

Guilherme Rabelo Coelho

Caracterização química e avaliação da atividade antiviral da fase aquosa do extrato da própolis de *Scaptotrigona postica*

Dissertação apresentada para ao Programa de Pós-Graduação em Toxinologia do Instituto Butantan para obtenção do título de Mestre em Toxinologia.

São Paulo

2014

Guilherme Rabelo Coelho

Caracterização química e avaliação da atividade antiviral da fase aquosa do extrato da própolis de *Scaptotrigona postica*

Dissertação apresentada para ao Programa de Pós-Graduação em Toxinologia do Instituto Butantan para obtenção do título de Mestre em Toxinologia

Orientador: Ronaldo Zucatelli Mendonça.

São Paulo

2014

## FICHA CATALOGRÁFICA

Coelho, Guilherme Rabelo

Caracterização química e avaliação da atividade antiviral da fase aquosa do extrato da própolis de *Scaptotrigona postica* / Guilherme, Rabelo Coelho; Orientador Ronaldo Zucatelli Mendonça. – São Paulo/SP, 2014.

83 folhas. : 12 il. color. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Toxinologia, Instituto Butantan, 2014.

1. Bioprospecção. 2. Antiviral. 3. Própolis  
4. Espectometria de Massas. 5. Produtos Naturais. I. Orientador (Mendonça Zucatelli Ronaldo). II. Programa de Pós-Graduação em Toxinologia. Instituto Butantan. III. Título.

CDD 615.9

## Autorização de reprodução

Ilmo Sr(a): Ana Maria Moura da Silva  
Presidente da Comissão de Pós-Graduação em Toxinologia  
Instituto Butantan

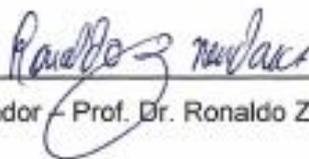
Eu, Guilherme Rabelo Coelho, aluno regular de Pós-graduação em Toxinologia, do Instituto Butantan, em nível de Mestrado, venho por meio desta autorizar a reprodução total de minha dissertação de Mestrado "Caracterização química e avaliação da atividade antiviral da fase aquosa do extrato da própolis de *Scaptotrigona postica*"

São Paulo, 09 de Janeiro de 2014.

Assinatura do aluno: \_\_\_\_\_



De acordo: \_\_\_\_\_



Orientador - Prof. Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça

Dr. Ronaldo Zucatelli Mendonça  
PqC.VI  
Diretor Técnico I  
Laboratório de Parasitologia  
Instituto Butantan

POS-GRADUAÇÃO EM TOXINOLOGIA  
INSTITUTO BUTANTAN

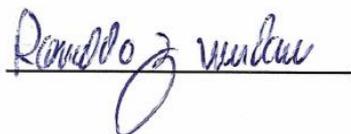
RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

MESTRADO

NOME DO ALUNO: GUILHERME RABELO COELHO

DATA DO EXAME: 14/02/2014

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovado	Reprovado
Ronaldo Zucatelli Mendonça (Presidente)		( X )	( )
Cristina Adelaide Figueiredo		( X )	( )
Daniel Carvalho Pimenta		( X )	( )

DECISÃO FINAL: APROVADO ( X )      REPROVADO ( )

*Comentários da Banca (opcional):*

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à memória de meus tios, Nélio de Freitas Mendes, Norma de Freitas Mendes. À memória de meu avô Antônio Araújo Rabello.

E a minha avó, Judith Guilherme Rabelo e ao meu tio avô João Nívio de Freitas Mendes.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e aos meus pais pelo amor e apoio de todos os dias.

Ao meu orientador, pela confiança, carinho, e oportunidade de aprendizado.

À minha avó Judith, por me ensinar a viver de bem com a vida, sorrindo sempre, independentemente das adversidades.

À minha Tia Ivone, Tio Lúcio, e minhas primas Natália e Camilla pelo apoio, amparo e abrigo, principalmente nos momentos finais deste trabalho.

À Edna, minha mãe e família na cidade de São Paulo, que ficará sempre em minha vida, e meu coração.

À Bianca, pelas conversas e discussões filosóficas sobre ciência e vida.

À Amanda Freitas por estar ao meu lado sempre, como uma grande irmã que é.

À Cleusa, pelo café de sempre, revigorante, animador e acolhedor, que tem o poder de mudar o dia de qualquer pessoa.

À todas as lindas meninas do laboratório de Imunopatologia.

À Guilherme Pacheco, pelo companheirismo, incentivo e carinho.

À Paula Bueno, sem ela, tudo teria seguido outros caminhos.

À Cristina Figueiredo, pela grande atenção dedicada, auxílio, e boas risadas.

À Arlete pela sua fidelidade, afeto e prontidão e Juliana Badari pela doçura.

À Kimie e a Rosana, pela paciência com todos os meus esquecimentos e chegadas ofegantes na secretaria de pós-graduação.

Agradeço a minha querida Taisy por me mostrar novos caminhos, e por me dar uma grande oportunidade por meio de suas palavras.

À minha querida Marina pela sua alegria radiante, e à Mariana pelo seu determinismo e percepção.

À Karina pelos sábios ensinamentos que ficarão para sempre em inscritos em mim.

À todos os meus companheiros do laboratório de Parasitologia.

À Dra. Giuseppina Negri, pela disponibilidade, paciência e colaboração.

E as minhas irmãs Priscila da Matta e Caroline Fariñas, pelo amor de todos os dias.

## EPÍGRAFE

Quando eu fui semeado  
Nas terras férteis do acaso  
Quem semeou disse alto  
Ao me fazer ao seu traço

Vai ser madeira de lenha  
Mas pra se queimar  
Não é qualquer mormaço

**Paulo Rezende**

## RESUMO

Coelho, Guilherme Rabelo. Caracterização química e avaliação da atividade antiviral da fase aquosa do extrato da própolis de *Scaptotrigona postica*, 2014. 70 f. Dissertação (Toxinologia). Instituto Butantan, São Paulo, 2014.

Estudos acerca de infecções virais são de alto interesse na área de saúde pública e animal, principalmente quando comparadas a infecções de origem bacteriana, para as quais já se tem uma série de medicamentos eficazes. Por esse motivo, a identificação de agentes com ação antiviral é um importante foco para a pesquisa científica. Estudos sobre a atividade antiviral de própolis são realizados há muitos anos, e já se tem descrição de extratos de própolis com atividade contra, poliovírus, influenza, HIV, vírus da hepatite entre outros. Dentre as abelhas existentes no Brasil, destacam-se aquelas pertencentes à família Apidae e subfamília Meliponinae, mais conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão, porém, as pesquisas com própolis têm se concentrado principalmente nas abelhas da espécie *Apis mellifera*, e poucos estudos tratam da própolis de abelhas indígenas sem ferrão. A própolis de *Scaptotrigona postica* tem sido utilizada popularmente na região de Barra do Corda, no estado do Maranhão, na forma de pomada, no tratamento de tumores e de cicatrização de feridas. Contudo, são escassos os estudos que comprovem suas atividades biológicas e a sua composição química. Em vista da observação etnofarmacológica deste extrato, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar o potencial antiviral do extrato da própolis de *Scaptotrigona postica* e de caracteriza-lo quimicamente. Para tanto, inicialmente a citotoxicidade foi avaliada pela técnica de MTT e a genotoxicidade pelo ensaio cometa. Uma vez estabelecidas as concentrações a serem utilizadas nos ensaios de atividade antiviral, foram realizados experimentos de quantificação de RNAm onde os extratos de própolis foram testados em 3 diferentes condições, 3 horas antes da infecção, 1 hora depois da infecção, e um preparo chamado virucida, em que o vírus é incubado com o própolis 1 hora antes da infecção. Paralelamente à estes experimentos foram realizados experimentos de microscopia eletrônica. Para a caracterização química foram utilizadas as técnicas de infravermelho, e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. As análises do RNAm viral dos vírus do herpes e da rubéola, demonstraram que o extrato de própolis tem atividade sobre os vírus em todas as condições testadas, com redução de 98% da carga viral utilizando baixas concentrações do extrato (1 ug/mL) nos dois vírus testados. Estes resultados corroboraram com as imagens obtidas na microscopia eletrônica, onde cultivos celulares que foram infectados com vírus que passaram por um processo de incubação prévia com própolis, não apresentaram nenhuma partícula ou complexo de replicação viral nas imagens analisadas. A caracterização química revelou a presença de moléculas como a apigenina, luteolina, crisina, catequina e o ácido dicafeoilquínico. Todas essas substâncias já possuem atividade antiviral descrita para uma grande variedade de vírus, e atuam em pontos distintos da replicação viral. Em suma, se conclui que o extrato possui atividade antiviral contra o vírus do herpes e da rubéola por mecanismos distintos ainda não bem elucidados, devido a variedade de compostos presentes no extrato com atividade antiviral previamente descritas.

Palavras chave: Bioprospecção, Antiviral, Própolis, Espectrometria de Massas Produtos Naturais

## ABSTRACT

Coelho, Guilherme Rabelo. Chemical characterization and antiviral evaluation of the aqueous phase of the *Scaptotrigona postica* própolis extract, 2014. 70 p. Master Thesis (Toxinology). Instituto Butantan, São Paulo, 2014.

Studies on viral infections are of high interest in the area of public and animal health, especially when compared to infections of bacterial origin, which already has a high number of effective drugs. Therefore, identification of agents with antiviral action is an important focus for scientific research. Studies on the antiviral activity of propolis are performed for many years, and already have description of propolis extracts with activity against, poliovirus, influenza, HIV, hepatitis and other viruses . Among the existing bees in Brazil, we highlight those belonging to the family Apidae and Meliponinae, better known as indigenous stingless bees, however, research on propolis have focused mainly on species *Apis mellifera*, and few studies address the propolis indigenous stingless bees. The *Scaptotrigona postica* propolis has been used popularly in the region of Barra do Corda, Maranhão state, in the form of ointment in the treatment of tumors and wound healing. However, there are few studies proving their biological activities and their chemical composition. In view of this observation ethnopharmacological extract, the aim of this study was to assess the antiviral potential of propolis extract *Scaptotrigona postica* and characterized it chemically. For this purpose, initially the cytotoxicity was evaluated by MTT technique and genotoxicity by the comet assay. Once established concentrations to be used in testing antiviral activity, mRNA quantification experiments with propolis extracts were tested in three different conditions, 3 hours before infection, 1 hour after infection, and was carried a called virucide preparation where the virus was incubated with propolis 1 hour before infection. Parallel to these experiments, electron microscopy experiments was performed. For chemical characterization, techniques of infrared , and liquid chromatography coupled to mass spectrometry was used . Analyses of viral mRNA of herpes and rubella virus, showed that propolis extract has activity against viruses in all conditions tested, with 98% reduction of viral load using low concentrations of the extract (1 µg/mL) in two viruses tested . These results corroborate the images obtained by electron microscopy, where cell cultures that were infected with viruses that have undergone a process of prior incubation with propolis showed no particle or viral replication complex images in the images analyzed. The chemical characterization showed the presence of molecules such as apigenin , luteolin , chrysin , galolil dicaffeoylquinic acid and catechins . All these substances already possess antiviral activity described for a variety of viruses, and act at different points in the viral replication. Finally, it is concluded that the extract has antiviral activity against the herpes virus and rubella by distinct mechanisms yet

to be elucidated, due to the variety of compounds present in the extract with previously described antiviral activity.

Keywords: Bioprospection, Antiviral, Propolis, Mass spectrometry, Natural Products

## LISTA DE ABREVIATURAS

CC50	Concentração Citotóxica 50%
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HIV	Vírus da Imunodeficiência adquirida
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INF	Interferon
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	Acido ribonucleico de interferência

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ensaio de genotoxicidade. A células após 90 min. de exposição às diferentes concentrações do extrato aquoso de própolis (01, 1 e 10 mg) e à 200uM de peróxido de hidrogênio como controle positivo de genotoxicidade, foram analisadas visualmente e classificadas de acordo como dano. A análise demonstrou diferença estatística entre o controle positivo de genotoxicidade e as diferentes concentrações de própolis. ....45
- Figura 2.** RT-PCR do vírus da rubéola. (Sobrenadante). Células SIRC foram tratadas com própolis em três condições distintas: 3h antes da infecção, 1h depois da infecção e a condição virucida (vírus incubado com a própolis por 1h antes da infecção) Todas as condições e concentrações foram estatisticamente diferentes do controle de infecção. ....46
- Figura 3.** RT-PCR do vírus da rubéola. (Lisado Celular). Células SIRC foram tratadas com própolis em três condições distintas: 3h antes da infecção, 1h depois da infecção e a condição virucida (vírus incubado com a própolis por 1h antes da infecção). Todas as condições e concentrações foram estatisticamente diferentes do controle de infecção .....47
- Figura 4.** qPCR do vírus do herpes. (Lisado Celular). Células VERO foram tratadas com própolis em três condições distintas: 3h antes da infecção, 1h depois da infecção e a condição virucida (vírus incubado com a própolis por 1h antes da infecção) Todas as condições e concentrações foram estatisticamente diferentes do controle de infecção. ....47
- Figura 5.** qPCR do vírus do herpes. (Sobrenadante). Células VERO foram tratadas com própolis em três condições distintas: 3h antes da infecção, 1h depois da infecção e a condição virucida (vírus incubado com a própolis por 1h antes da infecção). Todas as condições e concentrações foram estatisticamente diferentes do controle de infecção .....48
- Figura 6.** As células SIRC foram cultivadas sobre filme Aclar, e após 48h foram analisadas por microscopia eletrônica. Figura A - partículas do Vírus da Rubéola (VR) detectadas por microscopia direta do sobrenadante. B - É evidenciado um complexo replicativo típico, caracterizado pela presença de vesículas com inclusões filamentosas. C - Imagens representativas de partículas do VR. D= Células SIRC não infectadas, demonstrando a dinâmica natural do citoplasma, com a presença de vesículas, alta densidade de ribossomos livres e numerosas mitocôndrias. E – Células SIRC cultivadas na presença de própolis por 48h. Nota-se um aumento do número de mitocôndrias com zonas eletrodensas em suas intermembranas e também o aumento de vesículas. F – Células SIRC cultivadas em condição virucida. Nota-se um aumento do número de mitocôndrias, sendo que estas mitocôndrias se apresentam mais alongadas e com zona eletrodensa na faixa de intermembrana, é claro o aumento de ribossomos livres. Nenhum complexo replicativo ou VR foi encontrado. Bar= 200nm. ....49
- Figura 7.** Células VERO infectadas cultivadas por 48h sobre filme Aclar, analisadas por microscopia eletrônica. A- Partícula viral do Herpes Virus detectada por microscopia eletrônica direta. B – Capsídeo dentro núcleo e partículas virais envelopadas entre a membrana externa e interna do núcleo. C – O tegumento arranjado simetricamente ao redor do capsídeo, e assimétrico em vírions extracelulares. D – Célula VERO não infectada, dinâmica natural do citoplasma. Denso acúmulo de ribossomos, vesículas e grande número de mitocôndrias. E – Células VERO tratadas apenas com própolis. F. Células VERO infectadas e tratadas

com própolis. Mitocôndria alongada com zona eletrodensa na faixa intermembranar e aumento de ribossomos livres. Nenhum vírus foi encontrado.Bar= 200nm. ....	50
Figura 8. Espectro de infravermelho da fase aquosa do extrato da própolis de <i>Scaptotrigona postica</i> .....	51
<b>Figura 9.</b> Cromatograma monitorado por DAD à 254 nm de amostras de extrato aquoso de própolis. Principais picos : 19 e 27, 7 min de retenção. ....	52
<b>Figura 10.</b> Cromatograma monitorado por arranjo diodo (DAD) à 300 nm de amostras de extrato aquoso de própolis. Principais picos, 19, 25 e 27,5 min de retenção. ....	52
<b>Figura 11.</b> Cromatograma dos picos obtidos por detectados por ESI-MS modo positivo. Principais picos, 15,5, 16., 27,5 e 33.5 minutos de retenção. ....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Atividades biológicas descritas para própolis, tipo de atividade, modelo experimental, concentração efetiva e autor. ....	25
<b>Tabela 2.</b> Tabela de descrição da movimentação de vendas de mel e produtos apícolas - fonte IBGE .....	25
<b>Tabela 3.</b> Classificação de dano. Ensaio cometa .....	37
<b>Tabela 4.</b> Esquema de escalonamento da cromatografia em fase reversa com a finalidade de separar compostos da própolis.....	43
<b>Tabela 5.</b> Picos identificados na análise de infravermelho da fase aquosa do extrato da própolis.....	51
<b>Tabela 6.</b> Tabela de espectro de massas com os respectivos padrões de fragmentação, substância sugerida, e relatos da literatura. ....	53

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1 Os Vírus</b> .....	18
1.1.1 As infecções Virais .....	20
1.1.2 Imunidade Antiviral Intrínseca .....	21
<b>1.2 Própolis – Histórico</b> .....	22
1.2.1 Própolis – Composição Química.....	23
1.2.2 Própolis – Importância Econômica .....	25
1.2.3 Própolis – Atividade Antiviral .....	26
<b>1.3 A abelha <i>Scaptotrigona postica</i></b> .....	31
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	33
<b>2.1 Objetivos gerais</b> .....	33
2.1.2 Objetivos específicos .....	33
<b>3. MATERIAL E METODOS</b> .....	34
<b>3.1 Obtenção do extrato da própolis</b> .....	34
3.1.1 Separação da fase aquosa do extrato da própolis .....	34
<b>3.2 Linhagem Celular</b> .....	34
3.2.1 Teste de viabilidade celular .....	35
3.2.2 Ensaio cometa .....	35
<b>3.3 Avaliação do efeito do extrato da própolis sobre a replicação viral</b> .....	38
3.3.1 Ensaio em Placa.....	38
3.3.2 Quantificação do RNA mensageiro viral .....	39
<b>3.4 Microscopia Eletrônica</b> .....	40
3.4.1 Análise ultraestrutural .....	40
3.4.2 Coloração Negativa .....	41
<b>3.5 Separação e identificação dos componentes da fase aquosa do extrato da própolis de <i>Scaptotrigona postica</i></b> .....	42
3.5.1 Análise de infravermelho com a transformada de Fourier .....	42
3.5.2 Separação e análise de compostos por cromatografia de fase reversa acoplada à espectrometria de massas.....	42
<b>3.6 Análise Estatística</b> .....	44
<b>4. RESULTADOS</b> .....	45
<b>4.1 Avaliação de citotoxicidade e gentoxicidade da fase aquosa da própolis sobre células VERO</b> .....	45
<b>4.2 Avaliação do efeito da própolis o sobre a replicação viral</b> .....	46

<b>4.3</b>	<b>Microscopia Eletrônica</b> .....	<b>48</b>
<b>4.4</b>	<b>Identificação dos compostos presentes na própolis</b> .....	<b>50</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>69</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>70</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Os Vírus

Os vírus são seres intracelulares obrigatórios, e diferentemente da maioria dos agentes infecciosos, os vírus podem infectar qualquer tipo de forma viva, e uma vez que todos os vírus são constituídos basicamente por proteínas e código genético ([ácidodeoxiribonucleico] DNA ou [ácido ribonucleico] RNA), estes organismos utilizam a maquinária energética e replicativa do hospedeiro afim de produzir novas partículas virais (MIMS, *et al.*1999)

Na natureza os vírus possuem vários tamanhos, compreendidos nas faixas dos nanômetros, chegando a variar de 30 nm, como o poliovírus, até 400 nm, como o mimivírus. Os vírus podem ter diversas formas estruturais, como por exemplo, formas helicoidais, icosaédricas, e formais ainda mais complexas. Muito embora os vírus possuam diferenças particulares no que se diz respeito a morfologia e tamanho, algumas características são comuns à todos, tais como:

- ✓ Possuem DNA ou RNA de acordo com o tipo de vírus, além do tipo de material genético, existem as formas em que estes podem estar organizados no interior do capsídeo, podendo ser encontrados na forma de fitas lineares simples ou duplas, ou formas circulares. RNAs de fita simples possuem ainda, sentido positivo e negativo, os RNAs de sentido positivo são transcritos diretamente pelos ribossomos da célula hospedeira, enquanto RNAs de sentido negativo dependem de polimerases do próprio vírus nos estágios iniciais da replicação;
- ✓ Ao complexo formado pelo material genético viral, com a estrutura proteica rígida que o envolve (capsídeo viral), se dá o nome de nucleocapsídeo ou vírion;
- ✓ Alguns vírus possuem além do nucleocapsídeo, uma estrutura lipoproteica que os envolve, denominada envelope viral, este envelope possui

proeminências, denominadas espículas, que são glicoproteínas responsáveis pela interação entre a partícula viral e a célula hospedeira (CANN, 1997).

