

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste documento será disponibilizado somente a partir de 03/03/2028.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Maria Letícia de Oliveira Lyra

**EXPLORAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL VIRUCIDA
DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *EUCALYPTUS EXSERTA*,
EUCALYPTUS STAIGERIANA, *EUCALYPTUS LEPTOPHLEBA*
E DO 1,8-CINEOL CONTRA O VÍRUS DA DENGUE TIPO 1 E
INVESTIGAÇÃO DE CORRELAÇÕES ENTRE SEUS EFEITOS
E VARIAÇÕES GENÔMICAS VIRAIS**

Botucatu – SP

2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**EXPLORAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL VIRUCIDA
DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *EUCALYPTUS EXSERTA*,
EUCALYPTUS STAIGERIANA, *EUCALYPTUS LEPTOPHLEBA*
E DO 1,8-CINEOL CONTRA O VÍRUS DA DENGUE TIPO 1 E
INVESTIGAÇÃO DE CORRELAÇÕES ENTRE SEUS EFEITOS
E VARIAÇÕES GENÔMICAS VIRAIS**

Maria Letícia de Oliveira Lyra

Rejane Maria Tommasini Grotto

Dissertação apresentada ao Instituto de Biotecnologia, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção de título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia e patogenicidade dos microrganismos, Imunidade e Imunomodulação.

Rejane Maria Tommasini Grotto

Botucatu – SP

2026

L992e

Lyra, Maria Letícia de Oliveira

Exploração in vitro do potencial virucida de óleos essenciais de *Eucalyptus exserta*, *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus leptophleba* do 1,8-cineol contra o vírus da dengue tipo 1 e investigação de correlações entre seus efeitos e variações genômicas virais / Maria Letícia de Oliveira Lyra. -- , 2026
66 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu,

Orientadora: Rejane Maria Tommasini Grotto

1. Microbiologia. 2. Dengue. 3. Cultura de células. 4. Biologia molecular.
5. Genética molecular. I. Título.

Impacto Potencial desta pesquisa

Título: Exploração *in vitro* do potencial virucida de óleos essenciais de *Eucalyptus exserta*, *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus leptophleba* e do 1,8-cineol contra o vírus da dengue tipo 1 e investigação de correlações entre seus efeitos e variações genômicas virais.

Impacto científico: trazer mais conhecimentos sobre o vírus da dengue, incluindo sobre sua genética e entender se óleos essenciais de *Eucalyptus* podem ser usados como tratamento.

Impacto Econômico e Social: buscar um tratamento para a dengue, que é uma doença que afeta tanto o Brasil quanto o mundo, especialmente em regiões mais quentes, usando produtos naturais que são de origem mais sustentável.

Potential impact of this research

Dissertation Title: *In vitro* exploration of the virucidal potential of *Eucalyptus exserta*, *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus leptophleba* essential oils and 1,8-cineole against dengue virus type 1, and investigation of correlations between their effects and viral genomic variations.

Scientific impact: To expand knowledge of dengue virus genetics and assess if *Eucalyptus* essential oils could be used as treatment.

Economic and Social Impact: To seek a sustainable natural product treatment for dengue, a disease affecting Brazil and warmer regions worldwide.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Exploração in vitro do potencial virucida dos óleos essenciais de ***Eucalyptus exserta***, ***Eucalyptus staigeriana***, ***Eucalyptus leptophleba*** e do 1,8-cineol contra o vírus da dengue tipo 1 e investigação de correlações entre seus efeitos e variações genômicas virais

AUTORA: MARIA LETICIA DE OLIVEIRA LYRA

ORIENTADORA: REJANE MARIA TOMMASINI GROTTTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biologia Geral e Aplicada, área: Biologia de Micro-organismos e Imunidade pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. REJANE MARIA TOMMASINI GROTTTO (Participação Virtual)
Departamento de Proteção Vegetal / UNESP / Câmpus de Botucatu - FCA

Profª Drª BRUNA CRISTINA BORGES (Participação Virtual)
Departamento de Imunologia / Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. ERICK DA CRUZ CASTELLI (Participação Virtual)
Departamento de Patologia / UNESP / Câmpus de Botucatu - FMB

Botucatu, 03 de março de 2026.



