



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA APLICADA



Isabella Dai Prá Zuchi

POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTIVIRAL DE ESPÉCIES DE *BACCHARIS*

Florianópolis

2022

Isabella Dai Prá Zuchi

POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTIVIRAL DE ESPÉCIES DE *BACCHARIS*

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Izabella Thaís da Silva

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zuchi, Isabella Dai Prá
POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTIVIRAL DE ESPÉCIES DE BACCHARIS
/ Isabella Dai Prá Zuchi ; orientadora, Izabella Thaís da
Silva, 2022.
63 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Antiviral. 3. Potencial citotóxico. 4.
Baccharis. 5. Produtos Naturais. I. Silva, Izabella Thaís
da. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação
em Farmácia. III. Título.

Isabella Dai Prá Zuchi

POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTIVIRAL DE ESPÉCIES DE *BACCHARIS*

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia

Florianópolis, 27 de julho de 2022

Prof^a. Dr^a. Liliete Canes Souza Cordeiro
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Izabella Thaís da Silva
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Gislaine Fongaro
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Thiago Caon
Avaliador
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente minha mãe **Maira**, minha avó **Angelina** e minhas tias **Adir** e **Paula**, por todo amor, apoio, incentivo e por sempre prezarem pela minha educação. Por possibilitarem que eu crescesse cercada de mulheres fortes, determinadas, e com um coração enorme. Vocês são minha inspiração e espero me tornar metade do que vocês representam para mim. Muito obrigada!

A todo o restante da minha família, em especial a minha prima **Elisa**, por todo o carinho e parceria em todos os momentos das nossas vidas. Agradeço sempre pela sorte que tenho em ter você do meu lado e poder dividir mais esse momento contigo.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. **Izabella Thaís da Silva**, minha orientadora, por todo conhecimento compartilhado, por todas as oportunidades concedidas e por abrir as portas do LVA e com isso, me apresentar o meio científico. Obrigada por fazer eu me reencontrar no curso e ter certeza de ter feito a escolha certa para o meu futuro.

A professora Dr^a. **Gislaine Fongaro**, por todos os ensinamentos, conversas, por toda disposição em auxiliar sempre que necessário e pelas oportunidades de fazer parte de diversos trabalhos com seus orientados e sob sua coorientação. Você juntamente com a professora Dr^a. **Ariadne Cabral da Cruz** e Professora **Izabella**, são professoras excepcionais, que acreditam e incentivam os alunos todos os dias, além de serem exemplos de pesquisadoras que eu tive a oportunidade de conhecer e que fizessem parte dessa etapa.

Agradeço a todos os meus amigos, que mesmo longe fisicamente estiveram comigo durante esse momento, por todas as conversas, por todos os conselhos, por todos os momentos vividos durante os reencontros, todo incentivo e principalmente por me entenderem.

A todos que passaram pelo LVA e aos atuais integrantes que eu tive a oportunidade de conhecer, cada um de vocês me ensinou algo que levarei para minha vida. Não poderia deixar de agradecer especialmente algumas dessas pessoas. **Luiza**, te agradeço por todas as conversas, pela amizade que construímos, pela parceria em todas as noites em que passamos no laboratório e por toda troca de vivências que tivemos. Admiro muito sua dedicação, seu profissionalismo, seu jeito leve de levar a vida e saiba que sempre estarei aqui

quando precisar e torcendo por ti. **Beatriz, Iara, Giulia, Mariana, Mariane, Raphael, Catielen, Julia K., Paula e Rafael**, agradeço por todos os momentos que vivemos dentro e fora do LVA, as risadas, conversas e desabafos. Saibam que eu admiro cada um de vocês como pessoas e profissionais que são, e que estarei torcendo sempre para que alcancem todo sucesso e reconhecimento que merecem, independente do caminho que seguirem. **Bea e Iara**, eu não poderia deixar de agradecer por todo o auxílio que me deram no final dessa etapa, vocês podem ter certeza de que foi de grande importância e que sempre recordarei com gratidão.

Aos professores da Universidade Federal de Minas Gerais, Dr. **Fernão Castro Braga**, Dr. **Rodrigo Maia de Pádua**, Dr. **Geraldo Wilson Afonso Fernandes** e Dr^a. **Priscilla Rodrigues Valadares Campana**, bem como as acadêmicas **Maria Beatriz De Oliveira Rabelo, Alessandra Caroline Montes Frade** que realizaram a coleta e toda preparação dos extratos e frações que foram testados nesse trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, funcionários e aos professores do curso de farmácia, por prezarem por um ensino de extrema excelência.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

RESUMO

Os produtos naturais constituem uma fonte de grande importância de substâncias biologicamente ativas, desempenhando um papel fundamental na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antivirais. As infecções causadas pelos vírus *Herpes simplex* tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) prevalecem em até 90% da população mundial. Atualmente, os medicamentos anti-herpéticos são restritos e o aparecimento de cepas virais resistentes ao fármaco de primeira escolha (aciclovir) dificulta o manejo dessas infecções. Já a febre chikungunya é uma arbovirose causada pelo Chikungunya vírus (CHIKV), que encontra-se em expansão no Brasil e, nos casos agudos, pode levar à morte. Até o momento não há vacina aprovada e/ou tratamento antiviral específico para infecções causadas pelo CHIKV, sendo realizado apenas o tratamento dos sintomas, hidratação e repouso. Além disso, ainda não existem medicamentos específicos para o tratamento de COVID-19, causada pelo vírus SARS-CoV-2, considerada pela OMS como uma pandemia que já levou ao colapso os sistemas de saúde de vários países. O câncer é um problema global que, nas últimas décadas, ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um problema alarmante de saúde pública mundial sendo responsável por quase 13% das mortes em todo o mundo. Os tratamentos farmacológicos disponíveis carecem de especificidade e induzem graves efeitos adversos, demandando a pesquisa por novas opções terapêuticas. Algumas substâncias já isoladas de plantas do gênero *Baccharis*, como tricotecnos, flavonoides e terpenos, mostraram o potencial farmacológico de espécies desse gênero. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade citotóxica, bem como o potencial antiviral de extratos e frações de espécies do gênero *Baccharis*, frente ao HSV-1 (cepas KOS e 29-R), CHIKV e coronavírus murino (MHV-3). Durante a avaliação da citotoxicidade frente a linhagens de células tumorais, o extrato de *B. megapotamica* e suas frações (em acetato de etila, diclorometano e hexano), frações em diclorometano e hexano de *B. imbricata*, mostraram-se mais ativos quando considerados seus baixos valores de CC₅₀. Em contrapartida, ao se avaliar os valores de IS, os extratos que apresentaram os melhores resultados foram os extratos de *B. intermix*, *B. reticularia*, *B. aphylla*, *B. calvescens* e *B. retusa*, com valores de IS > 4. Os extratos de *B. intermix*, *B. calvescens*, *B. retusa*, *B. reticularia* e *B. platypoda* apresentaram inibição da replicação viral de CHIKV em ao menos uma das duas concentrações testadas (100 µg/mL e 50 µg/mL). Das 14 amostras avaliadas frente ao HSV-1, os extratos e frações de *B. intermix*, *B. reticularia*, *B. platypoda*, *B. concinna* e *B. altimontana*, além da fração acetato de etila de *B. brevifolia* inibiram a replicação viral da cepa sensível ao aciclovir (KOS). Já para o HSV-1, cepa 29-R (resistente ao aciclovir), os extratos de *B. intermix*, *B. retusa* e a fração acetato de etila de *B. brevifolia* foram os mais ativos na inibição da replicação viral. Em relação a atividade anti-MHV-3, onze amostras apresentaram uma redução de 50 – 100% da carga viral. Estudos posteriores serão realizados para elucidar os mecanismos da ação antiviral.

Palavras-chave: *Baccharis*; Produtos Naturais; Herpes Simplex Virus; Vírus Chikungunya; Coronavirus; Câncer

ABSTRACT

Natural products are an important source of biologically active substances, performing a key role in the research and development of new antiviral drugs. Infections caused by Herpes simplex viruses types 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2) are prevalent in up to 90% of the world's population. Currently, antiherpetic drugs are restricted and the emergence of viral strains resistant to the drug of first choice (acyclovir) makes it difficult to manage these infections. Chikungunya fever is an arbovirus caused by the Chikungunya virus (CHIKV), which is expanding in Brazil and, in acute cases, can lead to death. To date, there is no approved vaccine and/or specific antiviral treatment for infections caused by CHIKV, with only the treatment of symptoms, hydration and rest being performed. In addition, there are still no specific drugs for the treatment of COVID-19, caused by the SARS-CoV-2 virus, considered by the WHO as a pandemic that has already led to the collapse of health systems in several countries. Cancer is a global problem that, in recent decades, has gained a greater dimension, becoming an alarming public health problem worldwide, accounting for almost 13% of deaths worldwide. The available pharmacological treatments lack specificity and induce serious adverse effects, demanding the search for new therapeutic options. Some substances already isolated from plants of the genus *Baccharis*, such as trichothecenes, flavonoids and terpenes, showed the pharmacological potential of species of this genus. In this context, the objective of this study was to evaluate the cytotoxic activity, as well as the antiviral potential of extracts and fractions of species of the genus *Baccharis*, against HSV-1 (strains KOS and 29-R), CHIKV and murine coronavirus (MHV-3). During the evaluation of cytotoxicity against tumor cell lines, the extract of *B. megapota mica* and its fractions (in ethyl acetate, dichloromethane and hexane), fractions in dichloromethane and hexane of *B. imbricata*, showed to be more active when considering their low values of CC_{50} . On the other hand, when evaluating the IS values, the extracts that presented the best results were the extracts of *B. intermix*, *B. reticularia*, *B. aphylla*, *B. calvescens* and *B. retusa*, with IS values > 4. Extracts of *B. intermix*, *B. calvescens*, *B. retusa*, *B. reticularia* and *B. platypoda* showed inhibition of CHIKV viral replication in at least one of the two concentrations tested (100 $\mu\text{g/mL}$ and 50 $\mu\text{g/mL}$). Concerning the samples evaluated against HSV-1, extracts and fractions of *B. intermix*, *B. reticularia*, *B. platypoda*, *B. concinna* and *B. altimontana*, in addition to the ethyl acetate fraction of *B. brevifolia* inhibited viral replication of strain sensitive to acyclovir (KOS), whereas for strain 29-R, strain resistant to acyclovir, the extracts of *B. intermix*, *B. retusa* and the ethyl acetate fraction of *B. brevifolia* were the most active in inhibiting viral replication. Regarding the anti-MHV-3 activity, eleven samples showed a 50 – 100% reduction in viral load. Further studies will be carried out to elucidate the mechanisms of antiviral action.

Keywords: *Baccharis*; natural products; Herpes Simplex Virus; Chikungunya Virus; Coronavirus; Cancer

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|---|
| 29-R | Cepa de HSV-1 resistente ao aciclovir |
| A549 | Linhagem de células tumorais humanas de pulmão do tipo não-pequenas |
| ACV | Aciclovir |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| CC ₅₀ | Concentração Citotóxica 50% |
| CHIKV | Chikungunya vírus |
| CI ₅₀ | Concentração Inibitória a 50% |
| CMC | Carboximetilcelulose |
| CNCNP | Carcinoma pulmonar de células não pequenas |
| DMEM | <i>Dulbeccos` s Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DSMZ | <i>German Collection of Microorganisms and Cell Cultures</i> |
| ECA2 | Enzima conversora de angiotensina 2 |
| h | Hora |
| H460 | Linhagem de células de carcinoma de efusão pleural humana |
| HSV | Herpes Simplex Virus |
| IC 95% | Intervalo de confiança de 95% |
| IS | Índice de Seletividade |
| KOS | Cepa de HSV-1 sensível ao aciclovir |
| L929 | Fibroblasto murino |
| MEM | <i>Minimal Essential Medium</i> |
| MERS-CoV | Coronavírus responsável por causar a Síndrome Respiratória do Oriente Médio |

| | |
|------------|--|
| MHV-3 | Coronavírus murino |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> , solução de tampão fosfato |
| PC3 | Linhagem de células de adenocarcinoma prostático humano não sensível a hormônios |
| RPM | Rotações por minuto |
| RPMI 1640 | <i>Roswell Park Memorial Institute-1640</i> |
| SARS-CoV | Coronavírus responsável por causar a Síndrome Respiratória Aguda Grave |
| SARS-CoV-2 | Coronavírus responsável por causar a COVID-19 |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| SRB | Sulforrodamina B |
| TCA | Ácido Tricloroacético |
| UFP | Unidade Formadora de Placa |
| µL | Microlitro |
| VERO | Fibroblasto de macaco verde da África |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Potencial citotóxico das amostras de <i>Baccharis</i> sp..... | 38 |
| Tabela 2: Resultados da atividade anti-herpética de amostras de <i>Baccharis</i> sp. frente ao HSV-1, cepa KOS..... | 43 |
| Tabela 3: Atividade anti-herpética de amostras de <i>Baccharis</i> sp. contra a replicação de HSV-1, cepa 29-R..... | 43 |
| Tabela 4: Resultados da triagem anti-CHIKV de amostras de <i>Baccharis</i> sp..... | 45 |
| Tabela : Resultados da citotoxicidade em células L929 e da atividade anti-MHV-3 das amostras de <i>Baccharis</i> sp..... | 46 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1: Espécies do gênero <i>Baccharis</i> avaliadas | 28 |
|---|----|

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Figura 1: Valores de CC_{50} em células A549 e VERO e valores de IS..... | 40 |
| Figura 2: Figura 1: Valores de CC_{50} em células H460 e VERO e valores de IS. | 40 |
| Figura 3: Figura 1: Valores de CC_{50} em células PC3 e VERO e valores de IS. | 41 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 2.1 Gênero <i>Baccharis</i> | 17 |
| 2.2 Câncer | 19 |
| 2.3 Herpes Simplex Virus (HSV) | 21 |
| 2.4 Chikungunya Virus (CHIKV) | 22 |
| 2.5 Coronavírus | 24 |
| 3. OBJETIVOS | 26 |
| 3.1 Objetivo geral | 26 |
| 3.2 Objetivos específicos | 26 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| 4.1 Material vegetal | 27 |
| 4.2 Culturas celulares | 29 |
| 4.2.1 Células | 29 |
| 4.2.2 Meios de cultura | 29 |
| 4.3 Vírus | 30 |
| 4.3.1 Origem das cepas virais | 30 |
| 4.3.2 Preparo das suspensões-estoques virais | 30 |
| 4.3.3 Determinação dos títulos infecciosos virais | 31 |
| 4.4 Avaliação da citotoxicidade | 33 |
| 4.4.1 Avaliação do potencial citotóxico | 33 |
| 4.5 Avaliação da seletividade | 34 |
| 4.6 Avaliação da potencial atividade antiviral | 35 |
| 4.6.1 Avaliação do potencial anti-herpético e anti-CHIKV | 35 |
| 4.6.2 Avaliação do potencial anti-coronavírus | 36 |
| 4.7 Análise estatística | 37 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 38 |
| 5.1 Avaliação do potencial efeito citotóxico | 38 |
| 5.2 Determinação dos títulos infecciosos virais | 42 |
| 5.3 Avaliação da citotoxicidade e da atividade anti-herpética | 42 |
| 5.3.1 Avaliação da citotoxicidade | 42 |
| 5.3.2 Avaliação da atividade anti-herpética | 42 |
| 5.4 Avaliação da atividade anti-CHIKV | 44 |
| 5.5 Avaliação da atividade anti-coronavírus | 46 |
| 6. CONCLUSÃO | 48 |
| 7. PERSPECTIVAS | 49 |
| 8. REFERÊNCIAS | 50 |

1. INTRODUÇÃO

Em contraste com o grande número de medicamentos antibacterianos e antifúngicos disponíveis, o arsenal terapêutico antiviral é bastante reduzido e eles são originários predominantemente de produtos naturais. Até o ano de 2019 foram aprovados pelo FDA 112 antivirais, sendo que 52 deles eram para pacientes HIV+ ou com AIDS, 11 para o tratamento de pacientes com infecções herpéticas, 27 medicamentos para o tratamento das hepatites B e C e nove medicamentos para o tratamento de infecções ocasionadas por influenza. O maior número de fármacos antirretrovirais disponíveis deve-se ao surgimento do vírus HIV na década de 80, que impulsionou a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos antivirais, aliada a necessidade de se controlar as infecções persistentes, particularmente as infecções graves para as quais nenhuma vacina está disponível (DE CLERCQ, 2013a, b; DE CLERCQ; GUANGDI, 2016; MARTINEZ *et al.*, 2015; TOMPA *et al.*, 2021).