As diferenças do tipo de superfície que o vírus apresenta são fundamentais para o processo de invasão do vírus na célula hospedeira, e essas diferenças estruturais determinam o mecanismo de entrada do vírus na célula, que é o primeiro passo da replicação viral (MIMS, *et al.*, 1999).

A replicação viral depende das organelas do hospedeiro, e segue algumas etapas gerais, sendo elas:

- ✓ Adsorção: É a fase de fixação da partícula viral na célula hospedeira. No caso de vírus envelopados, esta interação se dá por meio das glicoproteínas do envelope lipídico, enquanto vírus não envelopados realizam essa interação utilizando um complexo protéico.
- ✓ Penetração: Os mecanismos de entrada dos vírus ocorrem de diferentes maneiras. Existem aqueles capazes de entrar na célula por interação de receptores de membrana, por endocitose e vírus que passam diretamente pela membrana celular.
- ✓ Desnudação: Os vírus que são endocitados podem seguir duas vias: a partir da acidificação do endossomo, que faz com que o capsídeo viral seja removido e assim estes vírus liberam o material genético, outros, fundem o envelope viral com a membrana do lisossomo antes do processo de acidificação, liberando também o genoma. E outros vírus conhecidos como os bacteriófagos são capazes de introduzir diretamente o material genético no interior da célula.
- ✓ Replicação e tradução: Os processos de replicação e tradução viral podem ocorrer no citoplasma ou no núcleo celular, dependendo do tipo de vírus em questão. No caso de vírus de DNA, estes, multiplicam-se no núcleo da célula, enquanto vírus de RNA se multiplicam no citoplasma. Tanto o DNA quanto o RNA, uma vez livres do capsídeo,

percorrem dois processos ao mesmo tempo, parte é utilizada na produção de proteínas estruturais, e a outra é utilizada para a produção de novas cópias do genoma.

- ✓ Liberação: As proteínas estruturais já formadas se unem às cópias de material genético, dando origem a novas partículas virais, que são liberadas da célula por diferentes formas. Uma das formas é a lise celular, onde ocorre o rompimento total da célula liberando os novos vírus para o ambiente. Outro mecanismo eficiente para liberação de partículas virais é um processo denominado brotamento, muito comum em vírus envelopados, onde os vírus atravessam a membrana celular do hospedeiro e na passagem do meio intracelular para o extracelular incorporam a membrana fosfolipídica do hospedeiro em sua estrutura dando origem ao envelope viral (CANDEIAS, 1989).

### 1.1.1 As infecções Virais

As infecções virais são de grande importância para a saúde pública, tanto que no Brasil, existe o sistema de vigilância epidemiológica, que dentre outras patologias, monitora 15 doenças causadas por diferentes vírus que são de notificação obrigatória, sendo elas: (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) AIDS, Hepatites, Hantavírose, Influenza, Doenças Exantemáticas [Rúbeola e Sarampo], Poliomielite, Gastroenterites, Meningites, Raiva, Febre Amarela, Febre do Nilo Ocidental, Dengue e Varicela/Herpes Zoster. Sendo que nos grupos das meningites e gastroenterites existem diversos vírus distintos que causam o mesmo tipo de quadro clínico (Coordenadoria de Vigilância Epidemiológica).

Vírus são organismos itinerantes, e mesmo com campanhas de imunização para determinadas doenças denominadas imunopreveníveis, ainda assim são reportados casos dessas patologias.

Em 2013, foram notificados 17 casos de poliomielite confirmados na República Árabe da Síria e 15 casos na Província de Deir Al Zour. Em ambas as localidades as infecções foram causadas pelo polivírus do tipo 1, demonstrando a existência de áreas endêmicas de um vírus imunoprevenível, e com isso, evidenciando que mesmo com as campanhas de vacinação, existe uma parcela da

população mundial que ainda é suscetível à infecção por vírus para os quais já existem vacinas (World Health Organization, 2013).

A poliomielite é uma doença de grande risco para crianças abaixo dos 5 anos de idade. A patologia cursa com paralisia em média de 1 para cada 200 crianças infectadas, sendo que 5 a 10% dos pacientes que desenvolvem paralisia vão à óbito, e mesmo com o grande decréscimo, de 350.000 casos mundialmente notificados no ano de 1988, para 223 casos no ano de 2012, por meio de vacinação, 3 países ainda são considerados áreas endêmicas desta doença (WHO, 2013).

O sarampo, doença causada por um vírus da família *paramyxovirus*, gera um quadro clínico agressivo causando muitas mortes mundialmente. No ano de 2011, 158 mil pessoas morreram de sarampo, 430 pessoas por dia, ou seja, 18 pessoas por hora. Estima-se que no ano de 1980, antes das campanhas de vacinação, que o número de mortes era em média de 2,6 milhões de pessoas por ano. Mesmo com a redução de 71% dos casos de 2000 para 2011, o sarampo ainda constitui um grande problema para a saúde pública (WHO, 2013). No ano de 2011, apenas 43 casos foram registrados no Brasil (CVE, 2011).

A infecção pelo vírus da Rubéola é normalmente autolimitada tanto em adultos como em crianças, porém, infecções em gestantes são complicantes para o feto, e o quadro de infecção fetal pelo vírus da rubéola, é conhecido como Síndrome da Rubéola Congênita (SRC), cuja síndrome pode levar a diversas alterações no desenvolvimento do recém-nascido. Por ano 110.000 crianças nascem com a SRC, sendo que grande parte deste montante se concentra na África e sudeste asiático, onde as condições de saúde são precárias (WHO, 2012). No estado de São Paulo, nenhum caso de Rubéola foi registrado desde 2009 (CVE).

Infecções como a gripe, são normalmente graves, e até o mês de outubro de 2013, as infecções por influenza somavam 13 mil internações e 1.567 mortes. Sendo que 1.938 dos casos foram confirmados como o sorotipo H1N1 sendo o causador, deste número, 396 faleceram (CVE, 2013).

### 1.1.2 Imunidade Antiviral Intrínseca

Em eucariotos, sistemas de atividade antiviral são descritos há muito tempo, e um dos mecanismos iniciais de defesa contra vírus, são os ácidos ribonucléicos de interferência (RNAi), que constituem uma das principais formas de defesa de plantas

e invertebrados contra diversos vírus. Estes organismos, usam de endoRNAses que clivam os RNAs virais de fita dupla, gerando fragmentos, denominados de complexos silenciadores induzidos por RNA, (do inglês, *RNA-induced silencing complex. RISC*) que bloqueiam a replicação dos vírus (HAMILTON & BAULCOMBE, 1999; ZAMORE, *et al.* 2000).

Não é descrito na literatura que a via antiviral de RNAi seja importante na defesa contra vírus em mamíferos, todavia, os mamíferos possuem um sistema proteico complexo denominado de sistema de interferon. Existem variados receptores que ativam a produção de interferons IFN, e cada uma das vias tem sua especificidade seja pelo tipo de vírus detectado ou mesmo pelo tipo de interferon a ser produzido (JANEWAY, 1989; IWASAKI & MEDZHITOV, 2010). Os interferons, uma vez sintetizados, são capazes de proteger células vizinhas que ainda não foram infectadas por meio da Jak-STAT, induzindo a expressão de genes codificadores de fatores antivirais (BOWIE & UNTERHOLZNER, 2008).

Os receptores do tipo *toll* participam dentro do contexto antiviral por detectarem tanto vírus de RNA como de DNA, por meio dos receptores TLR7 e TLR9 respectivamente. Ambos receptores se localizam no endossomo, formado durante a entrada de alguns vírus, e a ativação desses receptores desencadeia a produção de IRF, fator de transcrição que induz a produção de interferon- $\alpha$  (SKAUG, *et al.*, 2009).

## 1.2 Própolis – Histórico

A palavra própolis tem origem grega, de forma que o termo “pro” significa “em defesa”, e “polis” significa “cidade”, ou seja, “em defesa da cidade”, no caso das abelhas, a defesa da colmeia (BANKOVA, *et al.*, 2000). Na língua grega, a palavra própolis, também significa cola, e descreve bem um dos principais papéis que o material tem, que é o de vedar fendas na estrutura da colmeia (BOGDANOV, 2012; GHISALBERTI, 1979). Além disso, a própolis pode ser utilizada para envolver intrusos, o ato de envolver o cadáver na própolis impede a putrefação e a consequente disseminação de bactérias na colmeia (GHISALBERTI, 1979).

O uso de própolis para diversos propósitos tem relatos datados de antes de Cristo, como por exemplo, entre os povos gregos, incas e assírios. Plínio, um filósofo romano relatava o uso de própolis em casos de dores ou inchaços (LORISH, *et al.*,

1982). No Egito, a própolis era utilizada no processo de conservação de corpos, desempenhando a função de bálsamo (PEREIRA, *et al.*, 2002) e seu uso persiste até os dias atuais na medicina popular.

De acordo com Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), por definição, própolis é o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas de brotos, de flores e de exsudados de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreção salivar, cera e pólen para elaboração final do produto (MAPA, 2001). Para Bankova, trata-se de um material resinoso composto por exsudados de plantas, cera e enzimas da saliva das abelhas, que é utilizado para vedação da colmeia e como proteção contra microorganismos (BANKOVA, *et al.*, 2000). Para Burdock, a própolis é um produto composto de 50% de resinas e bálsamo, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias.

### 1.2.1 Própolis – Composição Química

Um dos principais fatores determinantes das características químicas e da coloração da própolis é a sua procedência. A substância pode variar entre o amarelo, verde, vermelho e marrom, e pode possuir ou não odor característico. (MARCUCCI, 1996). Outros fatores também podem interferir na composição da própolis são: o tempo e o local de coleta (KUMAZAWA, *et al.*, 2003), a estação do ano (VALENCIA *et al.*, 2012) a planta utilizada e fatores edafoclimáticos que interferem no seu crescimento (FABRIS, *et al.*, 2013), ou se a abelha faz uso de terra, na confecção do que se chama de geoprópolis. (KERR, 1987).

A literatura descreve diversas composições da própolis de acordo com a região de origem. Porém, classicamente, é composta por compostos fenólicos na forma de agliconas de flavonóides, como, por exemplo, flavonas e flavanonas, além de ácidos fenólicos e seus ésteres. Particularmente as principais substâncias descritas da própolis brasileira são derivados prenilados do ácido p-cumárico e de acetofenona, como, diterpenos e lignanos (BOGDANOV, 2012). Além disso, fazem parte da constituição de algumas própolis as vitaminas E, C e do complexo B, alguns metais como cobre, manganês, ferro e cálcio, dentre outros compostos. (DEBUYSE, 1983). A presença de outros compostos foi publicada em uma revisão por Marcucci, em que foi relatada a presença de álcoois, fenóis, aldeídos, ácidos alifáticos,

ésteres, aminoácidos, ácidos aromáticos, chalconas, hidrocarbonetos, ácidos graxos, cetonas, terpenóides e esteroides, e açúcares, em própolis das mais variadas origens (MARCUCCI, 1996).

É importante ressaltar que como a própolis é uma mistura de diversas substâncias, dentre elas, o conteúdo salivar das abelhas, alguns pesquisadores publicam estudos acerca dessas secreções, como é o caso da secreção hipofaríngea de *Apis mellifera*, que teve comprovada sua atividade anti-microbiana (WHITE *et al.*, 1963).

Conforme já descrito para as abelhas *Apis mellifera*, há também indícios de que glândulas da hipofarínge de abelhas da espécie *Scaptotrigona postica*, estejam também envolvidas na produção de substâncias anti-microbianas (Costa & Cruz-Landim, 1999, 2000), sendo que já foram identificadas enzimas como fosfatases ácidas e hidrolases em seu conteúdo (Costa & Cruz Landim, 2001;2005). Sabe-se também que a  $\beta$ -glucosidase presente na saliva de abelhas converte os flavonoides das plantas em flavonoides na forma aglicona (PARK, *et al.*, 1998).

Conforme descrito nos parágrafos anteriores, a própolis tem sua estrutura química muito variada, assim, torna-se uma grande fonte de moléculas com diferentes ações farmacológicas, tais como imunomoduladora, antioxidante, antimicrobianas, anti-inflamatórias e antitumorais (BANKOVA *et al.*, 2000). Abaixo, uma tabela retirada de um trabalho de revisão, em que foram levantados dados sobre as propriedades biológicas da própolis, as abordagens experimentais utilizadas, separadas por atividade biológica, e se o estudo foi realizado *in vivo* e *in vitro*, constando também a concentração da própolis e autor (BANKOVA & SFORCIN, 2011).

**Tabela 1.** Atividades biológicas descritas para própolis, tipo de atividade, modelo experimental, concentração efetiva e autor.

Immunomodulatory	In vivo	200 mg/kg	Orsatti et al. (2010a,b) Orsi et al. (2005)
	In vitro	3-300 µg/100 µl	
Anti-tumor	In vivo	50 and 150 mg/kg	Orsolich et al. (2005) Bassani-Silva et al. (2007)
	In vitro	5-100 µg/100 µl	
Antimicrobial			
Antibacterial		0.4- 14.0% v/v	Sforcin et al. (2000)
Antifungal	In vitro	0.4- 14.0% v/v	Sforcin et al. (2001)
Antiviral		5-100 µg/100 µl	Búfalo et al. (2009c)
Anti-diabetic	In vivo	100 and 300 mg/kg	Zamami et al. (2007)
Anti-ulcer	In vivo	50, 250 and 500 mg/kg	Barros et al. (2007)

### 1.2.2 Própolis – Importância Econômica

No Brasil, o MAPA, possui uma câmara setorial responsável por mel e produtos apícolas, essa câmara foi estabelecida no ano de 2006 e tem como enfoque a visão sistêmica da cadeia produtiva de mel e seus derivados. É constituída em parte pelos produtores de mel e produtos apícolas, e por membros da sociedade civil, e apesar de ter como foco a cadeia produtiva de mel, a busca por informações de produção e exportação oriundas dessa câmara trazem dados escassos sobre a produção ou exportação da própolis.

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) disponibiliza dados pouco exatos sobre a produção de própolis no censo agropecuário do ano de 2006, a última informação disponível até o momento. Neste sentido, os produtos apícolas e o mel são divididos da seguinte maneira: um grupo apenas para mel, outro apenas para cera e um terceiro grupo denominado “Geleia real, Própolis, Pólen e etc”

**Tabela 2.** Tabela de descrição da movimentação de vendas de mel e produtos apícolas - fonte IBGE

**Tabela 1.5.33 - Produção e venda dos produtos da apicultura no ano, segundo as variáveis selecionadas - Brasil - 2006**

Variáveis selecionadas	Produtos da apicultura no ano (conclusão)							
	Cera						Geleia real, própolis, pólen, etc.	
	Produção			Venda			Estabelecimentos	Valor da produção (R\$)
	Estabelecimentos	Quantidade (kg)	Valor (R\$)	Estabelecimentos	Quantidade (kg)	Valor (R\$)		
<b>Total</b>	20 512	519 174	7 238 039	9 001	256 986	3 426 967	5 700	5 731 404

Dados do censo de 2006 trazem informações sobre o número de estabelecimentos produtores de mel e cera, de acordo com a quantidade da produção, o valor da produção e o valor das vendas. Enquanto que o grupo da própolis possui apenas as informações dos estabelecimentos produtores e valor da produção. Ou seja, não se tem dados sobre o valor das vendas deste grupo, e uma vez que própolis está alocada juntamente com a geléia real, polén e outros, a ausência de estratificação de dados por produto, dificulta a análise dos de produção.

Estima-se que o montante anual da produção de própolis no ano de 1997 foi de 115 toneladas, o que na época equivalia a aproximadamente R\$ 80,5 milhões. De acordo com a Japan Trade Organization, 92% de toda a própolis consumida no Japão neste período eram de origem brasileira. No mesmo ano, japoneses compravam frascos de extratos alcoólicos brasileiros por até U\$ 150, enquanto que no Brasil, o mesmo extrato custava entre R\$ 5,00 e R\$ 10,00. O valor agregado da própolis brasileira está diretamente atrelado às propriedades farmacológicas previamente descritas na literatura, às características organolépticas, ao baixo teor de alguns metais e contaminantes (CIZMARIK & LAHITOVÁ, 1998).

O dado mais recente de literatura realizado de um estudo no ano de 2008, destacou que a produção nacional chegou a 150 toneladas, colocando o Brasil em primeiro lugar no *ranking* mundial dos produtores de própolis, sendo que 75% da produção nacional é destinada a exportação e desses 75%, 92% são destinados ao Japão. Apesar de atender grande demanda da própolis consumida no Japão, no ano de 2007 houve uma queda de 62% na receita das exportações e o preço por quilo que era de U\$ 117,00/Kg passou para U\$ 77,00/Kg (RESENDE & BORGES, 2008).

### 1.2.3 Própolis – Atividade Antiviral

Estudos acerca de infecções virais são de alto interesse na área de saúde pública e animal, principalmente quando comparadas a infecções de origem bacteriana, para as quais já se tem uma série de medicamentos eficazes. Assim sendo, torna-se clara a escassez de agentes para o controle destas viroses. Por esse motivo, a identificação de agentes com ação antiviral é um importante foco para a pesquisa científica.

Há muito tempo se sabe que a própolis possui compostos com ação antiviral, que afetam vírus como influenza A e B, Vaccinia vírus e Vírus da Hepatite B (ESANU

*et al.*, 1981; BANKOVA *et al.*, 1988, KÖING, DUSTMANN, 1985, MAKSIMOVA-TODOROVA *et al.*, 1985; MORFEI *et al.*, 1980; NEYCEHV *et al.*, 1988; SHEVCHENKO *et al.*, 1972).

Estudos com isolamento de compostos da própolis constataram a presença de alguns flavonoides, como flavonas e flavonóis isolados com frações obtidas por benzina e éter etílico. Em outro trabalho, a fração de éter etílico, testada contra os vírus H1N1 e H3N2, reduziu significativamente a infecção *in vitro* protegeu camundongos da infecção por H3N2 quando administrado via oral na concentração de 20 mg/Kg (MANOLOVA *et al.*, 1985; MAKSIMOVA-TODOROVA *et al.*, 1985).

Evidências como essas, já foram descritas previamente por Ktivotuchko *et al.*, 1975, em que camundongos infectados com influenza do tipo H1N1 foram submetidos à administração intranasal do extrato de própolis após a infecção, e os animais apresentaram títulos virais mais baixos e uma maior taxa de sobrevivência do que os animais controles e os que foram tratados com própolis 3 horas antes da infecção. No Japão, em 2008, um estudo com o mesmo modelo animal e vírus, com extrato de uma própolis brasileira, demonstrou o potencial antiinfluenza e melhoras dos sintomas nos animais que foram tratados com própolis durante a infecção (SHIMIZU, *et al.*, 2008).

