TAMYRIS FERNANDA BARBOSA

Avaliação *in vitro* da atividade antiviral do extrato de geoprópolis de *Scaptotrigona postica* na replicação dos vírus Herpes simples tipo 1 e Rubéola

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Pesquisa Laboratorial em Saúde Pública

Orientadoras: Profª Drª Maria Isabel de Oliveira

Profª. Drª. Cristina Adelaide Figueiredo (*in memorian*)

SÃO PAULO

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Barbosa, Tamyris Fernanda

Avaliação *in vitro* da atividade antiviral do extrato de geoprópolis de *Scaptotrigona postica* na replicação dos vírus Herpes simples tipo 1 e Rubéola / Tamyris Fernanda Barbosa – 2018.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Pesquisa Laboratorial em Saúde Pública

Orientação: Profa. Dra. Maria Isabel de Oliveira

1. Vírus da rubéola. 2. Antivirais. 3. Compostos fenólicos. 4. Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

SES/CCD/CD-370/2018

DEDICATÓRIA

À Cristina A. Figueiredo

In memoriam

À minha orientadora Dra. Maria Isabel de Oliveira

Agradecimentos

Inicio meus agradecimentos por DEUS, que colocou pessoas tão especiais ao meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!

Agradeço à Dra Cristina A. Figueiredo por ter sido amiga e orientadora não só deste trabalho como uma orientadora da vida. Obrigada por toda a confiança em todos os projetos e obrigada pela confiança que depositou em mim como pessoa, sempre fazendo me sentir a melhor pessoa, o que realmente me fez tentar ser mellhor. Agradeço por cada palavra, cada lição, cada passe e cada ensinamento nesse caminho, que para sempre serão lembrados.

Agradeço à Dra Maria Isabel de Oliveira pela confiança e paciência, por cada abraço, palavra de carinho, por aguentar meu choro e não me deixar sozinha. Por sempre me ajudar tanto, me colocar pra frente e fazer eu me sentir tão especial. E especialmente por não me deixar sozinha neste trabalho mesmo pegando o barco andando.

Aos Colegas do Núcleo de Doenças Respiratórias Dra. Ana Maria Afonso Sardinha e Dra Suely Pires Curti, pela participação no desenvolvimento deste trabalho.

À equipe de trabalho do Núcleo de Doenças Respiratórias pelo carinho, convívio, colaboração e amizade.

Á todos os funcionários do Centro de Virologia, que de forma direta ou indireta me auxiliaram.

À Giuseppina Negri da UNIFESP por todo o desenvolvimento da parte química do trabalho, várias explicações e toda a ajuda que eu precisei.

Ao meu pai pelo “patrocínio”, incentivo, paciência e amor

Ao meu irmão Rafael e cunhada Caroline por me mostrarem que este trabalho é sim muito importante.

Ao meu sobrinho Enzo por sempre me mostrar que eu sou importante.

À Patrícia Evelin Silva pelo apoio de todos os dias, por ouvir as reclamações, por rir das coisas mais absurdas comigo, por ser minha amiga nas horas que mais precisei e por continuar sendo sempre.

À Suêmi Anaí Todelo Ranieri pelas caronas de todos os dias, tornando minhas manhãs mais alegres, sempre me apoiando e incentivando.

À Roberta Helena por cada abraço e cada palavra que me ajudaram a seguir em frente e por cada grito de incentivo.

Ao psicólogo Victor Lobo, cuja orientação psicológica foi extremamente necessária para o término dessa dissertação.

À Tannile Vieira e Karoline Biffi por sempre estarem ao meu lado me dando tanto suporte.

Agradeço à Capes (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela ajuda financeira e ao Instituto Adolfo Lutz por oferecer todas as condições necessárias para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação que colaboraram para a minha formação cientifica.

Resumo

Avaliação *in vitro* da atividade antiviral do extrato de geoprópolis de *Scaptotrigona postica* na replicação dos vírus Herpes simples tipo 1 e Rubéola

Geopropolis é um produto elaborado por abelhas sem ferrão da tribo Meliponini que contém cera, resina vegetal e partículas de solo. Neste estudo foi analisada a composição química e a atividade antiviral de extrato hidroetanólico de geopropolis (HEG) de S. postica, preparado experimentalmente. Geopropolis de S. postica apresentou uma composição química peculiar que contém flavona-C-glicosídeos (principalmente vicenin-2), um alcalóide de pirrolizidina derivado da retronecina, catequina-3-O-galato, ácido 3,5-dicicoilínico e ácido cafeoilquinico-O -arabinoside, como constituintes principais. A atividade antiviral de geopropolis de S. postica contra o vírus do herpes simplex e rubéola foi corroborada por mais experimentos antivirais, como ensaio de ligação, teste de virucida, PCR quantitativa em tempo real, microscopia eletrônica direta e microscopia eletrônica de transmissão. Foi possivel verificar a viabilidade celular de 90% nas células Vero e Sirc tratadas na concentração de 128ug/mL de HEG e a replicação do virus Herpes simples e Rubeola foi de 1% com 96ug/mL de HEG. O geoprópolis apresentou atividade antiviral no Pré-tratamento (antes de inocular o vírus na célula foi tratada com geoprópolis) inibindo o crescimento de 40% a 100% dos vírus herpes e rubéola nas células, dependendo da concentração do gelprópolis . No Pós-tratamento (após inocular o vírus na célula foi tratada com geoprópolis) o crescimento do vírus nas células foi de 15% a 85% dependendo da concentração do gelprópolis.

Palavras-chave – geoprópolis, replicação do vírus do herpes e vírus da rubéola, Scaptotrigona postica, atividade antiviral, compostos fenólicos

Abstract

In vitro evaluation of the antiviral activity of *Scaptotrigona postica* geopropolis extract in the replication of Herpes simplex virus type 1 and Rubella

Geopropolis is a bee product elaborated by stingless bees of tribe Meliponini that contain wax, plant resin and soil particles. In this study was analyzed the chemical composition and the antiviral activity of a hydroethanolic extract of geopropolis (HEG) from ***S. postica*****,** prepared experimentally. Geopropolis from *S. postica* exhibited a peculiar chemical composition containing flavone-C-glycosides (chiefly vicenin-2), a pyrrolizidine alkaloid derived from retronecine, catechin-3-O-gallate, 3,5-dicaffeoyl quinic acid and caffeoylquinic acid-O-arabinoside, as main constituents. In the present study, the antiviral activity of geopropolis from S. postica against herpes simplex virus , and Rubela virus were corroborated by more antiviral experiments, such as, binding assay, virucida assay, quantitative real-time PCR, direct electron microscopy and transmission electron microscopy. It was possible to verify 90% cell viability in Vero and Sirc cells treated at the concentration of 128ug / ml HEG and replication of Herpes simplex virus and Rubeola virus was 1% with 96ug / ml HEG. The geopropolis exhibited antiviral activity in the pre-treatment (before inoculating the virus in the cell it was treated with geopropolis) inhibiting the growth of 40% to 100% of the herpes and rubella viruses in the cells depending on the concentration of the geoprolis. In post-treatment (after inoculating the virus in the cell was treated with geopropolis) the growth of the virus in the cells was 15% to 85% depending on the concentration of geopropolis.

Keywords – geopropolis, Herpes virus replication and rubella virus, *Scaptotrigona postica*, antiviral activity, phenolic compounds

Lista de Siglas e Abreviaturas

µg - micrograma

µL - microlitro

BHQ1 - Blackhole Quencher 1

CDC - Center for Disease Control and Prevention

CO_2 – Dioxido de Carbono

COX-2 - Ciclo-oxigenase-2

CT – Threshold Cycle

Diodo array - detector de iodo

DNA - (ácido desoxirribonucléico)

ECP- efeito citopático

FAM - 6-carboxifluoresceina

g - grama

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

HSV-1 – Herpes Simplex Virus Tipo 1

HSV-2 – Herpes Simplex Tipo 2

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses

IFN – Interferon

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

mL - mililitro

mRNA - RNA mensageiro

qPCR - PCR quantitativo em tempo real

RNA (ácido ribonucleico),

SFB- soro fetal bovino

SIRC - células epiteliais de córnea de Coelho

SNC - Sistema Nervoso Central

SRC - Síndrome da Rubéola Congênita

Vero - células de rim de macaco verde africano

Lista de Tabelas

Tabela 1: Tabela de primers e sondas da qPCR vírus herpes e rubéola 51

Tabela 2: Controle endógeno do gene alvo RNAse P humana 52

Tabela 3: Principais constituintes do extrato do geoprópolis 64

Lista de Figuras

Figura 1. Fases da infecção e replicação viral 21

Figura 2. Esquema estrutural do vírus HHV-1 24

Figura 3. Esquema estrutural do vírus da rubéola 29

Figura 4: Células SIRC 32

Figura 5: Efeito Citopático do vírus da rubéola em células SIRC 33

Figura 6: Células Vero 33

Figura 7: Efeito citopático do vírus HHV-1 em célula Vero 34

Figura 8: Colônia de *Scaptotrigona* postiça 41

Figura 9: Município de Barra do Corda 45

Figura 10: Viabilidade celular em células Vero 58

Figura 11: Viabilidade celular em células SIRC 58

Figura 12: qPCR do vírus Herpes simples 1..... 60

Figura 13: qPCR do vírus Herpes simples1 virucida e teste de ligação 61

Figura 14: qPCR do vírus da rubéola. Células SIRC 62

Figura 15: qPCR do vírus rubéola virucida e teste de ligação 62

Figura 16: Cromatograma comprimento de 254nm 65

Figura 17: Cromatograma comprimento de 300nm 65

Figura 18: Cromatograma dos picos obtidos por ESI-MS modo positivo 66

Figura 19: Células Vero virucida Microscopia Eletrônica 68

Figura 20: Células SIRC virucida Microscopia Eletrônic 70

Sumário

1. Introdução 17

1.1. Vírus 18

1.1.1. Herpes simplex tipo 1 (HS1) 22

1.1.1.1. Estrutura e Replicação 23

1.1.2. Rubéola - Família *Togaviridae* 25

1.2. Mecanismo de Inibidores Virais 29

1.2.1. Inibição da replicação viral por compostos análogos a nucleosídeos ... 29

1.2.2. Síntese de ínterferon 31

1.2.3. Inibidores de enzimas 31

1.3. Diagnóstico Laboratorial 31

1.3.1. Cultura celular 31

1.3.2. Biologia Molecular 34

1.3.2.1. Mecanismos do Real-Time qRT-PCR 34

1.4 Própolis 36

1.4.1. Composição Química 37

1.4.2. Propriedades Biológicas 39

1.5. *Scaptotrigona postiça* 41

2.Objetivos 43

2.1. Objetivos Gerais 43

2.1.2. Objetivos Específicos 43

3.Materiais e Métodos 44

3.1. Obtenção do extrato da própolis 44

3.1.2. Análise do extrato hidroetanólico de geoprópolis por cromatografia líquida de alta resolução 45

3.2. Culturas Celulares 46

3.3. Teste de Viabilidade celular 46

3.4. Vírus e Infecção 47

3.5. Estoque Viral 47

3.6. Avaliação do efeito da própolis sobre a replicação viral 48

3.6.1. Ensaio em Placa 48

3.6.2. Diagnóstico Laboratorial por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) 50

3.6.2.1. Extração do Ácido Nucléico das Amostras Clínicas 50

3.6.2.2. Primers (Oligonucleotídeos) 51

3.6.2.3. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para o Vírus da Rubéola 52

3.6.2.4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para o Vírus do Herpes 53

3.7. Microscopia Eletrônica 54

3.7.1. Análise Estrutura 54

3.7.2. Coloração Negativa 56

4. Resultados 57

4.1. Análise Estatística 57

4.2. Avaliação da citotoxicidade da fase hidroetanólica da geoprópolis sobre as culturas de células Vero e SIRC pelo método colorimétrico do MTT 57

4.3. Avaliação do efeito da geoprópolis sobre a replicação do vírus Herpes 59

4.4. Avaliação do efeito da geoprópolis sobre a replicação viral da rubéola 61

4.5. Análise fitoquímica utilizando a HPLC-DAD-ESI-MS / MS de fase inversa 63

4.6. Microscopia Eletrônica (ME) 67

4.6.1. Análise Ultraestrutural e Coloração Negativa das células Vero inoculadas com amostra virucida 67

4.6.2. Análise Ultraestrutural e Coloração Neg. das células SIRC inoculadas com amostra virucida 69

5. Discussão ..... .71

6. Conclusões 76

7. Referências 78

1.Introdução

A grande incidência de doenças causadas por vírus acomete uma parcela significativa da população humana mundial. Sendo assim, estudos que visam o controle de propagação e manifestação de tais doenças, além da inativação destes patógenos, seriam de grande interesse, incluindo os estudos relacionados com o desenvolvimento de novos fármacos com este tipo de atividade (De Clerq, 2004)

A própolis tem sido usada como medicamento alternativo de várias doenças.Foi usado mundialmente como medicina popular desde 300 aC e como uma dieta suplementar para manter ou melhorar a saúde do homem(Bankova et al.1999).

A própolis é formada quando as abelhas utilizam a saliva para coletar material de brotos, flores e plantas, transformando-os em uma resina. Sua composição química é complexa e variada, estando relacionada com a flora de cada região visitada pelas abelhas e com o período de coleta da resina. Essa resina natural produzida pelas abelhas tem sido objeto de estudos farmacológicos e químicos nas últimas décadas (Esanu ET AL.,1981).

Por possuir varias atividades biológicas como de ação antimicrobiana, antifúngica e antiviral .Sua aplicação pelas abelhas na colméia, além de conferir proteção, a própolis tem como função manter a colméia livre de micro-organismos proveniente do espaço externo para a colméia (Longhini et al.,2007).

Os flavonoides, juntamente com ácidos fenólicos e estéres, aldeídos fenólicos e cetonas são considerados os mais importantes compostos antimicrobianos da própolis. A própolis é uma mistura complexa, constituída de material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas de flores, pólen, exudatos de árvores e brotos, adicionados de secreções salivares e enzimas (Franco et al., 2000; Pereira et al.,2002;).

Segundo Lustosa (2008), a própolis contém 50-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grão de pólen entre outros microelementos, como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês, além de pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E.

O grande potencial da própolis as pesquisas tem revelado pode abrir várias possibilidades de descobertas de novas substâncias para utilização pelas indústrias farmacêuticas contra doenças que afetam a saúde da população, melhorando os sintomas e consequentemente a qualidade de vida. Uma das principais razões para a falta de sucesso no desenvolvimento de fármacos antivirais é a natureza dos vírus, que possuem uma estrutura extremamente simples e um sistema enzimático bastante restrito, sendo totalmente dependentes dos processos metabólicos celulares para sua multiplicação. Assim, agentes que inibem a replicação viral, em geral, também exibem certo grau de toxicidade às células hospedeiras (De Clerq, 2005; Harrison, 2014).

A identificação de agentes com propriedades antivirais é muito importante, visto que existem poucas drogas disponíveis para o tratamento de doenças virais e diante do surgimento de vários microorganismos resistentes à essas drogas (Lohner & Starudegger, 2001).

1.1 Vírus

Os vírus são microorganismos que se diferem dos demais, podendo infectar todas as formas de vidas. Possuem material genético DNA (ácido desoxirribonucléico) ou RNA (ácido ribonucleico), mas não possuem a maquinaria necessária para o processamento dessa informação em nova partícula viral, sendo assim é um microorganismo intracelular obrigatório (Mims et al. 1999).

Geralmente, os vírus só podem ser visualizados por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), devido ao seu tamanho entre 20 nm a 600 nm, representando diferentes morfologias (tamanho, formas e aspectos gerais) entre os diferentes grupos. Certas características fundamentais são preservadas em todos os grupos como material genético DNA ou RNA, podendo ser encontrados em forma de fita dupla ou fita simples ou ainda em formas circulares, ambos contidos em um capsídeo com número de moléculas protéicas individuais (capsômero). O RNA pode ser de sentido positivo (transcritos pelos ribossomos do hospedeiro) e sentido negativo (dependentes de polimerases do próprio vírus no início da replicação) (Cann, 1997).

O ácido nucléico juntamente com o capsídeo é chamado de nucleocapsídeo ou vírion que possui uma simetria, podendo ser icosaédrica, helicoidal ou complexa. Os vírus que possuem apenas o nucleocapsídeo são chamados de não envelopados, os que possuem uma membrana externa que geralmente consiste em uma bicamada lipídica, são chamados de vírus envelopados (Cann, 1997).

O processo de invasão da célula do hospedeiro depende do tipo de superfície que o vírus apresenta, determinando seu mecanismo de entrada (Cann, 1997), seguindo algumas etapas:

- Adsorção: Fixação do vírus na célula hospedeira. Vírus envelopados utilizam as glicoproteínas do envelope lipídico e vírus não envelopados interagem através de um complexo protéico.

- Penetração: ocorre por invaginação celular, fusão do invólucro viral e da membrana celular ou penetração do vírus através da membrana.

- Desnudação: As enzimas celulares contidas nos lisossomos removem o envoltório protéico da partícula viral, liberando o material genético.

- Transcrição: Ocorre a síntese do RNA mensageiro (mRNA) no núcleo da célula hospedeira , no citoplasma ou nos dois locais. Os vírus DNA multiplicam-se no núcleo das células e os vírus RNA no citoplasma. Sempre utilizando a energia da célula.

- Tradução: O mRNA se liga aos ribossomos celulares, assim sendo codificada a síntese das proteínas virais. Assim que o material genético é liberado no interior da célula hospedeira ocorrem dois processos ao mesmo tempo: produção de proteínas estruturais e produção de novas cópias do genoma.

- Replicação: São as novas cópias do genoma que são acopladas à proteína viral.

- Liberação: Os vírus não envelopados são liberados através da lise total da célula. Os vírus envelopados são liberados através do brotamento, estes incorporam a membrana fosfolipídica da célula hospedeira ao passarem para o meio extracelular (Candeias,1989).