A potencialidade dos produtos naturais como possíveis fontes de novos fármacos para o tratamento do câncer também tem sido demonstrada, principalmente, pelo fornecimento de um número significativo de substâncias ativas que chegaram à fase de ensaios clínicos, sendo que alguns dos compostos testados são, atualmente, empregados na clínica, como é o caso dos alcaloides da vinca (vimblastina e vincristina) e seus derivados e de compostos terpênicos como o paclitaxel, o qual é amplamente empregado no tratamento de câncer de mama, de pulmão e carcinoma metastático de ovário (BERNARDES, 2017).

Newman e Cragg (2020) realizaram um levantamento buscando produtos naturais que foram utilizados como fonte de novos medicamentos entre janeiro de 1981 e setembro de 2019, nesse trabalho foram relatadas 247 novas entidades químicas para o tratamento de câncer, sendo que deles 46,15% são derivados, macromoléculas ou até mesmo o produto natural inalterado. Já para os antivirais, das 86 novas entidades químicas somente 12,36% eram derivados, macromoléculas ou até mesmo o produto natural inalterado. Portanto, a exploração desses recursos naturais é uma estratégia válida para o desenvolvimento de medicamentos inovadores, especialmente se

considerarmos que produtos naturais forneceram a base para o desenvolvimento da farmacoterapia moderna (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Além de apresentarem um alto valor econômico, as espécies do gênero *Baccharis* possuem atividade biológica descrita para o tratamento de várias doenças, entre elas o tratamento de diabetes, inflamações, distúrbios hepatobiliares e infecções bacterianas e fúngicas.

Nesse sentido, o estudo de espécies do gênero *Baccharis* vem sendo cada vez mais explorado devido ao potencial biológico e citotóxico que as espécies desse gênero possuem. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade citotóxica e antiviral de espécies pertencentes a esse gênero.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Baccharis*

O gênero *Baccharis* é o maior gênero da família Asteraceae, compreendendo mais de 500 espécies, que estão distribuídas nos continentes norte e sul-americanos, principalmente no Brasil, Argentina, Uruguai, Colômbia, Chile e México. No Brasil, existem 167 espécies do gênero *Baccharis*, pertencendo essas a quatro subgêneros e encontradas em todos os biomas brasileiros, mas em grande quantidade nas regiões centro-oeste, sudeste e sul, sendo que somente no estado do Paraná é possível encontrar 83 espécies desse gênero (ABAD, MARIA JOSÉ; BERMEJO, 2007; RAMOS CAMPOS *et al.*, 2016).

As espécies de *Baccharis* apresentam elevado valor econômico, e são utilizadas na medicina popular para o controle e tratamento de várias doenças. São popularmente utilizadas para tratar sintomas de diabetes, alívio de cefaleias, ulcerações cutâneas, enfermidades estomacais, anemias, inflamações, febre, distúrbios hepatobiliares e infecções bacterianas e fúngicas (ABAD, MARIA JOSÉ; BERMEJO, 2007; RAMOS CAMPOS *et al.*, 2016; SOBRINHO *et al.*, 2016; TIMBE *et al.*, 2021; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). Já nos estudos de atividades biológicas, destacam-se os efeitos alelopáticos, gastroprotetor, hepatoprotetor, anti-inflamatório, antioxidante, antifúngico, antimicrobiano, citotóxico e antiviral (BARBOSA *et al.*, 2020; BONIN *et al.*, 2020; BRANDENBURG *et al.*, 2020; CARRIZO *et al.*, 2020; RABELO *et al.*, 2018; RAMOS CAMPOS *et al.*, 2016; SABIR *et al.*, 2017; SILVEIRA RABELO; CALDEIRA COSTA, 2018; TIMBE *et al.*, 2021).

O estudo fitoquímico desse gênero vem sendo extensivamente realizado desde o início do século XX, sendo que 120 espécies já foram estudadas e mais de 150 compostos foram isolados e identificados, dentre os quais 30 apresentam relatos de estudos de atividades biológicas. Os compostos mais presentes são flavonoides, diterpenos, sesquiterpenos e triterpenos, ácidos cumáricos e compostos fenólicos (ABAD, MARIA JOSÉ; BERMEJO, 2007; BONIN *et al.*, 2020; KARAM *et al.*, 2013; RAMOS CAMPOS *et al.*, 2016; UENO *et al.*, 2018; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

No que diz respeito ao potencial antiviral do gênero *Baccharis*, o extrato aquoso de *B. trinervis* inibiu a replicação do HSV-1 em concentrações variando

de 50 a 200 µg/mL (ABAD et al., 1999). No estudo realizado por Montanha e seus colaboradores (2004), foi possível observar que os extratos de três espécies do gênero *Baccharis*, obtiveram resultados favoráveis em relação a inibição do HSV-1 (cepa sensível ao aciclovir) em concentrações não citotóxicas. Nesse mesmo estudo, dois extratos de *B. erioclada* inibiram a replicação do HSV-1 resistente ao aciclovir. Visintini-Jaime e colaboradores (2013), ao testar o extrato aquoso de *B. gaudichaudiana* frente ao HSV-1, confirmaram seu efeito antiviral promissor com valores de IS > 107. O estudo do mecanismo de ação dessa espécie demonstrou que, ao adicionar o extrato aquoso à cultura de células antes da infecção viral, não houve proteção das células contra a infecção. Porém outros resultados sugerem que o extrato de *B. gaudichaudiana* pode exercer sua atividade antiviral pela inativação de partículas virais em altas concentrações e possivelmente pela interferência na etapa de adsorção do vírus nas células em concentrações não virucidas. Já uma fração obtida a partir do extrato aquoso de *B. anomala* exibiu pronunciada atividade virucida frente ao HSV-1 nas concentrações de 1,25 e 0,625 mg/mL (VENTURI et al., 2018).

O artepelin C (ARC), um dos principais compostos fenólicos encontrado na própolis verde brasileira, obtido a partir de *B. dracunculifolia*, vem atuando em diversos alvos moleculares, entre eles a PAK1 (proteína quinase ativada por p21) (MACHADO et al., 2016; MARUTA; HE, 2020). Recentemente vem sendo relatado o envolvimento da PAK1 no desenvolvimento da fibrose pulmonar causada pelo SARS-CoV-2. O receptor ECA2 (enzima conversora de angiotensina 2) acaba sendo uma porta de entrada para a infecção causada pelo novo coronavírus, no qual suas glicoproteínas virais conseguem se ligar e adentrarem as células, utilizando a maquinaria delas para que consiga se replicar e infectar novas células (MARUTA; HE, 2020). Maruta e He sugeriram que os inibidores da PAK1 são potenciais opções terapêuticas antiviral para infecções causadas pelo SARS-CoV-2, sugerindo que o ARC tenha um alto potencial de se tornar um fármaco antiviral.

Já Hocheim e seus colaboradores (2019), durante a determinação do perfil fenólico e da avaliação da atividade anti-herpética de própolis da abelha nativa brasileira *Melipona quadrifasciata*, obtiveram valores de CI_{50} de 90,5 µg/mL, 294,0 µg/mL, 188,0 µg/mL e 58,5 µg/mL para as frações de acetato de etila (AcF) e de butanol e para os compostos FM14 e FM45 (obtidos a partir

da fração de diclorometano), respectivamente. Cabe destacar ainda, que as amostras AcF e FM45 apresentaram um IS de 4,64 e 4,95, maior que as demais amostras testadas.

No ano de 2017, Pereira et al., perceberam que o óleo essencial de *B. milleflora* em concentrações de 30 e 100 µg/mL foi capaz de inibir a proliferação das células Jurkat, HL-60 e Raji (leucemia de células T; leucemia promielocítica e linfoblastoides derivadas de um linfoma de Burkitt, respectivamente), afetando o seu DNA. Outro exemplo são os compostos da própolis verde, obtido da *B. dracunculifolia*, que apresenta atividade citotóxica frente a células tumorais humanas de mama e de próstata, sendo associado principalmente a indução da apoptose por meio da expressão de p53 em células tumorais (SEPÚLVEDA *et al.*, 2020).

Já Rodrigues e seus colaboradores (2021) avaliaram 23 derivados e três precursores naturais de própolis verde obtido de *B. dracunculifolia*, frente a duas linhagens tumorais de mama e duas linhagens de câncer de próstata. Observou-se que sete compostos semissintéticos derivados de artepelin C, bacarina e drupanina apresentaram atividade moderada, com valores de CI_{50} variando de 9,6 a 46,5 µM frente às células de câncer de mama, sendo que dois dos compostos, um deles derivado da bacarina e o outro da artepelin C, apresentaram valores de IS de 3,2 e 3,0, demonstrando assim que esses compostos apresentavam uma maior seletividade frente às células tumorais poupando as células normais de seus efeitos citotóxicos, sendo bons indicativos para o desenvolvimento de novos medicamentos.

2.2 Câncer

Câncer, neoplasia ou tumor maligno, são denominações comuns para designar um grande grupo de doenças que possuem a capacidade de crescimento anormal de células, de forma incontrolável e em qualquer órgão ou tecido do corpo, com capacidade de invadirem órgãos e tecidos que estão próximos ou distantes do local do tumor primário (WHO, 2022a).

O consumo de cigarro e bebidas alcoólicas, a falta de atividades físicas e alimentação saudável, a poluição do ar bem como algumas infecções crônicas são fatores de risco para o câncer. Aproximadamente 13% dos casos diagnosticados no mundo em 2018, foram correlacionados a infecções virais,

que incluíam HPV, vírus da hepatite B e C, vírus Epstein-Barr, sendo que alguns tipos de HPV e os vírus da hepatite B e C, aumentam o risco de câncer de colo de útero e de fígado, respectivamente (WHO, 2022b).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o câncer é uma das principais causas de mortes no mundo, sendo responsável por quase 10 milhões de mortes em 2020. Entre os casos de maior incidência naquele ano estavam o câncer de mama com aproximadamente 2,26 milhões de casos, seguido pelo câncer de pulmão com 2,21 milhões de casos, em terceiro lugar estavam os cânceres de cólon e de reto com 1,93 milhões de casos e, em quarto lugar, o câncer de próstata com aproximadamente 1,41 milhões de casos. Já para os casos em que os pacientes vieram a obtido o câncer de pulmão foi responsável por aproximadamente 18% (1.796.144 óbitos), estando em segundo lugar o câncer de cólon e reto com 9,4% das mortes (935.173 óbitos), em terceiro o câncer de fígado com 8,3% (830.180 óbitos) e, em quarto lugar, os óbitos ocasionados por câncer de estômago com 7,7% (768.793 óbitos) (WHO, 2022c).

No Brasil, em 2020 as maiores incidências de câncer no sexo masculino foram o câncer de próstata (29,2%), câncer de cólon e reto (9,1%) e câncer de traqueia, brônquio e pulmão (7,9%), sendo que em relação a mortalidade esses valores se alteram, sendo o câncer de traqueia, brônquios e pulmões os responsáveis por 13,6% dos óbitos, seguido pelo câncer de próstata (13,5%) e em terceiro lugar pelo câncer de cólon e reto (8,4%). Já no caso das mulheres, o câncer de mama foi responsável por 29,7% dos casos, sendo seguido pelo câncer de cólon e de reto (9,2%) e em seguida o câncer de colo de útero (7,5%). Em relação a mortalidade das mulheres, os maiores responsáveis foram o câncer de mama com 16,5%, o câncer de traqueia, brônquios e pulmões com 11,6% e o câncer de cólon e reto com 9,6% dos óbitos (Brasil/INCA, 2019). Estima-se que para o ano de 2040, o Brasil apresente uma incidência de 994.823 novos casos de câncer, aumentando cerca de 68% os valores quando comparado ao ano de 2020. Já em relação a mortalidade, esse aumento é ainda maior, visto que em 2020 a mortalidade foi aproximadamente 260 mil casos, e estimasse que em 2040 esse número seja de aproximadamente 470 mil casos, tendo um aumento de 80,9% de óbitos (WHO, 2022).

2.3 Herpes Simplex Virus (HSV)

Os Herpes Simplex Vírus tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) pertencem a família *Herpesviridae* e à subfamília *Alphaherpesvirinae* (BRADSHAW; VENKATESAN, 2016; BUSSMANN *et al.*, 2008; KOGANTI; YADAVALLI; SHUKLA, 2019; LIN; HSU; LIN, 2014; NOVAK; PENG, 2005; SMITH, 2012; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

Os HSV foram os primeiros vírus herpéticos humanos descobertos e os seres humanos são os hospedeiros naturais desses vírus. Devido a sua exposição frequente a esses patógenos, os vírus herpéticos se adaptaram à infecção humana já que provocam uma infecção permanente, que dificilmente ocasiona morte em indivíduos imunocompetentes e são facilmente disseminados entre os indivíduos (BRADSHAW; VENKATESAN, 2016; DAMOUR *et al.*, 2019; MENENDEZ; CARR, 2017; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

A transmissão do vírus necessita do contato direto de um indivíduo contaminado (sintomático ou assintomático) e outro suscetível à infecção viral. A infecção causada pelo HSV-1 (herpes simplex vírus, tipo 1) geralmente apresenta lesões mucocutâneas na região orofacial e pode ocasionar encefalite, já o HSV-2 (herpes simplex vírus, tipo 2) apresenta lesões na região genital, podendo ser transmitidos de mães infectadas para neonatos ou sexualmente (BALDWIN; CUMMINGS, 2018; BRADSHAW; VENKATESAN, 2016; CUNNINGHAM *et al.*, 2006; KHAN; SHAW; BERNATONIENE, 2015; LOOKER *et al.*, 2015; SCOTT; COULTER; LAMEY, 1997).

Por serem vírus neurotrópicos, após a infecção primária, eles infectam usualmente o gânglio trigêmeo (HSV-1) e o gânglio sacral (HSV-2) por meio de interações com glicosaminoglicanos da superfície celular (sulfato de heparano), e moléculas de adesão celular (nectina-1) e estabelecem um estado de latência em que o DNA viral se mantém dentro dos núcleos neuronais, mas não são produzidas partículas virais infecciosas. Por vários estímulos, incluindo luz solar, febre, imunossupressão ou estresse, pode ocorrer a reativação e com isso a replicação viral, causando patologia periférica e o aparecimento de úlceras herpéticas (BALDWIN; CUMMINGS, 2018; HARRIS; HARRIS, 2015; LIN; HSU; LIN, 2014; MENENDEZ; CARR, 2017; ROWE *et al.*, 2013; SHIEH; SPEAR, 1994;

SHUKLA; TIWARI; VALYI-NAGY, 2012; STEINER; KENNEDY; PACHNER, 2007; WOZNIAK *et al.*, 2015).