Dados:
2026.03.24
16:12:04 -03'00'

Renan Codeco da Silva
Assistente Técnico Administrativo I da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu

Instituto de Biociências - Câmpus de Botucatu
Rua Doutor Antonio Celso Wagner Zanin, s/nº. 18618689
<https://www.ibb.unesp.br/#/ensino/pos-graduacao/programas-stricto-sensu/pg-biologia-geral-e-aplicada/> - CNPJ: 48031918002259.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos membros da minha família que, dia e noite, chuva e sol, risos e lágrimas, me fizeram sempre lembrar da importância do continuar, do perseverar e, acima de tudo, do tentar, independentemente do resultado. Muito obrigada à minha mãe Luciane, meu avô Edson Baravelli Lyra, meu primo Edmárcio, meu tio Edson Baravelli Lyra Júnior, minha avó Ana Maria e minha querida prima Eva.

Devo agradecer a todos os membros do Laboratório de Biotecnologia Aplicada, pelo companheirismo, amizades, carinho e aprendizados que me transmitiram, a cada dia em sua companhia.

Aos meus queridos amigos Sabrina, Kayo, Thaís e Beatriz, por sua paciência, pelos risos que inspiraram em meio a momentos de fadiga e desânimo, e pela certeza de que, ao longo desta jornada, estava rodeada de pessoas que queriam para mim o melhor, de perto, ou a quilômetros de distância.

Agradeço à professora Rejane Maria Tommasini Grotto pela oportunidade de desenvolver este trabalho sob sua supervisão e experiência e por todos os conhecimentos que a mim transmitiu, e à Doutora Fabiana por sua presença constante, serena e firme, e pela sofisticação que me ensinou a desenvolver.

Finalmente, agradeço ao meu companheiro Matheus, por todas as noites mal dormidas, desabafos, apoio e amor, incondicional e imensurável, terno e firmador. Com você, fui capaz de entender que não estou sozinha.

Muito obrigada à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro através de bolsa de estudo, ao programa de pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada e à UNESP.

SUMÁRIO

Sumário

Resumo	3
Abstract:	4
Capítulo 1: Fundamentação teórica	6
1 INTRODUÇÃO	6
1.1 Dengue: condição e agente etiológico	6
1.2 Dados epidemiológicos: mundo e Brasil.....	8
1.3 Dengue: patogênese	9
1.4 Imunoprofilaxia e tratamento	10
1.5 Variabilidade genômica viral	12
1.6 História do uso produtos naturais como estratégias terapêuticas e suas aplicações ..	12
2 OBJETIVO GERAL	14
2.1 Objetivos Específicos.....	14
Capítulo 2: Artigo	15
1 INTRODUÇÃO	15
3 METODOLOGIA.....	16
3.1 Obtenção dos vírus	16
3.2 Obtenção dos óleos essenciais e 1,8-Cineol.....	17
3.3 Avaliação de citotoxicidade	17
3.4 Quantificação de partículas virais em solução estoque a partir de TCID ₅₀	17

3.5 Determinação da Densidade Celular e Definição da Multiplicidade de Infecção (MOI)	17
3.6 Avaliação da atividade antiviral dos óleos essenciais sobre as partículas virais	18
3.6.1 Ensaio de atividade anti-infecção	18
3.6.2 Ensaio de atividade virucida	19
3.7 Monitoramento da replicação viral utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa em Tempo Real (RT-qPCR)	19
3.8 Análise quantitativa relativa por RT-qPCR integrado aos ensaios anti-infecção e virucida	20
3.8.1 Ensaio anti-infecção com integração de RT-qPCR	20
3.8.2 Ensaio virucida com integração de RT-qPCR	21
3.9 Processamento e controle de qualidade	21
3.10 Alinhamento de sequências	22
3.11 Chamada e anotação de variantes	22
3.12 Análise estatística e visualização	23
4 RESULTADOS	23
4.1 Determinação da Densidade Celular e Definição da Multiplicidade de Infecção (MOI)	23
4.2 Quantificação de partículas virais nas amostras expandidas	24
4.3 Avaliação da ação anti-infecção e virucida dos óleos essenciais e 1,8-cineol sobre DENV-1	24
4.4 Acompanhamento do processo de replicação viral utilizando técnica de RT-qPCR	31
4.5 Resultados dos ensaios de atividade anti-infecção e virucida com realização de RT-qPCR	31

