenza: The roles of stochasticity, evolution and model details. **Journal of Theoretical Biology**, v.256, n.1, p.117-125, 2009.

HARUTOSHI, T. **Exopolysaccharides of lactic acid bacteria for food and colon health applications**. INTECH Open Access Publisher. 2013

HETLAND, G.; JOHNSON, E.; LYBERG, T.; BERNARDSHAW, S.; TRYGGESTAD, A. M. A.; GRINDE, B. Effects of the Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murill on Immunity, Infection and Cancer. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.68, p.363–370, 2008.

HETLAND, G.; JOHNSON, E.; LYBERG, T.; KVALHEIM, G. The Mushroom *Agaricus blazei* Murill Elicits Medicinal Effects on Tumor, Infection, Allergy, and Inflammation through Its Modulation of Innate Immunity and Amelioration of

Th1/Th2 Imbalance and Inflammation. **Advances in Pharmacological Sciences**, p.1-10, 2011.

HUANG, T.-T.; OJCIUS, D. M.; YOUNG, J. D.; WU, Y.-H.; KO, Y.-F.; WONG, T.-Y.; WU, C.-Y.; LU, C.-C.; LAI, H.-C. The Anti-Tumorigenic Mushroom *Agaricus blazei* Murill Enhances IL-1b Production and Activates the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages. **PLoS ONE**, v.7, n.7, p.1-11, 2012.

HULEIHEL, M.; ISANU, V. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. **Israel Medical Association Journal**, v.4, n.11 SUPPL., p.923-927, 2002.

ISHIHARA, M.; NAOI, K.; HASHITA, M.; ITOH, Y.; SUZUI, M. Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. **Oncology reports**, v.22, n.2, p.349, 2009.

JOHNSON, E.; FØRLAND, D. T.; SÆTRE, L.; BERNARDSHAW, S. V.; LYBERG, T.; HETLAND, G. Effect of an Extract Based on the Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murill on Release of Cytokines, Chemokines and Leukocyte Growth Factors in Human Blood Ex Vivo and In Vivo. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.69, p.242–250, 2008.

KADIR, S. L. A.; YAAKOB, H.; ZULKIFLI, R. M. Potential anti-dengue medicinal plants: a review. **Journal of Natural Medicines**, v.67, n.4, p.677-689, 2013.

KIKUTI, M.; CUNHA, G. M.; PAPLOSKI, I. A.; KASPER, A. M.; SILVA, M. M.; TAVARES, A. S.; CRUZ, J. S.; QUEIROZ, T. L.; RODRIGUES, M. S.; SANTANA, P. M. Spatial distribution of dengue in a Brazilian urban slum setting: Role of socioeconomic gradient in disease risk. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.9, n.7, p.e0003937, 2015.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30 n.3, p.241-248, 2009.

KOZARSKI, M.; KLAUS, A.; JAKOVLJEVIC, D.; TODOROVIC, N.; NIKSIC, M.; VRVIC, M. M.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Dietary polysaccharide extracts of *Agaricus brasiliensis* fruiting bodies: Chemical characterization and bioactivities at different levels of purification. **Food Research International**, 2014.

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

LAKHANPAL, T.; RANA, M. Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. **Plant Genet. Resour.**, v.3, n.02, p.288-303, 2005.

LAUGHLIN, C. A.; MORENS, D. M.; CASSETTI, M. C.; COSTERO-SAINT DENIS, A.; SAN MARTIN, J. L.; WHITEHEAD, S. S.; FAUCI, A. S. Dengue research opportunities in the Americas. **Journal of Infectious Diseases**, v.206, n.7, p.1121-1127, 2012.

LIU, C. F.; TSENG, K. C.; CHIANG, S. S.; LEE, B. H.; HSU, W. H.; PAN, T. M. Immunomodulatory and antioxidant potential of Lactobacillus exopolysaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, n.12, p.2284-2291, 2011.

LIU, J.; LI, Y.; YUAN, X.; YANG, Z.; LIN, Z. Sodium  $\beta$ -aescin may be an effective therapeutic agent for Bell's palsy. **Medical Hypotheses**, v.71, n.5, p.762-764, 2008.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.447-454, 2008.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v.19, n.5, p.529-536, 1996.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H. M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of ethnopharmacology**, v.74, n.2, p.105-112, 2001.