Sabendo-se que existe ação antiviral na fração obtida do extrato de própolis onde se encontram flavonoides, Debiaggi e colaboradores estudaram cinco flavonoides isolados da própolis, sendo eles: crisina, canferol, acacetina, galanina e quercetina. Após o isolamento, as frações dos flavonoides foram avaliadas quanto ao potencial antiviral *in vitro* frente à rotavírus, vírus do herpes, adenovírus e coronavírus. Os resultados de atividade antiviral foram positivos apenas para o vírus do herpes, sendo que o canferol e a crisina diminuíram a replicação intracelular do vírus em condição dose dependente quando adicionadas ao meio de cultura após a infecção, porém, sem afetar a infectividade viral. Em contrapartida, a quercetina reduziu tanto a infectividade quanto a replicação, porém em altas doses (DEBIAGGI *et al.*, 1990).

Em seguida, um estudo comparando a ação de análogos de ésteres de ácidos cinâmicos substituídos presentes na própolis, levou à descoberta de uma molécula sintética, o isopentil ferulato, capaz de reduzir os títulos virais e a

reprodução do vírus H3N2 em ovos embrionados (SERKEDJIEVA & MANOLOVA, 1992).

Posteriormente, Amoros e seus colaboradores realizaram uma pesquisa dos tipos de vírus sobre os quais o extrato bruto da própolis possuía atividade antiviral, e para tanto, avaliaram vírus de DNA e RNA, envelopados ou não. Foi relatado que a ação virucida do extrato de própolis ocorria apenas em vírus envelopados. Todavia, nos testes de redução de formação de placa, a concentração de 30 µg/mL inibiu totalmente o poliovírus (um vírus não envelopado), enquanto que nos vírus do Herpes 1-2, Adenovírus 2, e Vírus da estomatite vesicular não foi observado redução significativa no ensaio de formação de placa, mas ainda assim, houve redução do tamanho das placas formadas por estes vírus. Esses resultados corroboraram com os ensaios de titulação viral denotando a atividade antiviral da própolis tanto para vírus de DNA como para os vírus de RNA (AMOROS *et al.*, 1992).

Na procura por moléculas responsáveis pelos efeitos antivirais da própolis, Amoros e seus colaboradores, realizaram experimentos testando flavonas e flavonóis isolados ou combinados em um sistema flavona-flavonol, comparando o efeito antiviral deste sistema em relação ao extrato bruto da própolis contra o vírus do herpes do tipo 1. Por meio disso, pôde-se constatar, primeiramente, que existe uma sinergia entre flavonas e flavonóis quanto à ação antiviral, o que explica a maior atividade do extrato bruto da própolis quando comparado ao sistema flavona-flavonol, uma vez que a própolis é uma mistura complexa de diversos componentes que agem sinergicamente. No mesmo trabalho foi evidenciado que quanto mais hidroxilado for o flavonól, maior é sua atividade antiviral (AMOROS *et al.*, 1992).

Em 1985, Köing e Dustmann publicaram um artigo que afirmava que compostos cafeólicos eram promissoras moléculas com atividade antiviral, comprovando por experimentos a atividade destas moléculas contra o herpes aviário de diversas espécies de pássaros. Na tentativa de encontrar um composto isolado, responsável pela a ação antiviral do extrato bruto de própolis, Amoros investigou compostos minoritários, tal como o 3-Metil-But-2-Enil-Cafeato, isolado por Bankova em 1987 (AMOROS, *et al.*, 1994).

Ao utilizar o cafeato contra vírus do Herpes tipo 1, os resultados sugeriram que a ação antiviral do cafeato ocorria no estágio de replicação viral, e não influenciava nos fenômenos de acoplamento e de penetração celular. Além disso, o

cafeato reduziu a síntese de DNA viral numa relação de dose dependência, o que a primeira vista, parecia positivo para o desenvolvimento de um fármaco, uma vez excluído os efeitos adversos causados pelo composto, que é responsável por alergia e irritação em apicultores (AMOROS, *et al.*, 1994).

Em 1994, Hegazi e seu grupo, avaliaram a atividade antiviral do extrato de própolis sobre o vírus Newcastle, pertencente família do vírus do sarampo, que é de grande importância no ramo da avicultura devido alta taxa de mortalidade. O extrato oriundo da Bulgária que foi utilizado no experimento foi capaz de reduzir de maneira importante os títulos virais em testes com ovos embrionados (HEGAZI, *et al.*, 1994).

Posteriormente, outro trabalho relatou a eficácia do extrato de própolis comparando-a ao aciclovir, medicamento de escolha no tratamento do herpes genital causada por herpes-2, e a própolis mostrou-se mais eficaz em reduzir as lesões e sintomas locais do que o próprio aciclovir (VYNOGRAD, *et al.*, 2000).

Estudos posteriores demonstraram ainda, que 0,5% de extrato aquoso de própolis reduz em 50 % a infecção com vírus do herpes em células VERO, e que a administração duas horas após a infecção, protege a células da infecção em 80-85% (HULEIHEL & ISANU, 2002).

Harish e colaboradores em 1997 verificaram que o extrato de própolis suprime a replicação do vírus do HIV, diminuindo a produção do antígeno p24 em 90 – 100% em condição de dose dependência, além de exercer efeitos imunomodulatórios sobre as células sanguíneas. Em outra pesquisa mais recente, realizada com própolis oriunda da divisa do Brasil com Uruguai, o ácido morônico foi isolado, e também foi descrita atividade antiviral desse composto contra o vírus do HIV (ITO *et al.*, 2001), mais recentemente o mesmo composto foi testado contra o EBV e demonstrou grande potencial antiviral (CHANG, *et al.*, 2010).

Um grupo egípcio de pesquisa, ao avaliar a atividade antiviral de própolis de diferentes países, utilizou como alvo, o vírus da doença bursal (vírus RNA não envelopado) e o rotavírus aviário (vírus RNA não envelopado), e os autores relataram que todas as própolis apresentaram atividade sobre os dois vírus, todavia foi encontrada uma diferença de atividade notória entre uma amostra e outra (HEGAZI *et al.*, 2001). Em um trabalho subsequente, a distância geográfica foi reduzida, e foram coletadas amostras de três cidades diferentes do Egito, e submetidas ao mesmo ensaio do trabalho anterior. Novamente foi descrita diferença

das atividades antivirais de acordo com a região de coleta (EL-HADY & HEGAZI, 2002). Fato esse, que reforça a ideia de que, própolis de regiões distintas tem suas particularidades, no que se diz respeito à atividade biológica e composição química.

Em vista da atividade antiviral contra o poliovírus do tipo 2 que foi vista por Amoros e seu grupo em 1992, recentemente foi estudada a atividade anti-poliovírus em relação à própolis verde, que tem como grande constituinte a planta *Baccharis drancunculifolia*, e neste estudo os pesquisadores avaliaram tanto a atividade de extratos da planta quanto o da própolis sobre o poliovírus do tipo 2. Por meio dos experimentos, constataram que as duas amostras atuam bloqueando parcialmente a entrada do vírus nas células, o ciclo de replicação viral, e levam a degradação do RNA viral após a entrada do vírus na célula ou depois da sua liberação para o sobrenadante do meio cultivado. Outro ponto importante deste estudo é o de que os extratos da planta tiveram atividades antivirais muito mais acentuadas do que o extrato da própolis, o que indica fortemente que talvez a atividade antiviral da própolis verde esteja ligada diretamente a *Baccharis drancunculifolia* (BÚFALO *et al.*, 2009).

Na tentativa de esclarecer os mecanismos da ação anti-herpética da própolis, extratos aquosos e etanólicos foram utilizados para experimentos com o vírus do tipo 1, e foi constatado que o pré-tratamento do vírus 1 hora antes com a própolis, garante uma maior atividade antiviral, reduzindo em mais de 98% do efeito do vírus no teste de formação de placa (SCHNITZLER *et al.*, 2010). Resultados diferentes encontrados foram obtidos para o Herpes do tipo 2 em outro trabalho do mesmo grupo, para este vírus, a condição de pré-tratamento do vírus (virucida) demonstrou o melhor resultado (NOLKEMPER *et al.*, 2010).

Em pesquisa comparativa com dois extratos de própolis, sendo um adquirido comercialmente e outro obtido experimentalmente, foi relatada atividade antiviral dos dois extratos sobre o calicivírus felino, o adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina, sendo que o extrato obtido em laboratório obteve melhor resultado em relação à própolis adquirida comercialmente (CUETO *et al.*, 2011).

Um estudo avaliando o potencial antiinfluenza do extrato aquoso da própolis verde brasileira, averiguou que os compostos majoritários do extrato eram cafeólicos, e por meio de análise de RNA viral, averiguaram que o efeito antiviral da própolis era decorrente de interação dos compostos com a célula, e não

diretamente com o vírus (URUSHISAKI, *et al*, 2011). Posteriormente, testando o ácido 3,4-dicafeoilquínico, o mesmo grupo comprovou que este composto possui importante ação antiviral e também aumenta a expressão de uma via apoptótica relacionada a tumores e infecções virais (TAKEMURA, *et al*, 2012).

Em pesquisa comparativa com dois extratos de própolis, sendo um adquirido comercialmente e outro obtido experimentalmente, foi relatada atividade antiviral dos dois extratos sobre o calicivírus felino, o adenovírus canino 2 e vírus a diarreia viral bovina, sendo que o extrato obtido em laboratório obteve melhor resultado em relação à própolis adquirida comercialmente (CUETO *et al.*, 2011).

Um estudo avaliando o potencial antiinfluenza do extrato aquoso da própolis verde brasileira, averiguou que os compostos majoritários do extrato eram cafeólicos, e por meio de análise de RNAm viral, averiguaram que o efeito antiviral da própolis era decorrente de interação dos compostos com a célula, e não diretamente com o vírus (URUSHISAKI, *et al*, 2011). Posteriormente, testando o ácido 3,4-dicafeoilquínico, o mesmo grupo comprovou que este composto possui importante ação antiviral e também aumenta a expressão de uma via apoptótica relacionada a tumores e infecções virais (TAKEMURA, *et al*, 2012).

Em 2012, Sartori e seu grupo, estudando mecanismos de ação antiviral da própolis marrom sobre o herpesvírus do tipo 2, utilizou como modelo animal camundongos, e os experimentos demonstraram atividades antiinflamatórias, denotadas pela redução de leucócitos totais no sangue, em especial dos neutrófilos, associado à diminuição da atividade da mieloperoxidase corroborando com a diminuição das lesões externas. E atividades antioxidantes, com redução dos níveis de espécies reativas, nitração da tirosina, e do ácido ascórbico. Um fator importante observado foi a inibição da atividade da enzima catalase nos animais infectados pelo herpesvírus, inibição essa, que foi revertida pelo tratamento com própolis, indicando que esta enzima possui um papel importante na patogênese do vírus do herpes.

### **1.3 A abelha *Scaptotrigona postica***

Dentre as abelhas existentes no Brasil, destacam-se aquelas pertencentes à família Apidae e subfamília Meliponinae, mais conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão. Estas abelhas misturam material resinoso das plantas com cera e terra,

formando a geoprópolis (KERR, 1987; NOGUEIRA-NETO, 1997; BANKOVA *et al.*, 1998). Porém, algumas espécies como *Scaptotrigona postica*, popularmente conhecida no Maranhão como “tubi”, não utilizam terra para a produção de própolis (NOGUEIRA-NETO, 1997).

O gênero *Scaptotrigona* distribui-se por toda a região neotropical e reúne espécies que constroem seus ninhos em cavidades pré-existentes (SILVEIRA *et al.*, 2002).

As pesquisas com própolis têm se concentrado principalmente nas abelhas africanizadas da espécie *Apis mellifera*, entretanto, poucos estudos tratam da própolis de abelhas indígenas sem ferrão (BANKOVA *et al.*, 1998).

A própolis de *Scaptotrigona postica* tem sido utilizada popularmente na região de Barra do Corda, no estado do Maranhão, no tratamento de tumores e de cicatrização de feridas. Contudo, são escassos os estudos que comprovem suas atividades biológicas e a sua composição química.

As poucas publicações acerca da atividade biológica da própolis de *Scaptotrigona postica* estão voltadas aos efeitos antimicrobianos diretos sobre bactérias como *Enterococcus faecalis*, *E. Coli*, e *S. Aureus* (MAIA FILHO, *et al.*, 2005), e indireta sobre o fungo *Candida albicans* por elevar a capacidade fungicida de células fagocitárias sanguíneas (POSSAMAI, *et al.*, 2013).

Outro trabalho sobre atividade biológica da própolis de *Scaptotrigona postica* foi realizado em camundongos com tumor de Erlich tratados com a própolis de *Scaptotrigona postica*. Os autores observaram uma importante redução do tumor, indicando efeito antitumoral. Em outro estudo sobre tumores, foi administrada própolis para ratos wistar como medida preventiva de câncer de cólon, o que resultou na redução da expressão de COX-2 e aumento de CASPASE III (CAVALCANTE, 2011). A avaliação de atividade antiproliferativa em linhagem de células de glioblastoma foi positiva, e não houve efeitos sobre a apoptose da linhagem, indicando possível função citostática (BORGES *et al.*, 2011).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho é o de identificar e caracterizar substâncias com ação antiviral da própolis de *Scaptotrigona postica* sobre vírus de interesse humano.

#### 2.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar citotoxicidade e genotoxicidade do extrato da própolis
- Testar a atividade antiviral do extrato contra diversos vírus
- Estudo de possíveis mecanismos de ação antiviral
- Identificar e caracterizar as substâncias presentes no extrato e correlacionar com as atividades observadas nos experimentos

## **3. MATERIAL E METODOS**

### **3.1 Obtenção do extrato da própolis**

A própolis foi coletada pelo apicultor Wilson Amorim Melo na cidade de Barra do Corda, no estado do Maranhão. De acordo com o fornecedor da própolis, a extração dos compostos da resina foi realizada mediante a maceração em álcool de cereais à temperatura ambiente, por 7 dias. Após este período o extrato foi filtrado e então evaporado/liofilizado com a intenção de prevenir a degradação dos componentes do extrato.

#### **3.1.1 Separação da fase aquosa do extrato da própolis**

Para os ensaios biológicos foi realizada uma partição do extrato liofilizado, utilizando-se Hexano, Acetato de Etila e a mistura de Água/Metanol (1:2). A partição teve como objetivo excluir os materiais graxos do extrato, a fim de obter-se uma fração com compostos hidrossolúveis.

Esta fração foi seca em *speed vac*, e seu peso seco foi aferido por gravimetria em balança analítica, em seguida, foi adicionada água ultra pura ao material para o preparo uma solução mãe de concentração conhecida, que foi utilizada em todos os ensaios químicos e biológicos

### **3.2 Linhagem Celular**

Células das linhagens VERO (células de rim de macaco verde africano-ATCC CCL 81), e células de córnea de coelho SIRC (células epiteliais de cornea de Coelho ATCC CL 60) foram cultivadas a 37°C em frascos T contendo 5 ml de meio modificado por Dulbecco's (DMEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Invitrogen/Life Carlsbad, CA, EUA).

### 3.2.1 Teste de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado com o reagente MTT, cujo teste se baseia na redução do MTT, no interior da mitocôndria através de ação enzimática, gerando um produto colorido. Células VERO foram cultivadas em poços de 96 escavações em meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino, após 24 h, foi adicionado aos poços meios de cultivos contendo concentrações de própolis que variavam de 10 mg/mL à 0,1 mg/mL em esquema de diluição seriada 1:2. Após 24h de exposição o sobrenadante foi descartado e aos poços foi adicionado meio de cultivo contendo PBS e MTT à concentração de 500 µg/mL por 4 horas. Após este período o meio de cultivo foi retirado e foram adicionados 100 µL de DMSO. Após a adição do DMSO as placas foram agitadas por 30 minutos e então foram lidas em espectrofotômetro à 570nm.

### 3.2.2 Ensaio cometa

O Ensaio foi realizado de acordo Schulz e colaboradores 2008, com algumas modificações, o ensaio segue os seguintes passos:

1) Células VERO, foram cultivadas em placas de 24 cavidades ( $2,5 \times 10^5$  células/mL, 1mL/cavidade), formando uma monocamada confluenta em 24h a 37°C à 5% de CO<sub>2</sub>. Essas células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino. Após o tapete formado, cada uma das amostras foi adicionada à placa, as quais foram incubadas durante 90min. As concentrações utilizadas da fase aquosa do extrato de própolis foram 0,1/ 1/ 10 mg/mL de extrato. Os controles positivos foram as células tratadas com uma solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 200 µM durante 90min e como controles negativos foram utilizadas células VERO não tratadas, ou seja, contendo apenas meio de cultivo.

2) Após a exposição, o tapete celular de cada cavidade das placas foi lavado três vezes com PBS, e então tripsinizado, a fim obter uma suspensão celular. A atividade da tripsina foi bloqueada pela adição de meio contendo 5% soro fetal bovino. A suspensão, uma vez coletada, teve uma alíquota separada para a contagem por azul de tripan, após a contagem a suspensão foi diluída até atingir  $1 \times 10^6$  células. Essa suspensão celular foi então adicionada à agarose de baixo ponto de fusão para formar a segunda camada sobre as lâminas.

3) Foram utilizadas lâminas de microscópio foscas apenas numa das extremidades, desengorduradas, e que já tiveram uma primeira camada de agarose formada com uma solução de agarose de ponto de fusão normal a 1,5% em PBS livre de íons cálcio e magnésio e deixadas à temperatura de 4°C para secagem. Para cada lâmina foram usados 40µL da suspensão celular, previamente preparada e tratada, e 60µL de solução de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% em PBS livre de íons cálcio e magnésio, mantida a 37°C. Uma lamínula de 24x60mm foi colocada sobre cada lâmina, imediatamente, para que a agarose não secasse, antes de se espalhar por toda lâmina. As lâminas foram deixadas a 4°C, por 15min, para a solidificação da agarose.

4) Em seguida, foram retiradas as lamínulas e as lâminas foram submersas em 100mL de solução de lise gelada (4°C), recém-preparada (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris- HCl 10mM, qsp de NaOH 10N para obter pH 10) adicionada de 10% DMSO e 1% Triton X-100. As lâminas podem permanecer nesta solução, no mínimo, por 1h e, no máximo, por 30 dias.

5) Após a lise celular, as lâminas foram lavadas com PBS gelado com auxílio de uma pipeta Pasteur e submetidas ao tratamento alcalino em solução tampão de pH 13 (300mM NaOH e 1mM EDTA), previamente refrigerada, por 30min, em banho de gelo. A corrida de eletroforese foi feita numa cuba horizontal disposta num banho de gelo, com voltagem constante (25Volts) e amperagem de 280.

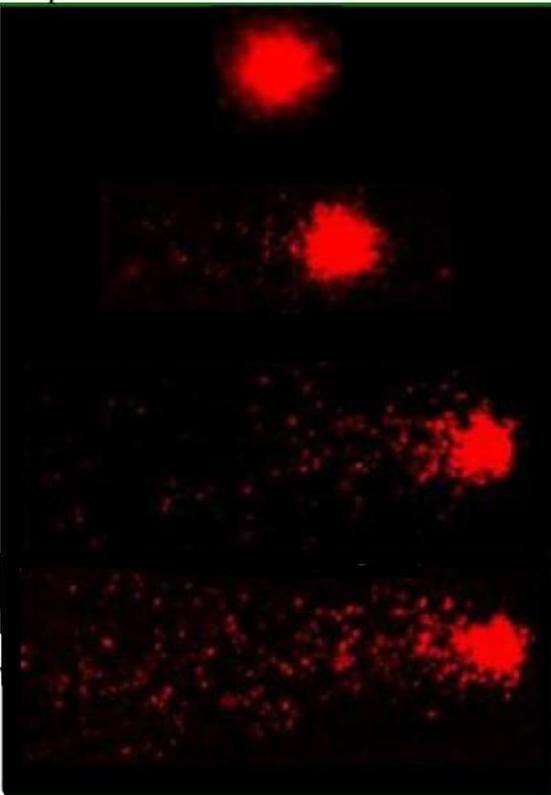
6) Após eletroforese, as lâminas foram lavadas três vezes com uma solução de neutralização (Tris-HCl 0,4M, pH 7,5), por 5min cada, sendo em seguida secadas e

posteriormente colocadas numa cuba com etanol absoluto por alguns segundos. Após secagem, as lâminas foram submetidas à coloração.