O HSV é um vírus grande, possui partículas virais esféricas que medem cerca de 150 a 186 nm de diâmetro com picos de glicoproteínas salientes (espículas) tornando seu diâmetro total de 200 a 225 nm. Seu vírion é dividido em quatro partes: núcleo contendo um DNA linear de fita dupla, com aproximadamente 152 e 155 kbp (HSV-1 e HSV-2, respectivamente); um capsídeo icosaédrico composto por 162 capsômeros; um tegumento constituído por uma camada amorfa com algumas regiões estruturadas contendo filamentos de 7nm de largura, composta por 26 proteínas estruturais e reguladoras virais; e externamente um envelope constituído por uma bicamada lipídica formada pela membrana celular durante a saída do vírus da célula hospedeira por endocitose e, que ancora 11 glicoproteínas (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL e gM) e duas proteínas de membrana não glicosiladas (UL20 e US9) (ARDUINO; PORTER, 2008; CHOWDHURY *et al.*, 2013; GRÜNEWALD *et al.*, 2003; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; TAYLOR *et al.*, 2002; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

2.4 Chikungunya Virus (CHIKV)

O CHIKV pertence à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus* e é um vírus artritogênico que foi isolado pela primeira vez na Tanzânia entre 1952 e 1953 e circula em mais de 100 países (BAUTISTA-REYES *et al.*, 2017; DEEBA *et al.*, 2020; PRESTI *et al.*, 2014; ROBINSON, 1955; SCHNEIDER *et al.*, 2019; SOLIGNAT *et al.*, 2009). O CHIKV é transmitido pelos mosquitos vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (SHANMUGARAJ; MALLA; RAMALINGAM, 2019; SILVA, J. V. J. *et al.*, 2018). Devido a extensa distribuição desses vetores a transmissão da infecção para novos locais ocorre de maneira facilitada, sendo que o *A. aegypti* possui hábitos diurnos, prefere alimentar-se de sangue humano e possui ovos resistentes à dessecação (PETERSEN; POWERS, 2016; SHANMUGARAJ; MALLA; RAMALINGAM, 2019).

O CHIKV é um vírus envelopado, capsídeo icosaédrico e seu genoma é composto por RNA fita simples de senso positivo, com tamanho aproximado de 60 – 70 nm e 12 Kb, contendo duas regiões de leitura abertas (*Open Reading Frames* – ORFs) nas extremidades, responsáveis por codificar as proteínas

estruturais (nsP1-4) e não-estruturais (E1-3, 6K, capsídeo) do vírus, sendo as ORFs flanqueadas por regiões não-traduzidas (BAUTISTA-REYES et al., 2017; BURT et al., 2017; GAO et al., 2019; KHAN, A. H. et al., 2002; NG; HAPUARACHCHI, 2010; RODRIGUEZ et al., 2019; WONG; CHU, 2018).

No Brasil, os primeiros casos de infecção por CHIKV foram notificados a partir de 2013, sendo identificadas as linhagens Asiáticas e *East-Central-South-African* (ECSA), responsáveis por causarem picos de infecções (YACTAYO et al., 2016).

As manifestações clínicas de CHIKV variam de infecção assintomática, febre leve com erupção cutânea e artralgia até artrite debilitante aguda grave. O conjunto de febre, erupção cutânea e artralgia, associados a outros sintomas como dor de cabeça, mialgia, náuseas e vômito são características sugestivas de febre Chikungunya, possuindo suas manifestações clínicas entre 5 a 14 dias na maioria dos pacientes (SCHILTE et al., 2013).

Outra manifestação característica da infecção por CHIKV é a poliartralgia simétrica, que começa de dois a cinco dias após o início da febre e afeta predominantemente mãos, pulsos, tornozelos e pés, bem semelhante à artrite reumatoide, podendo algumas vezes afetar articulações maiores previamente danificadas (PAUL, BINOY J.; SADANAND, 2018; PAUL, BINOY JAMES et al., 2011; THIBERVILLE et al., 2013).

No momento em que essas manifestações artríticas perduram por mais de três meses após o início da febre CHIKV, a doença passa a ser chamada de artrite crônica chikungunya, e estudos sugerem grande semelhança com a artrite reumatoide, devido as características clínicas e expressão de citocinas, fazendo com que pacientes que possuíram sintomas reumáticos fossem tratados com corticosteroides, cloroquina e hidroxicloroquina, metotrexato, AINEs, sulfassalazina ou agentes biológicos (etanercepte e abatacepte) (AMARAL et al., 2019; AMARAL; BILSBORROW; SCHOEN, 2020; AMARAL; BINGHAM; SCHOEN, 2020; CHAAITANYA et al., 2011; CHOW et al., 2011; HOARAU et al., 2010; TIWARI; BERGMAN, 2018; ZAID et al., 2018).

Até o momento não existe nenhuma vacina aprovada para uso, porém devido a uma parceria entre o Instituto Butantan e a Valneva (empresa biotecnológica franco-austríaca) vem sendo desenvolvida uma vacina (VLA1553) que já se encontra na fase final do ensaio clínico de fase 3. O estudo

foi realizado nos EUA com pacientes com idade superior a 18 anos e os resultados obtidos até o momento indicam que a imunogenicidade alcançada posteriormente a vacinação permanece ao menos por seis meses, com uma produção de anticorpos em 96,3% dos pacientes avaliados. Além disso, a vacina causou reações adversas mínimas e demonstrou um bom perfil de segurança. Como forma de complementar os resultados obtidos nos Estados Unidos, serão realizados ensaios clínicos no Brasil, em regiões endêmicas, testando assim a real eficácia do imunizante (BUTANTAN, 2022).

2.5 Coronavírus

No final de 2019, a OMS foi informada sobre uma série de casos de pneumonia que estaria ocorrendo na cidade de Wuhan, na China, tratando-se de uma nova cepa de coronavírus até então não identificada antes nos seres humanos. Atualmente sete diferentes tipos de coronavírus humanos já foram identificados, encontrando-se entre eles o SARS-COV que é responsável por causar a Síndrome Respiratória Aguda Grave, o MERS-COV que causa a Síndrome Respiratória do Oriente Médio, e o mais recente de todos, o novo coronavírus, que em fevereiro de 2020 passou a ser chamado de SARS-CoV-2, sendo esse o responsável por causar a doença conhecida como COVID-19 (WHO/OPAS, 2022).

A COVID-19 é uma doença infecciosa que apresenta como principais sintomas o cansaço, febre e tosse seca, sendo possível que alguns pacientes ainda apresentem a perda de paladar e olfato, congestão nasal, dor de garganta, dores nos músculos e cabeça, conjuntivite, náuseas, vômitos, diarreia, tonturas e até mesmo erupções cutâneas (WHO, 2022d). A infecção ocorre por meio da exposição a fluídos respiratórios, seja ela por inalação de gotículas, por meio da deposição das gotículas nas membranas mucosas da boca, nariz ou olhos ou ao tocar as membranas mucosas com as mãos contendo partículas infecciosas após terem entrado em contato com superfícies com vírus ou fluidos respiratórios (CDC, 2021b). A infecção por SARS-CoV, causa uma infecção que está associada ao aumento nos níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que acarretam o desenvolvimento de pneumonia atípica, com possibilidade de ocasionar insuficiência pulmonar e um rápido comprometimento respiratório (DING *et al.*, 2004).

Até o dia 12 de julho de 2022, no cenário mundial, a COVID-19 apresentou 554.290.112 casos de pessoas infectadas, sendo que desses 6.351.801 vieram a óbito. Já no Brasil, o número de pessoas infectadas e que vieram a óbito foram 32.874.501 e 673.554, respectivamente. O maior registro de casos de incidência ocorreu na quarta semana de janeiro de 2022 com 23.198.215 casos confirmados; já em relação aos óbitos, o maior número confirmado foi na terceira semana de janeiro de 2021 com 102.104 mortes (WHO, 2022e).

A realização de pesquisas e com isso a obtenção de dados clínicos sobre o SARS-CoV-2 sugerem potenciais fármacos que podem ser reposicionados e que apresentam uma terapêutica eficaz e efeitos farmacológicos adequados no tratamento de pacientes com COVID-19. Segundo a FDA, alguns medicamentos já existentes foram aprovados para serem utilizados de forma emergencial, entre eles alguns medicamentos antivirais como o remdesivir, medicamentos anti-inflamatórios, anticorpos monoclonais e até mesmo a terapia imunomoduladora como opções para o manejo farmacológico (CDC, 2022a).

Como ferramenta para a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da COVID-19, o Vírus da Hepatite Murina (MHV-3) tem sido utilizado como um substituto nas pesquisas, já que possui uma semelhança filogenética com o SARS-CoV-2, além de não ser necessário um alto nível de biossegurança nos laboratórios de pesquisa para sua manipulação. O MHV-3 pertence ao gênero betacoronavirus, é um vírus de RNA de fita simples, senso positivo, envelopado, com um diâmetro de 80 a 120 nm (GORBALENYA *et al.*, 2020).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar uma triagem citotóxica de espécies do gênero *Baccharis* frente a diferentes linhagens celulares tumorais e avaliar a atividade antiviral frente aos vírus herpéticos humanos (HSV), chikungunya (CHIKV) e ao coronavírus murino (MHV-3).

3.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar a atividade citotóxica das amostras de *Baccharis* frente a diferentes linhagens de células tumorais humanas;
- II. Avaliar a citotoxicidade das amostras mais ativas frente a linhagem não tumoral (células VERO) a fim de se obter o índice de seletividade (IS);
- III. Avaliar a citotoxicidade das amostras de *Baccharis* frente às células VERO, as quais são permissivas a infecção pelo HSV-1 e pelo CHIKV, e frente às células L929, as quais são permissivas a infecção pelo MHV-3.
- IV. Avaliar a atividade antiviral *in vitro* das amostras de *Baccharis*, frente aos vírus HSV-1 cepas KOS e 29-R (sensível e resistente ao aciclovir, respectivamente), frente ao CHIKV (cepa SLZ12) e frente ao MHV-3.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

O material vegetal foi coletado em duas unidades de conservação da Mata Atlântica (Serra da calçada – MG e Parque Nacional do Caparaó – MG/ES), pela equipe do professor Dr. Geraldo Wilson Fernandes, Laboratório de Ecologia Evolutiva - Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais. As espécies foram identificadas pelo taxonomista Gustavo Heiden e posteriormente todas as exsicatas foram depositadas no Herbário ECT (Herbário da Embrapa Clima Temperado, Pelotas).

As amostras botânicas foram secas em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura máxima de 40°C. Em seguida, o material foi separado em folhas e caules e posteriormente pulverizado em moinho de facas. As drogas vegetais pulverizadas foram acondicionadas em frascos de vidro lacrados e protegidos da luz e armazenadas em sala com temperatura controlada.

Os materiais vegetais pulverizados de *Baccharis* spp. foram submetidos à maceração com etanol 96° GL. Este então foi eliminado em fluxo de ar, à temperatura ambiente, por 72 horas. Em seguida os extratos foram liofilizados e armazenados em sala com temperatura controlada (25° C).

Alguns extratos das espécies de *Baccharis* foram selecionados, diante das respostas em diferentes modelos biológicos, e submetidos a uma percolação exaustiva com etanol 96°GL. O solvente foi eliminado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, à temperatura máxima de 45°C. Em seguida, os extratos foram liofilizados e armazenados em dessecador. Uma parte de cada extrato obtido por percolação exaustiva foi solubilizada em uma solução de metanol/água (3:7) e submetida à partição sequencial com *n*-hexano, diclorometano e acetato de etila. Após a remoção dos solventes em evaporador rotatório, à temperatura máxima de 45°C, foram obtidas as frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila e hidrometanólica, sendo posteriormente liofilizadas.

Quadro 1: Espécies do gênero *Baccharis* avaliadas

| Espécie | Local de coleta | Parte usada |
|----------------------------------|------------------------|--------------------|
| <i>Baccharis intermix</i> | Serra do Cipó | Folhas |
| <i>Baccharis reticularia</i> | Serra do Rola Moça | Folhas |
| <i>Baccharis concinna</i> | Serra do Cipó | Folhas |
| <i>Baccharis dracunculifolia</i> | Serra do Cipó | Folhas |
| <i>Baccharis aphylla</i> | Serra do Cipó | Partes aéreas |
| <i>Baccharis platypoda</i> | Parque do Caparaó | Folhas |
| <i>Baccharis calvescens</i> | Serra da Calçada | Folhas |
| <i>Baccharis symphyopappus</i> | Serra da Calçada | Folhas |
| <i>Baccharis retusa</i> | Serra da Calçada | Folhas |
| <i>Baccharis brevifolia</i> | Serra da Calçada | Folhas |
| <i>B. myriocephala</i> | Serra da Calçada | Partes aéreas |
| <i>Baccharis imbricata</i> | Parque do Caparaó | Folhas |
| <i>Baccharis hemiptera</i> | Parque do Caparaó | Partes aéreas |
| <i>Baccharis opuntioides</i> | Parque do Caparaó | Partes aéreas |
| <i>Baccharis megapotamica</i> | Parque do Caparaó | Folhas |
| <i>Baccharis parvidentata</i> | Parque do Caparaó | Folhas |
| <i>Baccharis magnifica</i> | Parque do Caparaó | Caules |
| <i>Baccharis altimontana</i> | Parque do Caparaó | Partes aéreas |

4.1.1 Preparo das soluções-estoques

As soluções-estoques foram preparadas a partir dos extratos e frações liofilizados. Após pesados, os extratos e frações foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck®).

Para a realização dos ensaios biológicos, as soluções-estoques foram diluídas em meio de cultura, adequado para cada linhagem celular, com o intuito de obter concentrações desejadas, sem que a concentração de DMSO ultrapassasse 1%. Esta concentração (<1%) não é citotóxica e foi utilizada a mesma quantidade deste reagente nos controles não tratados dos ensaios.

4.2 Culturas celulares

4.2.1 Células

Para os ensaios de citotoxicidade foram utilizadas linhagens celulares humanas de câncer de pulmão e de próstata, com diferentes potenciais metastáticos. As células de câncer de pulmão utilizadas foram células de câncer de pulmão do tipo células não pequenas (CPCNP) a saber: células A549 (ATCC:CCL185) e células H460 (ATCC:HTB-177). Já as células de câncer de próstata utilizadas foram as células PC-3 (adenocarcinomas de próstata insensíveis à terapia antiandrogênica). Foram também utilizadas células não tumorais VERO (ATCC: CCL-81), as quais são fibroblastos de rim de macaco africano (*Cercopithecus aethiops*). As células VERO, A549 e H460 foram adquiridas do ATCC® (*American Type Culture Collection*) e as células PC-3 foram adquiridas do DSMZ® (*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*).

Para os ensaios de atividade antiviral, também foram utilizadas as células VERO (ATCC:CCL 81), pela alta permissividade à replicação *in vitro* do HSV-1 e CHIKV e também por permitir a visualização do efeito citopático (HU; HSIUNG, 1989). Para os ensaios com o MHV-3, foram empregadas as células L929 as quais consistem de uma cultura de fibroblastos murino com alta permissividade à infecção e replicação *in vitro* do coronavírus murino MHV-3.

4.2.2 Meios de cultura

A linhagem celular PC-3 foi cultivada em meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol (Gibco®), A549, L929 e VERO foram cultivadas em meio MEM (Gibco®), PC3 foi cultivada em DMEM sem vermelho de fenol (Gibco®) e H460 foi cultivada em meio RPMI1640 (Gibco®). Os meios foram suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB - Gibco®), e as células mantidas a 37 °C, em atmosfera úmida

de 5% de CO₂. Para obter subculturas celulares e posterior realização de experimentos, utilizou-se a tripsina (Sigma®) como enzima proteolítica dissociante. Essa enzima é responsável por catalisar reações de quebra de cadeias polipeptídicas em determinadas sequências de aminoácidos.