MARCUCCI, M. C.; SAWAYA, A. C. H. F.; PAULINO, N.; DINIZ, S. N.; MENDONÇA, S. D.; RODRIGUES, N. C.; CASSINA-LÓPEZ., B. G. Composição Química, Atividade Biológica E Segurança De Uso Da Própolis Vermelha. **Revista da Associação Paulista dos Criadores de Abelhas Melíferas Européias - APACAME**, p.1-7, 2014.

MARCUCCI, M. C.; SAWAYA, A. C. H. F.; PAULINO, N.; DINIZ, S. N.; MENDONÇA, S. D.; RODRIGUES, N. C.; CASSINA-LÓPEZ., B. G. Composição Química, Atividade Biológica E Segurança De Uso Da Própolis Vermelha. . **Revista da Associação Paulista dos Criadores de Abelhas Melíferas Européias - APACAME**, p.1-7, 2014.

MATSUO, M.; SASAKI, N.; SAGA, K.; KANEKO, T. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. **Biological and pharmaceutical bulletin**, v.28, n.2, p.253-259, 2005.

MAZIA, R. S.; DE ARAÚJO PEREIRA, R. R.; DE FRANCISCO, L. M. B.; NATALI, M. R. M.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; BRUSCHI, M. L.; UEDA-NAKAMURA, T. Formulation and Evaluation of a Mucoadhesive Thermoresponsive System Containing Brazilian Green Propolis for the Treatment of Lesions Caused by Herpes Simplex Type I. **Journal of pharmaceutical sciences**, v.105, n.1, p.113-121, 2016.

MENGONI, F.; LICHTNER, M.; BATTINELLI, L.; MARZI, M.; MASTROIANNI, C. M.; VULLO, V.; MAZZANTI, G. In vitro anti-HIV activity of oleanolic acid on infected human mononuclear cells. **Planta Medica**, v.68, n.02, p.111-114, 2002.

MIETTINEN, M.; PIETILÄ, T. E.; KEKKONEN, R. A.; KANKAINEN, M.; LATVALA, S.; PI RHONEN, J.; ÖSTERLUND, P.; KORPELA, R.; JULKUNEN, I. Nonpathogenic *Lactobacillus rhamnosus* activates the inflammasome and antiviral responses in human macrophages. **Gut microbes**, v.3, n.6, p.510-522, 2012.

MINARI, M. C.; RINCÃO, V. P.; SOARES, S. A.; RICARDO, N. M. P. S.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Antiviral properties of polysaccharides from *Agaricus brasiliensis* in the replication of bovine herpesvirus 1. **Acta Virologica**, v.55, n.3, p.255-259, 2011.

MONTPIED, P.; DE BOCK, F.; RONDOUIN, G.; NIEL, G.; BRIANT, L.; COURSEAU, A.-S.; LERNER-NATOLI, M.; BOCKAERT, J. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. **Molecular brain research**, v.115, n.2, p.111-120, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63, Dec 16, 1983.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, n.3, p.311-335, 2012.

NOISAKRAN, S.; ONLAMOON, N.; SONGPRAKHON, P.; HSIAO, H.-M.; CHOKEPHAIBULKIT, K.; PERNG, G. C. Cells in Dengue Virus Infection In Vivo. **Advances in Virology**, 2010.

NOLKEMPER, S.; REICHLING, J.; SENSCH, K. H.; SCHNITZLER, P. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. **Phytomedicine**, v.17, n.2, p.132-138, 2010.

NUNES, C. F. **Atividade virucida de um extrato etanólico de própolis verde contra o vírus da doença de newcastle**. 2011. 82 f. (Dissertação - Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

NUNES, C. F. **Atividade virucida de um extrato etanólico de própolis verde *in vitro* e *in vivo***. 2011. 85 f. Mestrado (Pós-graduação) - Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

NUNES, C. F.; FINGER, P. F.; FISCHER, G.; DE CASTRO, C. C.; HUBNER, S. O.; PAULINO, N.; MARCUCCI, M. C.; ROCHA, O. V.; MARTES, P. E. A.; VARGAS, G. D. A. Padronização de uma amostra de extrato etanólico de própolis verde. **Revista Fitos (ALANAC)**, v.7, p.67-72, 2012.

OLIVEIRA, A. B.; LONGHI, J. G.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. A normatização dos fitoterápicos no Brasil. **Visão Acadêmica**, v.7, n.2, 2007.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciencia Rural**, v.32, n.6, p.997-1003, 2002.

PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. **Current Opinion in Microbiology**, v.11, n.4, p.369-377, 2008.