7) As lâminas foram coradas com 30µL de uma solução aquosa de brometo de etídeo a 20µg/mL e cobertas com lamínulas. O brometo de etídeo é um agente intercalante de DNA que emite fluorescência quando exposto à radiação.

8) Após coradas, as lâminas foram avaliadas, imediatamente, em microscópio de fluorescência (Olympus BX 40), com filtro de excitação de 515-560nm e filtro de barreira de 590nm, com aumento de 400X. A análise dos cometas foi realizada visualmente, conforme classificação proposta. Através da análise microscópica, os cometas foram classificados em quatro categorias, da seguinte forma:

**Tabela 3.** Classificação de dano. Ensaio cometa

Classe	Crítérios de classificação	Aparência
0	Células sem dano: cometas com cabeça grande e sem cauda, sem migração do DNA.	
1	Células pouco danificadas: cometas com cauda bem curta, com pouca migração do DNA.	
2	Células danificadas: cometas com caudas longas, com migração intermediária de DNA.	
3	Células muito danificadas: cometas com cabeças bem pequenas e uma cauda muito longa, com muita migração de DNA.	

### **3.3 Avaliação do efeito do extrato da própolis sobre a replicação viral**

#### **3.3.1 Ensaio em Placa**

A avaliação da atividade antiviral foi avaliada de acordo com as condições propostas por Beyleveld e colaboradores (2013) em seu artigo. Células da linhagem SIRC bem como as células VERO, foram cultivadas em placas de 96 poços, na concentração inicial de  $2,5 \times 10^5$  células/ mL em meio DMEM suplementado com 5% de soro bovino (Invitrogen/Life Carlsbad, CA, EUA), as culturas foram mantidas em estufa à 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24h.

Após as primeiras 24h diferentes concentrações de própolis foram avaliadas em três diferentes condições:

1) 3 horas antes da infecção. Meios de cultivo contendo diferentes concentrações (1, 10 e 100 µg/mL) de própolis foram adicionados aos poços, e então, a placa foi incubada à 37°C. Após este período, o meio foi retirado, os poços foram lavados com tampão fosfato (pH 7,2), em seguida foi adicionado aos poços meio de cultivo com o vírus.

2) 1 hora após a infecção. Meio de cultivo contendo os vírus foram adicionados a placa, e então, essa foi incubada à 37°C. Após este período, o meio foi retirado, os poços foram lavados com tampão fosfato (pH 7,2), em seguida foram adicionados aos poços meio de cultivo contendo diferentes concentrações (1, 10, e 100 µg/mL) de própolis.

3) Virucida. Meios de de cultivo contendo os vírus foram incubados com a solução de própolis em diferentes concetrações (1,10, e 100 µg/mL) durante 1 hora. Após a incubação, o meio de cultivo do foi adicionado aos poços.

Após 48h de incubação de cada uma das condições os sobrenadantes foram coletados e congelados para posterior análise e o tapete celular foi lisado e analisado por reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para avaliação da atividade sobre o vírus da Rubéola (vírus padrão RA27/3), foi utilizada a diluição de  $10^{-3}$ , correspondente a TCID<sub>50</sub>% do vírus, e como modelo de infecção foi utilizada a linhagem SIRC. Para o vírus do Herpes (vírus padrão Mc Intyre) foi utilizada a diluição de  $10^{-7}$ , também correspondente à TCID<sub>50</sub>% do vírus, e como modelo de infecção a linhagem VERO foi utilizada. Para ambos os vírus, durante o teste, os meios foram suplementados com 2% de soro fetal bovino.

### 3.3.2 Quantificação do RNA mensageiro viral

Os sobrenadantes coletados e os tapetes celulares oriundos dos testes em placa foram processados de acordo com o seguinte protocolo para a determinação da quantidade relativa de RNAm viral dos vírus da Rubéola e do Herpes.

O DNA/RNA total de cultura infectadas com o vírus da Rubéola e Herpes e não infectadas, foi extraído com o PURELINK RNA/DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

A reação de qRT-PCR foi processada utilizando a Superscript III RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante, para amplificar um fragmento de 185 nucleótidos na região de codificação E1 (8807-8991pb) descritos por Abernathy et al. (2009). A reação foi realizada com reações de 25  $\mu$ L, contendo tampão de reação (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,5  $\mu$ l de enzima Superscript-*Taq*, 0,2  $\mu$ M de cada iniciador, 0,1  $\mu$ M de sondas marcadas (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 5  $\mu$ l de RNA. Este ensaio foi realizado em triplicata para cada amostra, incluindo o controle negativo de infecção. Utiliza-se o termociclador em tempo real Applied Biosystems 7500 com o programa 50°C por 10 min, 95°C por 2 min e 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. Como controle endógeno para assegurar a qualidade do RNA, será utilizado o par de iniciadores RNaseP RNA 15 (EMERY *et al.*, 2004). Quatro controles positivos com números de cópias conhecidos foram utilizados como padrões de quantificação. Os dados foram analisados com o software SDS (version 2.1 Applied Biosystems).

No PCR em tempo real quantitativo para Herpes, foi utilizado o par de iniciadores descritos por Read et al., (1999). Cada reação de 20 $\mu$ l contém 12 $\mu$ l de

SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA EUA), 10µM de cada iniciador, 6,5 µl de H<sub>2</sub>O e 5µl de cDNA. Para amplificação utiliza-se o programa: 94°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 30s, 57°C por 20s e 72°C por 40 segundos.

### **3.4 Microscopia Eletrônica**

#### **3.4.1 Análise ultraestrutural**

Monocamada de células SIRC ( células epiteliais de córnea de Coelho ATCC CL-60) e Vero ( células de rim de macaco verde africano ATCC CCL- 81) foram cultivadas em placas de 24 orifícios na concentração de 3x10<sup>5</sup> células/mL em meio DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA,USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 20mM L-Glutamina(Invitrogen, Carlsbad, CA,USA) sobre filme Aclar. Os cultivos, foram mantidos a 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub> em estufa automática. Após a formação da monocamada, o meio de cultura foi retirado e as células foram infectadas com os vírus padrões (Herpes e Rubéola) e com o preparo chamado de virucida (vírus incubado com própolis durante 1 hora antes da infecção). As células, foram novamente incubadas a 37°C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub> em estufa automática, durante 48 horas. Após este período, as células foram processadas nas seguintes etapas para análise de microscopia eletrônica (TANIWAKI et al., 1998).

- 1) Antes de fixação, o meio de cultura foi cuidadosamente retirado da monocamada celular e foram lavados em uma solução contendo tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 e sacarose 0,2M durante 5 minutos à temperatura ambiente (solução de lavagem).
- 2) Em seguida, o material foi fixado em solução de glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH72, durante 1 hora a 4°C.
- 3) Novamente o material foi lavado na solução de cacodilato descrita no item 1.

- 4) Após a lavagem, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% contendo 0,8% de ferricianeto de potássio, 5mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 durante 1 hora a 4°C.
- 5) A seguir, o material foi lavado novamente em solução descrita no item 1.
- 6) Em seguida, o material foi desidratado em gradiente de acetona ( 30% a 70%) durante 1 hora.
- 7) A etapa de pré- embebição foi processada em misturas de acetona e resina (1:1, 1:2, 1:3) durante 3 horas e a embebição em resina pura deu-se durante 24 horas. A resina utilizada para inclusão foi a Resina Embed 812 . As culturas foram incubadas em estufa a 60°C, durante 24 horas.

Os blocos foram cortados em ultramicrótomo LKB (Modelo 8800 Ultratome III), onde foram obtidos os cortes semifinos (1µm). Para a localização da região estudada e micrografada, cortes semifinos (1µM), foram obtidos dos blocos. Estes cortes semifinos foram corados a quente (aproximadamente 70°C) em solução de azul de toluidina 1% em carbonato de sódio 0,23M para posterior análise em microscópio óptico.

Cortes ultrafinos, prateados, com aproximadamente 70nm de espessura, foram obtidos no mesmo ultramicrótomo e contrastados por acetato de uranila a 2,0%, durante 30 minutos e por citrato de chumbo a 0,5% durante 10 minutos (REYNOLDS, 1963). Os cortes ultrafinos foram estudados e fotografados em um microscópio eletrônico Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol 1011.

### 3.4.2 Coloração Negativa

As amostras do sobrenadante das placas infectadas com os vírus padrões herpes e rubéola foram analisadas pela técnica de coloração negativa (BRENNER, et al, 1959). As grades revestidas com formvar/carbono sobre uma gota de Alcian Blue (Alcian Blue a 1% em ácido acético) foram incubadas por 10 minutos. Após a incubação, as grades foram lavadas em água destilada. Em seguida, foi adicionado sobre as grades, o sobrenadante das amostras para análise. Após 10 minutos, as

grades são lavadas com PTK (ácido fosfotúngstico de potássio a 2% pH 6,4). Retirar o excesso de corante e deixar secar para observar no Microscópio Eletrônico.

### **3.5 Separação e identificação dos componentes da fase aquosa do extrato da própolis de *Scaptotrigona postica***

#### **3.5.1 Análise de infravermelho com a transformada de Fourier**

A espectroscopia de infravermelho (IV) é um tipo de espectroscopia de absorção que usa a região do infravermelho do espectro eletromagnético. Como as demais técnicas espectroscópicas, ela pode ser usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra. A espectroscopia no infravermelho se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas. Para a determinação dos grupos funcionais dos principais constituintes do extrato de própolis foi realizada a análise por espectroscopia de infravermelho com a transformada de Fourier e celas de vidro para colocar as amostras líquidas. O equipamento utilizado foi o Bomem spectrometer operado a temperatura ambiente 25o C, fazendo a varredura nos comprimentos de onda de 4000 – 400 cm<sup>-1</sup> com uma resolução de 4 cm<sup>-1</sup>.

#### **3.5.2 Separação e análise de compostos por cromatografia de fase reversa acoplada à espectrometria de massas**

Alíquotas do extrato aquoso foram analisadas usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos em comprimentos de onda de 254 e 300 nm e detector de massa (CLAE-DAD-ESI-MS/MS). O aparelho utilizado foi o SPD-M10Avp (Shimadzu) equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD), acoplado a um espectômetro de massas (Bruker Daltonics, Esquire 3000 Plus), controlado pelo software CBM – 20<sup>a</sup> da Shimadzu. . O detector de massas utilizado é um quadrupolo íon-trap, equipado com uma fonte de ionização a pressão atmosférica através de uma interface com ionização electrospray. O

equipamento possui bombas LC20 AD, detector SPD 20A Forno CTD 20A e autoinjeter SIL 20AC, todos da Shimadzu. Utilizou-se uma coluna de fase reversa, C18, Phenomenex – Gemini (250 x 4,6 mm, 5 µm) empregando-se gradientes de solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila (B): O gradiente da corrida foi escalonado da seguinte maneira (Tabela 4):. O fluxo de solvente foi 1,0 mL/min e a temperatura da coluna foi 40 oC..A voltagem no capilar foi de 4000V, a pressão no nebulizador foi 27 psi, temperatura de secagem do fluxo foi 320° C e a velocidade do gás para a secagem do solvente foi de 7 L/min A caracterização dos constituintes foi realizada através das análises dos espectros de massas obtido por CLAE-DAD-ESI-MS/MS, através da comparação dos respectivos espectros (MS/MS) com dados da literatura.

**Tabela 4.** Esquema de escalonamento da cromatografia em fase reversa com a finalidade de separar compostos da própolis.

Tempo	Gradiente
5 min.	10% B - 90% A
10 min.	20% B - 80% A
15 min.	30% B - 70% A
20 min.	40% B - 60% A
25 min.	50% B - 50% A
30 min.	60% B - 40% A
35 min.	70%B - 30% A
40 min.	80% B - 20% A
50 min.	100% B
60 min.	10% B - 90% A

### **3.6 Análise Estatística**

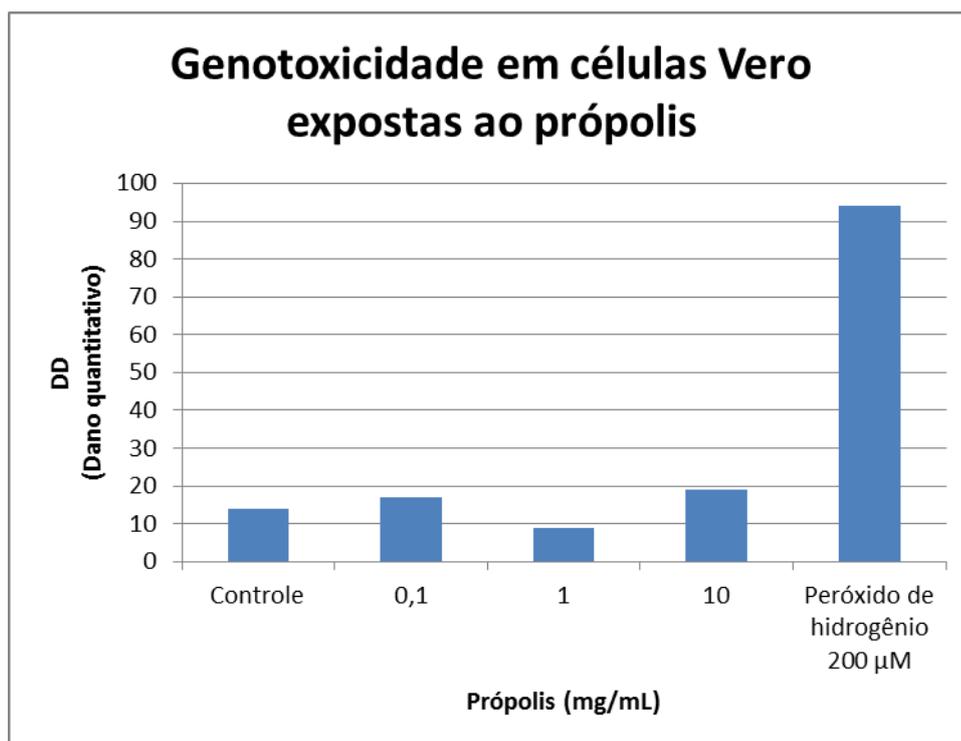
Para as análises estatísticas foi utilizado o *software* Exstat. Para a análise dos dados de viabilidade celular, gentoxicidade e atividade antiviral por quantificação de RNAm foi o utilizado o teste T-student com p valor corrigido por Bonferroni-Sidak.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade da fase aquosa da própolis sobre células VERO

No ensaio de MTT foi verificado que a exposição dos cultivos celulares à concentrações de até 2,5 mg/mL da fase aquosa do própolis não apresentaram nenhuma redução importante da viabilidade celular. Concentrações acima de 2,5 mg começam a apresentar redução gradativa da viabilidade.

O ensaio de genotoxicidade demonstrou a ausência de característica genotóxica na amostra de própolis.



**Figura 1.** Ensaio de genotoxicidade. A células após 90 min. de exposição às diferentes concentrações do extrato aquoso de própolis (0,1, 1 e 10 mg) e à 200µM de peróxido de hidrogênio como controle positivo de genotoxicidade, foram analisadas visualmente e classificadas de acordo com dano. A análise demonstrou diferença estatística entre o controle positivo de genotoxicidade e as diferentes concentrações de própolis.

## 4.2 Avaliação do efeito da própolis o sobre a replicação viral

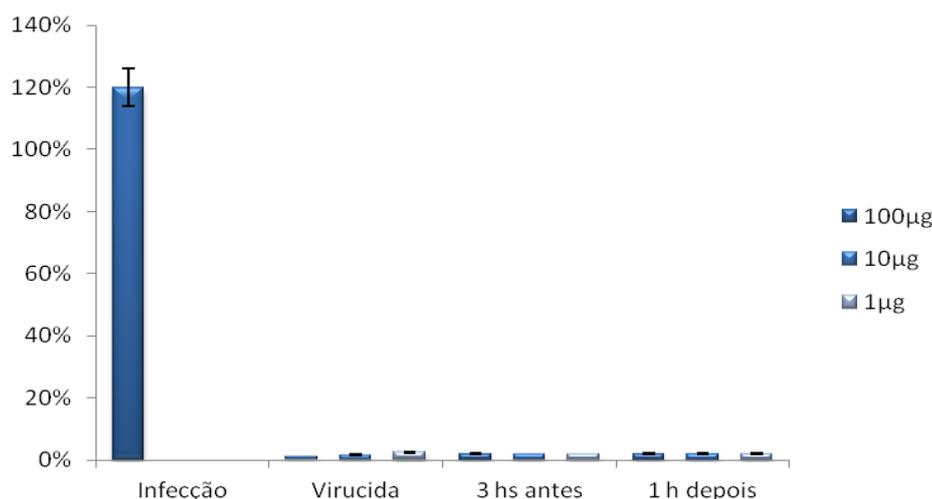
Para avaliação da atividade antiviral do extrato da própolis, bem como o mecanismo de ação, diferentes concentrações de própolis foram utilizadas (1,10 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em três condições distintas: adição de própolis 1 hora antes da infecção, adição de própolis 3 horas após a infecção e a condição virucida, onde o vírus foi incubado com a própolis 1 hora antes da infecção.

Nos experimentos com o vírus da Rubéola o tratamento com própolis reduziu de forma significativa o número de cópias de RNAm no sobrenadante, 20% (Fig.2) em todas as condições, porém, reduziu de forma ainda mais significativa a quantidade de RNAm no lisado celular (Fig.3); aproximadamente 98% em todas as condições.

Não houve diferença estatística do efeito observado entre as diferentes concentrações ou condições.

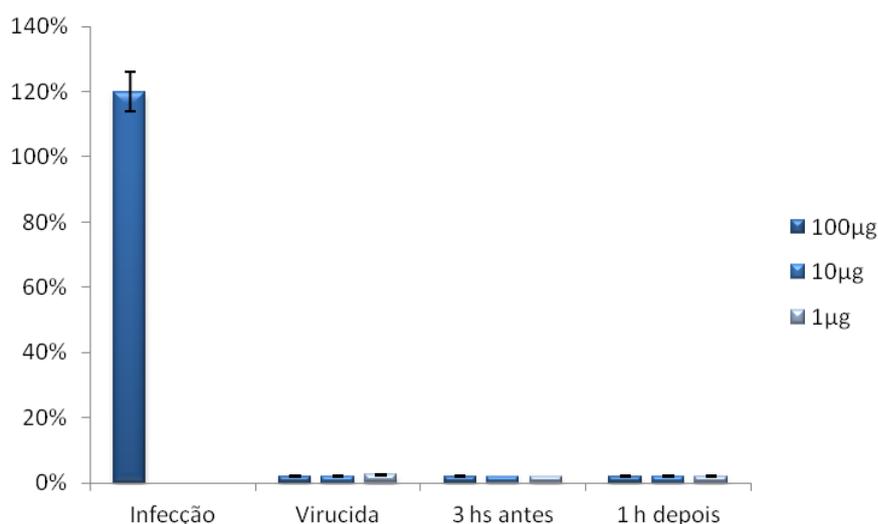


**Figura 2.** RT-PCR do vírus da rubéola. (Sobrenadante). Células SIRC foram tratadas com própolis em três condições distintas: 3h antes da infecção, 1h depois da infecção e a condição virucida (vírus incubado com a própolis por 1h antes da infecção) Todas as condições e concentrações foram estatisticamente diferentes do controle de infecção.