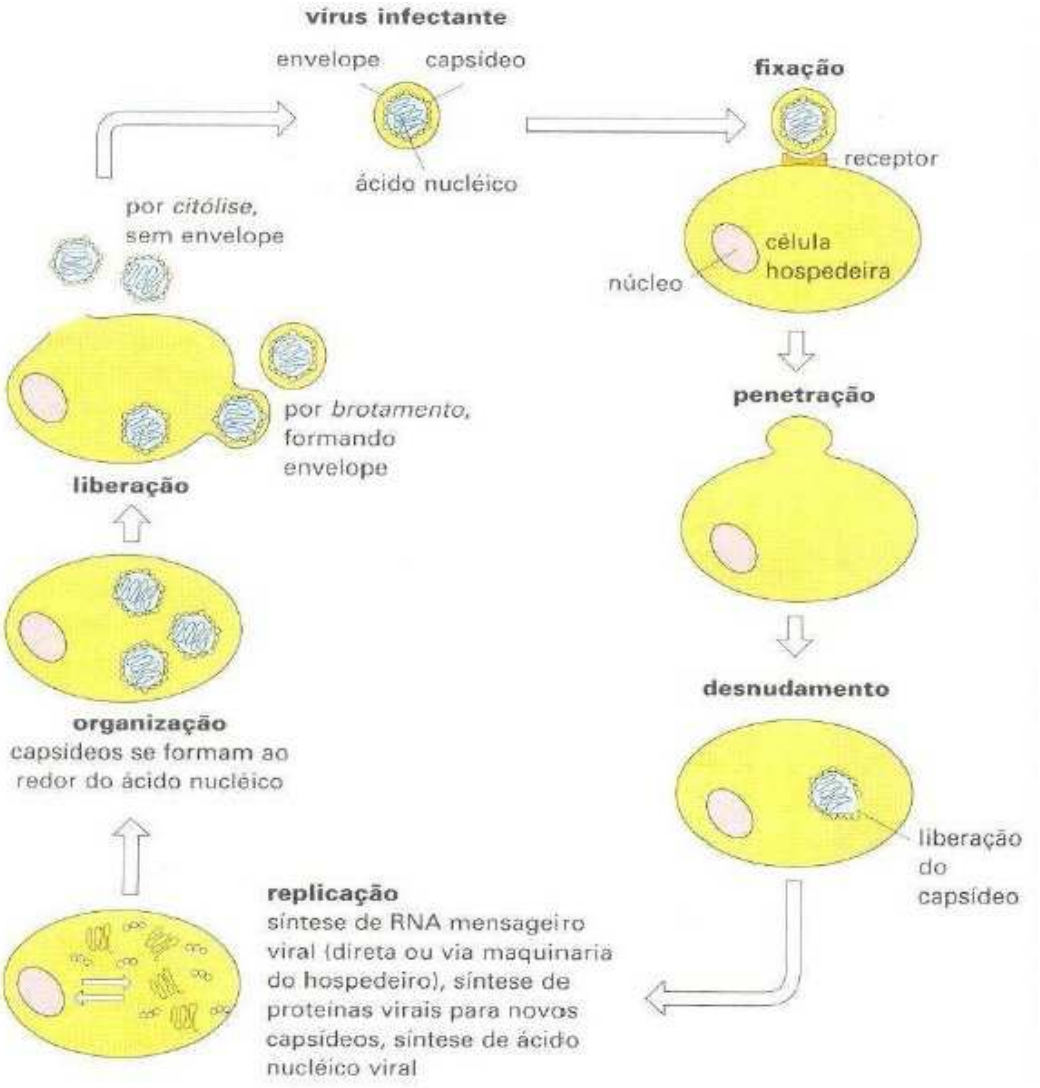

Figura 1. Representação das fases da infecção e replicação viral de uma célula hospedeira (MIms et al., 1999).

1.1.1. Herpes simplex tipo 1 (HSV-1)

Os herpes vírus tem sido descritos na literatura desde 3000 a.C. onde foram encontrados relatos de lesões herpéticas genitais descritos em Tábuas Sumérias. Hipócrates (460/377 a.C.) documentou lesões causadas por esses vírus denominados herpes (derivado do latim *herpein= rastejar, réptil*), em referência ao aparecimento de vesículas na pele. Vidal, em 1873, comprovou que o herpes era infeccioso e podia ser transmitido de uma pessoa a outra.. Em 1930, Andrews e Carmichael realizaram a conexão entre a infecção herpética e as recorrências, eles descreveram a reativação da doença em pacientes com anticorpos neutralizantes, o que gerou um polêmico debate internacional entre os cientistas da época. Já em 1939, Burnet e Willians publicaram a descrição que mais se assemelha à que é hoje reconhecida para os herpesvírus (Yalcin, Lennete, 1995; Santos, Romanos, Wigg, 2008).

O HSV-1 ocasiona um amplo espectro de doenças, desde infecções primárias ou recorrentes da mucosa, como ceratoconjuntivite, infecção visceral em imunocomprometidos, infecção neonatal, encefalite herpética, entre outros. As infecções do Sistema Nervoso Central (SNC) são causa importante de morbi-mortalidade (Kukhanova et al., 2014; Whitley et al., 1998). Alguns estudos também mostram associação do HSV-1 como fator de maior desenvolvimento da Doença de Alzheimer (Piacentini et al., 2014).

Frequentemente é adquirido na infância por exposição a secreções orais, mas sua epidemiologia vem mudando com o aumento da transmissão sexual do HSV-1 em diversos países. Tem soroprevalência estimada de 60 a 90% em algumas populações (Bernstein et al., 2013).

1.1.1.1 Estrutura e Replicação Herpes simplex tipo 1

O International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) classificou os dois vírus na família *Herpesviridae,* subfamília *Alphaherpesvirinae,* gênero *Simplexvirus,* tipo 1 e 2: herpesvírus humano 1 (HHV-1), ou vírus herpes simplex 1 (HSV-1), herpesvírus humano 2 (HHV-2), ou vírus herpes simplex 2 (HSV-2). Embora eles sejam mais encontrados na literatura especializada com a citação HSV, a terminologia oficial é HHV. O vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) é um vírion esférico de tamanho variando de 186nm a 225nm, composto de DNA fita dupla linear e possui ciclo replicativo, produzindo infecções líticas e estabelecendo infecção latente nas células do hospedeiro. As reativações podem ocorrer devido a estímulos como stress emocional ou físico, febre, exposição ao sol ou luz ultravioleta, febre e imunossupressão (Simmons, 2002; Whitley, 1998).

Os HHV-1 possuem características morfológicas e ciclo replicativo semelhantes aos de outros membros da família *Herpesviridae,* causando infecção persistente nas células do hospedeiro. Pode produzir infecções líticas, com ciclo replicativo curto, e estabelecer infecções persistentes em células neuronais sensoriais. Eles são constituídos de um vírion esférico de 186nm de diâmetro, que pode chegar a 225nm, incluindo as espículas do envelope. Possuem um core eletrodenso, composto de DNA de fita dupla linear de 150-153kpb com 68% de G/C. O capsídeo é icosaédrico, formado por 162 capsômeros, sendo 150 hexaméricos e 12 pentaméricos, e não esta localizada simetricamente no centro do envelope viral, o que pode ser observado em micrografias eletrônicas. Apresenta uma camada amorfa denominada tegumento, constituída de proteínas importantes para a regulação do ciclo replicativo viral, e um envelope lipídico, composto de glicoproteínas e poliaminas inseridas em sua superfície (De Tiége et al., 2008).

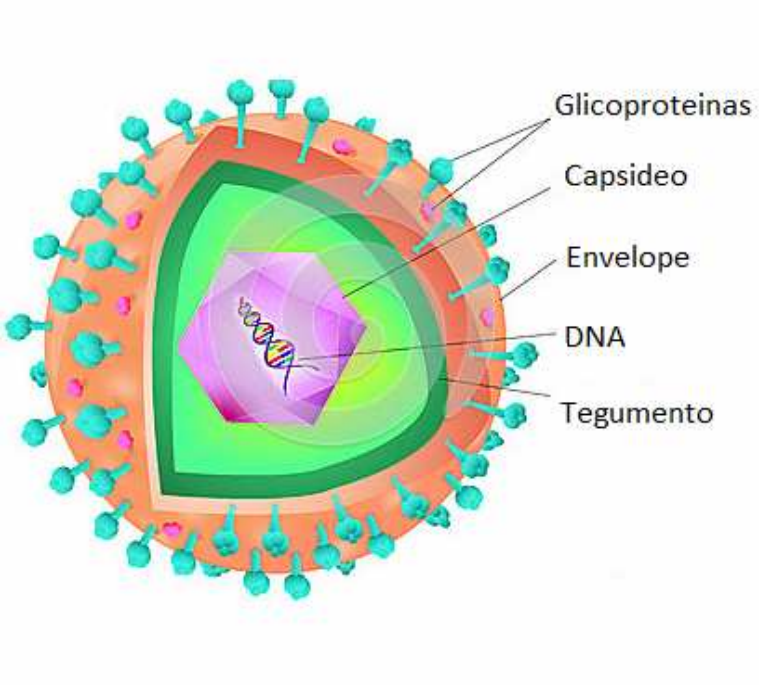

Figura 2. Esquema estrutural do vírus HHV-1. Fonte: www.google.com/imagens

A replicação viral se inicia quando o vírus adere à superfície da célula através da interação com receptores celulares. A entrada do vírus acontece em duas fases: adsorção das partículas virais à superfície celular e interação irreversível entre o envelope viral e a membrana celular, resultando na fusão do envelope com a membrana citoplasmática, permitindo a penetração do vírus no interior da célula. A adsorção do vírus é mediada por glicoproteínas virais por meio da ligação às glicosaminoglicanas presentes na superfície celular, tais como moléculas de heparan sulfato (HS), condrotin sulfato (CS) e dermatan sulfato (DS). Além disso, as moléculas de HS é um receptor importante para a entrada do vírus em células neurais (Sheybani et al., 2013).

Após a penetração na célula, o nucleocapsídeo é transportado pelo citoesqueleto através dos microtúbulos até as proximidades do núcleo, onde o

capsídeo é deixado no citoplasma. Em seguida, o DNA e a proteína do tegumento penetram no núcleo através do poro nuclear. Após a penetração, ocorre a circularização do DNA viral; e a transcrição dos genes α em RNAmα, pela RNA polimerase II celular; tradução de proteínas α no citoplasma que são translocadas para o núcleo para ativar a expressão dos genes β e a transcrição dos genes β, em RNAmβ, tradução das proteínas β que voltam para o núcleo para ativar a expressão dos genes ɣ; ativação dos genes ɣ pelas proteínas β e transcrição dos genes ɣ, em RNAmɣ, tradução das proteínas ɣ que voltam para o núcleo para fazer parte da estrutura dos vírions. Ocorre a replicação do genoma viral pela DNA polimerase viral e a montagem do capsídeo do vírus. Após essa etapa, o nucleocapsídeo adquire o envelope na lamela interna da membrana nuclear e perde esse envelope ao sair do núcleo. O vírus sai da célula por fusão da membrana da vesícula com a membrana citoplasmática, e é liberado da célula para o meio extracelular (Sheybani et al., 2013).

1.1.2. Rubéola- Família *Togaviridae*

O vírus da rubéola é o único membro do gênero Rubivirus, pertencente à família Togoviridae (Bowden & Westaway, 1984; Lee & Bowden, 2000; Trudel et al., 1982). Apresenta-se como uma partícula esférica com diâmetro de 60-70nm quando visualizado por técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão. O vírion consiste de um core elétron-denso de 30-35 nm, envolvido por um envelope lipídico derivado da célula hospedeira. O core é formado de uma fita única de RNA 40S e múltiplas cópias da proteína C (cápside), que interagem com o RNA genômico. As outras duas proteínas estruturais codificadas pelo vírus, são as glicoproteínas E1 e E2, que estão inseridas no envelope, ligadas entre si formando heterodímeros que se projetam na superfície do vírus como espículas de 5-6 nm de comprimento Essas proteínas tem a capacidade de

aglutinar hemácias de ave *in vitro* a um determinado pH (Lee & Bowden 2000).

A glicoproteína E1 é a principal proteína de superfície viral. Essa proteína é derivada de um precursor polipeptídico intracelular e está diretamente envolvida na ligação do vírus na superfície celular das células. Além disso, é o principal alvo do sistema imunológico para detecção e subsequente, eliminação do vírus. A segunda proteína E2 pertence a uma família de moléculas com peso molecular entre 42.000 a 54.000 daltons classificadas em E2a e E2b, conforme o seu grau de glicosilação A sua função está associada com a infectividade viral e com a hemaglutinação do vírus (Lee & Bowden, 2001).

A replicação do vírus da rubéola é lenta, compreendendo um período de 12 horas. O início da replicação celular ocorre no citoplasma celular após a penetração do vírus na célula por endocitose. O seu ácido nucléico, RNA viral, liga-se ao retículo endoplasmático rugoso, servindo como modelo para a tradução da proteína. Após a liberação do seu RNA genômico, este é utilizado como mRNA para a produção das proteínas não estruturais que são utilizadas para a síntese da fita complementar negativa do RNA, do RNA genômico e do RNA subgenômico (Lee & Bowden, 2000). A ORF que fica na região 5' do genoma é traduzida para uma poliproteína de 240kd, que posteriormente é clivada em dois polipeptideos, de 150 e 90kd. A proteína p150 tem a função de protease e metil-transferase, esta última aparentemente implicada no capping do RNA. A proteína p90 tem as funções de replicase e helicase. Estas enzimas catalisam tanto a replicação do RNA por meio da síntese do RNA antigenômico, quanto do mRNA subgenômico, que dirige a síntese das proteínas estruturais. A tradução do mRNA subgenômico produz uma outra poliproteína que dá origem às proteínas estruturais. Os genomas replicados podem ou não ser traduzidos para produzir mais proteínas estruturais ou participar da montagem (maturação) das partículas virais juntamente com as proteínas estruturais, formando a progênie viral (Ball, 2001).

Descoberta no final do século XVIII, a rubéola tem sido eliminada em vários países desenvolvidos nos últimos 30 anos, graças as campanhas de vacinação. Embora seja uma doença benigna em crianças e adultos, assume proporções devastadoras, quando acomete gestantes não imunes, principalmente no primeiro trimestre da gestação. A rubéola é conhecida desde o século XVIII, mas só ganhou notoriedade com a descoberta de sua teratogenicidade pelo oftalmologista australiano Norman Gregg, em 1941. Neste período, ocorreu uma epidemia pelo vírus da rubéola na Austrália e, inúmeras crianças nasceram com catarata congênita e malformação cardíaca. Coube a este oftalmologista australiano correlacionar a infecção viral materna com as referidas alterações. Estudos detalhados desses recém-nascidos, mostraram outros defeitos congênitos, tais como: retardo mental, microcefalia, cardiopatias e alterações auditivas. Os resultados desse estudo foram comprovados anos depois, em diversos estudos desenvolvidos em vários países (Webster, 1998).

A Síndrome da Rubéola Congênita pode ser considerada uma doença viral crônica que se inicia na vida intrauterina e continua na infância. O potencial lesivo do vírus da rubéola foi confirmado no início da década de 1960, quando teve início técnicas de cultivo e critérios sorológicos definidos para o diagnóstico da infecção em gestantes (Webster, 1998).

Entre 1962-1963 e entre 1964-1965, houve uma epidemia de rubéola na Europa e nos Estados Unidos da América (EUA), respectivamente. Nos EUA ocorreram cerca de 12,5 milhões de casos e 11 mil óbitos fetais. Cerca de 20.000 recém-nascidos nasceram com malformações compatíveis as descritas em 1941 por Gregg, que foram denominadas Síndrome da Rubéola Congênita e 2100 vieram a falecer no período neonatal. Porém, várias outras alterações foram observadas: restrição do crescimento fetal, miocardite, hepatite, púrpura trombocitopênica e alterações ósseas nos recém-nascidos. Devido à gravidade dos casos acometidos, denominou-se o quadro de Síndrome da Rubéola

Conênita Ampliada (Webster, 1998).

As principais desordens da infecção materna pelo vírus da rubéola são: abortamento precoce ou tardio, embriopatia, restrição de crescimento fetal, parto prematuro, óbito intrauterino, infecção congênita, malformação, óbito neonatal e aparecimento tardio de defeitos congênitos. As alterações fetais observadas são: surdez, alterações oculares, como a catarata e o glaucoma; alterações cardiovasculares, principalmente, a persistência do canal arterial e alterações do sistema nervoso central, como o retardo do desenvolvimento neuropsicomotor. Também podendo ocorrer manifestações clínicas ao nascimento, como: hepatoesplenomegalia, miocardite, trombocitopenia e radioluscência óssea (Webster, 1998). A ocorrência de milhões de casos de rubéola e o nascimento de crianças com malformações estimulou estudos para a descoberta de uma vacina e entre 1965 e 1967 várias cepas vacinais já estavam sendo testadas. A rubéola e a Síndrome da Rubéola Congênita tem sido controlada por diversos programas de imunização que ocorrem ao redor do mundo, entretanto, surtos entre indivíduos não vacinados ainda ocorrem. Infelizmente, casos de SRC ainda continuam ocorrendo em alguns países europeus apesar da cobertura vacinal (Plotkin et al.; 1969).

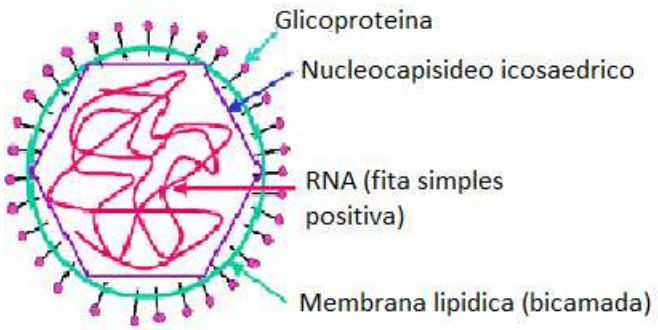

Figura 3. Esquema estrutural do vírus da rubéola.
Fonte: www.google.com/imagens

1.2. Mecanismo de Inibidores Virais

1.2.1. Inibição da replicação viral por compostos análogos a nucleosídeos

Alguns inibidores virais são compostos sintéticos com estrutura similar a guanosina e 2´-deoxitimidina, nucleosídeos que interferem na síntese dos ácidos nucléicos virais. A estrutura desses inibidores impede a ligação do próximo nucleotídeo à cadeia, podendo ser a falta do grupo hidroxila no carbono 3´, essencial para a adição do próximo nucleotídeo. Depois que os análogos de nucleosídeos entram na célula, são fosforilados no carbono 5´ para se tornar análogo de nucleotídeo. Esse 5´trifosfato derivado é a forma ativa do composto e atua como inibidor competitivo da polimerase viral e também da transcriptase reversa (Carter et AL., 2007).