PIRAINO, F. F. Emerging antiviral drugs from medicinal mushrooms. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, n.2, 2006.

PUJOL, C. A.; RAY, S.; RAY, B.; DAMONTE, E. B. Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.51, n.4, p.412-416, 2012.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v.20, n.7, p.933-956, 1996.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.67, n.16, p.2773-2786, 2010.

ROMANO, C. M.; DE MATOS, A. M.; ARAÚJO, E. S. A.; VILLAS-BOAS, L. S.; DA SILVA, W. C.; OLIVEIRA, O. M. N. P. F.; CARVALHO, K. I.; DE SOUZA, A.

C. M.; RODRIGUES, C. L.; LEVI, J. E.; KALLAS, E. G.; PANNUTI, C. S. Characterization of dengue virus type 2: New insights on the 2010 Brazilian epidemic. **PLoS ONE**, v.5, n.7, 2010.

RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.12, n.2, p.163-171, 2002.

SILVA CUNHA, I. B. D.; SALOMÇAAO, K.; SHIMIZU, M.; BANKOVA, V. S.; CUSTÓDIO, A. R.; CASTRO, S. L. D.; MARCUCCI, M. C. Antitrypanosomal activity of Brazilian propolis from *Apis mellifera*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.52, n.5, p.602-604, 2004.

SIRTORI, C. R. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. **Pharmacological Research**, v.44, n.3, p.183-193, 2001.

SMIDERLE, F. R.; ALQUINI, G.; TADRA-SFEIR, M. Z.; IACOMINI, M.; WICHERS, H. J.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1→6)-β-D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. **Carbohydrate polymers**, v.94, n.1, p.91-99, 2013.

SMIDERLE, F. R.; RUTHES, A. C.; VAN ARKEL, J.; CHANPUT, W.; IACOMINI, M.; WICHERS, H. J.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Polysaccharides from *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* show similarities in their structures and their immunomodulatory effects on human monocytic THP-1 cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.11, 2011.

SORIMACHI, K.; IKEHARA, Y.; MAEZATO, G.; OKUBO, A.; YAMAZAKI, S.; AKIMOTO, K.; NIWA, A. Inhibition by *Agaricus blazei* Murill fractions of cytopathic effect induced by western equine encephalitis (WEE) virus on Vero cells *in vitro*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.65, n.7, p.1645-1647, 2001.

SORIMACHI, K.; NAKAMOTO, T. Alternative medicine safety: *Agaricus blazei* and propolis. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v.14, n.7, p.616-621, 2011.

TALLON, R.; BRESSOLLIER, P.; URDACI, M. C. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. **Research in Microbiology**, v.154, n.10, p.705-712, 2003.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L.; PASIN, F. D. R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.3, n.2, p.249-254, 2006.

UTZINGER, J.; BECKER, S. L.; KNOPP, S.; BLUM, J.; NEUMAYR, A. L.; KEISER, J.; HATZ, C. F. Neglected tropical diseases: Diagnosis, clinical management, treatment and control. **Swiss Medical Weekly**, v.142, 2012.

VAN DYCK, S.; FLAMMANG, P.; MERIAUX, C.; BONNEL, D.; SALZET, M.; FOURNIER, I.; WISZTORSKI, M. Localization of secondary metabolites in marine invertebrates: contribution of MALDI MSI for the study of saponins in Cuvierian tubules of *H. forskali*. **PloS One**, v.5, n.11, p.e13923, 2010.

VAN ROMPAY, K. K. A. Evaluation of antiretrovirals in animal models of HIV infection. **Antiviral Research**, v.85, n.1, p.159-175, 2010.

VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: Safe cure? **Plantas medicinais: Cura segura?**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VILELA, C. O.; FISCHER, G.; CASTRO, C. C.; NUNES, C. F.; HÜBNER, S. O.; RAFFI, M. B.; SALLES, S. E.; ANCIUTI, M. A.; VARGAS, G. D. Virucidal activity of green propolis against avipoxvirus in chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs. **African Journal of Microbiology Research**, v.5, n.9, p.1075-1082, 2011.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of Food Science**, v.73, n.9, p.R117-R124, 2008.

WHO. **Dengue and severe dengue. Fact sheet N°117**. World Health Organization. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>>. Acesso em: 05 Mar 2014.