**Figura 3.** RT-PCR do vírus da rubéola. (Lisado Celular). Células SIRC foram tratadas com própolis em três condições distintas: 3h antes da infecção, 1h depois da infecção e a condição virucida (vírus incubado com a própolis por 1h antes da infecção). Todas as condições e concentrações foram estatisticamente diferentes do controle de infecção

Nos ensaios de atividade para vírus do Herpes também foram utilizadas as mesmas concentrações e condições do ensaio com o vírus da rubéola. Porém diferentemente da rubéola, o vírus do herpes apresentou redução de carga viral no sobrenadante (Fig. 5) tão significativa quanto à do lisado celular (Fig. 4) em todas as condições e concentrações. Todas as reduções foram de aproximadamente 98% da carga viral. Não houve diferença estatística do efeito observado entre as diferentes concentrações ou condições.



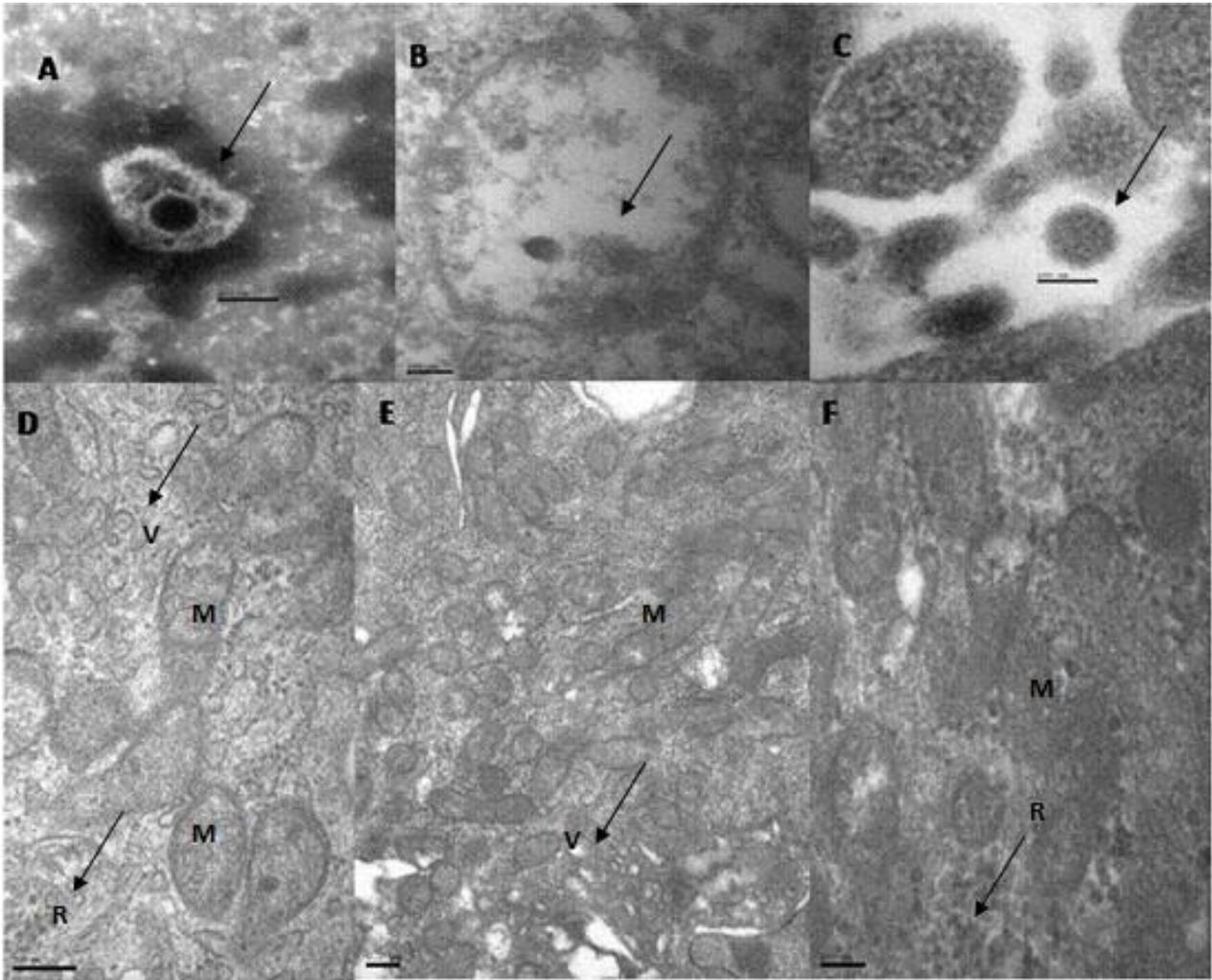
**Figura 4.** qPCR do vírus do herpes. (Lisado Celular). Células SIRC foram tratadas com própolis em três condições distintas: 3h antes da infecção, 1h depois da infecção e a condição virucida (vírus incubado com a própolis por 1h antes da infecção) Todas as condições e concentrações foram estatisticamente diferentes do controle de infecção.



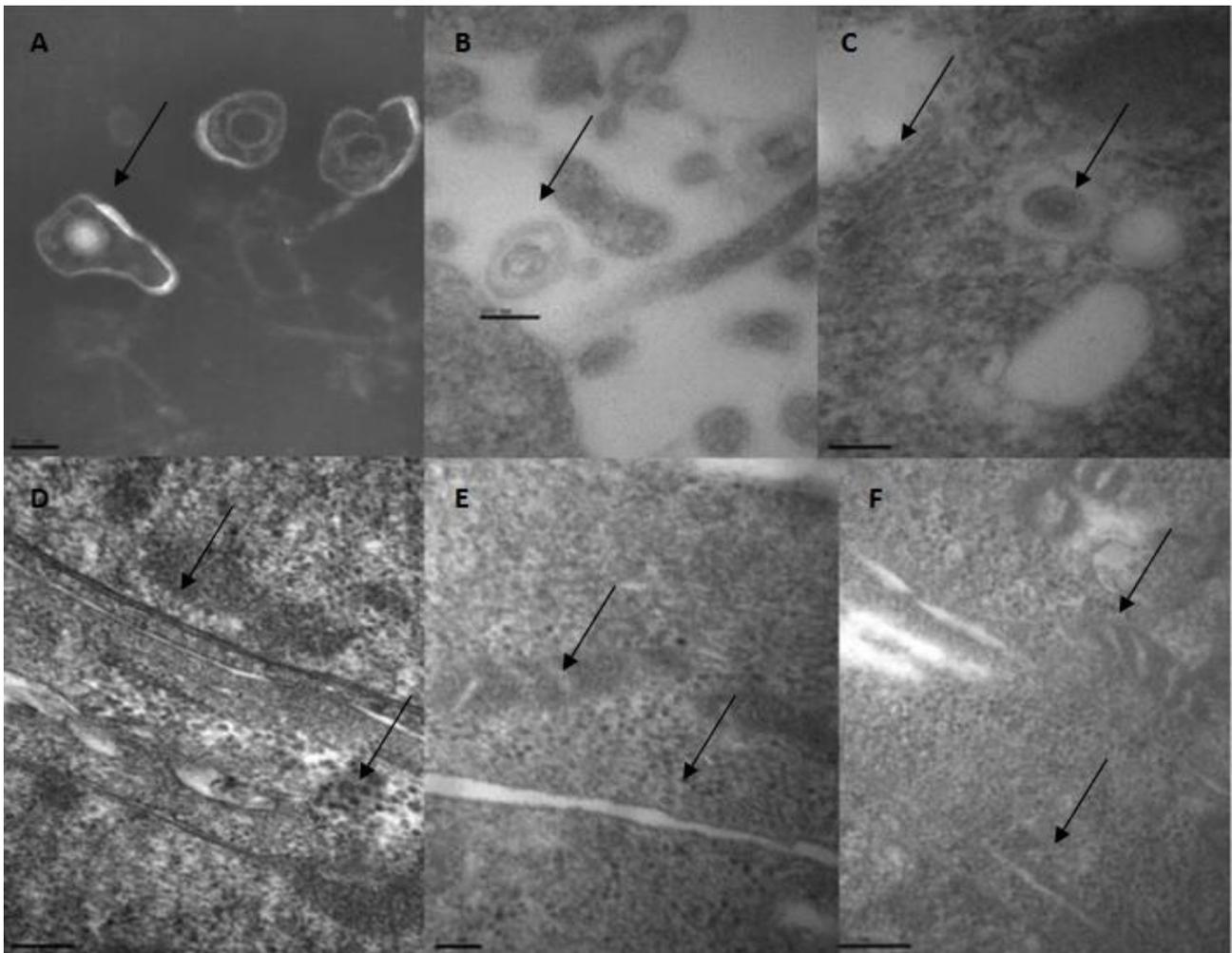
**Figura 5.** qPCR do vírus do herpes. (Sobrenadante). Células SIRC foram tratadas com própolis em três condições distintas: 3h antes da infecção, 1h depois da infecção e a condição virucida (vírus incubado com a própolis por 1h antes da infecção). Todas as condições e concentrações foram estatisticamente diferentes do controle de infecção

### 4.3 Microscopia Eletrônica

A microscopia eletrônica foi utilizada como ferramenta para avaliação de possíveis mecanismos de atividade antiviral, baseado na presença ou não de vírus



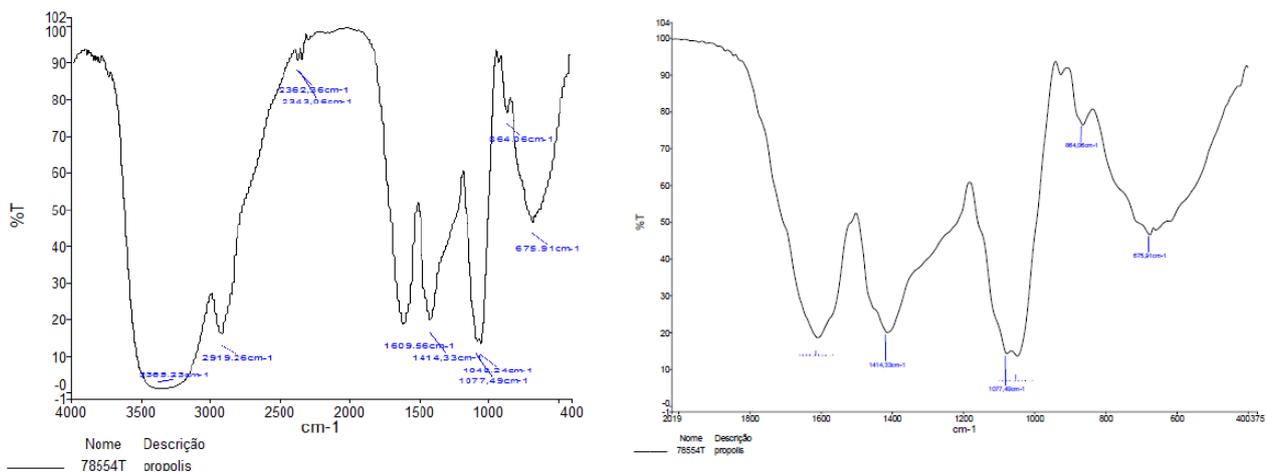
**Figura 6.** As células SIRC foram cultivadas sobre filme Aclar, e após 48h foram analisadas por microscopia eletrônica. Figura A - partículas do Vírus da Rubéola (VR) detectadas por microscopia direta do sobrenadante. B - É evidenciado um complexo replicativo típico, caracterizado pela presença de vesículas com inclusões filamentosas. C - Imagens representativas de partículas do VR. D= Células SIRC não infectadas, demonstrando a dinâmica natural do citoplasma, com a presença de vesículas, alta densidade de ribossomos livres e numerosas mitocôndrias. E – Células SIRC cultivadas na presença de própolis por 48h. Nota-se um aumento do número de mitocôndrias com zonas eletrodensas em suas intermembranas e também o aumento de vesículas. F – Células SIRC cultivadas em condição virucida. Nota-se um aumento do número de mitocôndrias, sendo que estas mitocôndrias se apresentam mais alongadas e com zona eletrodensa na faixa de intermembrana, é claro o aumento de ribossomos livres. Nenhum complexo replicativo ou VR foi encontrado. Bar= 200nm.



**Figura 7.** Células VERO infectadas cultivadas por 48h sobre filme Aclar, analisadas por microscopia eletrônica. A- Partícula viral do Herpes Virus detectada por microscopia eletrônica direta. B – Capsídeo dentro núcleo e partículas virais envelopadas entre a membrana externa e interna do núcleo. C – O tegumento arranjado simetricamente ao redor do capsídeo, e assimétrico em vírions extracelulares. D – Célula VERO não infectada, dinâmica natural do citoplasma. Denso acúmulo de ribossomos, vesículas e grande número de mitocôndrias. E – Células VERO tratadas apenas com própolis. F. Células VERO infectadas e tratadas com própolis. Mitocôndria alongada com zona eletrodensa na faixa intermembranar e aumento de ribossomos livres. Nenhum vírus foi encontrado. Bar= 200nm.

#### 4.4 Identificação dos compostos presentes na própolis

A análise de infravermelho da amostra de própolis teve como objetivo a elucidação dos grupos funcionais presentes no extrato a fim auxiliar na resolução das estruturas obtidas no espectro de massas. A análise de infravermelho obteve o seguinte perfil:



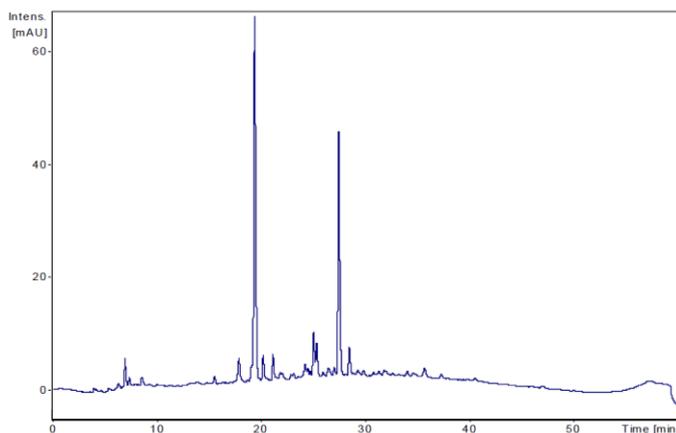
**Figura 8.** Espectro de infravermelho da fase aquosa do extrato da própolis de *Scaptotrigona postica*

Os picos identificados se encontram na Tabela abaixo, O espectro de infravermelho mostrou bandas em 3365 cm<sup>-1</sup> indicando a presença de grupos OH e NH, 2949 cm<sup>-1</sup> – presença de cadeias carbônicas, 2362 cm<sup>-1</sup> - presença de ligação CN, 1609 cm<sup>-1</sup> – presença de carbonila (C=O) conjugada com dupla ligação (C=C). 1414 cm<sup>-1</sup> – presença de ligações (C=C), anéis aromáticos, 1077 cm<sup>-1</sup> – presença de ligações C-O; 1048 cm<sup>-1</sup> – presença de ligações C-O e 864 – 675 cm<sup>-1</sup> – presença de anéis aromáticos

**Tabela 5.** Picos identificados na análise de infravermelho da fase aquosa do extrato da própolis

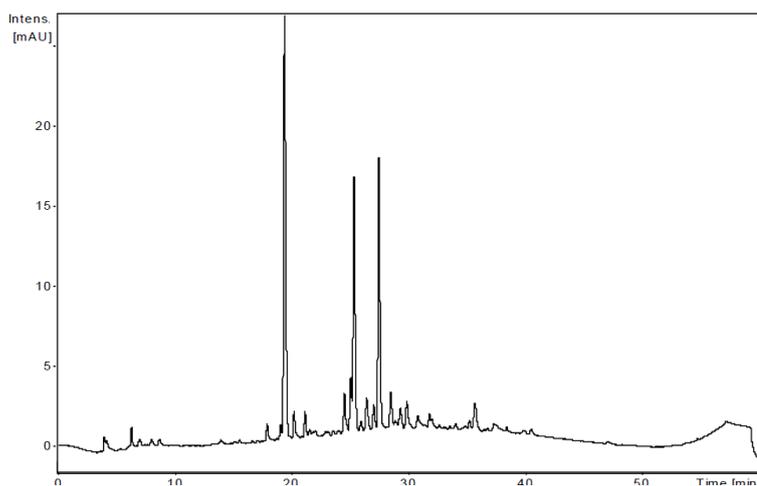
Nome do pico	X	Y
1	3365,23	1
2	2919,26	16,05
3	2362,36	91,04
4	2343,06	91,15
5	1609,56	18,55
6	1414,33	19,96
7	1077,49	14,26
8	1048,24	13,57
9	864,06	76,54
10	675,91	46,6

A cromatograma de amostras de extrato aquoso de própolis com detecção por DAD, com comprimento de 245 nm, detectou como principais constituintes as substâncias com tempos de retenção de 19,0 e 27,7 minutos de retenção.



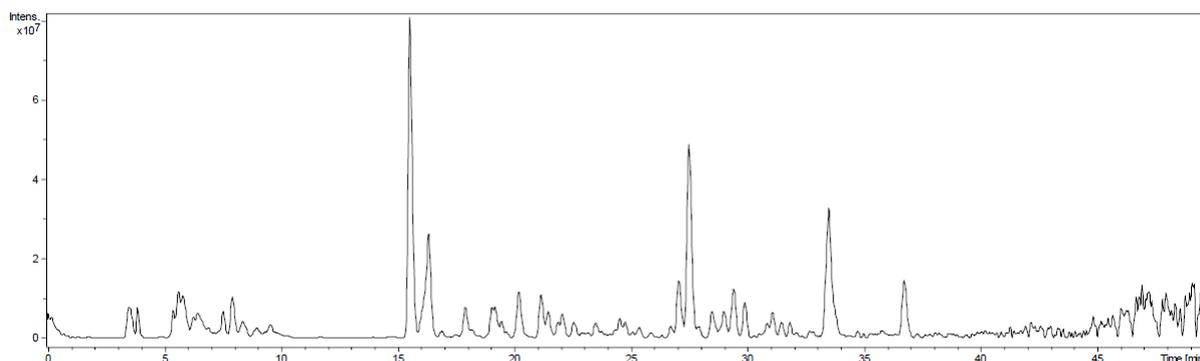
**Figura 9.** Cromatograma monitorado por DAD à 254 nm de amostras de extrato aquoso de própolis. Principais picos : 19 e 27, 7 min de retenção.

A cromatograma de amostras de extrato aquoso de própolis com detecção por DAD, com comprimento de 300 nm, detectou como principais constituintes as substâncias com tempos de retenção de 19,0 e 27,7 minutos de retenção, como foi observado em 254 nm, porém mostrou um pico em 25.0 minutos. O qual não foi observado no cromatograma anterior.



**Figura 10.** Cromatograma monitorado por arranjo diodo (DAD) à 300 nm de amostras de extrato aquoso de própolis. Principais picos, 19, 25 e 27,5 min de retenção.

O cromatograma de amostras de extrato aquoso de própolis detectado utilizando ESI-MS no modo positivo apresentou como compostos majoritários, os compostos com de 15, 15.5, 16.0, 27.5 e 33.5 minutos de retenção. Com exceção do pico em 27.5 minutos, os outros picos não foram observados nos cromatogramas obtidos por DAD. utilizando os comprimentos de onda de 254 e 300 nm.



**Figura 11.** Cromatograma dos picos obtidos por detectados por ESI-MS modo positivo. Principais picos, 15,5, 16., 27,5 e 33.5 minutos de retenção.

A interpretação dos espectros de massas, aliado aos tempos de retenção da cromatografia e os grupos funcionais evidenciados na análise de infravermelho foram utilizados para sugerir a estrutura dos compostos listados na tabela 6 abaixo.

**Tabela 6.** Tabela de espectro de massas com os respectivos padrões de fragmentação, substância sugerida, e relatos da literatura.