Alguns exemplos de inibidores virais análogos de nucleosídeos são:

- Ribavarina, sendo um análogo da guanosina é usado no tratamentos de alguns vírus RNA, como hepatite C (HCV) e no tratamento do vírus sincicial respiratório (SRV), uma importante causa de doença no trato respiratório em crianças. Apesar de reduzir a severidade da infecção, sua administração é cara, logo, não é usado frequentemente (Feldd E Hoofnagle, 2005).

- Aciclovir é um análogo de guanosina que inibe a síntese de DNA de HSV-1, HSV-2 e varicela-zoster. Em uma célula infectada, o aciclovir é fosforilado inicialmente pela timidina quinase viral. Na célula a timidina quinase é produzida somente em certos estágios do ciclo celular e tem menos afinidade pelo aciclovir que pela enzima viral, portanto há pouca fosforilação de aciclovir nas células saudáveis. Durante a síntese de DNA o aciclovir compete com a deoxiguanosina para se incorporar à cadeia, interrompendo a síntese por falta do grupo 3´-OH (De Clerq, 2004).

- Azidotimidina (AZT) é análogo de timidina e inibe a transcrição reversa no HIV. Se liga mais fortemente à transcriptase reversa que à DNA polimerase, inibindo a transcrição reversa e podendo interferir na síntese do DNA celular, apresentando severos efeitos colaterais nos primeiros dias de administração (Richman, 2003).

Lamivudina, dideoxicitidina e dideoxiinosina são outros exemplos de análogos de nucleosídeos que inibem a transcrição reversa e são usados no tratamento de infecção por HIV (Richman, 2003).

1.2.2. Síntese de Interferon

As células do sistema imune inato nos mamíferos são capazes de reconhecer a presença de vírus e responder a essas infecções através da produção de interferons tipo 1 (IFNs). Os IFNs tem ação autócrina e parácrina, quando ligadas aos receptores de intérferon ocorre a expressão de inúmeras proteínas, criando um ambiente celular altamente resistente a infecções virais (Bowie & Haga, 2005).

1.2.3. Inibidores de enzimas

Existem peptídeos sintéticos que agem através de mecanismos de ação específicos, podendo ser através de inibidores de enzimas relacionadas a replicação viral ou competidores das estruturas virais ou bloqueando a fusão dos vírus em uma célula hospedeira (Carter & Saunders, 2007). Alguns exemplos são os inibidores de protease do HIV (Richman, 2003) e os inibidores de neuraminidase do vírus influenza (De Clercq, 2005).

1.3. Diagnóstico Laboratorial

1.3.1. Cultura celular

O cultivo de células é essencial na pesquisa básica em virologia e doenças virais. Também é utilizada na produção de antígenos e produção de vacinas (Ohara, 1988).

Inocula-se uma pequena aliquota do vírus suspeito em uma cultura celular, previamente conhecida (figura 4 e Figura 6). A incubação é realizada em temperatura e condições apropriadas para a replicação viral. Com a replicação dos vírus, identificam-se certas alterações no tapete celular, denominado de efeito citopático (ECP) Figura 5 e 7, que é o primeiro passo para diagnóstico e pesquisa dos vírus (Ohara, 1988).

A cultura celular é um método quantitativo. São realizadas diluições seriadas do vírus a ser titulado (10^{-1} a 10^{-12}) e posteriormente, inoculado na cultura celular, em tubos ou placas de microtitulação, com número de células relativamente iguais. O objetivo dessa metodologia é definir a dose de vírus capaz de infectar cinquenta por cento da cultura celular inoculada, essa dose é conhecida como $TCID_{50}$ (tissue culture infeccious dose 50%) (Reed & Muench, 1938).

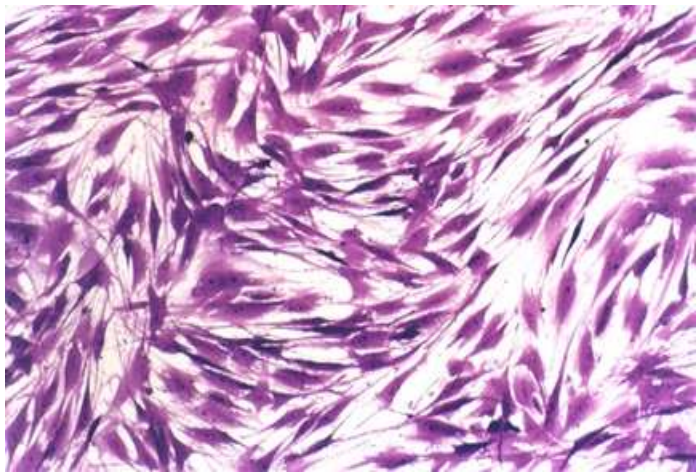

Figura 4: Células SIRC. Fonte: Arquivo pessoal.

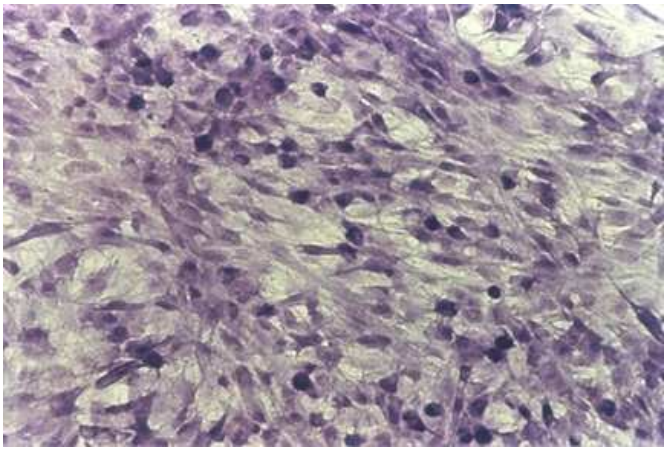

Figura 5: Efeito Citopático (ECP) do vírus da rubéola em células SIRC. Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 6: Células Vero **(** Fonte: Arquivo pessoal)

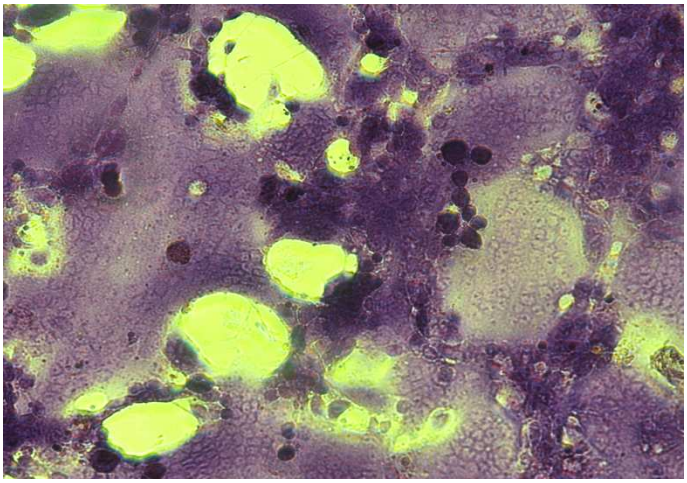

Figura 7: Efeito citopático do vírus HHV-1 em célula Vero.
(Fonte: Arquivo pessoal)

1.3.2. Biologia Molecular

1.3.2.1. Mecanismos do Real-Time qRT-PCR

Real-Time qPCR (PCR quantitativo em tempo real) é um importante desenvolvimento da tecnologia de PCR que permite a detecção e medição de produtos gerados durante cada ciclo do processo de PCR. Tornou-se possível através da introdução de iniciadores, sondas ou produtos amplificados marcados com moléculas fluorescentes, os quais produzem mudança no sinal de fluorescência quando interagem diretamente ou quando há hibridização com o produto amplificado (Santos, Romanos, Wigg, 2008).

A curva ideal apresenta-se de forma sigmoidal. Quando há quantidade suficiente do produto amplificado, as taxas de amplificação entram em uma fase linear, que em condições ideais a quantidade de produto amplificado aumenta a

razão de 1 $\log_{10}$ a cada 3,32 ciclos. Conforme os reagentes são consumidos a reação entra em uma fase de transição, chegando à fase de platô, onde não há aumento da emissão de fluorescência (Santos, Romanos, Wigg, 2008).

Existem três métodos de detecção de produtos da PCR em tempo real, sendo: SYBR green, o qual emite fluorescência quando ligado ao DNA de fita dupla; o FRET, que se baseia no uso de sondas marcadas com corantes fluorescentes e segue o princípio de transferência de energia de ressonância fluorescente, e o mais usado que é baseado na interação de sondas fluorescentes Taqman (Santos, Romanos, Wigg, 2008).

A sonda Taqman é uma sonda oligonucleotídica, concebida para hibridar no interior da sequência alvo. A clivagem da sonda ocorre durante a PCR por causa da atividade de nuclease 5´ de Taq polimerase que pode ser utilizado para detectar a amplificação específica do produto-alvo (Sanajay & Kramer, 1996).

Seu princípio baseia-se na atividade de exonuclease 5'-3 ' da Taq polimerase para clivar uma sonda duplamente marcada durante a hibridação para a detecção complementar da sequencia alvo e a detecção baseada no fluoróforo. Tal como em outros métodos de PCR quantitativos o sinal da fluorescência resultante permite medições quantitativas da acumulação do produto durante as fases exponencial do PCR. No entanto, a sonda TaqMan aumenta significativamente a especificidade da detecção (Sanajay & Kramer, 1996).

As sondas TaqMan hibridam dentro de uma região de DNA que é amplificado por um conjunto específico de iniciadores. Como a polimerase Taq estende o iniciador e sintetiza a cadeia simples, a partir de 3' para 5' da cadeia complementar, a atividade de 5' a 3' exonuclease da polimerase Taq degrada a sonda que tenha emparelhado com o molde. A degradação da sonda liberta o

fluoróforo a partir dele e quebra a estreita proximidade com o inibidor, de modo a aliviar o efeito de extinção e permitindo a fluorescência do fluoróforo. Assim, a fluorescência detectada no termociclador de PCR quantitativa é directamente proporcional ao fluoroforo libertado e a quantidade de DNA molde amplificada. Valores abaixo de CT 38 são considerados positivos.

A metodologia da PCR em tempo real representou significativa contribuição para o diagnóstico clínico por ser um método mais rápido e mais sensível, mas ainda é uma técnica de alto custo.

1.4. Própolis

A palavra própolis teve sua origem na Grécia Antiga, sendo que “pro” significa “em defesa” e “polis” significa “cidade ou comunidade”, sendo a palavra própolis “em defesa da comunidade”, ou seja, defesa da colmeia. Também é conhecida como cola de abelha, descrevendo um de seus principais papéis na estrutura da colmeia, que é utilizado como “cimento” no vedamento de furos e fissuras na estrutura da colmeia e para impermeabilização. Outra utilidade da própolis é o envolvimento de intrusos que entram na colmeia, evitando sua putrefação e ação de microorganismos em seu interior (Bankova, 1999). Além de ser utilizada, também, no preparo de locais assépticos onde se localiza a abelha rainha (Marcucci, 1996).

Há relatos do uso da própolis na medicina popular desde 300 a.C. (Da Silva et al., 2006). Começou a ser mais utilizada como tratamento no ano de 1950 na ex-União Soviética e em países do leste da Europa. Somente em 1980 a própolis obteve popularidade nos países do oeste da Europa, nas Américas e no Japão, sendo o principal importador de própolis, tendo preferência pela própolis brasileira (Salatino et al., 2005).

1.4.2.Composição Química

A composição química da própolis é complexa e bastante variada, estando relacionada com a flora de cada região (Park et al., 2002), com o período de coleta (Rocha et al., 2003), com a temperatura da região (Bankova et al., 1999), com a variabilidade genética das abelhas (Park et al., 1998), estação do ano (Valencia et al., 2012), a planta utilizada (Fabris et al., 2013) e o material utilizado pela abelha na confecção da colméia , como por exemplo a utilização de terra (Kerr et al., 1987).

Alguns componentes são comuns a todos os tipos de própolis, enquanto há outros componentes que são particulares de cada tipo de própolis, proveniente do tipo de planta utilizada (Vargas et al., 2004).

Sua composição inclui flavanódes, como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol; ácidos aromáticos, ésteres, aldeídos, cetonas, terpenóides, fenilpropanóides, esteroides, aminoácidos polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos, entre outros que aparecem em pequenas quantidades. Elementos inorgânicos também estão presentes, como cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício (Bankova, 1999; Hu et al., 2005; Marcucci, 1996; Rocha et al., 2003).

Os primeiros trabalhos foram realizados em zonas temperadas, mostrando que seus principais componentes são flavanóides (pinocembrina, pinobanksina, galangina e crisina). Também foi descrita a presença de fenilpropanoides e seus ésteres. A fonte desses constituintes são exsudatos de *Populus spp*. (Ghisalberti, 1979). Na Grécia, Turquia e Creta a maior parte das própolis são compostas de diterpenos ou antraquinonas (Salatino et al., 2011). Em Malta foram encontrados diterpenos daucanos, ésteres de ácidos hidroxibenzóicos, tendo como fonte provável a *Ferula communis.* Em Taiwan e

Okinawa, encontrou-se geranil flavanonas, tendo como componente de sua composição exsudato de *Macaranga tanarius* (Kumazawa et al., 2004; Bankova, 2005).

As própolis da região tropical são extremamente diferentes das própolis de outras regiões. Em Cuba e na Venezuela, a própolis vermelha, característica da região possui benzofenonas prenilanas, provenientes das flores da espécie *Clusia* (Cuesta-Rubio et al.,1999; Tomas-Barberan, 1993). Na Argentina e Uruguai a própolis tem composição bastante semelhante às própolis europeias (Park et al., 2002).

No Brasil a composição da própolis depende da região. A própolis vermelha, localizada ao longo do mar e costa de rios no nordeste brasileiro é proveniente do exsudato vermelho da superfície da *Dalbergia ecastophyllum* (Lustosa et al.,2008). As própolis da região sul são semelhantes ás própolis europeias, sendo composta principalmente por flavanóides (Park et al., 2002). Na Amazônia a própolis produzida é semelhante às própolis de Cuba e da Venezuela. A própolis verde, mais facilmente encontrada no sudeste é composta por fenilpropanóides prenilados e ácidos cafeoilquínicos (Salatino et al.,2005).

O conteúdo salivar de cada espécie de abelha também é um diferencial na composição da própolis, como é o caso da secreção hipofaringeal de Apis Mellifera, que possui ação antimicrobiana (White et al., 1963). No caso das abelhas da espécie *Scaptotrigona postica* foram encontradas substâncias antimicrobianas, sendo identificadas enzimas como fosfatases ácidas e hidrolases (Costa & Cruz-Landim, 2001). Também é conhecido que a β-glucosidase, encontrada na saliva das abelhas, converte os flavanóides das plantas em flavanóides (aglicona) (Park et al., 1998).

1.4.3. Propriedades Biológicas

Estudos mostram que a própolis possui propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antivirais, antiinflamatórias, hepatoprotetoras, antioxidantes, antitumorais, imunomodulatórias, entre outras (Bankova, 2005; Kosalec et al.,2005; Alencar et al.,2005).

As propriedades antibacterianas e antifúngicas são as mais estudadas, com provável ação de inibição da RNA-polimerase bacteriana, atribuídas à flavonona pinocembrina, ao flavanol galagina e ao éster feniletil do ácido caféico (Uzel et al., 2005). As bactérias gram-positivas são mais sensíveis ao efeito inibitório da própolis que as gram-negativas. (Marcucci et al., 2001; Rezende et al., 2006). Essa resistência maior das bactérias gram-positivas podem ser explicadas pelo fato de possuírem uma parede celular diferenciada quimicamente e com maior teor lipídico (Vargas et al., 2004).

A própolis também tem apresentado atividade fungistática e fungicida em leveduras causadoras de onicomicoses (Oliveira et al., 2006; Longhini et al., 2007).

A atividade antiinflamatória atribuída à própolis se dá pela presença de flavanóides (galangina), apresentando atividade inibitória contra a ciclooxigenase e lipooxigenase (Borreli et al., 2002). Também apresentou ação de inibição da síntese de prostaglandinas, atividade fagocítica e estimulação da imunidade celular (Kosalec et al., 2005).

Estudos demonstraram que o ácido caféico, éster feniletil do ácido caféico e quercetina presentes na própolis, tem sido úteis no controle do crescimento tumoral. Além de demonstrarem atividade da própolis no sistema imunológico,

ativando macrófagos e estimulando anticorpos, por exemplo (Orsolic et al., 2004). Também são atribuídas propriedades cicatrizantes relacionadas aos flavanóides e ácidos fenólicos (Arvouet-Grand et al., 1994).

Sua atividade antioxidante é atribuída aos flavonoides, onde sua alta concentração é relacionada a alta atividade anti radicais livres em extratos de própolis da Argentina (Ahn et al., 2007). Em relação à própolis brasileira, acredita-se que o extrato aquoso possua maior atividade antioxidante quando comparada com o extrato alcoólico (Mani et al., 2006).

Foram também descritas a ação sobre regeneração cartilaginosa e óssea (Burdok, 1998) e cardioprotetora (Chopra et al., 1995; Cook & samman 1995).A atividade antiviral é largamente estudada e será descrita a seguir.

1.5. Scaptotrigona postica

Pertencentes à família Apidae, subfamília Meliponinae são também conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão. São conhecidas como “mandaguari”, “canudo” ou tubi por construírem suas colmeias em cavidades de troncos de grandes árvores e também conhecidas por “torce cabelo”. Essas abelhas misturam material resinoso de plantas com cera e terra (barro) formando o geoprópolis (Kerr, 1987; Nogueira-Neto, 1994; Bankova et al.,1998;).

O gênero *Scaptotrigona* possui as abelhas mais robustas dos Meliponini, medindo de 5mm a 7mm, com o corpo negro (Figura 9), de colônias populosas e bastante agressivas (; Nogueira-Neto, 1970; Michener, 2017).

Figura 8: Colônia de *Scaptotrigona postica.* Fonte: Olímpio em: https://www.flickr.com/photos/fotolimponativebee/1663991144

São encontradas em toda a região neotropical e apresenta uma grande diversidade de formas. A *Scaptotrigona postica* é encontrada, geralmente, em

São Paulo e Minas Gerais, podendo também ser encontrada em outras regiões (Moure, 1942).