4.3 Vírus

4.3.1 Origem das cepas virais

Os vírus utilizados foram o Herpes Simplex Virus tipo 1 (HSV-1), cepa KOS (sensível ao aciclovir) e 29-R (resistente ao aciclovir), ambas provenientes da Faculdade de Farmácia, Universidade de Rennes, França; Chikungunya Virus (CHIKV), cepa SLZ12, coletada, isolada e identificada de acordo com o protocolo 2.498.658. aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos, CEP-UNICEUMA, Maranhão e o coronavírus murino (MHV-3), proveniente da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

4.3.2 Preparo das suspensões-estoques virais

A preparação das suspensões-estoques virais foi conforme metodologia descrita por (SIMÕES; AMOROS; GIRRE, 1999).

Frascos de cultura celular, contendo células VERO ou L929 semeadas 24 h antes da infecção, foram inoculados com uma suspensão viral estoque. Para isso, o meio de cultura existente foi aspirado e a monocamada celular foi lavada com solução tampão fosfato (PBS) para que restos celulares e resquícios de SFB fossem removidos. Em seguida, a monocamada celular foi infectada com 1mL da suspensão viral estoque (HSV-1, cepas KOS ou 29-R; CHIKV, cepa SLZ12 ou MHV-3) e incubada por 1 h a 37 °C, em estufa de CO₂ para permitir a adsorção e penetração viral. Após este período, o excesso de vírus foi retirado por sucção a vácuo e 10 mL de meio MEM sem SFB foram adicionados a monocamada celular infectada e o frasco foi incubado a 37°C em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂.

O efeito citopático foi monitorado por meio de microscópio invertido durante cada ciclo de replicação viral (18 h). Quando a monocamada celular demonstrou 100% de efeito citopático viral, a garrafa foi congelada a -80 °C e descongelada a 37 °C e esse ciclo foi repetido por 3 vezes para que ocorresse

o rompimento total das células e liberação das partículas virais. A suspensão viral foi então centrifugada por 5 minutos a 5000 RPM, em centrífuga refrigerada a 4°C, para que houvesse a separação dos debrís celulares e vírus. O sobrenadante, com a suspensão viral, foi aliquotado em tubos estéreis, titulado e armazenado a -80 °C até sua posterior utilização.

4.3.3 Determinação dos títulos infecciosos virais

Antes de realizar a avaliação da potencial atividade antiviral dos extratos, é importante o conhecimento da infecciosidade dos inóculos virais produzidos. A infecciosidade pode ser determinada como unidades formadoras de placas (UFP), assim sendo possível conhecer a concentração viral por mL, ou seja, o título viral. Os títulos infecciosos dos estoques virais de HSV-1 e CHIKV foram determinados através do método de contagem de placas de lise enquanto o título do MHV-3 foi obtido por meio do ensaio de TCID₅₀, ambos os métodos foram descritos por (BURLESON, F. G.; CHAMBERS, T. M.; WIEDBRAUK, 1992).

Para HSV-1 os ensaios foram realizados em placas de 24 cavidades, que foram previamente preparadas da seguinte forma: suspensões de células VERO, na densidade de $2,5 \times 10^5$ células/cavidade/0,75 mL, foram cultivadas em meio MEM, suplementado com 10% de SFB, e incubadas a 37°C em estufa de CO₂ por 24 h até completa confluência. Após este período, o meio de cultura de cada cavidade foi removido e a monocamada celular lavada com PBS. As células então foram infectadas com 400 µL de diferentes diluições seriadas da suspensão viral na razão 1:10, em meio MEM sem SFB (três réplicas para cada diluição). As placas, então, foram incubadas durante 1 h, sendo agitadas cuidadosamente a cada 15 minutos para que houvesse uma melhor distribuição da suspensão viral. Após esse tempo, a suspensão viral foi aspirada e, em cada cavidade, foram adicionados 500 µL de uma solução de CMC 1,5% (carboximetilcelulose - Sigma®) e MEM 2x, na proporção 1:1. As placas então foram novamente incubadas por 48 h e após este período, o meio foi retirado e as células fixadas e coradas pela adição de 200 µL do corante preto de naftaleno¹ por 20 min, à temperatura ambiente, em agitador horizontal. Após este tempo, o corante foi aspirado e a placa de cultura foi colocada para secar a

¹ **Preparo da solução de preto de naftaleno:** 100 mg do corante preto de naftaleno (Sigma®) foram dissolvidos em 100 mL de uma solução aquosa a 5% de ácido acético (Merck®), sendo o pH ajustado, se necessário, para 2,3-2,5. Esta mistura foi filtrada através de papel filtro e estocada a 4°C, sendo aquecida em banho-maria a 37°C, antes de seu uso.

temperatura ambiente, sendo possível a quantificação das placas de lise através da visualização em microscópio estereoscópio. Para calcular os títulos virais, foram contados os focos de infecção na última diluição, que se caracterizam por áreas claras de lise celular, chamadas de placas de lise ou focos.

O título viral foi calculado pela equação abaixo, e expresso como sendo o número de Unidades Formadoras de Placas por mililitro (UFP/mL):

$$UFP = \frac{\text{Placas de lise da última diluição que apresentou placa} \times \text{Recíproca da última diluição}}{\text{Volume do inóculo em mL}}$$

Para o CHIKV algumas alterações metodológicas foram realizadas. Uma suspensão de células VERO, com a densidade de $3,5 \times 10^5$ células/cavidade/mL foram inoculadas previamente em placas de 12 cavidades e incubadas. Após 24 h as células então foram infectadas com 400 μ L de diferentes diluições seriadas da suspensão viral na razão 1:10, em meio MEM sem SFB (três réplicas para cada diluição) e incubadas por 1 h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após esse tempo, a suspensão viral foi aspirada e em cada cavidade foram adicionados 700 μ L de uma solução de CMC 2,0% (carboximetilcelulose - Sigma®) e MEM 2x, na proporção 1:1, com adição de 1% de MgCl₂ e 1% de Piruvato de sódio. As placas então foram novamente incubadas por 48 h e, após este período, as células foram fixadas com PBS/formaldeído 10% e coradas com cristal violeta 1%.

Para a determinação do título viral de MHV-3 foi previamente preparado uma suspensão celular de L929, com densidade de $3,0 \times 10^5$ células/cavidade/mL, cultivadas em meio MEM e suplementada com 10% de SFB, sendo então adicionadas em uma placa de 24 cavidades, e posteriormente incubada a 37°C em estufa de CO₂ por 24 h até completa confluência. Após esse período, foi removido o meio de cultura de cada cavidade e a monocamada celular foi lavada com PBS. As células então foram infectadas com 400 μ L da suspensão-estoque viral, diluída em série na razão 1:10, em meio MEM sem SFB e as placas foram incubadas por 1 hora, sendo cuidadosamente agitadas a cada 15 minutos para uma melhor distribuição da suspensão viral. Após essa etapa, a suspensão viral foi aspirada e em cada cavidade foram adicionados 500 μ L de MEM e as placas foram novamente incubadas por 72 h sendo avaliado diariamente o efeito citopático que cada diluição viral provocava na monocamada

celular. Sendo assim, para a determinação do título, foi considerada a maior diluição viral que apresentou efeito citopático.

4.4 Avaliação da citotoxicidade

4.4.1 Avaliação do potencial citotóxico

A avaliação da viabilidade celular foi realizada por meio do ensaio colorimétrico de sulforrodamina B (SRB), descrito por Vichai; Kirtikara, 2006 e padronizado no Laboratório de Virologia Aplicada por Silva, I. T., 2009. Este ensaio consiste em um método *in vitro*, que se fundamenta na capacidade do corante em ligar-se a componentes proteicos das células previamente fixadas com ácido tricloroacético (TCA), possibilitando a quantificação proteica.

Procedimento: Suspensões de cada linhagem celular (para linhagens tumorais a densidade celular foi de 1×10^4 células/cavidade, enquanto para VERO e L929 a densidade celular foi de $2,5 \times 10^4$ células/cavidade), obtidas por tripsinização de frascos de cultura celular, foram distribuídas em uma placa de 96 cavidades (100 μ L/cavidade). Após 24 horas, foram adicionados 100 μ L dos materiais-teste diluídos em meio de cultura adequado, em diferentes concentrações, na faixa de 500 a 0 μ g/mL, por meio de diluições sucessivas na razão 1:2, sendo a placa novamente incubada por 48 h nas mesmas condições de temperatura e CO₂.

Após este período, sem remover o sobrenadante, as células foram fixadas por meio da adição de 100 μ L de uma solução aquosa de TCA a 10% em cada cavidade e a placa foi incubada por 1 h a 4°C. As cavidades foram cuidadosamente lavadas três vezes com água destilada e deixadas 24 h à temperatura ambiente para secagem. Em seguida, as células fixadas foram coradas com 100 μ L da solução ácida de sulforrodamina B² (0,057% p/v) por 30 min. O corante não ligado às proteínas foi removido por meio de três lavagens sucessivas com uma solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v), e a placa foi seca novamente por 24 h. A partir disso, procedeu-se a extração do corante ligado às proteínas, com a adição de 100 μ L, em cada cavidade, de uma solução

² **Preparo da solução ácida de sulforrodamina B:** 57 mg de sulforrodamina B (Sigma®) foram dissolvidos em 100 mL de uma solução aquosa a 1% de ácido acético (v/v) (Merck®).

tampão de Tris Base 10 mM³ (pH 10,5). A placa foi agitada por 10 min à temperatura ambiente para que todo o corante fosse dissolvido e as absorbâncias foram medidas em um espectrofotômetro (Spectra MD2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) a 510 nm. Então os valores de absorbância obtidos para as diferentes concentrações de cada material-teste foram transformados em porcentagens de viabilidade celular, em relação ao controle celular, o qual foi considerado 100% viável, pela seguinte equação:

$$CC_{50} = \frac{(\text{Absorbância do material teste} \times 100)}{\text{Absorbância do controle celular}}$$

Logo após, os percentuais calculados referentes às diferentes concentrações das amostras, foram inseridos em um gráfico, e, por meio de análise de regressão não linear, foi possível calcular os valores de CC₅₀ (concentração de cada amostra que reduziu em 50% a viabilidade celular). Os valores calculados são as representações da média de três experimentos independentes com seu intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

4.5 Avaliação da seletividade

O Índice de Seletividade das amostras foi calculado com base nos valores de CC₅₀ obtido em células VERO e células tumorais, de acordo com a seguinte equação:

$$IS = \frac{CC_{50} \text{VERO}}{CC_{50} \text{Tum}}$$

Onde CC₅₀VERO equivale ao valor de CC₅₀ da amostra em células VERO (saudáveis), e CC₅₀Tum equivale ao valor de CC₅₀ da amostra para cada linhagem tumoral (SILVA, I. T., 2009).

³ **Preparo da solução Tris-Base 10 mM:** 242,2 mg de Tris-Base (Sigma®) foram dissolvidos em 200 mL de água Milli-Q, e o pH foi ajustado até 10,5.

4.6 Avaliação da potencial atividade antiviral

4.6.1 Avaliação do potencial anti-herpético e anti-CHIKV

A avaliação da atividade antiviral das amostras frente ao HSV-1 (cepas KOS e 29-R) e CHIKV foi realizada por meio do ensaio de redução do número das placas de lise, conforme metodologia proposta por (DE LOGU *et al.*, 2000), com pequenas modificações. Para cada ensaio foram realizados controles virais, onde as células foram infectadas e não tratadas, e controles celulares, onde as células não foram infectadas nem tratadas. Nos experimentos envolvendo os vírus herpéticos foi empregado como controle positivo o Aciclovir (ACV – Sigma®).

Procedimento: células VERO foram cultivadas em placas de 24 cavidades ($2,5 \times 10^5$ /cavidade/0,75 mL) e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ até a confluência (24 h). Após 24 h, o meio foi aspirado cuidadosamente com o auxílio de vácuo e a monocamada celular confluenta foi lavada três vezes com PBS e infectadas com 100 UFP de HSV-1, por meio da adição de 400 µL de uma suspensão viral previamente titulada. Após 1 h de adsorção a 37°C e 5% de CO₂, as células foram lavadas com PBS e 500 µL de uma solução de CMC e meio MEM 2X foram adicionados no controle celular e controle viral, enquanto nas demais cavidades foram adicionadas 500 µL desta mesma solução contendo diluições das diferentes amostras testadas ou do controle aciclovir. As placas foram incubadas por 48 h, a 37°C e 5% CO₂. Passado este período, o meio foi aspirado e as células foram coradas com 300 µL de solução de preto de naftaleno (conforme descrito no item 3.3.3). Após 20 min, em agitação e temperatura ambiente, o corante foi aspirado e as placas contadas através da visualização em microscópio estereoscópio. Após a contagem das placas, a porcentagem de inibição da replicação viral de cada amostra, com relação aos controles virais, foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = \left(1 - \frac{\text{Número de placas amostras}}{\text{Número de placas controle viral}} \right) \times 100$$

Em seguida, os percentuais calculados foram inseridos em um gráfico, e através da análise de regressão não linear, foi possível calcular os valores de CI₅₀, ou seja, a concentração de cada amostra que inibe 50% a infecção viral. Os valores

de CI_{50} representaram a média de três experimentos independentes e foram expressos com seus respectivos intervalos de confiança de 95%.

De posse dos valores de CC_{50} e CI_{50} foi possível calcular o índice de seletividade (IS) de cada amostra, utilizando a seguinte equação:

$$IS: \frac{CC_{50}}{CI_{50}}$$

Em seguida, foram realizados experimentos para avaliação do potencial anti-CHIKV. Para isso células VERO foram cultivadas em placas de 12 cavidades ($3,5 \times 10^5$ /cavidade/mL) e incubadas a 37°C, 5% de CO_2 até a confluência (24 h). Após 24 h, o meio foi aspirado e a monocamada celular foi lavada três vezes com PBS e infectada com 50 UFP de CHIKV, por meio da adição de 700 μ L de uma suspensão viral previamente titulada. Após 1 h de adsorção a 37°C e 5% de CO_2 , as células foram lavadas com PBS e 700 μ L de uma solução de CMC e meio MEM 2X foram adicionados no controle celular e controle viral, enquanto nas demais cavidades foram adicionadas 700 μ L desta mesma solução contendo diferentes diluições das amostras testadas. As placas então foram novamente incubadas por 48 h e, após este período, as células foram fixadas com PBS/formaldeído 10%, agitadas por 40 minutos e então corada com cristal violeta 1%. Após 20 min, em agitação e temperatura ambiente, o corante foi aspirado e as placas contadas através da visualização em microscópio estereoscópio. Após a contagem das placas, a porcentagem de inibição da replicação viral de cada amostra foi calculada conforme descrito anteriormente para o HSV.

4.6.2 Avaliação do potencial anti-coronavírus

A avaliação da atividade antiviral das amostras frente ao MHV-3 foi realizada por meio do ensaio de visualização do efeito citopático viral (ECP) seguido de determinação do título viral por ensaio de placa de lise, conforme metodologia proposta por BURLESON, F. G.; CHAMBERS, T. M.; WIEDBRAUK, 1992, com pequenas modificações. Para cada ensaio foram realizados controles virais, onde as células foram infectadas e não tratadas, e controles celulares, onde as células não foram infectadas nem tratadas.

Procedimento: células L929, foram cultivadas em placas de 96 cavidades (contendo $2,5 \times 10^4$ células/cavidade/0,1mL) e incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por 24 h até completa confluência. Após 24 h, o meio foi aspirado e a monocamada celular foi infectada com 50 µL de uma suspensão viral previamente titulada. Após 1 h de adsorção a 37°C e 5% de CO₂, a suspensão viral foi retirada e então 100 µL das amostras na concentração de 50 µg/mL foram adicionados em cada cavidade, com exceção das cavidades do controle viral e controle celular, para posteriormente as placas serem incubadas novamente 37°C, 5% de CO₂ por 48 h. Após esse período, com o auxílio de microscópio invertido, foi avaliado a inibição do efeito citopático induzido pelas amostras e, então, o sobrenadante foi coletado e armazenado no freezer a -80°C para posterior titulação.