	Rt	[M + H] <sup>+</sup> m/z	MS/MS m/z	Suggested structure	references
1	3.9	443	291	catequina galato	Guilhon-Simplicio e Pereira (2011)
2	5.6	707	365	heptaidroxi-7-metil flavonol cafeoil glucosideo	
3	15.0	430	412, 385, 367, 315	Fenil etllamina arabinosil	Pode ser um alcalóide

				glucuronideo	
4	15.5	444	426, 399	Fenil etllamina raminosil glucuronideo	Pode ser um alcalóide
5	16.0	592	574, 556, 538, 508	Fenil etllamina arabinosil glucosil glucuronideo	
6	16.5	619	601, 583, 565, 535	metil apigenina acetil diraminosideo	
7	17.9	[M + Na] <sup>+</sup> 865 [M + H] <sup>+</sup> 843	825, 807, 789, 771, 723, 705	isomero apigenina-6,8-di- C-glucosil malonil glucosideo ou vicenina malonil glucosideo	
8	19.2	[M + Na] <sup>+</sup> 865 [M + H] <sup>+</sup> 843	825, 807, 789, 771, 723, 705, 687	isomero apigenina-6,8-di- C-glucosil malonil glucosideo	
9	20.2	[M + Na] <sup>+</sup> 865 [M + H] <sup>+</sup> 843	825, 807, 789, 771, 723, 705, 687	isomero apigenina-6,8-di- C-glucosil malonil glucosideo	
10	20.4	[M + H] <sup>+</sup> 857	839, 803, 737, 719	metil apigenina- C-malonil glucosideo-C- diglucosideo	
11	21.1	[M +	825, 807, 789, 771,	isomero	

		Na] <sup>+</sup> 865 [M + H] <sup>+</sup> 843	723, 705, 687	apigenina-6,8-di- C-glucosil malonil glucosideo	
12	22.6	563	417	metil apigenina arabinosil rhamnosideo	
13	24.5	[M + Na] <sup>+</sup> 865 [M + H] <sup>+</sup> 843	825, 807, 789, 771, 723, 705	isomero apigenina-6,8-di- C-glucosil malonil glucosideo	
14	27.0	[M + Na] <sup>+</sup> 617 [M + H] <sup>+</sup> 595	577, 559, 541, 529, 511, 499, 475, 457	vicenina-2	Barreca et al., 2013
15	27.5	867	445	apigenina-C- acetil arabinosideo-O- diacetil feruloil glucosideo	
16	28.0	459	441	apigenina-C- acetil raminosideo	
17	28.5	565	547, 529, 511, 427	apigenina-6,8-di- C-arabinosil glucosideo	Barreca et al., 2013
18	29.4	547	401	crisina-C- raminosil-O- raminosideo	
19	29.8	517	355, 337	ácido 3,4- dicafeoilquinico	

20	31.0	595	577, 567, 551	Luteolina-C- arabinosil glucuronideo	
21	31.4	487		Isômero do ácido cafeoilquinico arabinosideo	
22	33.4	487		Isômero do ácido cafeoilquinico arabinosideo	

As estruturas destacadas em vermelho ainda não estão totalmente elucidadas.

## 5. DISCUSSÃO

Os ensaios de PCR foram realizados para a detecção de atividade antiviral, e as diferentes condições do ensaio foram utilizadas para determinar em qual passo da replicação viral que o extrato possui atividade. A condição de incubação da própolis 3 horas antes da infecção tem como foco os processos de adsorção e penetração viral. A incubação 1 hora após a infecção tem como foco os processos transcricionais, traducionais, montagem e liberação de vírus, e por fim o preparo denominado virucida foi utilizado para avaliar a ação direta do extrato sobre a partícula do vírus.

Não existem dados na literatura sobre atividade de própolis contra o vírus da rubéola, porém existem dados da ação de própolis sobre vírus que possuem o mesmo tipo de material genético e constituição estrutural (RNA fita simples de polaridade positiva e envelopado).

O poliovírus, da família picornaviridae, apesar de ser desprovido de envelope, possui RNA simples fita com polaridade positiva como genoma. Amoros e seu grupo em 1992 averiguaram que o extrato de própolis da região de Renne na França possui ação sobre a replicação do vírus da poliomielite do tipo 1.

Mais recentemente foi estudada a atividade anti-poliovírus em relação à própolis verde brasileira. Por meio dos experimentos, constataram que a própolis atua bloqueando parcialmente a entrada do vírus nas células, o ciclo de replicação viral, e levam a degradação do RNA viral após a entrada do vírus na célula ou depois da sua liberação para o sobrenadante do meio cultivo. Em suma, atua de forma eficaz em todos os passos da replicação viral (BUFALO, *et al.*, 2009).

Outro vírus semelhante estudado em relação ao extrato de própolis é o calcivírus felino, assim como o polivírus, também é desprovido de envelope e possui material genético similar ao do vírus da rubéola. O estudou, avaliou o mecanismo de ação da própolis sobre o vírus, e os autores relatam atividade apenas na condição de tratamento com própolis após a infecção (CUETO, *et al.*, 2011).

Um vírus já mais parecido estruturalmente com o vírus da rubéola, o Vírus da Diarréia Bovina, possui envelope e tem como material genético RNA de fita simples de polaridade positiva também, e é usado como modelo de estudo do vírus da hepatite B. Os experimentos demonstraram que tanto utilizando a própolis antes

infecção, quanto após a infecção, é detectada atividade antiviral, todavia é mais pronunciada a atividade quando a própolis é incubada com a célula antes da infecção, esses dados indicam que apesar desta própolis atuar pontos distintos da infecção tem como mecanismo ação principal a interação do extrato com as células (CUETO, *et al.*, 2011).

Os experimentos de RT-PCR demonstraram diminuição tanto no sobrenadante (20% em média) como no lisado celular (98% em média), sendo que todas as condições testadas foram eficazes em inibir a replicação viral, e o efeito não variou entre as diferentes concentrações.

Assim como descrito para poliovirus no trabalho de Búfalo e colaboradores em 2009, a própolis atua em todos os níveis de replicação do vírus da rubéola, porém, em vista da diferença de redução do sobrenadante em relação a redução do lisado celular, o que se infere, é que provavelmente a interação do extrato da própolis se dê diretamente com a célula, modulando suas funções e metabolismo do que com o vírus propriamente dito.

A atividade antiviral de diferentes própolis sobre o vírus do herpes é bem descrita, em 1985 Koing e Dustmann relatavam que compostos cafeólicos eram promissoras moléculas detentoras de atividade antiviral, em seus testes, foi avaliado o potencial destes compostos contra herpes aviários de diferentes aves, e os experimentos demonstraram inibição. Compostos cafeólicos são comumente encontrados em alguns tipos de própolis.

Mais adiante, no ano de 1990, Debiaggi e colaboradores avaliaram o potencial anti-herpético de cinco flavonoides isolados de própolis, e averiguaram que as substâncias crisina e canferol inibiam a replicação do vírus do herpes, enquanto a quercetina, outro composto testado, demonstrou não só a capacidade de inibir a replicação, mas também a penetração do vírus na célula.

Sabendo-se que flavonoides possuem ação contra herpes, um estudo foi realizado acerca da atividade flavonóis e flavonas isoladamente, e também de alguns sistemas mistos de flavona/flavonol, e foi averiguado que o sistema flavona/flavonol é muito mais eficaz que as moléculas isoladas, e que quanto mais hidroxilado é o flavonoide, maior é o potencial antiviral (AMOROS, *et al.*, 1992).

Em 1994, uma vez já descrito que os compostos cafeólicos tem boa ação contra o vírus do herpes, Amoros e seus colaboradores testam um cafeato em

diversas condições afim de definir o mecanismo pelo qual ele inibe a replicação viral, e descobrem que este composto atua diretamente sobre a replicação viral, sem afetar a penetração do vírus na célula.

Um trabalho avaliou a diferença de pacientes portadores do herpes tipo 2 tratados com aciclovir, contra pacientes que foram tratados com uma pomada que possuía extrato de própolis em sua composição. O resultado demonstrou que o grupo que utilizou a pomada de própolis teve uma melhora muito mais rápida das lesões, e um número muito menor de infecções secundárias quando comparado ao pacientes tratados com aciclovir, medicamento de escolha para o tratamento de herpes (YVNOGRAD, *et al.*, 2000).

No ano de 2002, Huleilel e Isanu avaliam o mecanismo de ação da própolis oriundo de Israel, e averiguam que células tratadas com o extrato 2h após a infecção alcançam uma redução de 80-85% em relação ao controle de infecção viral.

Posteriormente Schnitzler e colaboradores na tentativa de esclarecer os mecanismos da ação anti-herpética da própolis oriunda da República Tcheca, contra o vírus do herpes tipo 1, constatou que o pré-tratamento do vírus 1 hora antes com a própolis, garante uma maior atividade antiviral, reduzindo em mais de 98% do efeito do vírus. No entanto, para o herpes do tipo 2, em outro trabalho do mesmo grupo, a condição de pré-tratamento do vírus (virucida) demonstrou-se a melhor condição (NOLKEMPER *et al.*, 2010).

Em vista dos resultados obtidos nos experimentos de PCR, onde todas as condições e concentrações testadas demonstraram grande potencial em reduzir o número de cópias de RNAm viral, pode-se afirmar que a própolis em estudo possui atividade antiviral.

Diferentemente da rubéola, a diminuição do número de cópias virais do vírus do Herpes no sobrenadante foi similar a redução do lisado celular, indicando importante efeito sobre a replicação deste vírus.

Analisando os dados da literatura, observa-se que própolis de localidades distintas atuam em pontos diferentes da replicação viral, enquanto a própolis de Israel possui grande atividade quando incubada 2h após a infecção (Huleilel Isanu, 2002), a própolis da República Tcheca possui atividade ótima quando incubada com as células 1h antes da infecção (SCHNITZLER, *et al.*, 2010).

Na revisão de bibliografia, não foram encontrados estudos com própolis que relatassem grande atividade inibitória em todos os estágios da replicação viral, nem mesmo no caso de substâncias isoladas, como a crisina, quercetina ou mesmo cafeatos.

O efeito observado nos experimentos não apresenta dose-dependência, todas as concentrações testadas apresentaram efeitos antivirais estatisticamente iguais. O que torna este extrato uma ótima fonte de estudos, uma vez que é possível que existam compostos que atuem em variados pontos da replicação viral.

Nos experimentos de microscopia eletrônica os resultados sugerem que a própolis inibe a replicação do vírus da rubéola. Algumas características da replicação do vírus da rubéola na linhagem SIRC foram comparadas com as SIRC infectadas com vírus pré-tratados durante 1h com a fase aquosa da própolis. Na infecção controle, após 48 h foi possível observar complexos de replicação típicos, e a presença de partículas virais.

Estudos sobre a morfogênese do vírus da rubéola reportam a presença de vacúolos intracitoplasmáticos durante o processo de maturação viral (LEE & BOWEDN). Há aproximadamente uma década atrás foi descrita uma ligação direta entre mitocôndrias e a replicação do vírus, sugerindo que os sítios de replicação requerem grande energia, uma vez que são ponto chave na replicação viral, sendo que as zonas eletrodensas intermembranares que surgem durante o processo infeccioso, parecem para criar ligações quase contínuas entre complexos de replicação do vírus e as mitocôndrias.

Em nosso estudo, também foram encontradas mitocôndrias com aparência alongada com a presença de zonas eletrodensas, tanto em células infectadas, como em células infectadas com o vírus tratado com própolis.

Em termos de sobrevivência e proliferação celular, a infecção pelo VR é regulada por uma série de genes envolvidos no crescimento e proliferação celular, bem como a sinalização. Recentemente, foi demonstrado que a infecção de células RK13 RV aumentou a fosforilação de componentes da via da Ras- Raf - MEK - ERK, sugerindo que o crescimento celular normal é necessário para a produção de vírus eficiente (COORAY, *et al.*, 2005) . Além disso, os interferons, alfa e gama, possuem a capacidade de inibir a replicação do víal, reduzindo os níveis de RNA do vírus na célula e conseqüentemente a tradução viral. Curiosamente, Stanwick e Hallum

(1974) verificaram que células com infecção persistente pelo vírus da rubéola [ BHK ( hamster ), RK13 ( coelho ) , e HeLa ( humano )], sendo que essas células não possuem receptor para interferons do tipo 1, não tiveram o quadro de infecção persistente revertido com a adição de INF exógeno ao meio de cultivo. Nossos resultados são consistentes com experimentos anteriores de que extrato de própolis não teve impacto direto sobre o vírus da rubéola, mas pode induzir alterações celulares internas que podem afetar a replicação do vírus, como por exemplo, através da interação com IFN ou com NF-kB ( HULEIHEL et al. , 2001).

Nos experimentos de microscopia com o vírus do herpes, Os dados indicam que a própolis inibe a replicação do vírus de herpes. Algumas características de replicação do HSV em células VERO, incluindo a replicação viral e produção de partículas infecciosas, foram comparadas com as células tratadas com própolis.

HSV - 1 e HSV - 2 são antigos agentes patogênicos humanos responsáveis por um inúmeras desordens, que incluem ulcerações orais e genitais , cegueira, encefalites, e infecções disseminadas de recém-nascidos. Em todo o mundo, a prevalência global de HSV-1 é de aproximadamente 90%, com uma prevalência de cerca de 65% nos EUA e na Europa do norte ( XU et al , 2002; PEBODY *et al.* , 2004).

HSV - 1 e HSV - 2 utilizam vários complexos de receptores de glicoproteína ao entrar nas células hospedeiras. Ambos expressam as glicoproteínas gB, gC e gD, Geh e gL. Todas, exceto gC, são essenciais para a entrada da célula hospedeira, embora a ausência de gC reduza a eficiência. gC é a glicoproteínas que realiza o primeiro contato com a célula hospedeira, ligando-se se ao sulfato de heparina (HS) proteoglicanos na superfície celular (BERNARD et al . , 2007) . O vírus do herpes inicialmente pode entrar nas células através de algumas vias: fusão do envelope com a membrana plasmática, e via dependente da interação com receptores específicos na superfície da célula e a segunda, via auxiliar envolve a endocitose da cápside do envelope e a fusão dependente do receptor do envelope com a membrana da vesícula endocítica.

Ambas as vias possuem uma ligação inicial reversível com a célula hospedeira (BERNARD et al. , 2007) . O primeiro passo na entrada, a interação reversível do envelope do vítrion com a superfície da célula envolve a ligação do virião de gC e gB de glicosaminoglicanos da superfície celular (GAG) . Neste estudo,

verificou-se que, própolis apresentam efeito inibitório seletiva contra HSV-1. Quatro prováveis mecanismos podem ser deduzidos para explicar o efeito anti-viral: bloqueio da ligação virai aos receptores da célula na etapa de uma infecção por vírus ; atenuação de replicação viral após a entrada ; (O'NEILL et al , 2003) inibição da libertação de vírus a partir de células hospedeiras (NICOLL et al , 2012) , e ( READ & KURTZ , 1999) redução de citocinas inflamatórias geradas pela infecção de vírus . Os resultados mostraram os efeitos antivirais com o tratamento de pré-incubação, além disso, os dados corroboram com os resultados obtidos por qPCR in vitro .

Assim, a ação inibitória da própolis sobre a replicação viral pode ser através da ativação do IFN. Recentemente, Melchjorsen et al (2009) mostrou que a primeira resposta das células infectadas por HSV é a secreção de substâncias anti-virais tais como as defensinas e óxido nítrico e IFN. Os IFNs do tipo I, IFN-  $\alpha\beta$ , são citocinas importantes produzidas dentro das primeiras horas após a infecção HSV. Estudos in vivo mostram que a adição exógena de IFN- $\alpha\beta$  é capaz de controlar a infecção precocemente por HSV independentemente do linfócito natural killer (NK) e atividade de outros linfócitos (BERNARD et al. , 2007) .

Embora algumas melhorias terapêuticas e de diagnóstico para o controle do HSV tivessem se desenvolvido durante os últimos anos, o vírus não está sob controle. O resultado da infecção por HSV é dependente do equilíbrio entre a propagação de vírus e uma resposta imune eficaz. A expressão adequada de IFNs, citocinas e quimiocinas são essenciais para a defesa do hospedeiro eficiente contra a infecção. Provalvemente, o mecanismo de própolis é ativado expressão de moléculas antivirais como os IFN  $\alpha\beta$ .

A cromatografia acoplada a massas revelou 22 compostos na fase aquosa do extrato da própolis, e muitos deles, já possuem na literatura a descrição de atividade antiviral.

Os resultados obtidos por cromatografias DAD e ESI-MS no modo positivo indicam que os principais constituintes encontrados são pico em 19.0 isomero apigenina-6,8-di-C-glucosil malonil glucosideo ou vicenina malonil glucosideo (detecção com UV em 254 nm e 300 nm); pico em 25.0 minutos outro isômero apigenina-6,8-di-C-glucosil malonil glucosideo ou vicenina malonil glucosideo (detecção com UV em 300 nm) e um pico em 27.5 minutos, apigenina-6,8-di-C-

glucosídeo conhecido como vicenina-2 (detecção com UV em 254 nm e 300 nm e ESI-MS no modo positivo). O cromatograma obtido por ESI-MS no modo positivo, mostrou como principais constituintes, com exceção do vicenina-2, picos não encontrados como principais constituintes nos cromatogramas obtidos por DAD usando comprimentos de onda de 254 nm e 300 nm.

Flavonas derivadas da apigenina, tais como, isômeros de apigenina-6,8-di-C-glucosil malonil glucosídeo, provavelmente isômeros da vicenina malonil glucosídeo foram detectadas em vários picos, 19,2, 20,2, 21.1 e 24.5 minutos. Estas substâncias mostraram a molécula protonada em m/z 843, e a molécula sodiada em m/z 865. No espectro de MS/MS a fragmentação da molécula protonada (m/z 843) ocorre através da perda de moléculas de água produzindo fragmentos em m/z 825, 807, 789, 771, 723, 705, o que indica a presença de glucose ligada a aglicona (apigenina) através de ligações carbono-carbono. Além desses derivados da vicenina malonil glucosídeo também foi detectada a presença da apigenina-6,8-di-C-arabinosil glucosídeo no tempo de retenção de 28.5 minutos, mostrando a molécula protonada em m/z 565 e fragmentos provenientes da perda de moléculas de água (18 u) em m/z 547, 529, 511 e m/z 427. Um dos principais constituintes deste extrato de própolis, o qual foi detectado em 27.0 minutos por ESI-MS e por DAD em 254 e 300 nm, a apigenina-6,8-di-C-glucosídeo conhecido como vicenina-2, mostrou a molécula protonada em m/z 595, a qual fragmentou produzindo fragmentos provenientes da perda de moléculas de água (18 u) em m/z 577, 559, 541, 529, 511 e m/z 409, o que está de acordo com o espectro de MS/MS no modo positivo da vicenina-2 publicado por Barreca e colaboradores em 2013.

Há muito tempo já é conhecida a atividade antiviral da apigenina, em 1994, um estudo averiguou que este composto é capaz de inibir o vírus do HIV (HU, *et al.*, 1994), posteriormente se descobriu que a apigenina é capaz de modular a replicação do vírus reduzindo os níveis do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), e possui uma toxicidade muito baixa em relação aos outros flavonoides testados no mesmo experimento (CRITCHFIELD, *et al.*, 1997).

Em 2005, foram isolados compostos de duas espécies de plantas, as apigeninas, com o intuito de pesquisar o potencial antiviral dos mesmos. As apigeninas foram testadas contra o vírus da hepatite B, demonstrando capacidade

de reduzir o número de cópias de DNA por inibir a replicação do vírus (Li, *et al*, 2005).