Os ninhos são constituídos com cerume, uma mistura de cera e resinas, apresentando-se em forma de túnel que desemboca em um local perto das células de cria. Durante a noite o túnel não é fechado (podendo ser fechado nas épocas de frio), durante os horários de maior movimento algumas abelhas operárias guardam a entrada do túnel (Nogueira-Neto, 1970; Michener, 2017).

Existem poucos trabalhos sobre as própolis das abelhas indígenas sem ferrão (Bankova et al., 1998). Os poucos estudos sobre a atividade biológica da *Scaptotrigona postica* são em relação aos efeitos antimicrobianos sobre as bactérias *Enterococcus faecalis*, *E. coli* e *S. aureus* (Maia-Filho et al., 2005). Em relação à capacidade fungicida um estudo com *Candida albicans* mostrou a capacidade de aumentar as células fagocitárias sanguíneas (Possamai et al., 2013).

Na região de Barra do Corda, no estado do Maranhão, o geoprópolis de *Scaptotrigona postica* é utilizado popularmente como pomada no tratamento de tumores e cicatrização de feridas.Existem poucos estudos sobre as atividades biológicas e composição química de *Scaptotrigona postica*. Cavalcante (2017), realizou um estudo em camundongos com tumor de Erlich, tratando-os com a própolis de Scaptotrigona postica. Foi observada uma significativa redução do tumor. Em outro estudo, a própolis foi usada em ratos Wistar, para prevenção de câncer de cólon, observou-se redução da expressão de COX-2 e aumento da CAPASE III (Cavalcante, 2017).

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho é a análise do extrato hidroetanólico do geoprópolis de *Scaptotrigona postica*, verificando sua ação na replicação dos vírus do herpes e rubéola.

2.1.2. Objetivos Específicos

- Examinar a atividade antiviral do geoprópolis de *Scaptotrigona postica*
- Caracterizar quimicamente o extrato de geoprópolis
- Avaliar a ação do geoprópolis sobre a inibição dos vírus da rubéola e do herpes tipo1, a partir da infecção de células de Rim de macaco verde africano (Vero) e células epiteliais de córnea de coelho (SIRC).

3. Material e Métodos

3.1. Obtenção do extrato da própolis

A própolis foi coletada pelo produtor Wilson Oliveira na cidade de Barra do Corda (Figura 9) no estado do Maranhão que fornece este tipo especifico de própolis. A secagem da geoprópolis foi realizada em estufa (40ºC) para evitar a proliferação de fungos. Para a preparação do extrato etanólico, a geoprópolis foi cortada em pequenos pedaços.

O extrato etanólico foi preparado no Instituto Butantã do Estado de São Paulo, usando 20g de geoprópolis dissolvida em 100 ml de metanol P.A., através do processo de maceração automática a temperatura ambiente, durante 4 dias. O extrato foi filtrado usando algodão e papel de filtro Whatmann Nº 4 e concentrado em rotaevaporador até a completa evaporação do metanol. A seguir o extrato etanólico foi ressuspendido em uma mistura de etanol e água (50:50, v/v), por meia hora de agitação (150 rpm) a temperatura ambiente e extraído, sucessivamente com metanol, para que toda a cera contida na geoprópolis fosse eliminada. O extrato foi filtrado novamente usando algodão e papel de filtro Whatmann Nº 4 e concentrado em rotaevaporador até a completa evaporação do etanol. Para a realização dos testes de atividade antiviral, o extrato etanólico seco apresentou peso de 156µg e foi dissolvido em 1mL água Milli-Q (extrato hidroetanólico).

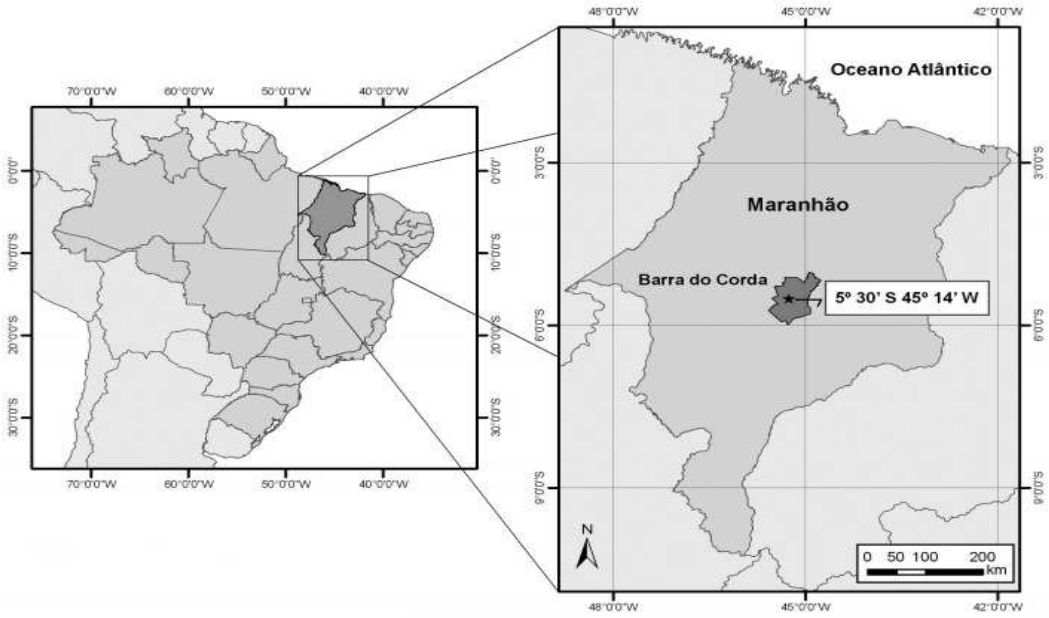

Figura 9: Município de Barra do Corda, área central do estado do Maranhão.
Fonte: http://www.scielo.br/pdf/aa/v45n3/1809-4392-aa-45-03-00307.pdf

3.1.2. Análise do extrato hidroetanólico de geoprópolis por cromatografia líquida de alta resolução

O extrato hidroetanólico de geoprópolis (30 µL) foi analisado por cromatografia líquida de alta resolução acoplado a um detector DAD e um espectrômetro de massas usando o equipamento da DADSPD-M10AVP Shimadzu acoplado ao Esquire 3000 Plus, Bruker Daltonics da Central Analítica da USP. A coluna utilizada foi de fase reversa Phenomenex Gemini C-18 (250 x 4.6 mm – 5um). A análise usando o detector diodo array foi realizada no comprimentos de onda de 300 nm, empregando-se gradientes de solução aquosa de ácido acético 0,1% (A) e metanol (B): 10 min – 20% B em A, 20 min – 40% B em A; 30 min – 60% B em A; 40 min – 80% B em A; 50 min – 100% B. O fluxo de solvente foi de 1,0 mL/min e a temperatura da coluna de 40℃.

A caracterização dos constituintes da geoprópolis foi realizada através das análises dos espectros de ultravioleta obtido por Diodo Array e o de massas obtido por HPLC-ESI-MS/MS, através da comparação dos respectivos espectros “MS/MS” (Coelho et al. 2015, Negri et al., 2011 and Mihajlovic et al., 2015).

3.2. Culturas Celulares

Baseado na suscetibilidade do vírus sarampo e rubéola respectivamente em Células das linhagens Vero (células de rim de macaco verde africano-ATCC CCL 81), e células de córnea de coelho SIRC (células epiteliais de córnea de Coelho- ATCC CL 60), foram cultivadas a 37ºC em frascos de cultura T75 contendo 10 mL de meio modificado por Dulbecco’s (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen/Life Carlsbad, CA, EUA).

3.3. Teste de Viabilidade Celular

No Instituto Adolfo Lutz (Núcleo de Doenças Respiratórias), foi avaliado em triplicata, a toxicidade da geoprópolis através do teste MTT, do qual a viabilidade celular é indicada pela atividade mitocondrial, sendo essa demonstrada pela atividade das enzimas sorbitol deidrogenase (SDH) e lactato deidrogenase (LDH) que reduzem o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a cristais de formazan (MOSMANN, 1983).

Células Vero e SIRC foram cultivadas em placas de 96 escavações em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen/Life Carlsbad, CA, EUA). Após 24hs, o meio de cultura foi retirado e foram adicionados aos poços meios de cultura contendo concentrações da própolis (0, à 156 µg/mL. As placas foram incubadas durante 24 horas a 37℃. Após este

período, foi realizado o descarte da solução e a placa foi lavada duas vezes com PBS estéril a 37 ℃, 100 µl de solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados a todos os poços e a placa foi incubada por 2h, a 37 ℃. Uma vez removida dos poços a solução de MTT, 100 µl de DMSO 100% foi acrescentado a cada poço, incluindo-se poços sem células. A placa foi agitada por 5 minutos e, em seguida deixada em repouso por outros 5 minutos para estabilização da cor. A leitura foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 540 nm. A porcentagem de células viáveis de cada amostra foi calculada a partir do valor de absorbância obtido pela subtração da média dos controles pela média dos brancos, sendo esse último valor considerado como 100% de células viáveis.

3.4. Vírus e Infecção

Para os testes de atividade antiviral, foram utilizados as seguintes amostras: vírus da rubéola - vírus padrão RA27/3 e herpes vírus - vírus padrão (McIntyre) previamente titulados através da metodologia da diluição final, conforme descrito por Reed e Muench (1938). Amostras dos cultivos infectados foram coletadas para a determinação do título viral como descrito por Reed e Muench (1938). Todos os cultivos infectados foram mantidos a 37°C.

3.5. Estoque Viral

Foi criado um lote-estoque armazenado em freezer -80°C para cada vírus utilizado nos diferentes experimentos, obtido através da infecção de cultura de células Vero e SIRC em frascos de cultura T75. As células em confluência foram incubadas com os respectivos vírus por 1 hora a temperatura ambiente. Após esse período, os frascos foram completados com 10mL de meio DMEM contendo 2% de SFB. O sobrenadante foi colhido e centrifugado para retirada de células residuais, aliquotado em tubos de 1ml pra congelamento em freezer a -80°C. Os estoques virais foram titulados como descrito por Reed e

Muench(1938). O título viral foi expresso em TCID50/mL (50% Tissue Culture Infectious Dose) o teste foi realizado em quadriplicata, em placas de 96 poços contendo $3x10^5$cel/mL. Foi realizado diluições do vírus de 10^{-1} a 10^{-10}, adicionando-se 200ul de cada diluição em 10 poços de placas, contendo tapete de células já aderidas nos poços, após 1hora de incubação, foi adicionado 100uL de meio DMEM contendo 10% se SFB. Foi observado o efeito citopático (ECP) diariamente, até observar 100% de ECP.

3.6. Avaliação do efeito da própolis sobre a replicação viral

3.6.1. Ensaio em Placa

Para avaliação da atividade sobre o vírus da rubéola foi utilizada a titulação viral de 10^{-3}, correspondente a TCID50% do vírus e como modelo de infecção foram utilizadas as células SIRC. Para o vírus do HSV-1 foi utilizada a diluição de 10^{-7}, também correspondente à TCID50% do vírus, e como modelo de infecção as células Vero. As células foram cultivadas em placas de 96 poços, na concentração de $3x10^5$ células/mL em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Para cada ensaio foram utilizadas 16 amostras de cada vírus e os testes foram realizados em quadruplicata.

Para ambos os vírus, durante o teste, os meio de cultura DMEM foram suplementados com 2% de soro fetal bovino. As culturas foram mantidas em estufa a 37℃, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2 durante 48 horas. Após 48 horas, diferentes concentrações de própolis foram avaliadas em três condições diferentes (Beyleveld et al., 2013):

1 hora antes da infecção: Meios de cultivo contendo diferentes concentrações (2, 8, 12, 24, 48 e 96 µg/mL) de geoprópolis foram adicionados aos poços e

incubadas a 37℃, atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2. Após este período, o meio foi retirado, os poços foram lavados com DMEM e em seguida, foram adicionados aos poços, meio de cultivo contendo vírus nas concentrações descritas acima. As placas foram incubadas a 37℃ por 1 hora e posteriormente, os poços foram lavados com DMEM para retirada do vírus que não penetraram na células.

- **1 hora após a infecção:** Os vírus da rubéola e herpes nas concentrações descritas acima, foram adicionados aos poços, e as placas incubadas a 37℃, durante 1 hora. Após este período, os poços foram lavados com meio DMEM para retirada dos vírus que não penetraram nas células e em seguida, foi adicionado aos poços, a geoprópolis nas concentrações (2, 8, 12, 24, 48 e 96 µg/mL) e incubadas a 37℃ durante 1 hora.

- **Ensaio Virucida**: O vírus nas concentrações acima descritas, foram tratados com 24, 48 e 96 µg/mL de geoprópolis e incubados com as frações de própolis nas concentrações descritas durante 1 hora em temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram adicionadas aos poços contendo as células Vero e SIRC.

- **Ensaio de Ligação Viral**: o ensaio foi realizado inicialmente a 4°C, pois a esta temperatura, o vírus se liga ao receptor, mas não penetra na células. Os vírus foram tratados com geopropolis nas concentrações de 24, 48 e 96 µg/mL durante 1 hora em temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram inoculadas com os vírus tratado com o geoprópolis nas concentrações descritas acima e incubadas a 4°C por 1h para permitir que o vírus se ligasse às células. As placas foram lavadas com meio DMEM para retirada dos vírus que não se ligaram ao receptor. Após a lavagem, as células foram incubadas a 37°C.

  As placas foram incubadas a 37°C durante 72 horas, em todos os

experimentos descritos acima. Como controle negativo, foram utilizados o meio DMEM +10% de DMSO e como controle positivo os vírus inoculados nas células. Em relação ao vírus herpes foi utilizado o aciclovir (20ug/mL), como controle positivo da inibição de replicação viral. No vírus da rubéola, não foi utilizado controle positivo da inibição de replicação viral, pois não há inibidores conhecidos. Após o período de incubação, o tapete celular foi lisado e armazenado a -70ºC. As amostras foram analisadas por reação em cadeia da polimerase em tempo real. (qPCR).

3.6.2. Diagnóstico Laboratorial por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR).

3.6.2.1. Extração do Ácido Nucléico das Amostras Clínicas

Os ácidos nucleicos das amostras foram extraídos utilizando o protocolo otimizado do Kit de extração de DNA e RNA Fabricante Qiagen-Germany (QIAamp® DNA Mini Kit) para rápida e eficiente purificação de ácido nucléico viral. Utilizando micro tubo estéril de 2,0mL, foi adicionado 200µL de secreção nasofaringe, 20µL de proteinase K e 200µL de tampão AL (incluso no Kit), seguido de incubação a 56ºC por 10 min. Após o período de incubação, centrifugou-se rapidamente para remover gotas da tampa. Foi adicionado 200µL de etanol absoluto. A mistura foi agitada no vórtex e incubada por 15 segundos. Após adicionada a mistura na coluna de purificação do Kit, foi seguido de centrifugação 6.000xg por 1min. A coluna foi lavada com 500µl de tampão W1 “Buffer AW1” centrifugação 6.000 x g por 1min. Após foi adicionado 500 µl de “Buffer AW2” centrifugação 6.000 x g por 1min de acordo com o protocolo do fabricante. O ácido nucléico foi eluído com 60µl Buffer AE (água estéril livre de RNAse e DNAse), após incubação por 5 min à temperatura ambiente e

centrifugação a 6000xg por 1 min. O material DNA extraído foi armazenado a -20℃ até o momento do uso.

3.6.2.2. Primers (Oligonucleotídeos)

O produto da extração das amostras foram submetidas à técnica de PCR em Tempo Real para detecção do DNA viral

Na tabela1, estão descritos os iniciadores utilizados e a sonda TaqMan® marcada na região 5´terminal com a molécula sinalizadora 6-carboxifluorescencia)FAM) e na região 3´terminal com Blackhole Quencher 1 (BHQ1). Os primers para o HSV-1 foram descritos por Watzinger et al. 2004. Os primers do vírus da rubéola por Abernathy et al. 2015. O protocolo foi realizado conforme descrito por ambos autores.

Tabela 1: Tabela de primers e sondas utilizadas na reação de qPCR para os vírus herpes e rubéola.

Primers Sondas	**Sentido**	**Sequência (5'para 3') Sonda (FAM para BHQ1)**	**Gene**	**Posição na amostra**
HSV-1	Sense	TTC TCG TTC CTC ACT GCC TCC C	US4	137279-301
HSV-1	Antisense	CGT CTG GAC CAA CCG CCA CAC AGG T	US4	137379-404
HSV-1	Sonda	GCA GGC ACA CGT AAC GCA CGC T	US4	137423-445
RV	Sense	CAA CAC GCC GCA CGG ACA AC	E1	8807-8826
RV	Antisense	CCA CAA GCC GCG AGC AGT CA	E1	8848-8820
RV	Antisense	CCA CGA GCC GCG AAC AGT CG	E1	8991-8996
RV	Sonda	AG GTC CAG GTC CCG CCC GAC	E1	8890-8893

Para avaliar a quantidade das amostras processadas com relação à recuperação do DNA extraído baseando-se no valor do CT e, à presença de possíveis inibidores da PCR, foi realizada uma PCR em tempo real de um controle interno endógeno cujo alvo foi a RNAse P humana seguindo o protocolo recomendado pelo CDC. Tabela 2

Tabela 2. Controle endógeno do gene alvo RNAse P humana

Primer	Sentido	Seqüência (5'para 3')	Produto amplificado
RnasePS	Sense	AGATTTGGACCTGCGAGCG	
RnasePA	Antisense	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	65 pares de bases
RnaseP	Sonda	6-FAMd(TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG)BHQ-1	

3.6.2.3. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para o Vírus da Rubéola

A reação de qRT-PCR foi processada utilizando a Superscript III RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA,USA), de acordo com as recomendações do fabricante, para amplificar um fragmento de 185 nucleotídeos na região de codificação E1 (8807-8991pb) descritos por Abernathy et al (2015). A reação foi realizada com reações de 25 µL, contendo tampão de reação (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,5 µl de enzima Superscript-Taq, 0,2 µM de cada iniciador, 0,1 µM de sondas marcadas (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 5 µl de RNA (Figueiredo et al., 2014). Este ensaio foi realizado em triplicata para cada amostra, incluindo o controle negativo de infecção. Foi utilizado o termociclador

em tempo real Applied Biosystems 7500 com o programa 50℃ por 10 min, 95℃ por 2 min e 40 ciclos de 95℃ por 15 seg e 60℃ por 1 min. Como controle endógeno para assegurar a qualidade do RNA, foi utilizado o par de iniciadores RNAseP RNA.