Para as amostras que apresentaram uma redução visual do efeito citopático viral, foi realizado a titulação de acordo com o que está descrito no item 4.3.3.

4.7 Análise estatística

Para realizar os cálculos de CC₅₀ e CI₅₀, utilizou-se análise de regressão não-linear, por meio de curvas de concentração x efeito, sendo que os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata e, os valores expressos juntamente com o Intervalo de Confiança de 95% (IC95%). As análises foram realizadas por meio do Software GraphPad Prisma 8.01.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do potencial efeito citotóxico

Os resultados do potencial efeito citotóxico dos extratos e frações de espécies do gênero *Baccharis* em diferentes linhagens celulares tumorais estão descritos na Tabela 1.

No presente trabalho foram considerados como mais promissores os extratos e frações que apresentaram valores de CC_{50} menores que 50 $\mu\text{g/mL}$ (COS *et. al.*, 2006) nas três linhagens tumorais testadas. Como foi o caso do extrato de *B. megapota mica* e suas frações (em acetato de etila, diclorometano e hexano), bem como as frações em diclorometano e hexano de *B. imbricata*. Outros extratos que apresentaram resultados interessantes para ao menos duas das linhagens tumorais testadas, foram o extrato de *B. symphyopappus* e o de *B. imbricata*. Como pode ser observado na tabela 1.

Ao ser considerado os valores de índice de seletividade (IS), foram consideradas promissoras as amostras que apresentaram valores de $IS > 4$, que demonstra uma seletividade da amostra em relação a célula tumoral, com menos efeitos em células saudáveis. Diante disso, os extratos de *B. intermix*, *B. reticularia*, *B. aphylla*, *B. calvescens* e *B. retusa* se enquadram dentro desses valores, como pode ser observado nos gráficos 1, 2 e 3.

Tabela 1: Potencial citotóxico das amostras de *Baccharis* spp.

| Espécie | H460 ^a | | PC3 ^b | | A549 ^c | | VERO ^d |
|---------------------------|--|-------------------|------------------------------|------|------------------------------|------|------------------------------|
| | CC ₅₀ ^e (IC 95%) ^f | IS ^g | CC ₅₀ (IC 95%) | IS | CC ₅₀ (IC 95%) | IS | CC ₅₀ (IC 95%) |
| <i>B. intermix</i> | 83,36 (74,20 - 93,66) | 4,40 | 97,84 (75,59 - 126,6) | 3,75 | N.D. ^h | S.A. | 366,90 (223,1 - 603,6) |
| <i>B. reticularia</i> | 89,79 (75,71 - 106,5) | 4,93 | 97,20 (78,85 - 119,8) | 4,55 | N.D. | S.A. | 442,30 (265,4 - 737,0) |
| <i>B. concinna</i> | 108,30 (87,46 - 134,0) | S.A. ⁱ | 139,00 (102,6 - 188,3) | S.A. | N.D. | S.A. | >500,00 |
| <i>B. dracunculifolia</i> | 76,44 (64,71 - 90,29) | 2,91 | 86,95 (70,32 - 107,5) | 2,56 | N.D. | S.A. | 222,30 (189,8 - 260,5) |
| <i>B. aphylla</i> | 37,05 (27,98 - 49,04) | 6,09 | 69,77 (55,34 - 87,95) | 3,23 | N.D. | S.A. | 225,50 (178,5 - 284,8) |
| <i>B. platypoda</i> | 89,46 (74,21 - 107,8) | 3,10 | 123,30 (97,08 - 156,7) | 2,25 | > 100 | S.A. | 277,70 (212,2 - 363,4) |

| | | | | | | | |
|--|---------------------------|-------|---------------------------|------|--------------------------|------|---------------------------|
| <i>B. calvescens</i> | 52,71 (44,50 - 62,44) | 7,32 | 74,75 (61,38 - 91,04) | 5,16 | 93,09 (65,85 - 131,6) | 4,14 | 385,80 (267,2 - 557,1) |
| <i>B. symphyopappus</i> | 39,51 (33,47 - 46,63) | 2,81 | 29,50 (23,97 - 36,31) | 3,77 | N.D. | S.A. | 111,10 (75,14 - 164,2) |
| <i>B. retusa</i> | 45,62 (37,38 - 55,67) | 10,04 | 79,77 (64,06 - 99,34) | 5,74 | > 100 | S.A. | 458,10 (325,9 - 643,8) |
| <i>B. brevifolia</i> | 40,51 (33,29 - 49,31) | 3,62 | 67,13 (53,96 - 83,52) | 2,18 | 63,42 (47,05 - 85,48) | 2,31 | 146,5 (86,28 - 248,7) |
| <i>B. brevifolia</i> (Acetato de etila) | 111,30 (97,31 - 127,3) | S.A. | 104,00 (87,42 - 123,7) | S.A. | N.D. | S.A. | >500,00 |
| <i>B. brevifolia</i> (Diclorometano) | 56,40 (42,66 - 74,58) | 3,72 | 61,89 (51,51 - 74,35) | 3,39 | N.D. | S.A. | 209,60 (154,7 - 284,0) |
| <i>B. myriocephala</i> | 42,95 (36,99 - 49,87) | 2,06 | 55,18 (46,84 - 65,02) | 1,61 | 83,39 (55,32 - 125,7) | 1,06 | 88,65 (70,20 - 111,9) |
| <i>B. imbricata</i> | 33,50 (29,91 - 37,53) | 1,21 | 22,11 (18,75 - 26,08) | 1,83 | 80,56 (51,63 - 125,7) | 0,50 | 40,39 (33,01 - 49,42) |
| <i>B. imbricata</i> (Acetato de etila) | 116,10 (105,4 - 127,9) | 1,21 | 83,45 (70,88 - 98,26) | 1,68 | > 100 | S.A. | 140,10 (121,9 - 160,9) |
| <i>B. imbricata</i> (Diclorometano) | 23,33 (20,51 - 26,54) | 1,45 | 18,13 (16,02 - 20,53) | 1,87 | 39,96 (30,41 - 52,53) | 0,85 | 33,90 (28,70 - 40,05) |
| <i>B. imbricata</i> (Hexano) | 25,68 (21,93 - 30,08) | 1,02 | 17,22 (14,92 - 19,87) | 1,52 | 28,00 (24,17 - 32,43) | 0,93 | 26,09 (23,10 - 29,47) |
| <i>B. hemipteran</i> | 132,40 (118,4 - 147,9) | 1,84 | 122,60 (97,23 - 154,7) | 1,98 | > 100 | S.A. | 243 (200,4 - 294,7) |
| <i>B. opuntioides</i> | 105,00 (90,32 - 122,0) | 2,30 | 107,70 (87,30 - 132,9) | 2,24 | > 100 | S.A. | 241,70 (213,8 - 273,2) |
| <i>B. megapotamica</i> | 1,36 (0,96 - 1,91) | 3,61 | 8,24 (4,69 - 14,50) | 0,59 | 2,77 (1,80 - 4,27) | 1,77 | 4,90 (3,36 - 7,16) |
| <i>B. megapotamica</i> (Acetato de etila) | 5,26 (3,95 - 6,99) | 2,71 | 20,44 (13,65 - 30,62) | 0,70 | 6,30 (4,92 - 8,07) | 2,26 | 14,26 (11,22 - 18,13) |
| <i>B. megapotamica</i> (Diclorometano) | <0,09 | S.A. | 0,11 (0,01 - 0,90) | S.A. | < 0,78 | S.A. | <0,09 |
| <i>B. megapotamica</i> (Hexano) | 1,27 (0,91 - 1,78) | 3,03 | 6,99 (4,01 - 12,19) | 0,55 | < 0,78 | S.A. | 3,85 (2,80 - 5,29) |
| <i>B. parvidentata</i> | 78,62 (67,83 - 91,13) | 0,93 | 64,59 (55,05 - 75,79) | 1,13 | > 100 | S.A. | 72,73 (61,32 - 86,26) |
| <i>B. magnifica</i> | 52,35 (44,11 - 62,13) | 1,51 | 40,90 (36,93 - 45,30) | 1,94 | 81,10 (43,93 - 149,7) | 0,98 | 79,24 (62,20 - 100,9) |
| <i>B. altimontana</i> | 102,30 (83,06 - 126,0) | S.A. | 148,90 (109,2 - 203,0) | S.A. | > 100 | S.A. | >500,00 |
| Paclitaxel (μ M) ^j | <0,01 | - | <0,01 | - | 0,020 (0,02 - 0,03) | - | - |

^aH460: carcinoma de pulmão humano

^bPC3: adenocarcinoma de próstata insensíveis à terapia antiandrogênica

^cA549: carcinoma de pulmão humano

^dVERO: fibroblasto de macaco verde da África

^eCC₅₀: concentração em que reduz 50% à viabilidade celular

^fIC 95%: intervalo de confiança de 95%

^gIS: índice de seletividade

^hN.D.: não determinada

ⁱS.A.: sem atividade

^jPaclitaxel: controle positivo

Figura 1: Valores de CC_{50} em células A549 e VERO e valores de IS.

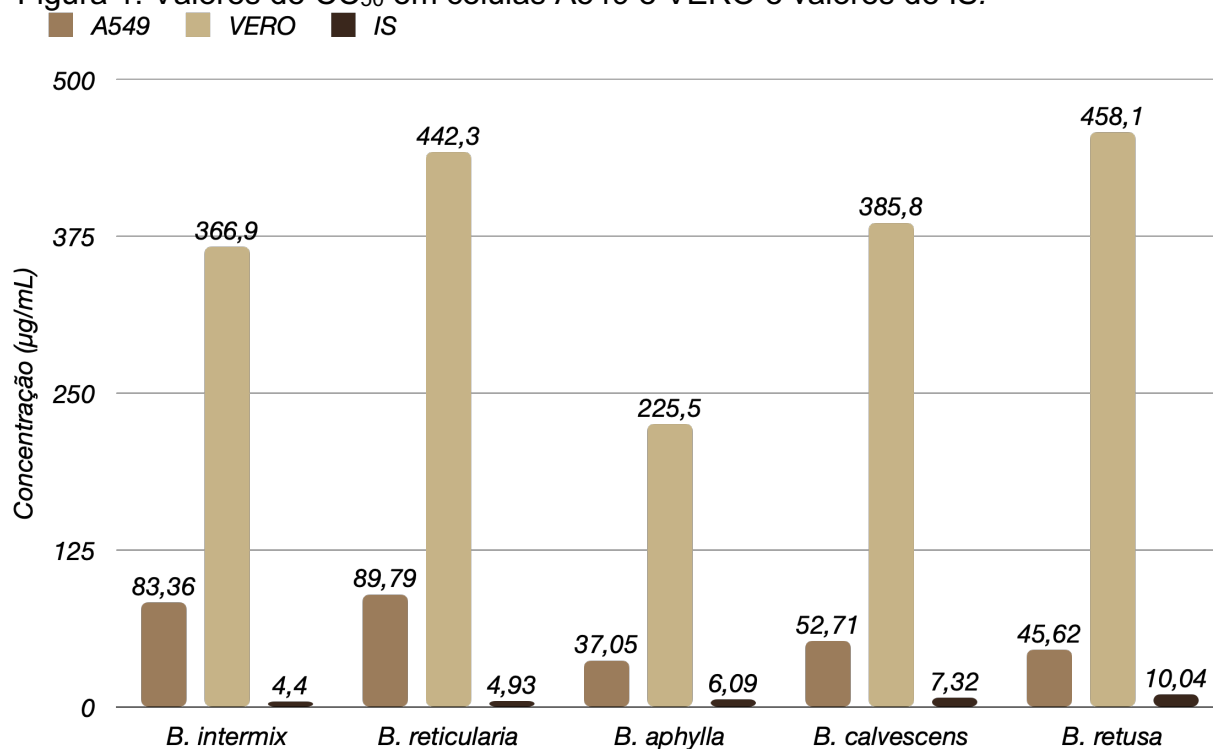


Figura 2: Valores de CC_{50} em células H460 e VERO e valores de IS.

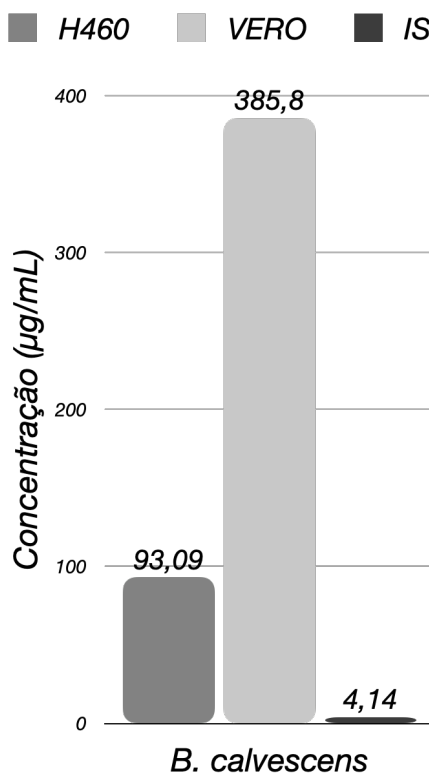
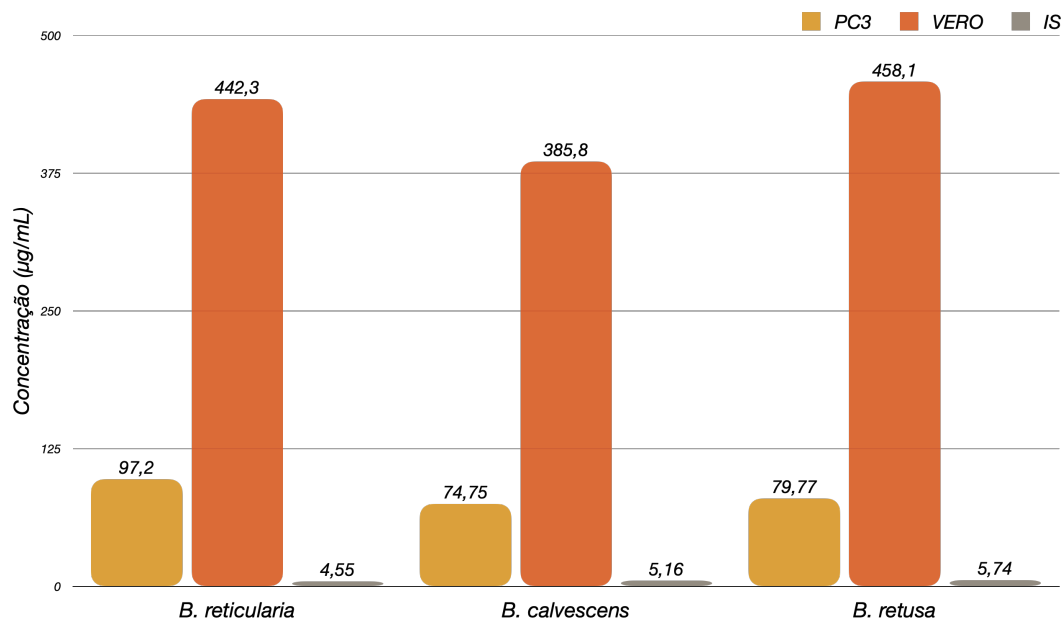


Figura 3: Valores de CC_{50} em células PC3 e VERO e valores de IS.