YAMANAKA, D.; TADA, R.; ADACHI, Y.; ISHIBASHI, K.-I.; MOTOI, M.; IWAKURA, Y.; OHNO, N. *Agaricus brasiliensis*-derived  $\beta$ -glucans exert immunoenhancing effects via a dectin-1-dependent pathway. **International immunopharmacology**, v.14, n.3, p.311-319, 2012.

YANG, L.; ZHANG, L. M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. **Carbohydrate Polymers**, v.76, n.3, p.349-361, 2009.

ZANDI, K.; TEOH, B.-T.; SAM, S.-S.; WONG, P.-F.; MUSTAFA, M. R.; ABUBAKAR, S. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. **Virology Journal**, v.8, n.1, p.1, 2011.

ZANDI, K.; TEOH, B.-T.; SAM, S.-S.; WONG, P.-F.; MUSTAFA, M. R.; ABUBAKAR, S. Novel antiviral activity of baicalein against dengue virus. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.12, n.1, p.1, 2012.

ZANDI, K.; TEOH, B.-T.; SAM, S.-S.; WONG, P.-F.; MUSTAFA, M. R.; ABUBAKAR, S. In vitro antiviral activity of fisetin, rutin and naringenin against dengue virus type-2. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.8, n.6, p.307-312, 2014.

ZHANG, M.; CUI, S. W.; CHEUNG, P. C. K.; WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, n.1, p.4-19, 2007.

ZHANG, M.; ZHANG, L.; WANG, Y.; CHEUNG, P. C. K. Chain conformation of sulfated derivatives of beta-glucan from sclerotia of *Pleurotus tuber-regium*. **Carbohydrate Research**, v.338, n.24, p.2863-2870, 2003.

## ANEXOS

### ANEXO A – Certificado de apresentação em formato pôster no XXIII Congresso Latinoamericano de Microbiologia em 2016.



Se deja constancia que

*L Vieira Bio, F T G S Cardozo, C Freitas Nunes, C Malta Romano, E Cerdeira Sabino*

participó en calidad de

Presentador/es de Poster

*In vitro anti-dengue activity of natural products derivatives*

**Rosario, Santa Fe, Argentina. 26 al 30 de Septiembre de 2016**

Marcelo Galas  
Presidente ALAM-CAM

Hector Morbidoni  
Presidente SLAMTB

Graciela Torno  
Presidente CLAMME

Gustavo Giusiano  
Presidente AAM

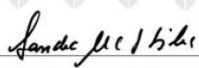
Manuel Gómez Carrillo  
Presidente ALAM

**ANEXO B – Certificado de apresentação em formato oral no XIX Jornada Científica em 2015.**



Certificamos que o trabalho intitulado **ATIVIDADE ANTIDENGUE IN VITRO DE COMPOSTOS NATURAIS DERIVADOS DE PLANTA E FUNGO**, de autoria de **LARISSA VIEIRA BIO**; ; **Francielle T G S Cardozo**, foi apresentado durante a XIX Jornada Científica do Centro Universitário São Camilo, realizada no dia 07 de novembro de 2015, no Centro Universitário São Camilo, São Paulo - SP, com carga horária total de 20 horas.

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Margareth Zabeu Pedroso**  
Pró-Reitora Acadêmica  
Centro Universitário São Camilo

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Sandra Maria Chemin Seabra da Silva**  
Coordenadora da XIX Jornada Científica  
Centro Universitário São Camilo



**ANEXO C - Certificado de apresentação em formato pôster no XXVI Congresso Brasileiro de Virologia em 2015.**



**XXVI** Brazilian Congress  
**of Virology**  
X Mercosur Meeting of Virology  
11 to 14 October 2015  
Florianópolis, SC  
Costão do Santinho Resort

*Certificate*

We hereby certify that

**Bio, L.V.**

attend the XXVI Brazilian Congress of Virology & X Mercosur Meeting of Virology,  
from October 11 - 14, 2015, in Florianópolis – SC, Brazil, at the Resort Costão do Santinho,  
as presenter poster abstract **FUNGUS** IN VITRO ANTI-DENGUE ACTIVITY OF NATURAL COMPOUNDS FROM PLANT AND

Organization

*Dra. Célia Regina Monte Barardi*  
Dra. Célia Regina Monte Barardi  
President of XXVI CBV

*Dr. Bergmann Morais Ribeiro*  
Dr. Bergmann Morais Ribeiro  
President of Brazilian Society of Virology



**ANEXO D - Certificado de apresentação em formato oral no 23º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP em 2015.**