Para avaliação da especificidade e sensibilidade dos ensaios de PCR em tempo Real e PCR foram selecionados grupos positivos e negativos estocados na Seção. As amostras positivas de ensaios anteriores foram realizadas sequenciamento e estocadas para serem utilizadas como padrão nas reações e as negativas procedentes de outras infecções.Quatro controles positivos com números de cópias conhecidos foram utilizados como padrões de quantificação.

3.6.2.4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para o Vírus do Herpes

No PCR em tempo real quantitativo para Herpes todo o procedimento foi realizado utilizando a Superscript III RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA,USA), de acordo com as recomendações do fabricante, para amplificar um fragmento de 166 nucleotídeos do gene US4 descrito por Watzinger et Al. (2004). O volume total de 25 µL, contendo tampão de reação (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,5 µl de enzima Superscript-Taq, 0,2 µM de cada iniciador, 0,2 µM de sondas marcadas (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 6 µl de DNA. Este ensaio foi realizado em triplicata para cada amostra, incluindo o controle negativo de infecção. Foi utilizado o termociclador em tempo real Applied Biosystems 7500 com o programa 50℃ por 2 min, 95℃ por 10 min e 50 ciclos de 95℃ por 15 seg e 60℃ por 1 min. Para avaliação da especificidade e sensibilidade dos ensaios de PCR em tempo Real e PCR foram selecionados grupos positivos e negativos estocados na Seção. As amostras positivas de ensaios anteriores foram

realizadas sequenciamento e estocadas para serem utilizadas como padrão nas reações e as negativas procedentes de outras infecções.

Para avaliação da especificidade e sensibilidade dos ensaios de PCR em tempo Real e PCR foram selecionados grupos positivos e negativos estocados na Seção. As amostras positivas de ensaios anteriores foram realizadas sequenciamento e estocadas para serem utilizadas como padrão nas reações e as negativas procedentes de outras infecções. Quatro controles positivos com números de cópias conhecidos foram utilizados como padrões de quantificação.

Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e os valores p 0,05 (< ou >) comparados pelo teste de Turkey para completar a análise.

O desvio padrão dos valores de cada experimento foi calculado. O desvio padrão é uma medida do grau de dispersão dos valores das replicatas experimentais, em relação ao valor médio obtido (média dos valores das duplicatas de dois experimentos independentes). As análises foram realizadas no programa Microsoft Office Excel 2003.

3.7. Microscopia Eletrônica

3.7.1. Análise Estrutural

Monocamada de células SIRC (células epiteliais de córnea de Coelho ATCC CL- 60) e Vero (células de rim de macaco verde africano ATCC CCL- 81) foram cultivadas em placas de 24 orifícios sobre o filme Aclar (Kingsley et al., 1988), com meio suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 20mM L-Glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA,USA). Os cultivos foram mantidos a 37ºC,

em atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2 em estufa automática. Após a formação da monocamada, o meio de cultura foi retirado e as células foram infectadas com os vírus padrões (Herpes e Rubéola) e com o preparo chamado de virucida (vírus incubado com própolis durante 1 hora antes da infecção). As células foram novamente incubadas a 37ºC, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2 em estufa automática, durante 48 horas. Após este período, as células foram processadas para análise por microscopia eletrônica (Taniwaki & Katchburian, 1998).

1) O meio de cultura foi cuidadosamente retirado da monocamada celular separadamente o sobrenadante e as células. As células foram centrifugadas 2000 RPM por 5 minutos. Foi descartado o sobrenadante e as células foram lavadas em um solução contendo tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 , 2 vezes por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante 200ul foi estocado a -70^0C para a realização do qPCR.

2) Em seguida, o material foi fixado em solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, durante 2 horas a 4℃.

3) O material foi lavado em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2, 3 vezes por 5 minutos cada.

4) Após a lavagem, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% contendo 0,8% de ferricianeto de potássio, 5mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, durante 1h a 4℃.

5) A seguir, o material foi lavado novamente em solução descrita no item 3.

6) Em seguida, o material foi desidratado em gradiente crescente de acetona 30% , 50%. 70%, 95% e 100% por 10 minutos cada.

7) A etapa de pré-embebição foi processada em misturas de acetona e resina (1:1, 1:2, 1:3) durante 3 horas e a embebição em resina pura deu-se por 12

horas. A resina utilizada para inclusão foi a Resina Embed 812, as amostras foram emblocadas em moldes de silicone e colocadas em estufa a 60℃ para polimerização por 72 horas.

Cortes ultrafinos, prateados de 70 - 90 nm de espessura, foram obtidos no ultramicrótomo e colhidos em telas de cobre revestidas com formvar. Os cortes foram contrastados com acetato de uranila a 2% por 10 minutos e Citrato de chumbo (Reynolds, 1963) por 10 minutos. Os cortes ultrafinos foram analisados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol 1011 e as imagens adquiridas com a camera Gatan 785 ES1000W Erlangshen.

3.7.2. Coloração Negativa

O sobrenadante das placas infectadas com os vírus herpes e rubéola foram analisadas pela técnica de coloração negativa (Brenner, et al., 1959). As grades de cobre foram revestidas com película de formvar/carbono. As grades foram tratadas com uma gota (30 µL) de Alcian Blue (Alcian Blue a 1% em ácido acético) por 10 minutos. Após a incubação foram lavadas em água destilada. Em seguida, foi adicionado sobre as grades 30 µL do sobrenadante das amostras virais por 10 minutos. Logo após, foram lavadas com PTK (ácido fosfotúngstico de potássio a 2% pH 6,8). O excesso de corante foi retirado com papel filtro e foram colocadas em uma placa de Petri e permaneceram a temperatura ambiente por 24 horas. As grades foram observadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol, modelo JEM 1011(Jeol/Massachussets/ EUA) e as imagens adquiridas com a camera Gatan 785.

4. Resultados

4.1. Análise estatística

Os dados foram submetidos à Análise estatística de Variância (ANOVA) e os valores p 0,05 (< ou >) comparados pelo teste de Turkey para completar a análise.

O desvio padrão dos valores de cada experimento foi calculado. O desvio padrão é uma medida do grau de dispersão dos valores das replicatas experimentais, em relação ao valor médio obtido (média dos valores das duplicatas de dois experimentos independentes). As análises foram realizadas no programa Microsoft Office Excel 2003.

4.2. Avaliação da citotoxicidade da fase hidroetanólica da geoprópolis sobre as culturas de células Vero e SIRC pelo método colorimétrico do MTT

A citotoxicidade da geoprópolis foi determinada pelo método colorimétrico do MTT. Nas figuras 10 e 11 são apresentadas as viabilidades das células Vero e SIRC quando tratadas com a geoprópolis. Os resultados obtidos a partir do ensaio de viabilidade demonstram que a geoprópolis nas concentrações até 128µg/mL não apresentaram redução significativa da viabilidade celular para ambas as células. Como observado, na concentração de 156 µg/mL houve redução da viabilidade celular para ambas as células.

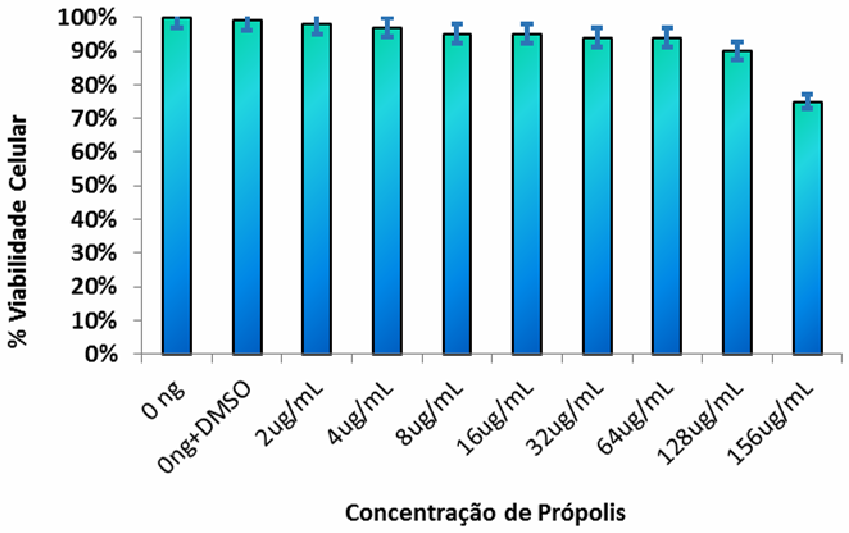

Figura 10: Avaliação da viabilidade celular usando o método do MTT em células Vero tratadas com diferentes concentrações da geoprópolis.

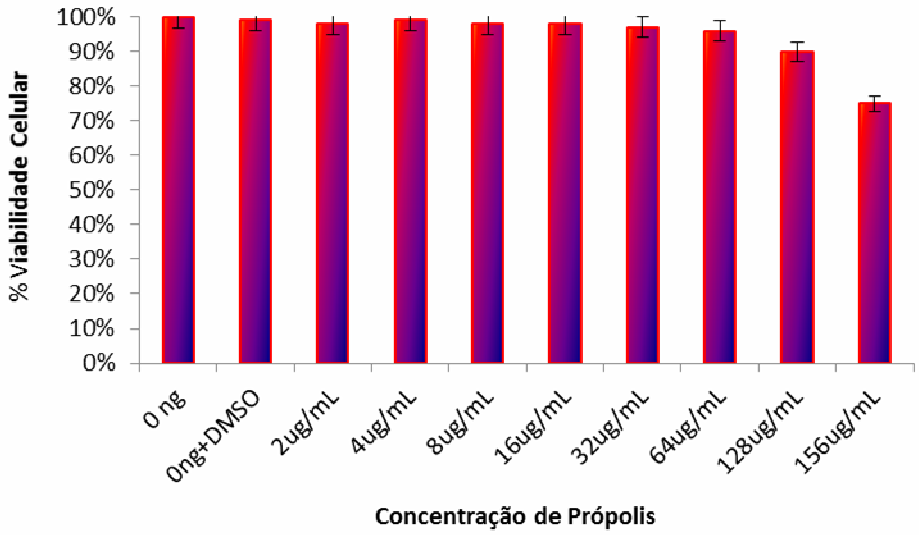

Figura 11: Avaliação da viabilidade celular usando o método do MTT em células SIRC tratadas com diferentes concentrações da geoprópolis

4.3. Avaliação do efeito da geoprópolis sobre a replicação viral do vírus Herpes tipo 1.

Para a avaliação da atividade antiviral do extrato da geoprópolis, e o seu mecanismo de ação, diferentes concentrações da geoprópolis foram utilizadas: 2, 8, 12, 24, 48 e 96 µg/mL respectivamente. Os resultados foram observados através do efeito citopático em cultura celular e finalizado através do teste qPCR.

Pré-tratamento da geoprópolis: Primeiramente analisamos a ação da geoprópolis 1 hora antes da infecção do vírus na célula.

Nos experimentos com o vírus do HSV-1 o pré-tratamento reduziu de forma significativa a replicação viral, na concentração da geoprópolis inicial de 2µg/mL inibiu a replicação em 40%. Na concentração de 96µg/mL da geoprópolis houve inibição na replicação viral de aproximadamente 100%.

Pós-tratamento: Analisamos também a ação da geoprópolis 1 hora após a infecção do vírus na célula. Observamos inibição na replicação viral a partir da concentração da geoprópolis de 2 µg/mL, porém acentuada inibição foi observada nas concentrações acima de 24µg/mL (Figura 12).

Também pudemos observar a ação do aciclovir na concentração testada (20 µg/mL) como controle positivo da inibição viral.

Também realizamos o ensaio de Ligação Viral e Virucida (Figura 13). Os resultados do ensaio de ligação viral mostraram que não houve ligação do vírus ao receptor celular. Este ensaio é realizado a 4℃ e nessa temperatura o vírus é capaz de se ligar no receptor celular, mas não ocorre a penetração do vírus dentro da célula. Após a incubação a 4℃, as amostr as incubadas novamente a 37℃ para que ocorra a penetração do vírus. Nossos resultados mostraram que o vírus herpes não conseguiu penetrar na célula, como observado no Gráfico 4,

e mostrou que não houve replicação viral. O mesmo resultado foi observado no ensaio virucida, onde o vírus herpes tratado com geoprópolis e posteriormente inoculado nas células Vero, mostrou que não houve replicação viral.

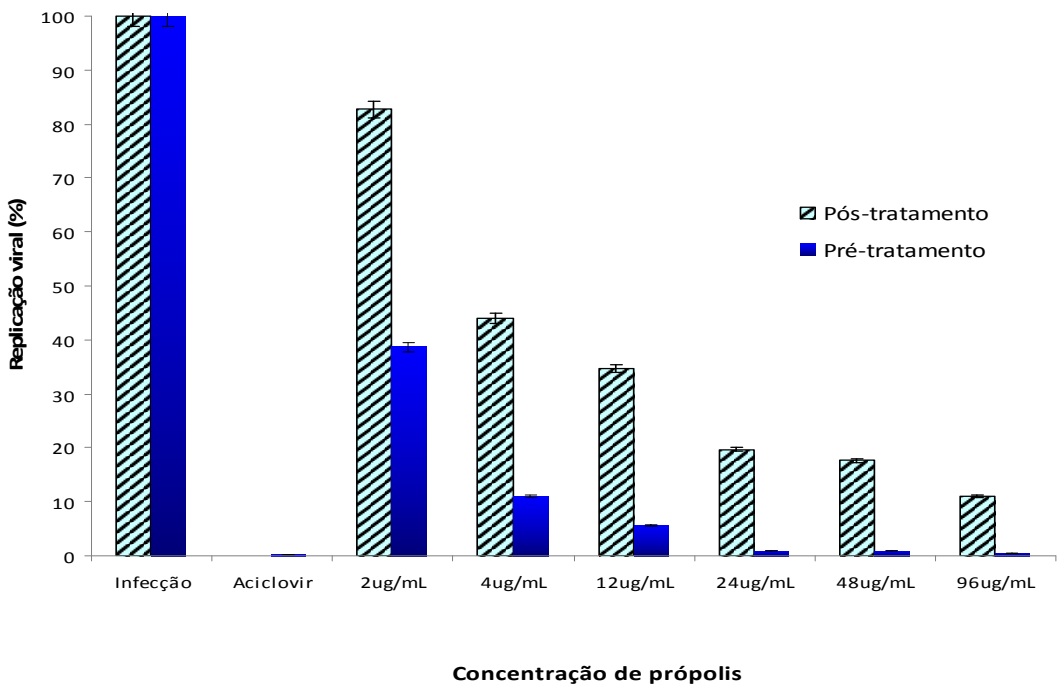

Figura 12: qPCR do vírus Herpes simples 1. Células Vero foram tratadas com própolis em diferentes concentrações e em duas condições: 1 hora antes da infecção (pré-tratamento) e 1 hora após a infecção (pós-tratamento).

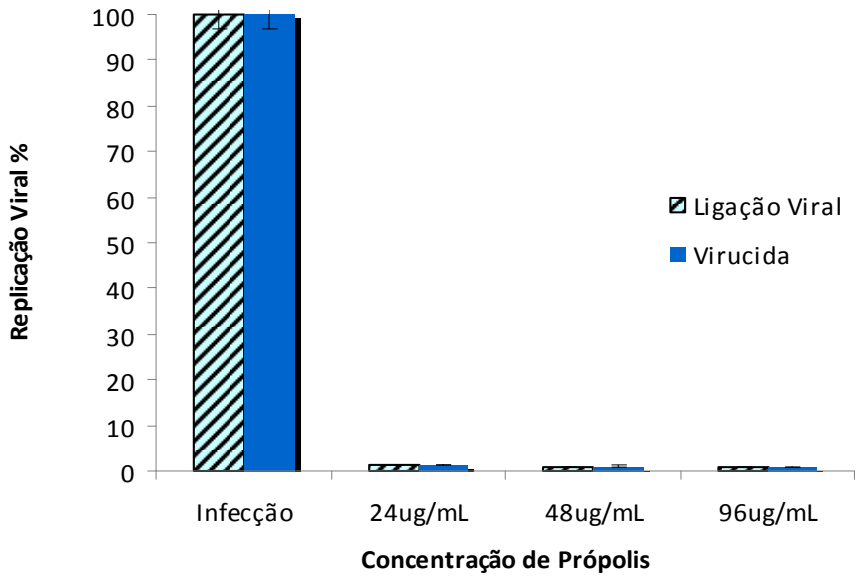

Figura 13: Pré-tratamento qPCR do vírus Herpes simples1 no tratamento com própolis denominado virucida e teste de ligação viral em diferentes concentrações.

4.4. Avaliação do efeito da geoprópolis sobre a replicação viral do vírus da rubéola.

Nos ensaios de atividade para o vírus da Rubéola também foram utilizadas as mesmas concentrações e condições do ensaio com o vírus do Herpes. Porém, diferentemente do Herpes, o vírus da Rubéola apresentou redução de carga viral aproximadamente em 85% (Figura 14).

Em relação aos ensaios de virucida e ligação viral, houve inibição da replicação viral para ambos os vírus nas concentrações estudadas (Figura 15).