Kobal e colaboradores (2020) avaliaram a atividade mitocondrial de células HEp-2 (carcinoma de laringe humano) em contato com diferentes concentrações (10^{-6} a 10^{-3} mol/L) de artepelin C, em três diferentes tempos de tratamentos experimentais (12, 24 e 48 horas). Eles observaram que em uma concentração de 5×10^{-5} mol/L, a viabilidade celular é afetada, independente do tempo de incubação; em contrapartida, em concentrações mais elevadas, a viabilidade celular é reduzida de forma significativa, demonstrando assim potencial citotóxico do artepelin C. A atividade citotóxica da própolis brasileira também foi avaliada por Frión-Herrera e seus colaboradores) no ano de 2017, onde foi possível observar que ocorreu uma diminuição concentração-dependente na viabilidade celular de HEp-2 quando utilizado concentrações de 50 e 100 µg/mL.

Outro estudo realizado, foi a avaliação das propriedades citotóxicas do extrato aquoso e frações de *B. trinervis* brasileira e colombiana. Nesse trabalho foi possível observar que as frações obtidas a partir da planta brasileira reduziram de forma significativa a sobrevivência das células CHO em concentrações superiores a 0,05 mg/mL. Já a planta colombiana mostrou uma toxicidade semelhante, porém as alterações na viabilidade celular foram induzidas dependente da concentração testada (JARAMILLO-GARCÍA *et al.*, 2018).

5.2 Determinação dos títulos infecciosos virais

As suspensões-estoques virais foram preparadas como descrito no item 3.3.2 e seus títulos infecciosos foram determinados conforme orientações descritas no item 3.3.3. Os títulos avaliados em relação a suspensão viral de HSV-1 (cepa KOS) foi de $6,77 \times 10^7$, para cepa 29-R o título viral foi de $1,37 \times 10^7$, para o CHIKV o título viral foi de $2,37 \times 10^5$ UFP/mL e, para o MHV-3, foi 1×10^7 TCID₅₀/mL .

5.3 Avaliação da citotoxicidade e da atividade anti-herpética

5.3.1 Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade das amostras de *Baccharis* sp. frente às células VERO, foi realizado utilizando o ensaio colorimétrico com sulforrodamina B (VICHAI; KIRTIKARA, 2006), descrito no item 3.4.1. As amostras e suas frações foram testadas em uma concentração inicial de 500 µg/mL. Cada material testado teve seus valores de CC₅₀, calculados após 48 h de incubação como podem ser visualizados nas Tabelas 3 e 4.

De acordo com os valores de CC₅₀, apenas os extratos de *B. dracunculifolia*, *B. aphylla*, *B. brevifolia*, *B. opuntioides*, fração diclorometano de *B. brevifolia* e fração acetato de etila de *B. imbricata* apresentaram efeitos tóxicos moderados, com valores variando de 140,10 µg/mL até 241,70 µg/mL, enquanto os extratos de *B. intermix*, *B. reticularia*, *B. concinna*, *B. platypoda*, *B. calvescens*, *B. retusa*, *B. altimontana* e a fração acetato de etila de *B. brevifolia* apresentaram baixos índices de toxicidade nas células VERO, com valores de CC₅₀ variando de 277,70 µg/mL a >500 µg/mL.

5.3.2 Avaliação da atividade anti-herpética

Os extratos que apresentaram os resultados mais significativos em relação a inibição da replicação do HSV-1, cepa KOS, foram os extratos obtidos de *B. intermix*, *B. reticularia*, *B. platypoda*, *B. concinna* e *B. altimontana*, além da fração acetato de etila de *B. brevifolia*, com valores de IS de 50,23, 27,68, 24,06, 28,60, 48,12 e 46,34, respectivamente. Já para a cepa resistente ao aciclovir (29-R) os extratos de *B. intermix*, *B. retusa* e a fração acetato de etila de *B. brevifolia* foram os mais ativos, com valores de IS de 37,05, 35,46 e 34,84,

respectivamente. Esses valores de IS demonstram o quão seletivos são esses extratos e frações em relação as cepas virais avaliadas.

Tabela 2: Resultados da atividade anti-herpética de amostras de *Baccharis* sp. frente ao HSV-1, cepa KOS.

| Espécies vegetais testadas | ^a CC ₅₀ ug/mL (^b IC 95%) | ^c CI ₅₀ (IC 95%) | ^d IS |
|--|---|---|-----------------|
| <i>B. intermix</i> | 366,90 (223,1 - 603,6) | 7,31 (4,76 - 11,22) | 50,23 |
| <i>B. reticularia</i> | 442,30 (265,4 - 737,0) | 15,98 (10,15 - 25,16) | 27,68 |
| <i>B. concinna</i> | >500,00 | 17,48 (11,66 - 26,23) | 28,60 |
| <i>B. dracunculifolia</i> | 222,30 (189,8 - 260,5) | 15,11 (11,66 - 26,23) | 14,71 |
| <i>B. aphylla</i> | 225,50 (178,5 - 284,8) | 27,04 (13,02 - 56,19) | 8,34 |
| <i>B. platypoda</i> | 277,70 (212,2 - 363,4) | 11,54 (5,014 - 26,54) | 24,06 |
| <i>B. calvescens</i> | 385,80 (267,2 - 557,1) | 26,12 (10,22 - 66,77) | 14,77 |
| <i>B. brevifolia</i> | 146,50 (86,3 - 248,7) | 10,98 (4,123 - 29,25) | 11,25 |
| <i>B. brevifolia</i> (Acetato de etila) | >500,00 | 10,79 (7,397 - 15,74) | 46,34 |
| <i>B. imbricata</i> (Acetato de etila) | 140,10 (121,9 - 160,9) | 29,38 (15,87 - 54,40) | 4,77 |
| <i>B. opuntioides</i> | 241,70 (213,8 - 273,2) | 43,47 (25,83 - 73,17) | 5,56 |
| <i>B. altimontana</i> | >500,00 | 10,39 (7,923 - 13,62) | 48,12 |

^aCC₅₀: concentração em que reduz 50% a viabilidade celular

^bIC 95%: intervalo de confiança de 95%.

^cCI₅₀: concentração em que inibe 50% da replicação viral

^dIS: índice de seletividade

Os valores representam a média de três experimentos independentes

Aciclovir: utilizado como controle positivo e apresentou 100% de inibição da replicação viral

Tabela 3: Resultados da atividade anti-herpética de amostras de *Baccharis* sp. frente ao HSV-1, cepa 29-R.

| Espécies vegetais testadas | ^a CC ₅₀ ug/mL (^b IC 95%) | ^c CI ₅₀ (IC 95%) | ^d IS |
|----------------------------|---|---|-----------------|
| <i>B. intermix</i> | 366,90 (223,1 - 603,6) | 9,90 (6,48 - 15,14) | 37,05 |
| <i>B. reticularia</i> | 442,30 (265,4 - 737,0) | 18,18 (11,89 - 27,79) | 24,33 |
| <i>B. platypoda</i> | 277,70 (212,2 - 363,4) | 11,64 (8,72 - 15,55) | 23,86 |

| | | | |
|--|---------------------------|--------------------------|-------|
| <i>B. retusa</i> | 458,10 (325,9 - 643,8) | 12,92 (8,82 – 18,93) | 35,46 |
| <i>B. brevifolia</i> | 146,50 (86,3 - 248,7) | 8,70 (5,97 – 12,68) | 14,19 |
| <i>B. brevifolia</i> (Acetato de etila) | >500,00 | 14,35 (11,39 – 18,07) | 34,84 |
| <i>B. brevifolia</i> (Diclorometano) | 209,60 (154,7 - 284,0) | 10,57 (6,66 – 16,77) | 21,67 |
| <i>B. altimontana</i> | >500,00 | 18,91 (8,20 – 43,63) | 26,44 |

^aCC₅₀: concentração em que reduz 50% a viabilidade celular

^bIC 95%: intervalo de confiança de 95%.

^cCI₅₀: concentração em que inibe 50% da replicação viral

^dIS: índice de seletividade

Os valores representam a média de três experimentos independentes

Aciclovir: utilizado como controle positivo e não apresentou inibição da replicação viral, visto que a cepa 29-R apresenta resistência para esse fármaco.

No trabalho desenvolvido por Montanha e seus colaboradores (2004), foi possível observar que os extratos etanólicos e aquosos de *Baccharis erioclada*, *Baccharis megapotamica* e *Baccharis uncinella* apresentaram atividade antiviral frente ao HSV-1. O mesmo acontece com o extrato de *B. gaudichaudiana* que possui a capacidade de inativar partículas virais quando administrado em altas concentrações, interferindo na concentração viral (VISINTINI JAIME *et al.*, 2013). Já Venturi e seus colaboradores (2018) observaram que uma fração obtida das partes aéreas da *Baccharis anômala*, possuía uma grande quantidade de compostos fenólicos, que conseguiram inibir a replicação do HSV-1 em células VERO.

Esses resultados encontrados em literatura, corroboram os obtidos durante a realização desse trabalho, mostrando como as espécies desse gênero possuem um grande potencial de inibição da replicação viral do Herpes Simplex Virus.

5.4 Avaliação da atividade anti-CHIKV

Inicialmente, foi realizada uma triagem com 14 extratos e frações, testadas em duas concentrações (100 e 50 µg/mL) e então avaliada a redução da porcentagem de inibição da replicação viral de CHIKV.

Considerando que o CHIKV infecta e replica em células VERO e, os experimentos foram conduzidos nesta linhagem celular, os valores de CC₅₀ são

os mesmos apresentados na Tabela 3. Em relação a triagem antiviral, os extratos de *B. intermix*, *B. calvescens* e *B. retusa* inibiram 100% da replicação viral na concentração testada de 100 µg/mL, enquanto os extratos de *B. reticularia*, *B. platypoda* e *B. retusa* inibiram 100% da replicação viral na menor concentração testada (50 µg/mL).

Tabela 4: Resultados da triagem anti-CHIKV de amostras de *Baccharis* sp.

| Espécies vegetais testadas | CC ₅₀ ^a IC 95% ^b | % de inibição da replicação viral | |
|--|--|-----------------------------------|----------|
| | | 100 µg/mL | 50 µg/mL |
| <i>B. intermix</i> | 366,90 (223,1 - 603,6) | 100,00 | 73,78 |
| <i>B. reticularia</i> | 442,30 (265,4 - 737,0) | Cito ^c | 100,00 |
| <i>B. concinna</i> | >500,00 | 44,52 | 38,84 |
| <i>B. dracunculifolia</i> | 222,30 (189,8 - 260,5) | 90,16 | 46,90 |
| <i>B. aphylla</i> | 225,50 (178,5 - 284,8) | 39,43 | 6,69 |
| <i>B. platypoda</i> | 277,70 (212,2 - 363,4) | Cito | 100,00 |
| <i>B. calvescens</i> | 385,80 (267,2 - 557,1) | 100,00 | 61,13 |
| <i>B. retusa</i> | 458,10 (325,9 - 643,8) | 100,00 | 100,00 |
| <i>B. brevifolia</i> | 146,50 (86,3 - 248,7) | Cito | 61,54 |
| <i>B. brevifolia</i> (Acetato de etila) | >500,00 | 16,80 | 5,69 |
| <i>B. brevifolia</i> (Diclorometano) | 209,60 (154,7 - 284,0) | Cito | 19,37 |
| <i>B. imbricata</i> (Acetato de etila) | 140,10 (121,9 - 160,9) | Cito | 4,81 |
| <i>B. opuntioides</i> | 241,70 (213,8 - 273,2) | 12,24 | SA |
| <i>B. altimontana</i> | >500,00 | 15,91 | 28,46 |

^aCC₅₀: concentração em que reduz 50% a viabilidade celular

^bIC 95%: intervalo de confiança de 95%

^cCito: apresentou citotoxicidade para as células na concentração testada não apresentando potencial antiviral

^dSA: sem atividade antiviral

Os valores representam a média de três experimentos independentes

Até o momento da finalização de escrita desse trabalho, não foram encontrados trabalhos relatados na literatura que avaliassem qualquer uma das espécies do gênero *Baccharis* frente ao CHIKV, demonstrando que os resultados obtidos na triagem realizada são extremamente promissores, principalmente para as espécies que apresentaram porcentagens de inibição superiores a 90%.

5.5 Avaliação da atividade anti-coronavírus

Com a avaliação da citotoxicidade em células L929, foi possível determinar que os extratos e frações testados apresentaram valores de CC₅₀ superiores a 50 µg/mL. Em relação a avaliação da atividade anti-MHV-3, seis das 20 amostras testadas apresentaram uma redução da carga viral de 6 log, o que representou 100% de inibição viral quando comparado ao controle viral. Foi possível ainda observar que cinco amostras tiveram 50% ou mais de inibição da carga viral (redução de 3, 4 e 5 logs), como pode ser observado na tabela a seguir.

Tabela 5: Resultados da citotoxicidade em células L929 e da atividade anti-MHV-3 das amostras de *Baccharis* sp.

| Espécies vegetais testadas | CC ₅₀ ^a IC 95% ^b | Redução de carga viral |
|----------------------------|--|------------------------|
| <i>B. intermix</i> | 122,2 (83,14 - 179,7) | 100,00% |
| <i>B. reticularia</i> | 173,1 (120,7 - 248,4) | 100,00% |
| <i>B. concinna</i> | 332,8 (198,4 - 558,3) | N.D. |
| <i>B. dracunculifolia</i> | 150,6 (121,2 - 187,0) | 66,66% |
| <i>B. aphylla</i> | 83,75 (68,42 - 102,5) | 66,66% |
| <i>B. platypoda</i> | 185,7 (143,1 - 241,1) | 100,00% |
| <i>B. calvescens</i> | 137,2 (115,3 - 163,3) | 50,00% |
| <i>B. symphyopappus</i> | 51,03 (32,27 - 80,69) | 16,67% |
| <i>B. retusa</i> | 78,87 (26,25 - 237,0) | 100,00% |
| <i>B. brevifolia</i> | 82,38 (47,83 - 141,9) | 83,33% |

| | | |
|--|--------------------------|---------|
| <i>B. brevifolia</i> Acetato de etila | 222,8 (140,9 - 352,2) | N.D. |
| <i>B. brevifolia</i> Diclorometano | 148,8 (111,7 - 198,0) | 83,33% |
| <i>B. myriocephala</i> | 51,2 (15,73 - 166,7) | 16,67% |
| <i>B. imbricata</i> | 43,42 (25,56 - 73,76) | 100,00% |
| <i>B. imbricata</i> Acetato de etila | 221,3 (192,2 - 254,7) | 16,67% |
| <i>B. hemiptera</i> | 168,9 (126,0 - 226,4) | N.D. |
| <i>B. opuntioides</i> | 204,8 (164,8 - 254,5) | 0,00% |
| <i>B. parvidentata</i> | 103,6 (73,79 - 145,5) | 16,67% |
| <i>B. magnifica</i> | 60,84 (44,40 - 83,36) | 16,67% |
| <i>B. altimontana</i> | 271,8 (176,8 - 417,7) | 100,00% |

^aCC₅₀: concentração em que reduz 50% a viabilidade celular

^bIC 95%: intervalo de confiança de 95%

N.D.: não foi avaliado, pois no teste por TCID₅₀ houve o aparecimento de efeito citopático nas três repetições experimentais.

A inibição da enzima ECA2 tem sido um alvo importante para o tratamento de infecções causadas por SARS-CoV-2, diante disso GÜLER e colaboradores (2020), identificaram alguns ácidos hidroxicinâmicos obtidos de um extrato alcoólico de própolis e, diante de avaliações em relação a ancoragem molecular *in silico*, foi descoberto que a rutina possuía uma maior energia de ligação à enzima ECA2, dificultando a ligação do vírus com as células. Outro estudo realizado que corrobora os resultados obtidos anteriormente, foi o trabalho desenvolvido por OSÉS et al., (2020) que evidenciou que a maioria dos diferentes tipos de própolis avaliados, tiveram mais de 90% de capacidade de inibirem a ECA2.