Kanerva e colaboradores, em 2007, avaliaram o efeito da combinação da apigenina com o medicamento clorpromazina sobre o adenovírus, e observaram sinergia entre as duas moléculas em inibir a replicação do vírus. Posteriormente, um estudo sobre o potencial antiinfluenza de um extrato identificou a apigenina como o composto isolado mais potente em inibir a neuramidase do vírus influenza (LIU, *et al*, 2008).

Para a substância detectada em 3.9 min, o espectro de ESI-MS/MS mostrou a molécula protonada em m/z 443 e um fragmento em m/z 291, a qual corresponde a molécula de catequina protonada e é obtido através da perda de 152 u (grupo galato), sendo sugerido como catequina galato através de comparação com o trabalho realizado por Guilhon-Simplicio e Pereira (2011) .

Em 1992, um grupo avaliando o potencial de inibição de alguns componentes do chá verde, relatou que algumas catequinas presentes no chá, epigalocatequina-3-galato (EGCG), epicatequina-galato (ECG) e epigalocatequina (EGC), foram capazes de inibir a transcriptase reversa do vírus do HIV, inibiram a replicação do vírus da hepatite B de pato, e também a DNA polimerase do herpesvírus tipo 1 (TZAO, *et al.*, 1992).

Posteriormente, um trabalho que avaliou o potencial anti-HIV do EGCG sobre cultura de linfócitos periféricos, demonstrou 100% de inibição da infecção pelo vírus à concentração de 50 uM do composto (FASSINIA, *et al.*, 2002). Liu, e colaboradores em 2005 relataram que catequinas tem a capacidade de interferir na no processo de fusão do vírus do HIV com a célula tendo com alvo a glicoproteína gp41.

Nance e seu grupo, por meio de experimentos comprovaram no de 2008, que o EGCG se liga ao receptor CD4 do linfócito T, e assim, bloqueia a interação CD4/gp120, e conseqüentemente impedindo a infecção da célula pelo vírus. Em 2009 Hauber e colaboradres, avaliaram o potencial da epigalocatenina-3-galato sobre uma via pela qual a infecção do HIV é facilitada a partir de substâncias presentes no sêmen humano. O composto EGCG foi capaz de inibir a replicação do vírus do HIV interferindo nesta via de sinalização.

Um estudo avaliando o potencial de catequinas inibirem a integrase do vírus do HIV demonstrou que catequinas que possuem o motivo galoil em sua estrutura, possuem grande potencial de inibição, o mecanismo inibitório é explicado pela ligação do motivo galoil com a treonina 143 e à glicina 148 da proteína, o que bloqueia sua atividade (JIANG, *et al*, 2010).

O vírus da Hepatite C é de grande importância para a saúde pública, assim como o HIV, e pesquisadores testando o EGCG contra esse vírus, descobriram que a molécula inibe a entrada do vírus na célula independentemente do genótipo testado, sendo que o pré-tratamento das células com o composto não confere proteção as células, em contrapartida, a adição da molécula logo após a infecção protege de maneira significativa as células (CIESEK, *et al*, 2010). Anteriormente, em 2008, Xu e seu grupo haviam demonstrado que o mesmo composto inibia também a replicação do vírus da Hepatite B.

No ano de 1993, Nakayama e colaboradores pesquisaram a atividade anti-influenza mediada por polifenóis oriundos de chás, e descobriram que o EGCG se liga a hemaglutinina do vírus impedindo a infecção da célula hospedeira. Posteriormente, em 2005, é descoberto que as catequinas EGCG e ECG inibem tanto a replicação do RNA, quanto a liberação de novos vírus e dentro das células (SONG, *et al.*, 2005). Kuzuhara e seu grupo, estudando outros aspectos da inibição da transcriptase reversa do vírus influenza frente a catequinas de chá, averiguaram que catequinas que possuem o grupo galoil em sua estrutura, inibem a atividade de endoRNase da proteína, característica desta enzima que tem a função de degradar o RNAm da célula hospedeira (KUZUHARA, *et al.*, 2009)

Harakeh e seu grupo de pesquisa, em 2008, avaliaram o potencial antiviral do EGCG frente ao vírus HTLV-1, e utilizando linhagens celulares leucêmicas e não leucêmicas, relatam que as células infectadas, frente ao EGCG entram em apoptose e sofrem parada de ciclo celular como mecanismo antiviral.

O EGCG foi testado contra o herpes do tipo 1 e 2 em uma pesquisa no ano de 2008, e o composto foi capaz de interagir com o vírion de ambos os tipos e de reduzir em 10.000 vezes a infectividade do tipo 2 e 3.000 vezes do tipo 1. A molécula foi capaz de reduzir em 99% a infectividade de isolados clínicos dos vírus do tipo 1 e 2, e em estudos de microscopia eletrônica foi possível observar dano no envelope viral de vírions expostos ao EGCG (ISAACS, *et al.*, 2008).

O EGCG foi testado contra o rotavírus humano e o enterovírus, o primeiro, causador de gastroenterites graves em crianças, o segundo, presente em quadros de meningites. A EGCG presente no chá estudado, foi eficaz em reduzir 100% da infecção por 8 tipos distintos de rotavírus e pelo enterovírus também, a redução das cópias de vírus cursou com a redução de espécies reativas presentes nos meios de cultivo (MUKOYAMA, *et al.*, 1991). Werber e colaboradores, em 2003, comprovaram a inibição da montagem dos vírions de adenovírus, quando expostos a catequinas.

Duas outras flavonas foram detectadas em 29.4 e 31.0 minutos. O espectro de massas da substância detectada em 29.4 minutos mostrou a molécula protonada em  $m/z$  547 minutos e um fragmento em  $m/z$  401, indicando a perda de raminose (146 u). Este constituinte do extrato foi sugerido como crisina-C-raminosil-O-raminosideo, o outro com um tempo de retenção de 31.0 minutos apresentou a molécula protonada, em  $m/z$  595, e mostrou um padrão de fragmentação diferente da vicenina, mostrando fragmentos provenientes da perda de água (18 u) e da perda de 30 unidades de massa atômica em  $m/z$  577, 567 e  $m/z$  551. Esta molécula foi sugerida como Luteolina-C- arabinosil glucuronideo.

A crisina, possui algumas atividades antivirais já descritas, em 1994, Hu e colaboradores avaliaram o potencial de compostos oriundos do *Chrysanthemum morifolium* sobre o vírus do HIV, e na análise, descobriram que a molécula com o maior potencial de inibição do extrato era a crisina, que à concentração de 35  $\mu$ M foi capaz de reduzir em 50% a quantidade de antígeno p24 em relação ao controle viral.

Diferentemente de outros flavonoides, a crisina não interage com a transcriptase reversa ou com a integrase do vírus do HIV, e inibe fracamente a protease. Experimentos em cultivo celular demonstraram que a crisina reduz os níveis de TNF- $\alpha$  e PMA de células infectadas pelo vírus do HIV, e estas atividades tem correlação com a atividade inibitória sobre o vírus (CRITCHFIELD, *et al.*, 1997).

A luteolina, outra flavona com potencial antiviral bem descrito, teve um dos seus primeiros relatos de atividade antiviral no ano de 1990 por Debiaggi e seu grupo, que testaram alguns flavonoides isolados de própolis contra uma série de vírus, e a luteolina testada contra alguns vírus foi capaz de inibir a replicação do do herpes. Uma década depois, estudando a sua atividade sobre o vírus do HIV, e a

pesquisa conduzida por Xu e seus colaboradores descreveu que esta flavona tem a característica de inibir a protease do HIV tipo 1.

Em 2004, uma pesquisa visando o descobrimento de drogas que fossem eficazes contra o coronavírus, patógeno causador da Síndrome respiratória aguda severa, evidenciou que a luteolina é capaz de inibir a entrada do vírus na célula, o que a torna uma molécula promissora ao desenvolvimento de um medicamento, e também serve de modelo de estudos de possíveis novas drogas contra este agente infeccioso (Yi, *et al.*, 2004).

Tewtrakul e colaboradores, em 2003 estudando mecanismos de inibição do vírus do HIV exposto ao extrato de *Coleus parvifolius*, relataram que a luteolina presente no extrato era capaz de inibir a integrase do vírus HIV. Um trabalho recentemente publicado descreve que a luteolina, interfere com um fator de transcrição de uma via regulatória importante na replicação do HIV e é proposta como terapia complementar ao tratamento com antiretrovirais (Mehla, *et al.*, 2011).

Também é a conhecida a atividade da luteolina contra o vírus influenza, o mecanismo de inibição pelo qual a luteonina exerce sua ação, é a inibição da neuramidase do vírus (Liu, *et al.*, 2008).

Derivados do ácido cafeoilquinico foram detectados em 29.8, 31.4 e 33.4 minutos. O espectro de massas da substância detectada em 29.8 min mostrou a molécula protonada em m/z 517 e fragmentos em m/z 355 (ácido cafeoilquinico protonado) e m/z 337, proveniente da perda de água da molécula do ácido cafeoilquinico (m/z 355), sendo sugerido como ácido 3,4-dicafeoilquínico. Dois isômeros do ácido cafeoilquinico arabinosideo foram detectados em 31.4 e 33.4 minutos. Os espectros de massas destas substâncias mostraram a molécula protonada em m/z 487. A substância em 33.4 minutos foi detectada em maiores concentrações no espectro de ESI-MS no modo positivo.

Um estudo avaliando o potencial antiinfluenza do extrato aquoso da própolis verde brasileira, averiguou que os compostos majoritários do extrato eram cafeólicos, e por meio de análise de RNAm viral, averiguaram que o efeito antiviral da própolis era decorrente de interação dos compostos com a célula, e não diretamente com o vírus (URUSHISAKI, *et al.*, 2011). Posteriormente, testando o ácido 3,4-dicafeoilquínico, o mesmo grupo comprovou que este composto possui

importante ação antiviral e também aumenta a expressão de uma via apoptótica relacionada a tumores e infecções virais (TAKEMURA, *et al*, 2012).

Em vista dos resultados obtidos, é possível observar que o extrato desta própolis possui baixa toxicidade, tanto para a célula quanto para o material genético celular. Que também possui grande atividade à baixas concentrações (1 µg/mL), o que nos dá uma grande margem de segurança dos efeitos em relação as dosagens tóxicas, e além disso, possui em sua composição variadas substâncias com atividade antiviral já descritas.

Em virtude do panorama atual de medicamentos eficazes contra viroses em geral, o resultado deste trabalho é de grande importância para a saúde pública, pois uma vez que o extrato atuou de maneira eficaz sobre dois vírus totalmente distintos, outros vírus podem ser testados com este extrato, e as moléculas presentes no mesmo podem ser isoladas e igualmente testadas quanto o seu potencial antiviral.

Mesmo sabendo-se que existe uma sinergia entre os diferentes compostos, como já descrito na literatura, três compostos detectados na espectrometria de massas ainda foram elucidados, e supõe-se que sejam alcaloides inéditos, e em geral alcaloides são substâncias de alto poder farmacológico, para conclusão das estruturas é necessária a realização de outros experimentos de caracterização estrutural.

Em suma, este material demonstra grande potencial no que se diz respeito a atividade antiviral, o que abre diversas vertentes a serem estudadas sobre o mesmo.

## 6. CONCLUSÕES

O extrato da própolis de *Scaptotrigona postica*, demonstrou baixa toxicidade e ausência de genotoxicidade.

O extrato demonstrou atividade inibitória de 98% de redução das cópias de RNAm tanto do vírus da Rubéola como do vírus do Herpes, e essa redução foi alcançada com a exposição das células e dos vírus à concentrações muito pequenas do extrato (de 1 a 100 µg). Concentrações muito distantes das concentrações tóxicas do extrato (Acima de 2,5 mg/mL).

A microscopia eletrônica gerou resultados que corroboraram com os resultados de PCR, além disso, foi possível observar que a própolis é capaz de induzir mudanças histológicas, tais como o aumento de ribossomos livres, indicando um aumento da tradução de proteínas, e um aumento do número de mitocôndrias, que também fazem parte de vias de sinalização antiviral.

Os compostos identificados quase que em sua totalidade possuem atividade antiviral previamente descrita, o que explica o grande potencial do extrato em reduzir as cópias de RNAm viral à concentrações tão baixas.

Foi detectada a presença de três moléculas ainda não identificadas supostamente inéditas neste extrato.

O extrato inibiu a replicação de dois vírus de grande importância em saúde pública, e serão necessários mais estudos para elucidar os mecanismos de ação e para identificar as moléculas responsáveis por estes efeitos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMOROS, M.; LURTON, E.; BOUSTIE, J.; GIRRE, L. C. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. **J Nat Prod.**, v. 57, n. 5, p. 644-647, 1994.

AMOROS, M.; SAUVAGER, F.; GIRRE, L.; CORMIER, M. In *vitro* antiviral activity of propolis. **Apidologie.**, v. 23, p. 231-240, 1992.

AMOROS, M; SAUVAGER, F.; GIRRE, L.; CORMIER, M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 12, p. 1732-1740, 1992.

ARAUJO, A. M. et al.. Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona aff. postica* sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. **Rev. bras. farmacogn.**, Curitiba, v. 20, n. 4, p. 580-587, 2010.

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

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. Constituents of brazilian geopropolis. **Z Naturforschung.**, v. 53, p. 402-406, 1998.

BANKOVA, V. S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N. L. High-Performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. **Journ of Crom.**, v. 242, p. 135-143, 1982.

BANKOVA, V. S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N. L. A study on flavonoids of propolis. **J Nat Prod.**, v. 46, n. 4, p. 471-474, 1983.

BANKOVA, V.; POPOV, S.; MAREKOV, N.; MANOLOVA, N.; MAKSIMOVA, V. The chemical composition of propolis fractions with antiviral action. **Acta. Microbiol. Bulg.**, v. 23, p. 52-57, 1988.

BARRECA, D.; BISIGNANO, C.; GINESTRA, G.; BISIGNANO, G.; BELLOCCO, E.; LEUZZI, U.; GATTUSO, G. Polymethoxylated, C and O glycosyl flavonoids in Tangelo (*C. reticulata* C. *paradisi*) juice and their influence on antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 23, p. 1481-1488, 2013.

BERNARD, R. *et al.* 2007. **Herpes virus**, in: Knipe, D.M., Howley, P.M. ed. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2502-2601.

BEYLEVELD, G.; WHITE, K. M., AYLLON, J. SHAW, M. L. New-generation screening assays for the detection of anti-influenza compounds targetin viral and host functions. **Antiviral Research**, v. 100, p. 120-132, 2013.

BOGDANOV, S. Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review. disponível em: <<http://www.beehexagon.net/files/fileE/Health/PropolisBookReview.pdf>> acesso em 23 de jun. 2013.

BORGES, K. S.; BRASSESCO, M. S.; SCRIDELLI, C. A.; SOARES, A. E. E.; TONE, L. G. Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. **Genet. Mol. Biol.**, v. 34, n. 2, p. 310-314, 2011.

BOWIE, A.G.; UNTERHOLZNER, L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 911–922, 2008.

BUFALO, M. C.; FIGUEIREDO, A. S.; SOUSA, J. P. B.; CANDEIAS, J. M. G.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and própolis by cell viability determination and real-time. **Appl Microbiol.**, v. 107, p. 1669-1680, 2009

BURDOCK, G.A.. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chem Toxicol.**, v. 36, p. 347–363, 1998.

BRUSCHI, M. L.; FRANCO, S.L.; GREMIAO, M. P. D. Application of na HPLC method for analysis of própolis extract. **J Liq Chrom & Rel Tech**, v. 26, n. 14, p. 2399-2409, 2003..

BURDOCK, G.A.. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chem Toxicol.**, v. 36, p. 347–363, 1998.

CANN, A. J. Principles of Molecular Virology. 2 ed. Academic Press; 1997.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia.**, v. 73, p. 1-6, 2002.

CAVALCANTE, D. R. R. Efeito quimiopreventivo de variedades de própolis brasileira sobre a carcinogênese oral experimentalmente induzida. Disponível de em: [http://ww3.unit.br/mestrados/saude\\_ambiente/wpcontent/uploads/2012/04/Defesa\\_Versao-Final.pdf](http://ww3.unit.br/mestrados/saude_ambiente/wpcontent/uploads/2012/04/Defesa_Versao-Final.pdf). Acesso em 04 de fev., 2013.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. MINISTÉRIO DA SAÚDE

CIESEK, S. *et al.* The Green Tea Polyphenol, Epigallocatechin-3-Gallate, Inhibits Hepatitis C Virus Entry. **Hepatology**, v. 54, p. 1947-1955, 2011

CIZMARIK, J.; LAHITOVA, N. Antimutagenicity. **Pharmazie.**, v.53, p. 883-884, 1998.

COORAY, S; JIN, L; BEST, J. M. The involvement of survival signaling pathways in rubella-virus induced apoptosis. **Virology**, v. 2, n. 1, p. 1, 2005.

COSTA, R. A.; CRUZ-LANDIM, C. Comparative study of the ultrastructure and secretory dynamic of hypopharyngeal glands in queens, workers and males of *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apinae, Meliponini). **Biocell**, v. 24, n. 1, p. 39, 2000.

COSTA, R. A. C.; CRUZ-LANDIM, C. Distribution of acid phosphatases in the hypopharyngeal glands from workers, queens and males of a Brazilian stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille: An ultrastructural cytochemical study. **The Histochem Jour.**, v. 33, p. 653-662, 2001.

COSTA, R. A. C.; CRUZ-LANDIM, C. Electrophoretical polypeptide pattern of hypopharyngeal glands extracts from workers and males of *Scaptotrigona postica* Latr.(Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Netherlands jour of zoo**, v. 49, n. 3, p. 157-166, 1999.

COSTA, R. A. C.; CRUZ-LANDIM, C Hydrolases in the hypopharyngeal glands of workers of *Scaptotrigona postica* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apinae). **Genet. Mol. Res**, v. 4, n. 4, p. 616-623, 2005.

CHANG, F. R.; HSIEH, Y. C.; CHANG, Y. F.; LEE, K. H.; WU, Y. C.; CHANG, L. K. Inhibition of the Epstein–Barr virus lytic cycle by moronic acid. **Antiviral research**, v. 85, n. 3, p. 490-495, 2010.

CRITCHFIELD, J. W.; BUTERA, S. T.; FOLKS, T. M. Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. **AIDS Res Hum Retro**, v. 12, p. 39-46, 1996.

CUETO, A. P.; ALVES, S. H.; PILAU, M.; WEIBLEN, R.; KUBIÇA, T. F.; LOVATO, L. T. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina., **Ciência Rural**., v.41, n.10, p.1800-1806, 2011.

DEBIAGGI, M.; TATEO, F.; PAGANI, L.; LUINI, M.; ROMERO, E. Effects os propolis flavonoids on vírus infectivity and replication. **Microbiologica**., v.13, n. 3, p. 207-213, 1990.

DEBUYSER, E. La própolis. Tese de doutorado em Farmácia. Université de Nantes, França, 82 páginas. 1983.

EL-HADY, F. K. A.; HEGAZI, A. G. Egyptian Propolis: 2. Chemical Composition, Antiviral and Antimicrobial Activities of East Nile Delta Propolis. **Z. Naturforsch. C.**, v. 57, p. 386-394, 2002.

ESANU, V.; PRAHOVEANU, E.; CRISAN, I.; CIOCA, A.; The effect of an aqueous propolis extract, of rutin and of a rutin-quercetin mixture on experimental influenza virus infection in mice. **Virologie**., v. 32, n.3, p. 213-215, 1981.

FABRIS, S.; BERTELLE, M.; ASTAFYEVA, O.; GREGORIS, E.; ZANGRANDO, R.; GAMBARO, A.; LIMA, G. P. P.; STEVANATO, R.; Antioxidant properties and chemical composition relationship of Europeans and Brazilians propolis. **Pharmacology & Pharmacy**., v. 4, p. 46-51, 2013.

FASSINIA, G.; BUFFA, A.; BENELLI, R.; VARNIER, O. E.; NOONAN, D. M. Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea as a candidate anti-HIV agent. **AIDS**, v. 16, p. 939-941, 2002.

GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. **Bee World.**, v. 60, p. 59–84, 1979.

GUALBERTO, F. A. S.; OLIVEIRA, M. I.; ALVES, V. A.; KANAMURA, C. T.; ROSEMBERG, S.; SATO, H. K.; FIGUEIREDO, C. A. Fulminant encephalitis associated with a vaccine strain of rubella virus. **J of Clin Virol**, v. 58, n. 4, p. 737-740, 2011.

GUILHON-SIMPLICIO, F.; PEREIRA, M. M.. Chemical and pharmacological aspects of Byrsonima (Malpighiaceae). **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1032-1041, 2011

HAMILTON, A.J.; BAULCOMBE, D.C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. **Science**, v. 286, p. 950–952, 1999.

HARISH, Z.; RUBINSTEIN, A.; GOLODNER, M.; ELMALIAH, M.; MIZRACHI, Y. Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. **Drug. Exp. Clin. Res.**, v. 23, n. 2, p. 89-96, 1997.

HAUBER, I. The main green polyphenol epigallocatechin-3-gallate counteracts semen-mediated enhancement of HIV infection. **Pro Natl Acad Sci USA**, v. 106, p. 9033-9038, 2009.

HEGAZI, A. G.; EL-BERDIY, F.; EL-ASSILY, S.; KHASHABAH, E.; HASSAN, N.; POBOV, S. Studies of some aspects of antiviral activity.1.- influence of propolis on newcastle disease virus. **Vet Med J Cairo Univ.**, v. 41, n. 2, p. 53-58, 1993.

HEGAZI, A. G.; EL-HADY, F. K. A.; ALLAH, FAYROUZ, A. M. A. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of European Propolis **Z. Naturforsch.**, v. 55, p. 70-75, 2000.

HU, C. Q.; Chen, K., SHI, Q.; KILKUSKIE, R. E.; CHENG, Y. C.; LEE, K. H. Anti-aids agents, 10.' acacetin-7-o-β-d-galactopyranoside, an anti-hiv principle from chrysanthemum morifolium and a structureactivity correlation with some related flavonoids. **J of Nat Prod**, v. 57, p. 42-51, 1994.

HULEIHEL, M.; ISHANO, V. Effect of propolis extract on malignant cell transformation by moloney murine sarcoma virus. **Archives of virology**, v. 146, n. 8, p. 1517-1526, 2001.

HULEIHEL, M.; ISANU, I. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. **Isr. Med. Assoc. J.**, v. 4, suplemento 11, p. 923-927, 2002.

ISAACS, C. E.; WEN, G. Y.; XU, W.; JIA, J. H.; ROHAN, L.; CORBO, C. Epigallocatechin gallate inactivates clinical isolates of herpes simplex virus. **Antimicro Agents Chemoter**, v. 52, p. 962-970, 2008.

IORISH, N.; *As Abelhas: Farmacêuticas com Asas*, Editora Mir: Moscou, 1982; p. 228.

ITO, J.; CHANG, F. R.; WANG, H. K.; PARK, Y. K.; IKEGARI, M.; KILGORE, N.; LEE, K. H. Anti-AIDS Agents. 48. Anti-HIV Activity of Moronic Acid Derivatives and the New Melliferone-Related Triterpenoid Isolated from Brazilian Propolis. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 1278-1281, 2001.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. **Science**, v. 327, p. 291–295, 2010.

JANEWAY, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Bio**, v. 54, p. 1–13, 1989.

JIANG, F.; CHEN, W.; YI, K.; WU, Z.; SI, Y.; HAN, W.; ZHAO, Y. The evaluation of catechins that contain a galloy moiety as potential HIV-1 integrase inhibitors. **Clin Immunol**, v. 137, p. 347-356, 2010.

KERR, W. Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, geoprópolis e cera. **Inf Agropec.**, v. 13, p. 15-27, 1987.

KINGSLEY R.E.; COLE N.L. Preparation of cultured mammalian cells for transmission and scanning electron microscopy using Aclar film. **J of Electr Micro Tech**, v. 10, p. 77-85, 1988.

KANERVA, A. Chlorpromazine and apigenin reduce adenovirus replication and decrease replication associated toxicity. **The jour of gen med**, v. 9, n. 1, p. 3-9, 2007.

KÖNIG, B.; DUSTMANN, J. H. The caffeoylics as new family of natural antiviral compounds. **Naturwissenschaften.**, v.72, p. 659-661, 1985.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; AMBROSANO, G. M. B.; MURATA, R. M.; YATSUDA, R.; IKEGARI, M. ALENCAR, S. M.; PARK, Y. K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. **Current Microbiology.**, v. 41, p. 192-196, 2000.

KUMAZAWA, S.; HAYASHI, K.; KAIJYA, K.; ISHII, T.; HAMASAKA, T.; NAKAMAYA, T. Studies of the constituents of Uruguayan propolis. **J of Agri and Food Chem.**, v. 50, p. 4777 – 4782, 2002.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 51, n. 6, p. 740-742, 2003.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J of Ethnopharm.**, v. 64, n. 3, p. 235-240, 1999.

KUZUHARA, T. *et al.* Green tea catechins inhibit the endonuclease activity of influenza A virus RNA polymerase. **Plos Currents**, 2009.

KTIVOTUCHKO, V. F.; DEGTYARENKO, V. I.; ZAITSEVA, T. L.; GANCHENKO, M. G. Antiviral effects of propolis. **Vitus I Virus Zabolevaniya.**, v.3, p. 61-64, 1975.

LEE, J. Y.; BOWDEN, D. S. Rubella virus replication and links to teratogenicity. **Clin microbiol reviews**, v. 13, n. 4, p. 571-587, 2000.

LEE, J. Y.; BOWDEN, D. S.; MARSHALL, J. A. Membrane junctions associated with rubella virus infected cells. **J of submicro cytol and pathol**, v. 28, n. 1, p. 101-108, 1996.

LI, Y.; BUT, P. P. H.; OOI, V. E. C. Antiviral activity and mode of action of caffeoylquinic acids from *Schefflera heptaphylla* (L.) Frodin. **Antiviral research**, v. 68, n. 1, p. 1-9, 2005.

LI, H.; Zhou, C. X.; PAN, Y.; GAO, X.; WU, X.; BAI, H.; ZHAO, Y. Evaluation of antiviral activity of compounds isolated from *Ranunculus sieboldii* and *Ranunculus sceleratus*. **Planta med**, v. 71, n. 12, p. 1128-1133, 2005.

LIU, S. Theaflavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41. **Biochim et Bioph Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1723, n. 1, p. 270-281, 2005.

LIU, A.; LIU, B.; QIN, H. L.; LEE, S. M. Y.; WANG, Y. T.; DU, G. H. Anti-Influenza Virus Activities of Flavonoids from the Medicinal Plant *Elsholtzia rugulosa*. **Planta Med**, v. 74, p. 847-851, 2008.

MAIA FILHO, E. M.; MAIA, C. D. C. R.; BASTOS, A. C. S. C.; NOVAIS, T. M. G. Efeito antimicrobiano in vitro de diferentes medicações endodôntica e própolis sobre *Enterococcus faecalis*. **Rev Gaúcha Odonto.**, v. 56, n.1, p. 21-25, 2009.

MAKSIMOVA-TODOROVA, V.; MANOLOVA, G.; GEGOVA, G.; SERKEDJIEVA, J.; UZUNOV, S.; PANCHEVA, N.; MAREKOV, N. BANKOVA. Antiviral action of fractions isolated from própolis. **Acta. Microbiol. Bulg.**, v.17, p. 79-85, 1985.

MANOLOVA, N.; MAXIMOVA, V.; GEGOVA, G.; SERKEDJIEVA, J.; UZUNOV, S.; MAREKOV, N.; BANKOVA, V. On the antiinfluenza action of fractions from própolis. **C. R. Bulg. Acad. Sci.**, v. 38, n. 6, p. 735, 1985.

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

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

MARKHAM, K. R.; MITCHELL, K. A.; WILKINS, A. L.; DALDY, J. A.; LU, Y. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 205-211, 1996.

MARTOS, I.; COSSENTINI, M.; FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Flavonoid Composition of Tunisian honeys and própolis. **J. Agric. Food Chem.**, v.45, p. 2824-2829, 1997.

MEHLA, R.; BIVALKAR-MEHLA, S.; CHAUHAN, A. A Flavonoid, Luteolin, Cripples HIV-1 by Abrogation of Tat Function. **Plos One**, v.6, p. 1-13, 2011.

MELCHJORSEN, J.; MATIKAINEN, S.; PALUDAN, S. R. Activation and evasion of innate antiviral immunity by herpes simplex virus. **Viruses**, v. 1, p. 737-759, 2009.

MIMS, C., *et al.* Microbiologia médica. 2ed. São Paulo: Manole; 1999.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA

MORFEI, A.; BURDUCEA, O.; NEUMAN, R.; CAJAL, N.; COPELOVICI, Y.; CRISAN, I. Investigations concerning the action of several chemical and biological agents on HBsAg. **Virologie**, v. 31, n. 4 , p.273-278, 1980.

MUKOYAMA, A.; USHIJIMA, H.; NISHIMURA, S.; KOIKE, H.; TODA, M.; HARA, Y.; SHIMAMURA, T. Inhibition of rotavirus and enterovirus infections by tea extracts. **Jpn J Med Sci Biol**, v. 44, p. 181-186, 1991.

NAGASSE-SUGAHARA, T. K.; KISIELIUS, J.J.; UEDA-ITO, M.; CURTI, S. P.; FIGUEIREDO C. A.; CRUZ, A. S.; SILVA, M. M.; RAMOS, C. H.; SILVA, M. C.; SAKURAI, T.; SALLES-GOMES, L. F.; Human vaccinia-like virus outbreaks in São Paulo and Goiás States, Brazil: virus detection, isolation and identification. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 46, p, 315-322, 2004.

NAKAYAMA, M.; SUZUKI, K.; TODA, M.; OKUBO, S.; HARA, Y.; SHIMAMURA, T. Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. **Antiviral Research**, v. 21, p. 289-299, 1993.

NANCE, C. L.; SIWAK, E. B.; SHEARER, W. T. Preclinical development of the green tea catechin, epigallocatechin gallate, as an HIV-1 therapy. **J Allergy Clin Immunol**, v. 123, n. 2, p. 459-465, 2009.

NEYCHEV, H.; DIMOV, V.; VULEVA, V.; SHIROVA, L.; SLAVCHEVA, E.; GEGOVA, G.; MANOLOVA, N.; BANKOVA, V. Immunomodulatory action of propolis. II. Effect of water-soluble fraction on influenza infection in mice. **Acta Microbiol. Bulg.**, v. 23, p. 58-62, 1988.

NICOLL, M P.; PROENÇA, J. T.; EFSTATHIOU, S. The molecular basis of herpes simplex virus latency. **FEMS Microbiol Ver**, v. 36, p. 684-705, 2012

NOGUEIRA-NETO, P. A vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae). São Paulo: Nogueirapes, 1997.

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

O'NEILL, H. J.; WYATT, D. E.; COYLE, P. V.; MCCAUGHEY, C.; MITCHELL, F. Real-time nested multiplex PCR for the detection of herpes simplex virus types 1 and 2 and varicella zoster virus. **J Med Virol** v. 71, p. 557-560, 2003

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian própolis. **J of agri and food chem.**, v. 50, p. 2502-2506, 2002.

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

PARK, Y. K.; IKEGARI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 62, n. 11, p. 2230-2232, 1998.

PARK, Y. K.; IKEGARI, M.; ABREU J. A. S.; ALCICI, N. M. F.; Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciênc. Technol. Aliment.**, v. 18, n. 3, p. 313-318, 1998.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova.**, v. 25, n. 2, 2002.

POSSAMAI, M. M.; HONORIO-FRANÇA, A. C.; REINAQUE, A. P. B.; FRANÇA, E. L.; SOUTO, P. C. D. S. Brazilian Propolis: A Natural Product That Improved the Fungicidal Activity by Blood Phagocytes. **BioMed Res Int.**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

PLOTKIN S.; REEF S.; COOPER L.; ALFORD C.A. Rubella. In: Infectious diseases of the fetus and newborn infant. Philadelphia, PA: Elsevier. pp. 861-898, 2011

RESENDE, R. B.; BORGES, L.F.H. Exportações março/2008. **Coordenação Nacional da rede APIS**. UAGRO- Sebrae Nacional, 2008.

RUBIO, O. C.; CUELLAR, A. C.; ROJAS, N.; CASTRO, H. V.; RASTRELLI, L.; AQUINO, R. A Polyisoprenylated benzophenone from Cuban Propolis. **J. Nat. Prod.**, v. 62, p. 1013-1015, 1999.

SANTOS, F. A.; BASTOS, E. M. A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M. A. R.; FARIAS, L. M.; MOREIRA, E. S. A.; BRAGA, F. C. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **J of Ethnopharmacol.**, v. 80, p. 1-7, 2002.

SAWAYA, A. C. H. F.; PALMA, A. M.; CAETANO, F. M.; MARCUCCI, M. C.; SILVA CUNHA, I. B.; ARAUJO, C. E. P.; SHIMIZU, M. T. Comparative study of *in vitro* methods use to analyse the activity os propolis extracts with different compositions against species of Candida. **L in Appl Microbio**, v. 35, p. 203-207, 2002.

SARTORI, G.; PESARICO, A. P.; PINTON, S.; DOBRANCHINSKI, F.; ROMAN, S. S.; PAULETTO, F.; JUNIOR, L. C. R.; PRIGOL, M. Protective effect of brown Brazilian propolis against acute vaginal lesions caused by herpes simplex virus type 2 in mice: involvement of antioxidant and anti-inflammatory mechanisms. **Cell biochem and func**, v. 30, n. 1, p. 1-10, 2012.

SERKEDJIEVA, J.; MANOLOVA, N. Anti-influenza vírus effect os some própolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). **J of Nat Prod.**, v. 53, n. 3, p. 294-302, mar. 1992.

SCHNITZLER, P.; NEUNER, A.; NOLKEMPER, S.; ZUNDEL, C.; NOWACK, H.; SENSCH, K. H.; REICHLING, J. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. **Phyto Research.**, v. 24, p. 20-28, 2010.

SCHULZ, D.; CAON, T.; MUSSI, C. S.; SIMOES, C. M. O.; BATISTA, C. R. V. Genotoxicidade do extrato bruto antibacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens* R10 frente a células VERO. **Alim. Nutr. Araraquara**, v. 19, p. 153-158, 2008.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. Abelhas brasileiras : sistemática e identificação. Belo Horizonte: 2002. 253 p.

SIESS, M. H.; LE BON, A. M.; CANIVENC-LAVIER, M. C.; AMIOT, M. J.; SERGE, S. S.; AUBERT, S. Y.; SUSCHETET, M. Flavonoids of honey and propolis: Characterization and effects on hepatic drug-metabolizing enzymes and benzo[a]pyrene-DNA binding in rats. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 44, p. 2297-2301, 1996.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs?. **Jour of ethnopharm**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SHEVCHENKO, L. F.; CHASOVODTSEVA, O. A.; PESCHANSKII, A. N. Inhibiting activity of própolis on the influenza virus. **Chem. Abstr.**, v. 82, n. 11, 1972.

SHIMIZU, T.; HINO, A.; TSUTSUMI, A.; PARK, Y. K.; WATANABE, W.; KUROKAWA, M. Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. **Antivir Chem & Chemoter**, v. 19, n. 1, p. 7-13, 2008.

SHIMIZU, T.; TAKESHITA, Y.; TAKAMORI, Y.; KAI, H.; SAWAMURA, R.; YOSHIDA, H.; WATANABE, W.; TSUTSUMI, A.; PARK, Y. K.; YASUKAWA, K.; MATSUNO, K.; SHIRAKI, K.; KUROKAWA, M. Efficacy of Brazilian própolis against herpes simples vírus type 1 infection in mice and their modes of antiherpetic efficacies. **Evidence-Based Complement and Alter Med.**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

SKAUG, B.; JIANG, X.; CHEN, Z.J. The role of ubiquitin in NF- $\kappa$ B regulatory pathways. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 78, p. 769–796, 2009.

SONG, J. M.; LEE, K. H.; SEONG, B. L. Antiviral effects of catechins in green tea on influenza virus. **Antiviral Research**, v. 68, p. 66-74, 2004.

TOMAS-BARBERAN, F. A.; GARCIA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVER, P.; FERRERES, F.; TOMAS-LORENTE, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 191-196, 1993.

TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D. MEIRA, R. N. S. A.; SALATINO, A. Indicadores da origem botânica da própolis, importância e perspectivas. **Boletim da Indústria Animal**, v. 60, p. 83-106, 2003.

VALENCIA, D.; ALDAY, E.; ROBLES-ZEPEDA, R.; GARIBAY-ESCOBAR, A.; GLAVEZ-RUIZ, J. C.; SALAS-REYES, M.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; VELAZQUEZ-CONTRERAS, E.; HERNANDEZ, J.; VELAZQUEZ, C. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. **Food Chem.**, v. 131, p. 645-651, 2012.

VYNOGRAD, N.; VYNOGRAD, I.; SOSNOWSKI, Z. A comparative multi-centre study of efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2001.

WEBSTER, W. S. Teratogen update: congenital rubella. **Teratology**, v. 58, n. 1, p. 13-23, 1998.

WERBER, J. M. Inhibition of adenovirus infection and adenine by green tea catechins. **Antiviral Research**, v. 58, p. 167-173, 2003

WHITE, J. J. W.; SUBERS, M. H.; SCHEPARTZ, A. I. Identification of inhibine, the antibacterial factor in honey glucose oxidase system. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 73, p. 57-70, 1963.

TANIWAKI N. N.; KATCHBURIAN E. Ultrastructural and lanthanum tracer examination of rapidly resorbing rat alveolar bone suggests that osteoclasts internalize dying bone cells. **Cell Tissue Res**, v. 293, p. 173-176, 1998.

TAKEMURA, T.; URUSHISAKI, T.; FUKUOKA, M.; HOSOKAWA-MUTO, J.; HATA, T.; OKUDA, Y.; KUWATA, K. 3, 4-dicaffeoylquinic acid, a major constituent of Brazilian propolis, increases TRAIL expression and extends the lifetimes of mice infected with the influenza A virus. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2011.

TAO, P. The inhibitory effects of catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and DNA polymerases. **Acta Acad Med Sin**, v. 14, n. 5, p. 334-338, 1992.

URUSHISAKI, T.; TAKEMURA, T.; TAZAWA, S.; FUKUOKA, M.; HOSOKAWA-MUTO, J.; ARAKI, Y.; & KUWATA, K. Caffeoylquinic acids are major constituents with potent anti-influenza effects in brazilian green propolis water extract. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

YI, L. Small molecules blocking the entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus into host cells. **Journal of Virology**, v. 78, p. 11334-11339, 2004.

#### WORLD HEALTH ORGANIZATION

XU, H.; Wan, M., DONG, H.; BUT, P. P. H.; FOO, L. Y. Inhibitory activity of flavonoids and tannins against HIV-1 protease. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 23, n. 9, p. 1072-1076, 2000.

XU, J.; WANG, J.; DENG, F.; HU, Z.; WANG, H. Green tea extract and its major component epigallocatechin gallate inhibits the replication cell cycle of hepatitis C virus. **Antiviral Research**, v. 78, p. 242-249, 2008

ZAMORE, P.D; TUSCHL, T.; SHARP, P. A.; BARTEL, D. P.. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. **Cell**, v. 101, p. 25–33, 2000.

ZHAO, Y.; JIANG, F.; LIU, P.; CHEN, W.; YI, K. Catechins containing a galloyl moiety as potential anti-HIV-1 compounds. **Drug Disc Today**, v. 17, n. 11/12, p. 630-635, 2012