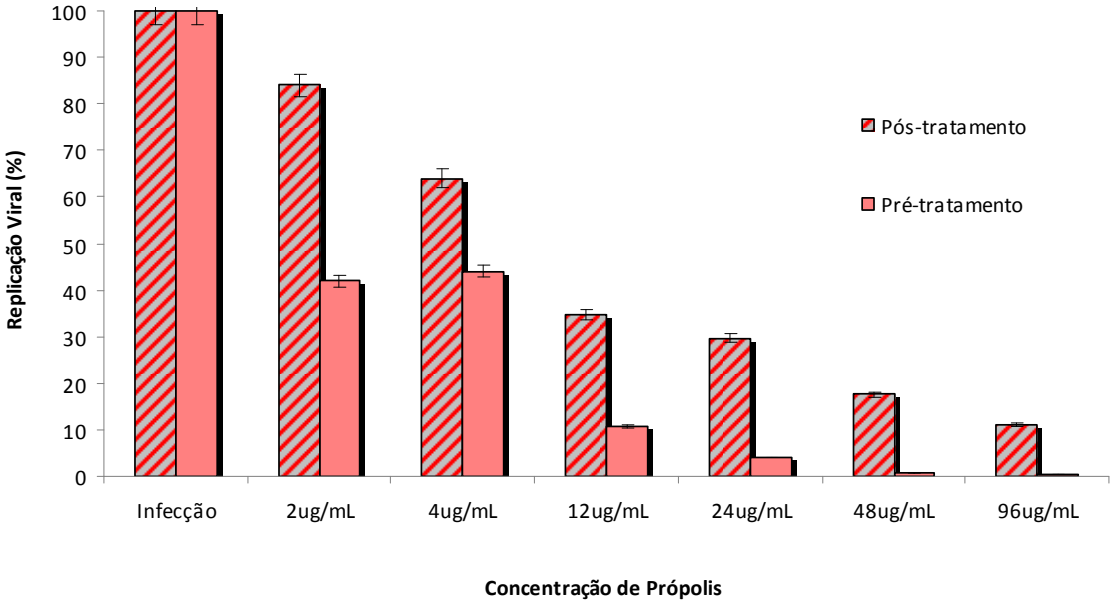

Figura 14: qPCR do vírus da rubéola. Células SIRC foram tratadas com própolis em diferentes concentrações e em duas condições: 1 hora antes da infecção (pré-tratamento) e 1 hora após a infecção (pós-tratamento).

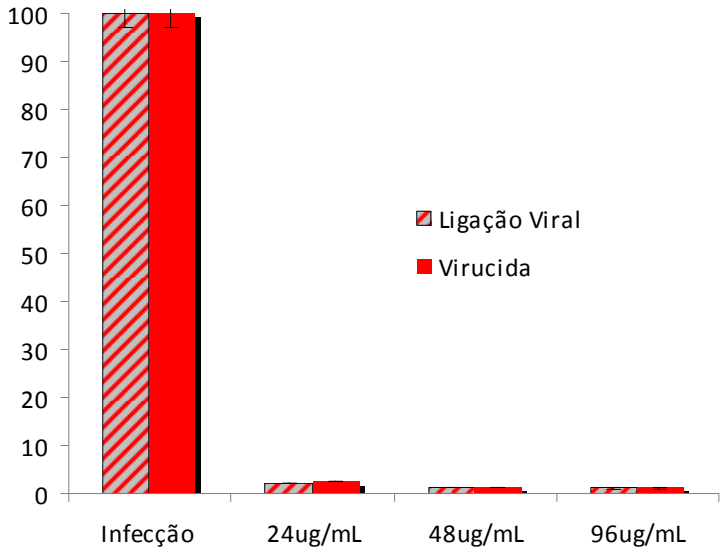

Figura 15: qPCR do vírus rubéola em células Sirc. no tratamento com própolis denominado virucida e teste de ligação viral em diferentes concentrações.

4.5. Análise fitoquímica utilizando a técnica HPLC-DAD-ESI-MS / MS de fase inversa

A Tabela 3 resume os dados dos constituintes detectados no extrato hidroetanolico de geopropolis de *S. postica*, incluindo o número de picos, o tempo de retenção, os íons moleculares e as fragmentações MS / MS. Os principais compostos encontrados foram vicenina-2 (7), catequina arabinosídeo (8), catequina rhamnosida (9), schaftóside (10), arabinpsídeo do ácido 5-O-caozoilquinico (23) e o alcalóide 7- (3-metoxi-2 (2), em conjunto com um baixo teor de derivados de amida de ácido hidroxicinâmico, tais como, N', N'', N' '- tris-caoleoil-espermidina (13), N', N'' -dicaffeoílo, N '''- cumeroil-espermidina (14), N' - caqueoil-N'', N '- dicoumaroil spermidina (15), N', N '', N '' - tris-p- , N '', N '' - tris-p-sinapoyl espermidina (18) e N ', N'', N' '- tris-p-feruloil espermidina (19), entre outras espermidinas triaciladas e genisteína glucósido. Foram caracterizados com base nos dados espectrais de MS relatados por Coelho et al.(2015). A presença de vicenina-2, arabinósido de catequina, catequina rhamnosida, schaftósido, arabinosido de ácido cafeoilquinico e a Alcalóide A 7- (3-metoxi-2-metilbutiril) -9-equimidinil retronecina em extrato hidroetanólico de geopolípolis de *S. postica* foi relatada anteriormente por Coelho et al., 2015.

A padronização foi realizada utilizando um padrão de vitexina, uma vez que as flavonas-C-glicosídeos, vicenina-2 e schaftoside são os principais constituintes encontrados neste extrato. A quantificação foi realizada com base na área do pico do sinal de UV (270 nm) dos cromatogramas de HPLC e curva de calibração utilizando vitexina como padrões. O teor de vicenina-2 e schaftósido em 13,8 mg / mL de extrato de geoprópolis foi 0,022 e 0,009 mg / mL, respectivamente. Nosso objetivo na realização deste experimento foi para detectar os componentes químicos constituintes do geoprópolis que possa estar agindo como maior atividade antiviral.

Tabela 3: Mostra os principais constituintes do extrato hidroetanólico do geoprópolis de S. postica detectados usando a técnica de HPLC-ESI-MS/MS

N°	Tempo min	HPLC/DAD Max (nm)	HPLC/(+)ESI-MS/MS m/z	HPLC/(-)ESI-MS/MS m/z	Identificação
1	2.8	320		[M - H]- - 341 MS/MS – 179	6-O-cafeoil glucosideo
2	3.5	-	[M + H]+ - 430 MS/MS - 412 (100), 385 (70), 315 (20)	[M - H]- - 428 MS/MS – 398	7-(3-metoxi-2-metilbutiril)-9- echimidinil retronecina ou derivado da metoxi echimidina
3	4.1	-	[M + H]+ - 541 MS/MS – 523 (100), 472 (20), 444 (40)		metoxi-heptahidroxi-flavona glicuronideo
4	5.5	260 - 355	[M + H]+ - 555 MS/MS – 537 (100), 486 (20), 454 (30)		dimetoxi- hexahidroxi-flavona glicuronídeo
5	6.0	260 - 355	[M + H]+ - 641 MS/MS – 479 (90), 317 (100)		Isoraminetina-7,3-O- diglucosideo
6	6.5	-	[M + H]+ - 490 MS/MS – 473 (40), 445 (100), 315 (60)		7-(3-dihidroxi-propoxi-2-metilbutiril)-9-echimidinil retronecina
7	10.3	270 - 335	[M + H]+ - 595 MS/MS - 577 (100), 559 (30), 529 (40), 511 (50), 499 (30), 475 (30), 457 (80)	[M – H]- - 593 MS/MS - 575 (20), 503 (40) 473 (100), 383 (40), 353 (50)	vicenina-2
8	11.2	280	[M + Na]+ - 445 MS/MS - 427 (100) [M + H]+- 423 MS/MS - 405 (100), 387 (30), 357 (80), 327 (50)	[M - H]- - 421 MS/MS – 403 (20), 331 (80), 301 (100)	catequina arabinosideo
9	12.6	280	[M + H]+ - 437 MS/MS - 419 (100), 371 (60), 341 (40)		catequina ramnosideo
10	13.0	270 – 335	[M + H]+ 565 MS/MS - 547 (100), 529 (70), 511 (80), 427 (85)	[M - H] - 563 MS/MS - 545 (40), 503 (50), 473 (80), 443 (100), 383 (60), 353 (60)	schaftosideo
11	14.0	-	[M + H]+ - 333 MS/MS – 315 (20), 206 (80), 179 (100)		2-galoil glicose
12	15.1	-	[M + Na]+ - 587 MS/MS – 569 (100), 551 (40) [M + H]+ - 565 MS/MS - 547 (100), 529 (30), 499 (60), 457 (50)	[M - H] - 563	isoschaftosideo
13	19.4	300 - 330	[M + H]+ - 632 MS/MS – 470 (100), 452 (20)	[M - H] - 630 MS/MS – 494 (80), 468 (100), 358 (40)	N',N",N'"-tris-cafeoil espermidina
14	19.6	300 - 330	[M + H]+ - 616 MS/MS – 454 (100), 436 (18)	[M - H] - 614 MS/MS – 478 (100), 452 (80), 358 (70)	N',N"-dicafeoil,N'"-coumaroil espermidina
15	19.8	300 - 330	[M + H]+ - 600 MS/MS – 454 (80), 438 (100),	[M - H] - 598 MS/MS – 478 (100), 358 (60)	N'-cafeoil-N",N'"- dicoumaroil espermidina
16	20.5	-	[M + H]+ - 770 MS/MS – 562 (30), 544 (100)		N'-hidroxiferuloil-N"-dihidrohidroxi sinapoil-N'"-dihidrosinapoil espermidina
17	22.2	300 - 330	[M + Na]+ - 606 MS/MS – 460 (100) [M + H]+- 584 MS/MS – 438 (80), 420 (100)	[M - H] - 582 MS/MS – 462 (100), 342 (40)	N',N",N'"-tris-p-coumaroil espermidina
18	23.2	300 - 330	[M + H]+ - 764 MS/MS – 558 (100), 540 (80)	[M - H] - 762 MS/MS – 596 (40), 582 (100)	N',N",N'"-tris-p-sinapoil espermidina
20	23.6	300 - 330	[M + Na]+ - 696 MS/MS – 520 (100), 344 (40) [M + H]+ -674 MS/MS – 498 (60), 480 (100)	[M - H] - 672 MS/MS – 522 (100)	N',N",N'"-tris-p-feruloil espermidina
21	25.0		[M + Na]+ - 455 [M + H]+ - 433 MS/MS – 415 (80), 311 (50), 293 (100)	[M - H] - 431 MS/MS – 413 (10), 309 (80), 265 (100)	6-C-fucosil luteolina
22	25.4	-	[M + Na]+ - 929 MS/MS – 753, 577 [M + H]+ -907 MS/MS – 731 (100), 713 (50)	[M - H] - 905 MS/MS – 755 (100), 605 (40)	catequina diferuloil diarabinosideo
23	35.4		[M + H]+ - 487 MS/MS – 469 (100), 451 (80), 433 (40)		ácido 5-O-cafeoilquinico arabinose

.

O cromatograma de amostras do extrato hidroetanólico de própolis de comprimento de 254nm detectou como principais constituintes as substâncias com tempo de retenção de 19,0 e 27,7 minutos de retenção (Figura 16).

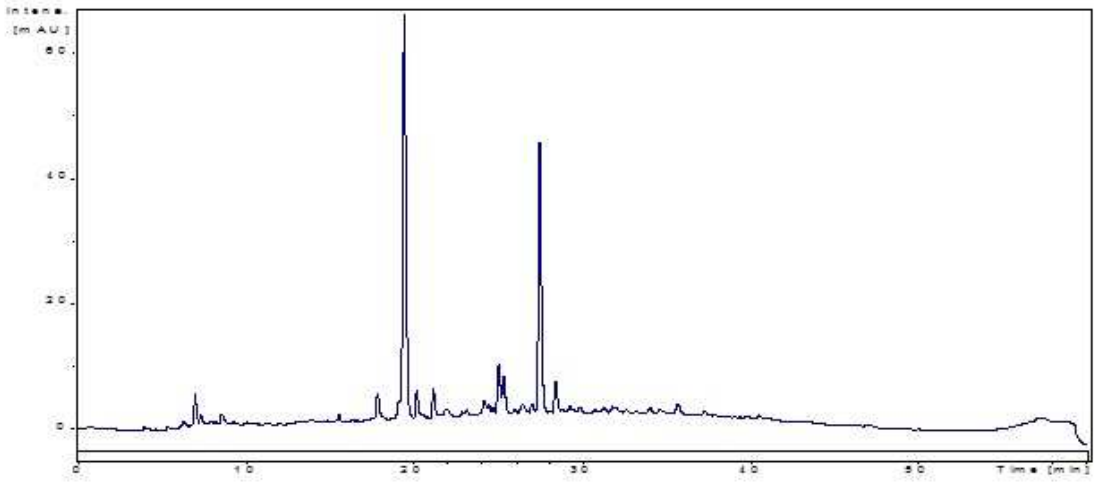

Figura 16: Cromatograma de amostras do extrato hidroetanólico de própolis, comprimento de 254nm.

O cromatograma do extrato hidroetanólico de própolis com comprimento de 300nm, detectou como principais constituintes as substâncias com tempo de retenção de 19,0; 25 e 27,5 min de retenção (Figura 17).

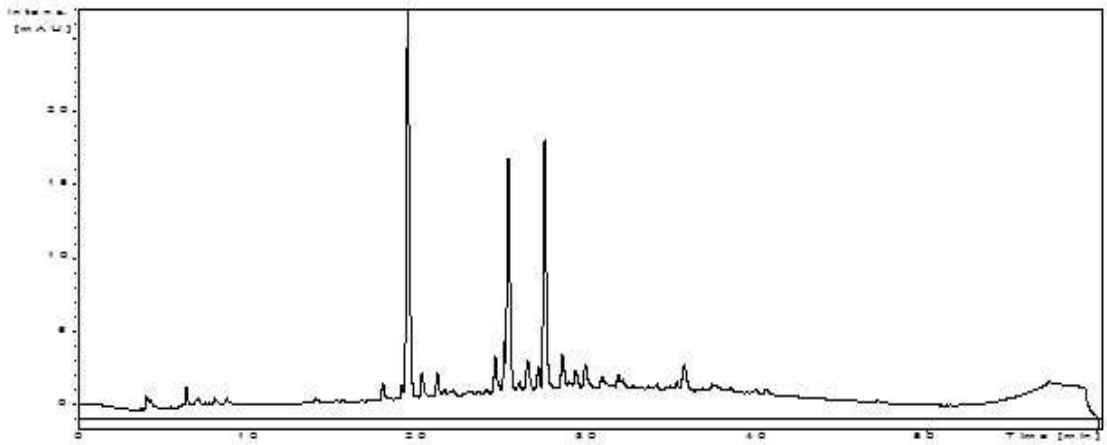

Figura 17: Cromatograma de amostras do extrato hidroetanólico de própolis de 300nm.

A figura 18 mostra o cromatograma de amostras do extrato hidroetanólico de própolis detectado por ESI-MS modo positivo, os compostos majoritariamente encontrados foram os de 15,5; 16,0; 27,5 e 33,5 minutos de retenção.

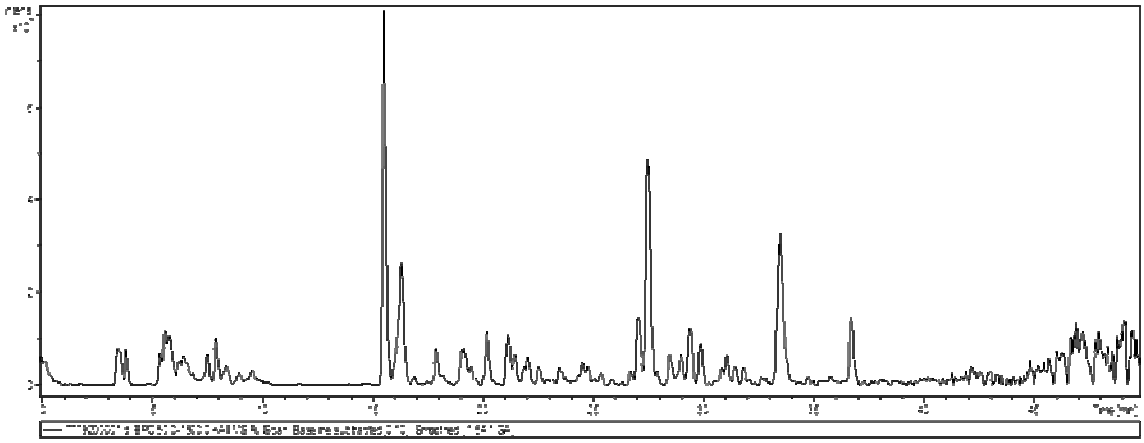

Figura 18: Cromatograma dos picos obtidos por ESI-MS modo positivo.

4.6. Microscopia Eletrônica (ME)

4.6.1. Análise Ultraestrutural e Coloração Negativa das células Vero inoculadas com amostra virucida

A análise ultraestrutural das células Vero inoculadas com a amostra virucida, apresentaram características de células saudáveis como observado na Figura 19-A. No citoplasma das células Vero (Figura19- B), podemos observar a presença de mitocôndrias intactas, complexo de Golgi liberando muitas vesículas e fragmentos de reticulo endoplasmático granular. Não foi observado nenhum complexo de replicação viral. Como controle positivo, as células Vero foram inoculadas com o vírus HSV-1e processadas para ME. Na Figura 19- C podemos observar um vírus totalmente formado próximo a célula.

Na Figura 19-D, visualizamos o vírus Herpes tratado com geoprópolis e processado pela técnica de coloração negativa. Podemos observar que o vírus está com a sua morfologia totalmente alterada.