Outro componente que esta presente no própolis da *B. dracunculifolia* é o artepelin C (ARC). Um dos alvos promissores do ARC é o PAK1, que recentemente vem sendo relatado seu envolvimento na fibrose pulmonar ocasionada pela COVID-19, demonstrando assim como os resultados obtidos nesse trabalho são promissores para o desenvolvimento de futuros medicamentos com potencial atividade antiviral (CUI et al., 2022).

6. CONCLUSÃO

Na avaliação do efeito citotóxico frente às células tumorais testadas (PC3, A549 e H460), os extratos e frações das amostras de *Baccharis megapotamica* foram os que apresentaram melhor potencial citotóxico. Dessa maneira, as amostras mais promissoras podem então passar para testes de elucidação do mecanismo de ação de morte celular.

Na avaliação da atividade anti-herpética, quatro dos 14 extratos e frações testados mostraram resultados promissores na inibição das duas cepas de HSV-1. Os extratos de *B. concinna* e *B. altimontana* inibiram a replicação viral da cepa sensível ao aciclovir (KOS), enquanto o extrato de *B. retusa* e a fração diclorometano de *B. brevifolia* apresentaram resultados promissores na inibição da replicação da cepa resistente ao aciclovir (29-R).

Durante a triagem antiviral realizada empregando o CHIKV, os extratos de *B. intermix*, *B. calvescens*, *B. retusa*, *B. reticularia* e *B. platypoda* apresentaram inibição da replicação viral em ao menos uma das duas concentrações testadas, tornando válidos estudos posteriores para determinar os valores de CI_{50} .

Para a avaliação frente ao MHV-3, das 20 amostras avaliadas 11 delas apresentaram porcentagens de inibição viral promissoras, demonstraram o potencial dessas espécies na inibição do coronavírus murino, sendo válido a realização de futuros ensaios, buscando elucidar o seu mecanismo de ação antiviral.

7. PERSPECTIVAS

Avaliação da citotoxicidade das amostras que não foram testadas na linhagem tumoral A549, bem como a avaliação em outra linhagem de câncer de próstata (DU-145) e em uma linhagem saudável humana (HGF). Com posse dos resultados serão escolhidas as amostras mais promissoras para determinação do mecanismo de morte celular. Em relação a atividade antiviral, selecionar as amostras mais promissoras para modelo viral e elucidar o seu mecanismo de inibição.

8. REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J. *et al.* Antiviral activity of some South American medicinal plants. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 2, p. 142–146, 1999.
- ABAD, MARIA JOSÉ; BERMEJO, P. Baccharis (compositae): A review update. **Arkivoc**, v. 2007, n. 7, p. 76–96, 2007.
- AMARAL, J. K. *et al.* The clinical features, pathogenesis and methotrexate therapy of chronic chikungunya arthritis. **Viruses**, v. 11, n. 3, p. 1–12, 2019.
- AMARAL, J. K.; BILSBORROW, J. B.; SCHOEN, R. T. Chronic Chikungunya Arthritis and Rheumatoid Arthritis: What They Have in Common. **American Journal of Medicine**, v. 133, n. 3, p. e91–e97, 2020.
- AMARAL, J. K.; BINGHAM, C. O.; SCHOEN, R. T. Successful Methotrexate Treatment of Chronic Chikungunya Arthritis. **Journal of clinical rheumatology : practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases**, v. 26, n. 3, p. 119–124, 2020.
- ARDUINO, P. G.; PORTER, S. R. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: Overview on relevant clinico-pathological features. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 37, n. 2, p. 107–121, 2008.
- BALDWIN, K. J.; CUMMINGS, C. L. Herpesvirus Infections of the Nervous System. **CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology**, v. 24, n. 5, p. 1349–1369, 2018.
- BARBOSA, R. J. *et al.* Promising therapeutic use of Baccharis trimera (less.) DC. as a natural hepatoprotective agent against hepatic lesions that are caused by multiple risk factors. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 254, 23 maio 2020.
- BAUTISTA-REYES, E. *et al.* Chikungunya: Molecular aspects, clinical outcomes and pathogenesis. **Revista de Investigacion Clinica**, v. 69, n. 6, p. 299–307, 2017.
- BERNARDES, L. S. C. ET AL. Produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.* *Farmacognosia – do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: **Artemed**, p. 107–127, 2017.
- BONIN, E. *et al.* Baccharis dracunculifolia: Chemical constituents, cytotoxicity and antimicrobial activity. **LWT**. 1 fev. 2020
- BRADSHAW, M. J.; VENKATESAN, A. Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. **Neurotherapeutics**, v. 13, n. 3, p. 493–508, 2016.

BRANDENBURG, M. M. *et al.* Baccharis dracunculifolia (Asteraceae) essential oil displays anti-inflammatory activity in models of skin inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 259, 15 set. 2020.

BURLESON, F. G.; CHAMBERS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. *Virology: a laboratory manual*. San Diego: Academic, 1992.

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

BUSSMANN, C. *et al.* Molecular pathogenesis and clinical implications of eczema herpeticum. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 10, n. 21, p. 1–9, 2008.

BUTANTAN. Vacina da chikungunya é segura e gera resposta imune duradoura em 96% dos voluntários, apontam resultados de fase 3 nos EUA. Disponível em: <<https://butantan.gov.br/noticias/vacina-da-chikungunya-e-segura-e-gera-resposta-imune-duradoura-em-96-dos-voluntarios-apontam-resultados-finais-de-fase-3-nos-eua>>. Acessado em: 19 jul 2022.

CARRIZO, S. L. *et al.* Antifungal activity of phytotherapeutic preparation of Baccharis species from argentine Puna against clinically relevant fungi. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 251, 6 abr. 2020.

CDC. COVID-19 Treatments and Medications. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/your-health/treatments-for-severe-illness.html>>. Acessado em: 05 jul 2022a

CDC. Scientific Brief: SARS-CoV-2 Transmission. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/sars-cov-2-transmission.html#print>>. Acessado: 04 jul 2022b.

CHAAITANYA, I. K. *et al.* Role of proinflammatory cytokines and chemokines in chronic arthropathy in CHIKV infection. **Viral Immunology**, v. 24, n. 4, p. 265–271, 2011.

CHOW, A. *et al.* Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 2, p. 149–157, 2011.

CHOWDHURY, S. *et al.* The Amino Terminus of Herpes Simplex Virus 1 Glycoprotein K Is Required for Virion Entry via the Paired Immunoglobulin-Like Type-2 Receptor Alpha. **Journal of Virology**, v. 87, n. 6, p. 3305–3313, 2013.

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

- CUI, J. *et al.* Extraction, purification, structural character and biological properties of propolis flavonoids: A review. **Fitoterapia**. 2022
- CUNNINGHAM, A. L. *et al.* The Cycle of Human Herpes Simplex Virus Infection: Virus Transport and Immune Control. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. s1, p. S11–S18, 2006.
- DAMOUR, A. *et al.* Eczema Herpeticum: Clinical and Pathophysiological Aspects. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, 2019.
- DE CLERCQ, E. Dancing with chemical formulae of antivirals: A panoramic view (Part 2). **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 10, p. 1397–1410, 2013a.
- DE CLERCQ, E. Dancing with chemical formulae of antivirals: A personal account. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 6, p. 711–725, 2013b.
- DE CLERCQ, E.; GUANGDI, L. Approved antiviral drugs over the past 50 years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 695–747, 2016.
- DE LOGU, A. *et al.* Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by Santolina insularis essential oil. **Antiviral Research**, v. 48, n. 3, p. 177–185, 2000.
- DEEBA, F. *et al.* Global transmission and evolutionary dynamics of the Chikungunya virus. **Epidemiology and Infection**, v. 148, p. e63, fev. 2020.
- DING, Y. *et al.* Organ distribution of severe acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus (SARS-CoV) in SARS patients: Implications for pathogenesis virus transmission pathways. **Journal of Pathology**, v. 203, n. 2, p. 622–630, jun. 2004.
- FRIÓN-HERRERA, Y. *et al.* Mechanisms underlying the cytotoxic effect of propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma cells. **Natural Product Research**, v. 32, n. 17, p. 2085–2091, 2 set. 2018.
- GAO, Y. *et al.* Multiple roles of the non-structural protein 3 (nsP3) alphavirus unique domain (AUD) during Chikungunya virus genome replication and transcription. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 1, p. e1007239, jan. 2019.
- GORBALENYA, A. E. *et al.* The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**. 1 abr. 2020.
- GRÜNEWALD, K. *et al.* Three-Dimensional Structure of Herpes Simplex Virus from Cryo-Electron Tomography. **Science**, v. 302, n. 5649, p. 1396–1398, 2003.
- GÜLER, H. I. *et al.* Article title: Investigation of potential inhibitor properties of ethanolic propolis extracts against ACE-II receptors for COVID-19 treatment by Molecular Docking Study. **ScienceOpen Preprints**, 2020.

- HARRIS, S. A.; HARRIS, E. A. Herpes Simplex Virus Type 1 and Other Pathogens are Key Causative Factors in Sporadic Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 48, n. 2, p. 319–353, 2015.
- HOARAU, J.-J. *et al.* Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5914–5927, 2010.
- HOCHHEIM, S. *et al.* Determination of phenolic profile by HPLC–ESI-MS/MS, antioxidant activity, in vitro cytotoxicity and anti-herpetic activity of propolis from the Brazilian native bee *Melipona quadrifasciata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 339–350, 1 maio 2019.
- HU, J. M.; HSIUNG, G. D. Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. **Antiviral Research**, 1989.
- JARAMILLO-GARCÍA, V. *et al.* Chemical characterization and cytotoxic, genotoxic, and mutagenic properties of *Baccharis trinervis* (Lam, Persoon) from Colombia and Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 213, p. 210–220, 1 mar. 2018.
- KARAM, T. K. *et al.* Carqueja (*Baccharis trimera*): Utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 280–286, 2013.
- KHAN, A. H. *et al.* Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site The GenBank accession number of the sequence reported in this paper is AF369024. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 12, p. 3075–3084, dez. 2002.
- KHAN, A.; SHAW, L.; BERNATONIENE, J. Fifteen-minute consultation: Eczema herpeticum in a child. **Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition**, v. 100, n. 2, p. 64–68, 2015.
- KOBAL, M. B. *et al.* Correlating Artepillin C cytotoxic activity on HEp-2 cells with bioinspired systems of plasma membranes. **Materials Science and Engineering C**, v. 112, 1 jul. 2020.
- KOGANTI, R.; YADAVALLI, T.; SHUKLA, D. Current and emerging therapies for ocular herpes simplex virus type-1 infections. **Microorganisms**, v. 7, n. 10, p. 1–16, 2019.
- KUKHANOVA, M. K.; KOROVINA, A. N.; KOCHETKOV, S. N. Human herpes simplex virus: Life cycle and development of inhibitors. **Biochemistry (Moscow)**, v. 79, n. 13, p. 1635–1652, 2014.
- LIN, L. T.; HSU, W. C.; LIN, C. C. Antiviral natural products and herbal medicines. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 4, n. 1, p. 24–35, 2014.

LOOKER, K. J. *et al.* Global and regional estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 1 infections in 2012. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–17, 2015.

MACHADO, B. A. S. *et al.* Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, 8 jan. 2016.

MARTINEZ, J. P. *et al.* Antiviral drug discovery: Broad-spectrum drugs from nature. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 1, p. 29–48, 2015.

MARUTA, H.; HE, H. PAK1-blockers: Potential Therapeutics against COVID-19. **Medicine in Drug Discovery**, 2020.

MENENDEZ, C. M.; CARR, D. J. J. Defining nervous system susceptibility during acute and latent herpes simplex virus-1 infection. **Journal of Neuroimmunology**, v. 308, p. 43–49, 2017.

MONTANHA, J. A. *et al.* Antiviral activity of Brazilian plant extracts. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 2, p. 183–186, 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NG, L. C.; HAPUARACHCHI, H. C. Tracing the path of Chikungunya virus—Evolution and adaptation. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 876–885, out. 2010.

NOVAK, N.; PENG, WM. Dancing with the enemy: the interplay of herpes simplex virus with dendritic cells. **Clinical and Experimental Immunology**, 2005.

OPAS. Folha informativa sobre COVID-19. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/covid19>>. Acesso em: 05 jul 2022.

OSÉS, S. M. *et al.* Phenolic profile, antioxidant capacities and enzymatic inhibitory activities of propolis from different geographical areas: Needs for analytical harmonization. **Antioxidants**, v. 9, n. 1, 1 jan. 2020.

PAUL, BINOY J.; SADANAND, S. Chikungunya Infection: A Re-emerging Epidemic. **Rheumatology and Therapy**, 2018.

PAUL, BINOY JAMES *et al.* Clinical profile and long-term sequelae of Chikungunya fever. **Indian Journal of Rheumatology**, v. 6, n. 1 SUPPL., p. 12–19, 2011.

PEREIRA, C. B. *et al.* Cytotoxic mechanism of *Baccharis milleflora* (Less.) DC. essential oil. **Toxicology in Vitro**, v. 42, p. 214–221, 1 ago. 2017.

PETERSEN, L. R.; POWERS, A. M. Chikungunya: Epidemiology. *F1000Research*, v. 5, n. 82, p. 01–08, jan. 2016.

PRESTI, A. LO *et al.* Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 12, p. 925–932, dez. 2014.

RABELO, A. C. S. *et al.* *Baccharis trimera* protects against ethanol induced hepatotoxicity in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 215, n. December 2017, p. 1–13, 2018.

RAMOS CAMPOS, F. *et al.* *Baccharis* (Asteraceae): Chemical Constituents and Biological Activities. **Chemistry and Biodiversity**, v. 13, n. 1, p. 1–17, 2016.

ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, 1955.

RODRIGUES, D. M. *et al.* Synthesis, antitumor activity and in silico analyses of amino acid derivatives of artemisinin, drupanin and baccharin from green propolis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 47, 1 out. 2021.

RODRIGUEZ, A. K. *et al.* Molecular characteristics and replication mechanism of dengue, zika and chikungunya arboviruses, and their treatments with natural extracts from plants: An updated review. **EXCLI Journal**, v. 18, p. 988–1006, 2019.

ROWE, A. M. *et al.* Herpes keratitis. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 32, n. 1, p. 88–101, 2013.

SABIR, S. M. *et al.* Antioxidant activities and phenolic profile of *Baccharis trimera*, a commonly used medicinal plant from Brazil. **South African Journal of Botany**, v. 113, p. 318–323, 2017.

SCHILTE, C. *et al.* Chikungunya Virus-associated Long-term Arthralgia: A 36-month Prospective Longitudinal Study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, 2013.

SCHNEIDER, A. DE B. *et al.* Updated Phylogeny of Chikungunya Virus Suggests Lineage-Specific RNA Architecture. **Viruses**, v. 11, n. 9, p. 798, ago. 2019.

SCOTT, D. A.; COULTER, W. A.; LAMEY, P. J. Oral shedding of herpes simplex virus type 1: A review. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, 1997.