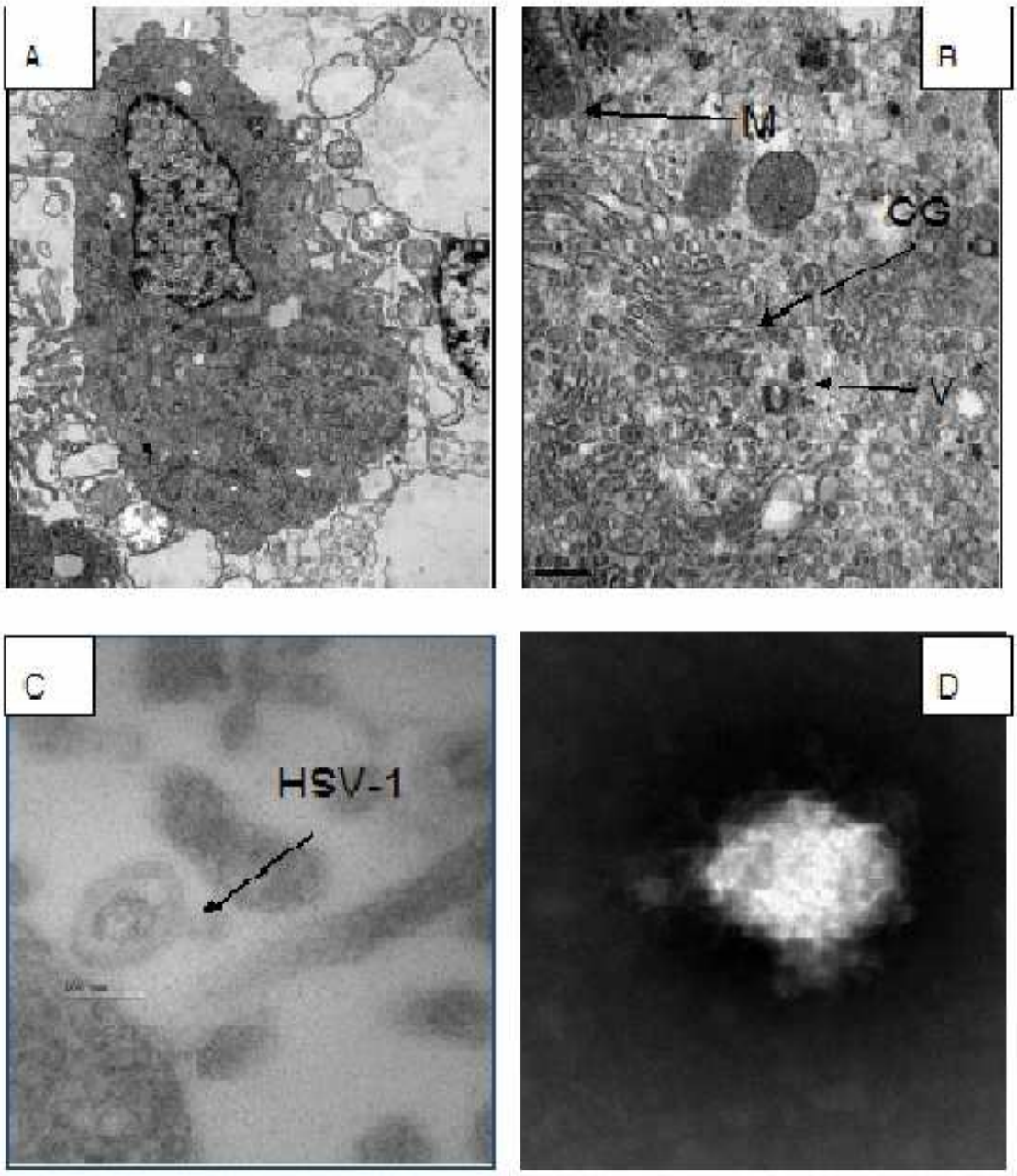

Figura 19: Células Vero cultivadas e inoculadas com amostra virucida e analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. Na Figura A, observa-se a célula Vero infectada ainda integra. Em B, note o citoplasma da célula Vero contendo mitocôndrias intactas, complexo de Golgi com vesículas sendo liberadas e retículo endoplasmático granular. Na figura C, célula Vero infectada com HSV-1 mostrando um vírus totalmente formado. Na Figura D, o vírus Herpes incubado com geoprópolis e corado pela técnica de coloração negativa. Visualizamos o vírus Herpes com a morfologia completamente alterada.

4.6.2. Análise Ultraestrutural e Coloração Negativa das células SIRC inoculadas com amostra virucida

A análise ultraestrutural das células SIRC inoculadas com a amostra virucida, apresentaram características de células saudáveis como observado na Figuras 20-A. No citoplasma das células (Figura 20-B) podemos observar a presença de mitocôndrias intactas, complexo de Golgi com vesículas sendo liberadas e retículo endoplasmático granular. Não foi observado nenhum complexo de replicação viral. Como controle positivo, as células SIRC foram inoculadas com o vírus da rubéola e processadas para Microscopia Eletrônica de Transmissão. Na Figura20-C podemos observar o vírus da rubéola totalmente formado, próximo aos prolongamentos da célula SIRC. Na Figura 20-D, visualizamos o vírus da rubéola tratado com geoprópolis, processado pela técnica de Coloração negativa. Note que o vírus da rubéola está com a sua morfologia totalmente alterada.

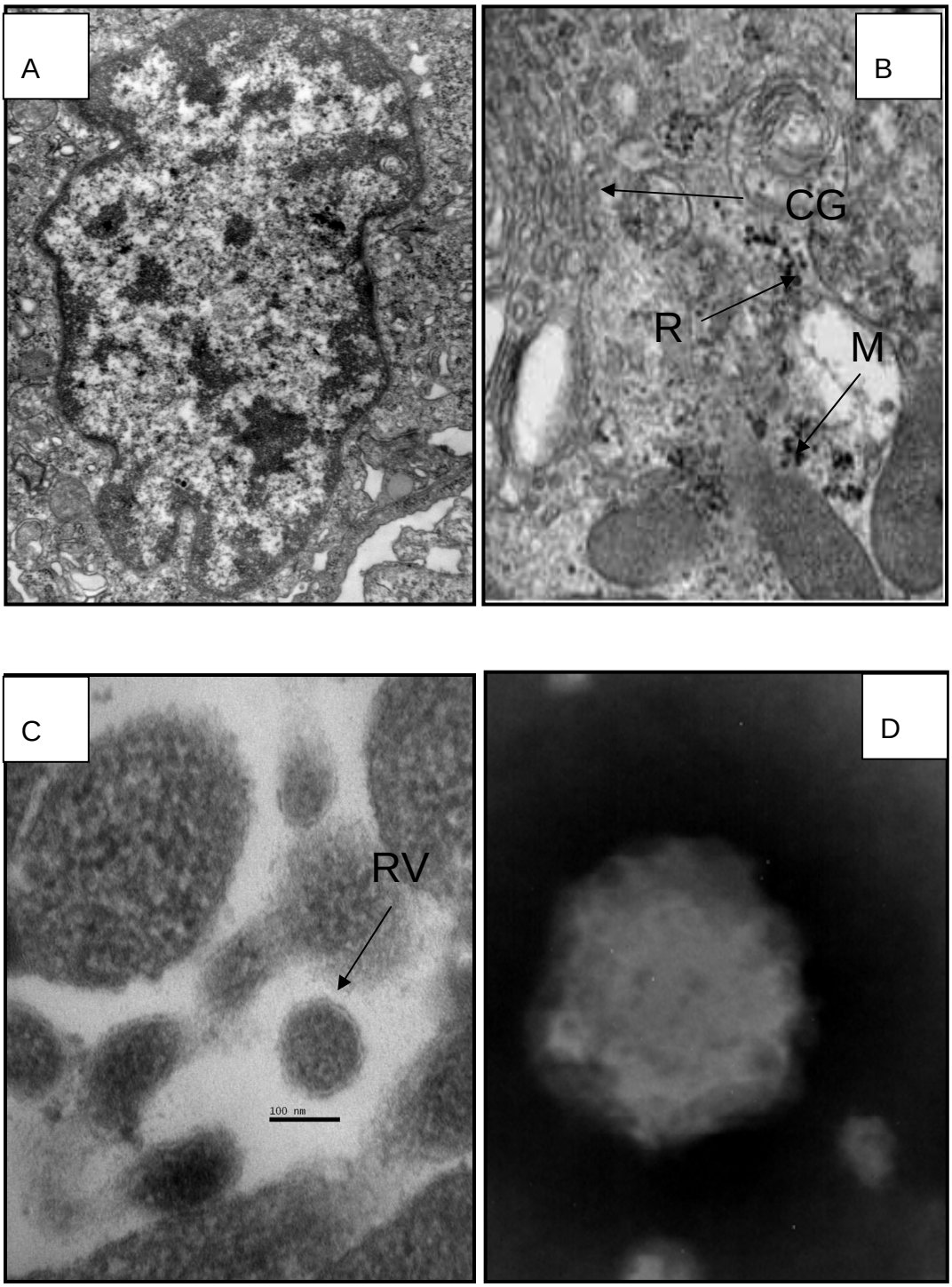

Figura 20: Células SIRC cultivadas e inoculadas com amostra virucida e analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmisão. Figura A mostra a célula SIRC íntegra. Note o citoplasma contendo mitocôndrias intactas, complexo de Golgi com vesículas e reticulo endoplasmático granular, na Figura B. Na figura C, as células SIRC infectadas com RV observamos o vírus totalmente formado próximo aos prolongamentos da célula SIRC. Na Figura D,o vírus incubado com geoprópolis foi processado pela técnica de coloração negativa. Note que o vírus da rubéola está com a sua morfologia completamente alterada.

5.Discussão

Este estudo foi pioneiro realizado com a geoprópolis da *Scaptotrigona postica,* principalmente em relação à sua atividade antiviral e quanto à avaliação da análise química. Demonstrando peculiaridade na composição química que contém flavona-C-glicosídeos, principalmente vicenin-2, não havendo relatos de estudos anteriores com este tipo de própolis. Há relatos da potente atividade antiviral de um extrato comercial de geoprópolis de S. postica contra o vírus herpes simplex e atividade antiviral do extrato hidrometanólico (Coelho et al., 2015) e atividade antioxidante (Dos Santos et al., 2017).

Os resultados obtidos mostraram que o extrato hidroetanólico dessa própolis possui baixa toxicidade para as células VERO e SIRC e para o material genético celular.

Os testes realizados por qPCR para os vírus herpes e rubéola mostraram uma maior atividade antiviral no pré-tratamento (98%) quando comparado ao pós-tratamento. Os testes virucida e de ligação viral apresentaram uma atividade antiviral ainda maior. Também foi possível observar que todas as concentrações testadas apresentam efeitos antivirais estatisticamente iguais.

O vírus HSV-1 foi testado com o extrato aquoso e etanólico de própolis, tendo a conclusão de que tratando o vírus 1 hora antes com a própolis a atividade antiviral foi maior, 98% de redução no teste de formação de placa. Huleihel & Isano, 2002 demonstraram que 0,5% de extrato aquoso de própolis reduz em 50% a infecção por herpes. Quando administrado duas horas após a infecção, células VERO ficam protegidas da infecção em 80-85%.

De acordo com a literatura,a própolis de diferentes localidades atuam em pontos diferentes da replicação viral. Temos como exemplo a própolis de Israel

apresentando grande atividade antiviral quando incubada 2 horas após a infecção (Huleihel & Ishano, 2002) e a própolis da República Tcheca apresentando maior atividade quando incubada com as células 1 hora antes da infecção (Schnitzler et al., 2010).

Estudos mostram a atividade antiviral da própolis contra o vírus da influenza A e B. Foram verificadas a presença de flavonoides que inibem o crescimento de H1N1 e H3N2 e também a prevenção de infecção por H3N2 em camundongos. No Japão foi realizado um estudo com extrato de própolis brasileira demonstrando o potencial antiviral contra influenza e também demonstrou melhora dos sintomas nos animais infectados tratados com própolis (Esanu et al.,1981; Maskimova-Todorova et al., 1985; Monolova et al., 1985; Shimizu, et al., 2008).

Um estudo realizado por Amoros et al. (1992) demonstrou a atividade antiviral do extrato bruto da própolis tanto para vírus RNA, quanto para vírus DNA, sendo estes envelopados ou não. Foram encontrados resultados positivos de atividade antiviral para o poliovírus. Os resultados para HSV-1 foram comparados entre o extrato bruto e combinando um sistema flavona-flavonol, chegando-se a conclusão de que o extrato bruto apresenta melhores resultados, propondo-se que esse resultado se dá pelo sinergismo que ocorre entre os componentes do extrato bruto da própolis (Amoros et al., 1992).

Debiaggi et AL. (1990) estudou flavanóides isolados da própolis, crisina, canferol, acacetina, galanina e quercetina frente à rotavirus, herpes, adenovírus e coronavírus. O resultado foi positivo apenas para o vírus herpes. O cancerol e a crisina diminuíram a replicação intracelular do vírus quando adicionado após a infecção. A quercetina, em altas doses, diminuiu a infectividade e a replicação. Dados condizentes com nossos achados.

A atividade antiviral de vários tipos de própolis no vírus herpes é bem

descrita. Compostos cafeólicos são encontrados em alguns tipos de própolis e foi descrito em 1985 por König & Dustmann que relatavam a eficácia desse composto contra herpes aviário de diferentes aves.

Não existem dados na literatura sobre atividade da própolis contra o vírus da rubéola, somente existem dados sobre vírus que possuem o mesmo matérial genético e constituição estrutural, ou seja, vírus RNA envelopado de fita simples e polaridade positiva.

Nos ensaios de qPCR observou-se que a inibição do efeito citopático e a replicação viral para o vírus Rubéola e herpes vírus infectadas e tratadas com geoprópolis, eram dependentes da dose. Além disso,é provavel, que o ensaio de ligação-penetração indicou que a flavona-C-glicosídeos bloquearam a ligação de ambos os vírus, com receptores na membrana plasmática da célula hospedeira impediram a penetração nas células, afetando as etapas de replicação do ciclo viral nas células ou levando à degradação do DNA antes da entrada do vírus nas células. Geralmente, os flavonóides são os principais constituintes detectados na própolis. Os flavonóides contribuem grandemente para as atividades farmacológicas dos produtos apícolas. O EPEG contém um alto conteúdo de flavonas-C-glicósidos, vicenina-2 e schaftoside, que são derivados da apigenina. Os flavonóides são conhecidos como compostos antivirais, desde 1940. Os flavonóides inibem várias enzimas associadas ao ciclo de vida dos vírus. Os flavonóides atuam como antioxidantes e podem inibir enzimas essenciais, perturbar as membranas celulares, impedir a ligação viral e a penetração nas células e aumentar o mecanismo de autodefesa da célula hospedeira. Além disso, inibem a enzima polimerase viral e a ligação do ácido nucleico viral ou das proteínas da cápside viral no receptor da célula hospedeira (Friedman, 2014).

A atividade antiviral dos derivados da apigenina e outras flavonas são conhecidas desde 1994. Apigenina exibiu atividade antiviral contra o vírus herpes simplex, vírus auzesky, poliovírus tipo 2 (Visintini Jaime et al., 2013),

enterovírus 71 (Ji et al., 2015; Lv et al., 2014, Wang , et al, 2014) e vírus da hepatite C (Shibata et al., 2014. A Luteolina 7-O-metil-éter-3'-O-beta-D-glucósido exerceu um efeito inibitório na primeira fase da infecção pelo vírus herpes-2, atribuída à inibição da ligação do vírus herpes-2 ao receptor da membrana celular e à sua penetração na célula (Behbahani et al., 2013). Vários flavonóides 6-C-monoglicosídeos mostraram efeito antiviral potente in vitro (Wang et al., 2012). A apigenina exibiu atividade antiviral contra onze diferentes tipos de vírus (Ahmad et al., 2015).

A microscopia eletrônica realizada indica que a própolis inibe a replicação do HSV-1. Foram comparadas algumas características de células infectadas, como a replicação viral e a produção de partículas infecciosas, entre células VERO tratadas com a própolis e não tratadas.

Bernard et al., 2007 verificou que própolis apresenta efeito inibitório seletivo contra HSV-1. São prováveis quatro mecanismos diferentes para explicar o efeito antiviral, sendo eles: bloqueio antiviral aos receptores da célula na etapa de infecção, atenuação de replicação viral após a entrada e redução de de citocinas inflamatórias geradas pela infecção (O'Neil et al., 2014). Os resultados mostram os efeitos antivirais com o tratamento de pré-incubação, corroborando com os resultados obtidos por qPCR in vitro.

A ação inibitória da própolis na replicação viral pode acontecer através da ativação de IFNs. Em 2009, Melchjorsen et al., demonstrou que a primeira resposta quando ocorre infecção por HSV é a secreção de IFNs. Bernard et al, 2007 demonstrou que a adição exógena de IFN-αβ é capaz de controlar a infecção por HSV, independente do linfócito NK e outros linfócitos.

Os experimentos de microscopia eletrônica no vírus rubéola sugerem que a própolis inibe a replicação do vírus. Características de replicação de células

SIRC foram comparadas com células SIRC infectadas com o vírus rubéola.

Estudos reportam a presença de vacúolos intracitoplasmáticos durante o processo de maturação viral. Foi descrita a ligação direta entre mitocôndrias e replicação viral, mostrando que os sítios de replicação requerem grande energia já que as zonas eletrodensas intermembranares surgem durante o processo infeccioso (Lee & Bowden,2000). Mitocôndrias com aparência alongada e zonas eletrodensas também foram encontradas em nosso estudo nas células infectadas, tanto em células tratadas com própolis como células não tratadas.

6. **Conclusões**

- Caracterização química e análise do extrato hidroetanólico de geopropolis (HEG) de S. postica, preparado experimentalmente. Geopropolis de S. postica apresentou uma composição química peculiar que contém flavona-C-glicosídeos (principalmente vicenin-2), um alcalóide de pirrolizidina derivado da retronecina, catequina-3-O-galato, ácido 3,5-dicicoilínico e ácido cafeoilquinico-O -arabinoside, como constituintes principais.

- O geoprópolis extraído de *Scaptotrigona postica*, apresentou atividade antiviral no Pré-tratamento inibindo o crescimento do vírus herpes nas células foi de 60% a 100% dependendo da concentração do geoprópolis. No Pós-tratamento o crescimento do vírus herpes nas células foi de 15% a 85% dependendo da concentração do geoprópolis

- Quanto a citotoxidade do geoprópolis em células de linhagem Vero e Sirc na concentração até 64ug/mL não apresentou citotoxidade para ambas as células

- A replicação do vírus herpes em células Vero observadas pelo efeito citopático e reação qPCR. Com Pré-tratamento em 2ug/mL de geoprópolis inibe o crescimento de 86% e com 96ug/mL inibe o crescimento de 100% e no Pós-tratamento 2ug/mL de geoprópolis o crescimento do vírus de 85% e com 96ug/mL o crescimento do vírus de 15%.

- A replicação do vírus rubéola no Pré-tratamento em 2ug/mL de geoprópolis inibe o crescimento de 42% e com 96ug/mL inibe o crescimento de 10% e no Pós-tratamento 2ug/mL de geoprópolis o

crescimento do vírus de 85% e com 96ug/mL o crescimento do vírus de 15%.

- O efeito virucida apresentou 99% de inibição no crescimento viral para ambos os vírus

- Outros estudos serão necessários para aplicação deste fármaco para ser implantado como fitoterápico na profilaxia do vírus da rubéola e do vírus herpes na população humana. Sendo o primeiro estudo registrado na literatura com este tipo de própolis.

7. **Referências**

Abernathy E, Peairs RR, Chen MH, Icenogle J, Namdari H. Genomic characterization of a persistent rubella virus from a case of Fuch' uveitis syndrome in a 73 year old man. J Clin Virol. 2015 Aug;69:104-9.

Ahmad, A., Kaleem, M., Ahmed, Z., Shafiq, H. Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections - A review. Food Res., 2015. Int. 77, 221–235.

Ahn M, Kumazawa S, Usui Y, Nakamura J, Matsuka M, Zhu F, Nakayama T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China, 2007; 101: 1400-9.

Alencar SM, Aguiar CL, Guzmán JP, Park YK. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*. Ciênc Rural, 2005; 35:909-15.

Amoros M, Sauvager F, Girre L, Cormier M. In vitro antiviral activity of propolis. Apidologie, 1992; 23:231-40.

Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P. Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. J Pharm Bel, 1994; 49:462-68.

Ball SC. Persistent herpes simplex virus infection.AIDS Read. 2001;11(5):249-1.

Bankova V, Christov R, Marcucci MC, Popov S. Constituints of Brazilian geopropolis. Z Naturforschung, 1998; 53:402-6.

Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. J Ethnopharmacol, 2005; 100:114-17.

Bankova VS, Castro SL, Marccuci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie, 1999; 31:3-15.

Behbahani, M., Zadeh, M.S., Mohabatkar, H. Evaluation of antiherpetic activity of crude extract and fractions of Avicenna marina, in vitro. Antiviral Res, 2013. 97, 376–80.

Bernard D, Hansen JD, Du Pasquier L, Lefranc MP, Benmansour A, Boudinot P.Costimulatory receptors in jawed vertebrates: conserved CD28, odd CTLA4 and multiple BTLAs. Dev Comp Immunol. 2007;31(3):255-71

Bernstein DI, Bellamy AR, Hook EW, Levin MJ, Wald A, Ewell MG et al. Epidemiology, clinical presentation and antibody response to primary infection with herpes simplex virus type 1 and 2 in young women. Clin Infect Dis, 2013; 56(3):344-51.

Beyleveld G, White KM, Ayllon J, Shaw ML. New-generationscreening assays for the detection of anti-infleunza compounds targetin viral andhost functions. Antiviral Research, 2013; 100:120-132.

Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, Ialenti A. Phytochemical compounds involved in the anflammatory effect of própolis extract. Fitoterapia, 2002; 73:53-63.

Bowden DS, Westaway EG. Rubella Virus: Structural and Non-structural Proteins. J gen Virol, 1984; 65: 933-43.

Brenner S, Horne RW.A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses.Biochim Biophys Acta. 1959;34:103-10

Bufalo MC, Figueiredo AS, Sousa JPB, Candeias JMG, Bastos JK, Sforcin JM. Anti-poliovirus activity of *Baccharis drancunfolia* and própolis by cell viabilitty determination and real-time. Appl Microbiol, 2009; 107:1669-80.

Burdok GA. Review of the biological properties and toxicity of bee própolis (propolis). Food Chem Toxicol, 1998; 36:347-63.

Cann AJ. Principles of Molecular Virology. 2 ed, 1997; Academic Press.

Carter AM, Croy BA, Dantzer V, Enders AC, Hayakawa S, Mess A, Soma H. Comparative aspects of placental evolution: a workshop report. Placenta. 2007; 28 Suppl A:S129-32.

Cavalcante DRR. Efeito quimiopreventivo de variedades de própolis brasileira sobre a carcinogênese oral experimentalmente induzida. Disponível em: 6 de http://ww3.unit.br/mestrados/saude_ambiental/wpcontent/uploads/2012/04/Defesa_Versao_Final.pdf. Acesso em: 6 de janeiro de 2017.

Chopra S et al., Propolis protects against doxorubicin-induced myocardiopathy in rats. Exp Mol Pathol, 1995/ 62:190-8.

Coelho GR, Mendonça RZ, Vilar Kde S, Figueiredo CA, Badari JC, Taniwaki N, Namiyama G, de Oliveira MI, Curti SP, Evelyn Silva P, Negri G. Antiviral Action of Hydromethanolic Extract of Geopropolis from Scaptotrigona postica against Antiherpes Simplex Virus (HSV-1).Evid Based Complement Alternat Med. 2015; 2015:296086.

Coelho SG, Yin L, Smuda C, Mahns A, Kolbe L, Hearing VJ Photobiological implications of melanin photoprotection after UVB-induced tanning of human skin but not UVA-induced tanning. Pigment Cell Melanoma Res. 2015; 28(2):210-6

Cook NC e Samman S. Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary souces. J Nutr Biochem, 1995; 7:77-76.

Costa RAC, Cruz-Landim C. Distribuitin of acid phosphatases in the hipophatingeal glands from workers, queens and males of a Brazilian stingless bee *Scaptotrigona postica*Latreille: An ultrastructural cytochemical study. The Histochem Jour, 2001; 33:653-662.

Cuesta-Rubio O, Cuellar Cuellar A, Rojas N, Castro HV, Rastrelli L, Aquino R, Rubio OC. A polyisoprenylated benzophenone from Cubam própolis. Journal of Natural Products, 1999; 62:1013-5.

Cueto AP, Alves SH, Pilau M, Weiblen R< Kubiça TF, Lovato LT. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. Cienc Rural, 2011; 41(10):1800-6.

Da Silva JFM, Souza MC, Matta SR, Andrade MR, Vidal FVN. Correlation analisys between phenolic levels of Brazilian própolis extracts and their antimicrobial and antioxidante activies. Food Chem, 2006; 99:431-35.

De Clerq E. Antiviral drug discovery and development: where chemistry meets with biomedicine. Antivir Res, 2005; 67:56-75.

De Clerq E. Antivirals and antiviral strategies. Nat Rev Microbiol, 2004; 2:701-20.

De Tiège X, Rozenberg F, Héron B. The spectrum of herpes simplex encephalitis in children. Eur J Paediatr Neurol. **2008** Mar;12(2):72-81.

Debiaggi M, Tateo F, Pagani L, Luini M, Romero E. Effects of própolis flavonoids on vírus infectivity and replication. Microbiologica, 1990; 13(3):207-13.

Dos Santos CM, Campos JF, Dos Santos HF, Balestieri JBP, Silva DB, de Picoli Souza K, Carollo CA, Estevinho LM, Dos Santos EL. Chemical Composition and Pharmacological Effects of Geopropolis Produced by Melipona quadrifasciata anthidioides. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:8320804.

Esanu V, Prahoveanu E, Crisan I, Cioca A. The effect of an aqueous propolis extract, of rutin and of a rutin-quercetin mixture on experimental influenza virus infection in mice. Virologie, 1981; 32(3):213-15.

Fabris S, Bertelle M, Astafyeva O, Gregoris E, Zangrando R, Gambaro A, Lima GPP, Stevanato R. Antioxidant properties and chemical composition relationship of Europeans and Brazilians própolis. Pharmacology & Pharmacy, 2013; 4:46-51.

Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. Nature. 2005 18;436(7053):967-72

Figueiredo CA, de Oliveira MI, Tarandachi PR, de Carvalho WB, Kanamura CT, Scatena RS. Fatal acute liver failure in a child due to acquired rubella infection. J Clin Virol, 2014; 61(1):1-2.

Franco SL, Brusch ML, Moura LPP, Bueno JHP. Avaliação Farmacognóstica da própolis da região de Maringá. Rev Bras Farmacogn, 2000; 9: 1-10.

Friedman, M. Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Properties of Wines and Winery Byproducts in Relation to Their Flavonoid Content. J. Agric. Food Chem, 2014; 62, 6025–6042.

Ghisalberti, EL. Propolis: a review. Bee World, 1979; 60:59-84.

Harrison CS. Principles of vírus structure. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology. Vol. 1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2014; 1069–1070.

Hu F, Hepburn HR, Li Y, Chen M, Radloff SE, Daya S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. J Ethnopharmacol, 2005; 276-83.

Huleihel M, Ishano V. Anti-herpes simplex virus effect of an anqueous extract of propolis. Isr Med Assoc J, 2002; 11:923-27.

Ji, P., Chen, C., Hu, Y., Zhan, Z., Pan, W., Li, R., Li, E., Ge, H.-M., Yang, G. Antiviral Activity of Paulownia tomentosa against Enterovirus 71 of Hand, Foot, and Mouth Disease. Biol. Pharm. Bull,2015; 38: 1-6.

Kerr W. Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, geoprópolis e cera. Inf Agropec, 1987; 13:15-27.

Kingsley RE, Cole NL.Preparation of cultured mammalian cells for transmission and scanning electron microscopy using Aclar film.J Electron Microsc Tech. 1988 Sep;10(1):77-85.

König B, Dustmann JH. The caffeoylics as a new family of natural antiviral compounds. Naturwissenschaften. 1985;72(12):659-61.

Kosalec I, Pepeljnjak S, Bakmaz M, Vladimir-Knezevic S. Flavonoide analisys and antimicrobial activity of commercially available propolis product. Acta Pharm, 2005; 55:423-30.

Kukhanova MK, Korovina AN, Kochetkov SN. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. Biochemistry -Mosc, 2014; 79(13): 1635-52.

Kumar, S., Pandey, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. Sci. World J. The Scientific World Journal, 2013 Article ID 162750

Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolisof various geographic origins. Food Chemistry, 2004; 84: 329-39.

Lee JY, Bowden DS. Rubella virus replication and links to teratogenicity. Clin microbial reviews, 2000; 13(4): 571-87.

Lohner K, Staudegger E. Are we on the thrshold of the post-antibiotic era? In: Lohner K, editor. Development of novel antimicrobial agents: Emergingstrategies, 2001; England Horizon Scientific.

Longhini R, Raksa SM, Oliveira ACP, Svidizinsk TIE, Franco SL. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. Ver Bras Farmacogn, 2007; 17: 388-95.

Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LCC, Randau KP, Neto PJR. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2008; 18(3): 447-54.

Lv, X., Qiu, M., Chen, D., Zheng, N., Jin, Y., Wu, Z. Apigenin inhibits enterovirus 71 replication through suppressing viral IRES activity and modulating cellular JNK pathway. Antiviral Res.,2014 109, 30–41.

Maia-Filho EM, Mais CDCR, Bastos ACSC, Novais TMG. Efeito antimicrobiano in vitro de diferentes medicações endodôntica e própolis sobre *Enterococcus faecalis*. Rev Gaúcha Odonto, 2009; 56(1):21-25.

Maksimova-Todorova V, Manolova G, Gegova G, Serkedjieva J, Uzunov S, Pancheva N, Marekov N, Bankova V. Antiviral action of fraction isolated from própolis. Acta Microbiol Bulg, 1985; 17:79-85.

Mani F, Damasceno HCR, Novelli ELB, Martins EAM, Sforcin JM. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. J Ethnopharmacol, 2006; 105:95-98.

Manolova N, Maximova V, Gegova G, Serkedjieva J, Uzunov S, Marekov N, Bankova V. On the antiinfluenza action of fractions from própolis. C R Bulg Acad Sci, 1985; 38(6):735.

Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, Valente PHM, Paulino N. Phenolic compounds from Brazilian própolis with pharmacological activities. J Ethnopharmacol, 2001; 74: 105-12.

Marcucci MC. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. Quim Nova, 1996; 19:529-36.

Mathias RG, Meekison WG, Arcand TA, Schechter MT. The role of secondary vaccine failures in measles outbreaks. Am J Public Health, 1989; 79(4):475-8.

Melchjorsen J, Matikainen S, and Paludan SR. Activation and evasion of innate antiviral immunity by herpes simplex virus, *Viruses*,2009; 1(3): 737–759.

Michener CD. The bees of the world. The Johns Hopkins University Press. 2 ed. Baltimore, 2007. Disponível em: www.press.jhu.edu. Acesso em: 6 de janeiro de 2017

Mins C, Playfair J, Roitt I, Wakelin D, Williams R. Microbiologia médica. Tradução de Cristina Gubert. 2 ed, 1999; São Paulo: Manole.

Moure JS. Abelhas de Salobra (Hym. Apoidea). Papéis Avulsos, 1942; 2 (21):291-321.

Nogueira-Neto P. A criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae). São Paulo: Editora Chácaras e Quintais,1970.

Nogueira-Neto P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapes, 1994; 445p.

O´Neil ST, Rahn KC, Bump JK.Habitat capacity for cougar recolonization in the Upper Great Lakes region.PLoS One. 2014 Nov 12;9(11):e112565

Ohara K. Changes in the human corneal endothelial cell junction in vivo]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi. 1988; 92(4):705-13.

Oliveira ACP, Shinobu CS, Longhini R, Franco SL, Svidzinski TIE. Antifungal activity of própolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2006; 101: 493-97.

Orsolic N, Knezevic AH, Sver L, Terzic S, Basic I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. J Ethnopharmacol, 2004; 94:307-15.

Park YK, Alencar SM, Scamparine ARP, Aguiar CL. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Urugyai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. Ciência Rural, 2002; 2:997-1003.

Park YK, IkegakI M, Abreu JAS, Alcici NMF. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações . Ciênc Tecnol Aliment, 1998; 18:313-18.

Pereira AS, Seixas FRMS, Aquino Neto FR . Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. Quim Nova, 2002; 25: 321-326

Piacentini R, De Chiara G, Li Puma DD, Ripoli C, Marcocci ME, Garaci E, et al.HSV-1 and Alzheimers disease: more than a hypothesis. Front Pharmacol, 2014; 5:97.

Plotkin SA. How to reconize congenital rubella. Clin Pediatr (Phila). 1969; 8(7):403-4

Possamai MM, Honorio-França AC, Reinaque APB, França EL, Souto PCDS. Brazilian propolis: A natural product that improved the fungicidal activity by blood phagocytes. BioMed Res Inst, 2013; 2013:1-9.

Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints Am J Hyg. 1938;27:493-7.

Rezende GPSR, Pimenta FC, Costa LRRS. Antimicrobial activity of two Brazilian comercial própolis extracts. Braz J Oral Sci, 2006; 5:967-70.

Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(7):4144-9

Rocha L, Dos Santos LR, Arcenio F, Carvalho ES, Lúcio EMRA, Araújo GL, Teixeira LA, Sharapin N. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. Ver Bras Farmacogn, 2003; 13:71-74.

Salatino A, Fernandes-Silva CC, Righi AA, Salatino MLF. Propolis research and chemistry of plant products. Natural products reports, 2011; 925-36.

Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and chemical variation of Brazilian própolis. E CAM, 2005; 2:33-38.

Sanjay T e Kramer FR. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. Nature Biotechnology.1996; 14: 303-308.

Santos OSN, Romanos VTM, Wigg DM. Virologia Humana 3 Ed.Editora Guanabara, 2008.

Schnitzler P, Neuner A, Nolkemper S, Zundel C, Nowack H, Sensch KH, Reichling J. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. Phyto Research, 2010; 24:20-28.

Sheybani F, Arabikhan HR, Naderi HR. Herpes Simplex Encephalitis (HSE) and its outcome in the Patients who were Admitted to a Tertiary Care Hospital in Mashhad, Iran, over a 10-year Period. J Clin Diagn Res. 2013;7(8):1626-8.

Shibata, C., Ohno, M., Otsuka, M., Kishikawa, T., Goto, K., Muroyama, R., Kato, N., Yoshikawa, T., Takata, A., Koike, K. The flavonoid apigenin inhibits hepatitis C virus replication by decreasing mature microRNA122 levels. Virology, 2014. 462–463, 42–48.

Shimizu T, Hino A, Tsutsumi A, Park YK, Watanabe W, Kurokawa M. Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza inection in mice. Antivir Chem e Chemoter, 2008; 19(1): 7-13.

Simmons A. Clinical manifestations and treatment considerations of herpes simplex virus infection. J Infect Dis, 2002; 186(1): 71-7.

Taniwaki NN, Katchburian E. Ultrastructural and lanthanum tracer examination of rapidly resorbing rat alveolar bone suggests that osteoclasts internalize dying bone cells.Cell Tissue Res. 1998;293(1):173-6.

Tomas-Barberan FA, Garcia-Viguera C, Vit-Oliver P, Ferreres F, Tomas-Lorente F. Phytochemical evidence for botanical origin of tropical propolis from Venezuela. Phytochemistry, 1993; 34(1):191-96.

Trudel M, Nadon F, Comtois R, Payment P, Bonneau A, Lecomte J. Identification of rubella virus structural proteins byimmunoprecipitation. Elsevior Biomedical, 1982; 5: 191-7.

Uzel A, Shorkun K, Önçag Ö, Çogulo D, Gençay Ö, Salih B. Chemical composditions and antimicrobial activities of four different Anatolian própolis samples. Microbiol Res, 2005; 160:189-95.

Valencia D, Alday E, Robles-Zepeda R, Garibay-Escobar A, Glavez-Ruiz JC, Salas-Reyes M, Jimenez-Estrada M, Velazquez-Contreras E, Hernandes J, Vargas AC, Loguercio AP, Witt NM, Da Costa MM, Sá e Silva M, Vianna LR. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. Ciênc Rural, 2004; 34:159-63.

Velazquez C. Seasonal effect on chemical composition and biological activities os Sonoran própolis. Food Chem, 2012; 131:645-51.

Visintini Jaime, M.F., Redko, F., Muschietti, L. V, Campos, R.H., Martino, V.S., Cavallaro, L. V. In vitro antiviral activity of plant extracts from Asteraceae medicinal plants. Virol, 2013; J. 10, 245.

Wang, J., Zhang, T., Du, J., Cui, S., Yang, F., Jin, Q.. Anti-enterovirus 71 effects of chrysin and its phosphate ester. PLoS One 9,2014. e89668

Wang, Y., Chen, M., Zhang, J., Zhang, X.-L., Huang, X.-J., Wu, X., Zhang, Q.-W., Li, Y.-L., Ye, W.-C. Flavone C-glycosides from the leaves of Lophatherum gracile and their in vitro antiviral activity. Planta Med, 2012. 78, 46–51.

Watzinger F, Suda M, Preuner , Baumgartinger R., Ebner K, Baskova L, Niesters H, Lawitschka A, Lion T. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. J Clin Microbiol, 2004; 42:5189-98.

Webster WS. Teratogen update: congenital rubella. Teratology. 1998;58(1):13-23.

White JJW, Subers MH, Schepartz AI. Identification of inhibine the antibacterial factor in honey glucose oxidase system. Biochm Biophys Acta, 1963; 73:57-70.

Whitley RJ, Kimberlin DW, Roizman B. Herpes simplex viruses. Clin Infect Dis, 1998; 26(3): 541-53.

Yalcin S, Yamanishi K. Human Herpesvirus 6 (HHV-). In: Lennette EH, Schmidit NJ, editors. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 7th ed. Washington (DC): American Public Health Associations; 1995. p. 397-405.