- SEPÚLVEDA, C. *et al.* Antitumor Activity of Propolis: Recent Advances in Cellular Perspectives, Animal Models and Possible Applications. **Food Reviews International**. 2020.
- SHANMUGARAJ, B.; MALLA, A.; RAMALINGAM, S. Epidemiology, clinical features and transmission of re-emerging arboviral infection chikungunya. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 9, n. 4, p. 135–139, 2019.
- SHIEH, M. T.; SPEAR, P. G. Herpesvirus-induced cell fusion that is dependent on cell surface heparan sulfate or soluble heparin. **Journal of Virology**, v. 68, n. 2, p. 1224–1228, 1994.
- SHUKLA, N. D.; TIWARI, V.; VALYI-NAGY, T. Nectin-1-specific entry of herpes simplex virus 1 is sufficient for infection of the cornea and viral spread to the trigeminal ganglia. **Molecular Vision**, v. 18, n. November, p. 2711–2716, 2012.
- SILVA, I. T. *Triagem anti-herpética de alguns táxons da biodiversidade brasileira: fracionamento biomonitorado de Cecropia glaziovii Sneth., Urticaceae (embaúba)*. 2009. 133 f. 2009.
- SILVA, J. V. J. *et al.* A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. **Acta Tropica**, v. 188, p. 213–224, dez. 2018.
- SILVEIRA RABELO, A. C.; CALDEIRA COSTA, D. A review of biological and pharmacological activities of Baccharis trimera. **Chemico-Biological Interactions**, v. 296, n. August, p. 65–75, 2018.
- SIMÕES, C. M. O.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 4, p. 323–328, 1999.
- SMITH, G. Herpesvirus Transport to the Nervous System and Back Again. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 153–176, 2012.
- SOBRINHO, A. C. N. *et al.* Chemical composition, antioxidant, antifungal and hemolytic activities of essential oil from Baccharis trinervis (Lam.) Pers. (Asteraceae). **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 108–115, 2016.
- SOLIGNAT, M. *et al.* Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183–197, 2009.
- STEINER, I.; KENNEDY, P. G.; PACHNER, A. R. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. **Lancet Neurology**, v. 6, n. 11, p. 1015–1028, 2007.
- TAYLOR, T. J. *et al.* HERPES SIMPLEX VIRUS. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 752–764, 2002.
- THIBERVILLE, S. D. *et al.* Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Research**, v. 99, n. 3, p. 345–370, 2013.

TIMBE, P. P. R. *et al.* Antimicrobial activity of *Baccharis dracunculifolia* DC and its synergistic interaction with nisin against food-related bacteria. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 8, p. 3010–3018, 1 ago. 2021.

TIWARI, V.; BERGMAN, M. J. *Arthritis, Viral*. [S.l: s.n.], 2018.

TOMPA, D. R. *et al.* Trends and strategies to combat viral infections: A review on FDA approved antiviral drugs. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2021

UENO, A. K. *et al.* Sesquiterpenes, diterpenes, alkenyl p-coumarates, and flavonoid from the aerial parts of *Baccharis retusa* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 78, p. 39–42, 1 jun. 2018.

VENTURI, C. R. *et al.* Chemical analysis and antiviral activity evaluation of *Baccharis anomala*. **Natural Product Research**, v. 32, n. 16, p. 1960–1962, 2018.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85–94, 2005.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.

VISINTINI JAIME, M. F. *et al.* In vitro antiviral activity of plant extracts from Asteraceae medicinal plants. **Virology Journal**, v. 10, p. 1–10, 2013.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes Simplex Virus Infections. **The Lancet**, v. 357, 2001.

WHO. Cancer. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Acessado em: 04 jul 2022a.

WHO. Cancer. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acessado em: 04 jul 2022b.

WHO. Cancer today. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/home>>. Acessado em: 09 jul 2022c.

WHO. Coronavirus disease (COVID-19). Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_3>. Acessado em: 04 jul 2022d.

WHO. Coronavirus (COVID-19) dashboard. Disponível em: <<https://covid19.who.int>>. Acessado em: 06 jul 2022e

WONG, K. Z.; CHU, J. J. H. The Interplay of Viral and Host Factors in Chikungunya Virus Infection: Targets for Antiviral Strategies. **Viruses**, v. 10, n. 6, p. 294, maio 2018.

WOZNIAK, M. *et al.* Anti-HSV1 activity of brown algal polysaccharides and possible relevance to the treatment of Alzheimer's disease. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 530–540, 2015.

YACTAYO, S. *et al.* Epidemiology of chikungunya in the americas. **Journal of Infectious Diseases**. p. S441–S445. 2016.

ZAID, A. *et al.* Chikungunya Arthritis: Implications of Acute and Chronic Inflammation Mechanisms on Disease Management. **Arthritis and Rheumatology**, v. 70, n. 4, p. 484–495, 2018.

APÊNDICE

1. Menção honrosa

Menção honrosa por trabalho apresentado no IV Simpósio de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC, na categoria de Iniciação Científica, PGFAR, UFSC, 2019.

2. Capítulos de livro publicado

CADAMURO, R. D.; ROGOVSKI, P.; MICHELON, WILLIAM; VIANCELLI, A.; CRUZ, A. C. C.; TREICHEL, H.; **PRÁ, I. D.**; GUTERRES, I. Z.; CAMARGO, A. F.; BONATTO, C.; SCAPINI, T.; STEFANSKI, F. S.; FONSECAC, T. G.; MASS, A. P.; SILVA, I.T.; FONGARO, GISLAINE. Chapter 14 - Trends in biofiltration applied to remove pharmaceuticals and personal care products from wastewater. In: Maulin Shah; Susana Rodriguez-Couto; Jayanta Biswas. (Org.). An Innovative Role of Biofiltration in Wastewater Treatment Plants (WWTPs). 1ed.: Elsevier, 2022, v., p. 267-284.

SOUZA, E. B.; SILVA, R.; SAVI, B. P.; ROGOVSKI, P.; SILVA, V. C.; **PRÁ, I. D.**; SOUZA, D. S. M.; SILVA, I. T.; CRUZ, A. C. C.; TREICHEL, H.; FONGARO, G.. Active Control of Environmental Enteric Viruses and Bacteria Using Biochar. In: Riti Thapar Kapoor; Helen Treichel; Maulin P. Shah. (Org.). Biochar and its Application in Bioremediation. 1ed.: Springer, Singapore, 2021, v., p. 427-454.

3. Artigo publicado

MICHELON, WILLIAM; **ZUCHI, ISABELLA DAI PRÁ**; REIS, JACQUELINE GRAFF; MATTHIENSEN, ALEXANDRE; VIANCELLI, ALINE; DA CRUZ, ARIADNE CRISTIANE CABRAL; SILVA, IZABELLA THAÍS; FONGARO, GISLAINE; SOARES, HUGO MOREIRA. Virucidal activity of microalgae extracts harvested during phycoremediation of swine wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 1, p. 1, 2022.

4. Artigos em produção

PRÁ, I. D.; PAVI, P.C.; GUTERRES, I.Z.; RABELO, M.B.O.; FRADE, A.C.M.; PADUA, R.M.; FERNANDES, G.W.; CRUZ, A.C.C.; FONGARO, G.; SILVA, I. T. Antiviral potential of *Baccharis* genus., 2022.

PRÁ, I. D.; PAVI, P.C.; GUTERRES, I.Z.; RABELO, M.B.O.; FRADE, A.C.M.; PADUA, R.M.; FERNANDES, G.W.; CRUZ, A.C.C.; FONGARO, G.; SILVA, I. T. Evaluation of cytotoxic potential of *Baccharis* genus against lung and prostate cells., 2022.

5. Patente

FONGARO, G.; REIS, J. G.; **PRÁ, I. D.**; CADAMURO, R. D.; CRUZ, A. C. C.; SILVA, I. T.. PRODUTO PARA INATIVAÇÃO VIRAL OBTIDO A PARTIR DE EXTRATO DE PLANKTOCHLORELLA. 2021, Brasil. Patente: Privilégio de

Inovação. Número do registro: BR10202102454, título: "PRODUTO PARA INATIVAÇÃO VIRAL OBTIDO A PARTIR DE EXTRATO DE PLANKTOCHLORELLA", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 03/12/2021.

6. Cursos de curta duração ministrados

SILVA, R.; SOUZA, E. B.; ZUCHI, I. D. P.; CADAMURO, R. D.; ROGOVSKI, P.; FONGARO, G. *Biologia e Biotecnologia Viral*. 2019. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

7. Resumos publicados em anais de congressos

- I. **PRÁ, I. D.**; RABELO, M. B. O.; FRADE, A. C. M.; PADUA, R. M.; FERNANDES, G. W.; FONGARO, G.; SILVA, I. T.. EVALUATION OF PLANTS BELONGING TO THE GENUS BACCHARIS AGAINST HERPES SIMPLEX VIRUS. In: XXXI Congresso Brasileiro de Virologia, 2021.
- II. PAVI, C. P.; **PRÁ, I. D.**; KANZAKI, L. I. B.; FONGARO, G.; SILVA, I. T.. Preliminary antiviral and virucidal activity of Amazonian medicinal plants against Chikungunya and Herpes viruses. In: XXXI Congresso Brasileiro de Virologia, 2021.
- III. PAVI, C. P.; SILVA, S. S. F.; **PRÁ, I. D.**; GARCIA, L.; FONGARO, G.; SILVA, I. T.. Preliminary evaluation of Grape Seed Extract (GSE) against Chikungunya and Herpes viruses. In: XXXI Congresso Brasileiro de Virologia, 2021.
- IV. **PRÁ, I. D.**; RABELO, M. B. O.; FRADE, A. C. M.; BRAGA, F. C.; FERNANDES, G. W.; FONGARO, G.; SILVA, I. T.. ATIVIDADE ANTIVIRAL DE ESPÉCIES DO GÊNERO BACCHARIS FRENTE AO HERPES SIMPLEX VIRUS, CEPAS KOS E 29R. In: XIII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2021
- V. PAVI, C. P.; **PRÁ, I. D.**; KANZAKI, L. I. B.; FONGARO, G.; SILVA, I. T.; BEZERRA, R. M.. ATIVIDADES ANTIVIRAL E VIRUCIDA DE PLANTAS MEDICINAIS AMAZÔNICAS FRENTE AO CHIKUNGUNYA E HERPES VÍRUS. In: XIII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2021
- VI. PAVI, C. P.; **PRÁ, I. D.**; PAULERT, R.; FONGARO, G.; SILVA, I. T.. PRELIMINARY EVALUATION OF CYTOTOXIC AND ANTIHERPES ACTIVITIES OF *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe AND *Solanum cernuum* Vell.. In: XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul, 2020. Anais do Congresso Brasileiro de Virologia & Encontro de Virologia do Mercosul, 2020.
- VII. SILVA, R.; PAVI, C. P.; **PRÁ, I. D.**; SAVI, B. P.; SOUZA, E. B.; CADAMURO, R. D.; ROGOVSKI, P.; GUTERRES, I. Z.; REIS, J. G.; SILVA, V. C.; SILVA, S. S. F.; SOUZA, D. S. M.; CRUZ, A. C. C.; SILVA, I. T.; FONGARO, G.. VIRALL BRAZIL: BRAZILIAN VIROLOGY NETWORK

FOCUSED ON ONE HEALTH APPROACH. In: XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul, 2020. Anais do Congresso Brasileiro de Virologia & Encontro de Virologia do Mercosul, 2020.

- VIII. **PRÁ, I. D.**; MICHELON, W. ; VIANCELLI, A. ; FONGARO, G. ; SILVA, I. T. . CHLORELLA SPP. MICROALGAE EXTRACTS CULTIVATED IN SWINE MANURE AS POTENTIAL VIRUCIDAL AGAINST HERPES SIMPLEX VIRUS AND ADENOVIRUS. In: XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul, 2020. Anais do Congresso Brasileiro de Virologia & Encontro de Virologia do Mercosul, 2020.
- IX. **PRÁ, I. D.**; RABELO, M. B. O. ; FRADE, A. C. M. ; CAMPANA, P. R. V. ; BRAGA, F. C. ; PADUA, R. M. ; FERNANDES, G. W. ; SILVA, I. T. . PRELIMINARY EVALUATION OF BACCHARIS GENUS AGAINST ACYCLOVIR-RESISTANT HERPES SIMPLEX VIRUS. In: XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul, 2020. Anais do Congresso Brasileiro de Virologia & Encontro de Virologia do Mercosul, 2020.
- X. REIS, J. G. ; **PRÁ, I. D.** ; SILVA, R. ; MICHELON, W. ; VIANCELLI, A. ; TREICHEL, H. ; SILVA, I. T. ; FONGARO, G. . ACCELERATING CORONAVIRUS INACTIVATION IN HUMAN SEWAGE BY CHLORELLA SPP. EXTRACT. In: XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul, 2020. Anais do Congresso Brasileiro de Virologia & Encontro de Virologia do Mercosul, 2020.
- XI. TOMASI, M. L. M. ; GUTERRES, I. Z. ; **PRÁ, I. D.** ; BATTISTI, M. A. ; CAMPOS, A. M. ; SILVA, I. T. . ANTIHERPES CTIVITY OF STANDARDIZED EXTRACT OF ILEX PARAGUARIENSIS A. ST. HIL.. In: XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul, 2020. Anais do Congresso Brasileiro de Virologia & Encontro de Virologia do Mercosul, 2020.
- XII. BATTISTI, M. A. ; **PRÁ, I. D.** ; SILVA, S. S. F. ; CAMPOS, A. M. ; SILVA, I. T. . DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF COLLOIDAL SYSTEMS OF TEA TREE OIL AND IN VITRO ANTIHERPES EFFECTS EVALUATION.. In: XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul, 2020. Anais do Congresso Brasileiro de Virologia & Encontro de Virologia do Mercosul, 2020.
- XIII. TRUJILLO, D. C. ; **PRÁ, I. D.** ; FARIAS, I. V. ; REGINATTO, F. H. ; SILVA, I. T. ; COSTA, G. M. . Antiherpes evaluation of extracts and fractions of Ilex guayusa Loes. leaves.. In: Congresso Brasileiro de Virologia, 2019. XXX Congresso Brasileiro de Virologia, 2019.
- XIV. **PRÁ, I. D.**; MICHELON, W. ; VIANCELLI, A. ; SILVA, I. T. . Virucidal potencial of microalgae extracts cultivated in swine manure. In: Congresso Brasileiro de Virologia, 2019. XXX Congresso Brasileiro de Virologia, 2019.

- XV. **PRÁ, I. D.**; RABELO, M. B. O. ; FRADE, A. C. M. ; CAMPANA, P. R. V. ; BRAGA, F. C. ; PADUA, R. M. ; FERNANDES, G. W. ; SILVA, I. T. . Antiherpetic evaluation of plants belonging to the genus *Baccharis*. In: Congresso Brasileiro de Virologia, 2019. XXX Congresso Brasileiro de Virologia, 2019.
- XVI. TRUJILLO, D. C. ; **PRÁ, I. D.** ; FARIAS, I. V. ; REGINATTO, F. H. ; SILVA, I. T. ; COSTA, G. M. . Antiviral activity of *Ilex guayusa* Loes. against acyclovir-resistant Herpes Simplex Virus. In: 7th Brazilian Conference on Natural Product, 2019, Rio de Janeiro. 7th Brazilian Conference on Natural Product, 2019.
- XVII. **PRÁ, I. D.**; RABELO, M. B. O.; FRADE, A. C. M.; CAMPANA, P. R. V.; BRAGA, F. C.; PADUA, R. M.; FERNANDES, G. W.; SILVA, I. T.. Antiherpetic evaluation of plants belonging to the genus *Baccharis*. In: IV SIMPÓSIO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA, 2019. IV Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2019.

8. Bolsas de Iniciação científica

I. 2019/2020

Bolsista de Iniciação Científica, Carga horária de 20 horas semanais. Iniciação Científica no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, sob a orientação da Professora Dra. Izabella Thaís da Silva, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, sendo a pesquisa em questão: Avaliação citotóxica e anti-herpética de espécies do gênero *Baccharis*.

II. 2020/2021

Bolsista de Iniciação Científica, Carga horária de 20 horas semanais. Iniciação Científica no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, sob a orientação da Professora Dra. Izabella Thaís da Silva, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, sendo a pesquisa em questão: Avaliação da ação antiviral (anti-HSV e anti-CHIKV) de espécies do gênero *Baccharis*.

III. 2021/2022

Bolsista de Iniciação Científica, Carga horária de 20 horas semanais. Iniciação Científica no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, sob a orientação da Professora Dra. Izabella Thaís da Silva, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, sendo a pesquisa em questão: Avaliação de espécies do gênero *Baccharis* frente ao coronavírus.