4.5.1 Ensaio de atividade virucida	31
4.5.2 Ensaio de atividade anti-infecção	32
4.6 Métricas de Sequenciamento e Alinhamento	32
4.7 Perfil funcional e quantitativo	33
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	42
7 DECLARAÇÃO DE USO DE FERRAMENAS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL ...	43
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
9 MATERIAL SUPLEMENTAR	55
9.1 Análises estatísticas	55
Capítulo 3: Conclusões Gerais	63

Resumo

A dengue, causada pelo vírus DENV (família *Flaviviridae*), permanece como importante problema de saúde pública, sem terapia antiviral específica consolidada. Produtos naturais, em especial óleos essenciais de *Eucalyptus*, e seu principal constituinte, 1,8-cineol, apresentam propriedades farmacológicas que justificam sua investigação como potenciais agentes antivirais contra DENV-1. Assim, o objetivo consistiu em avaliar *in vitro* a atividade antiviral dos óleos essenciais das folhas de *Eucalyptus exserta*, *E. staigeriana* e *E. leptophleba* e do 1,8-cineol contra DENV-1, além de caracterizar geneticamente três isolados clínicos e explorar correlações entre perfis genômicos e resultados dos ensaios *in vitro*. A citotoxicidade dos óleos essenciais e do 1,8-cineol foi avaliada previamente em células Vero. Ensaios antivirais *in vitro* foram conduzidos nas modalidades virucida e anti-infecção, com avaliação por observação do efeito citopático (microscopia) e por ensaio colorimétrico com *neutral red* (indicador de metabolismo celular), seguidos de quantificação da carga viral por RT-qPCR para as concentrações que se mostraram efetivas. Adicionalmente, os isolados virais foram caracterizados por análise bioinformática de dados de sequenciamento NGS previamente gerados, envolvendo o alinhamento do genoma dos isolados clínicos virais utilizando ferramentas a ferramenta BWA-MEM e sua indexação utilizando o pacote Samtools, bem como análise de variantes genômicas através de ferramentas de como LoFreq, Bcftools e SnpEff. Ensaios *in vitro* em células Vero indicaram manutenção parcial da atividade metabólica celular frente à infecção por DENV-1 em baixas concentrações dos óleos essenciais (1,95 µg/mL e 0,97 µg/mL para *E. leptophleba* e *E. staigeriana* no ensaio virucida; 0,97 µg/mL para *E. exserta* no ensaio anti-infecção); contudo, a ausência de redução consistente da carga viral e a presença de efeito citopático indicam que os compostos não exerceram ação antiviral. A preservação parcial do metabolismo celular observada sob infecção viral pelas amostras tratadas pode estar associada à modulação de respostas celulares ao estresse, por mecanismos ainda não elucidados e que demandam validação experimental adicional. A análise genômica revelou predominância de variantes sinônimas e presença de variantes *missense*, reforçando a necessidade de estudos futuros com isolados clínicos para avaliar possíveis impactos funcionais dessas variações.

Abstract:

Dengue, caused by the DENV virus (family Flaviviridae), remains a significant public health problem, with no established specific antiviral therapy. Natural products, especially *Eucalyptus* essential oils and their main constituent, 1,8-cineole, exhibit pharmacological properties that justify their investigation as potential antiviral agents against DENV-1. Thus, the objective was to evaluate in vitro the antiviral activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus exserta*, *E. staigeriana*, and *E. leptophleba* and of 1,8-cineole against DENV-1, as well as to genetically characterize three clinical isolates and explore correlations between genomic profiles and in vitro assay results. The cytotoxicity of the essential oils and 1,8-cineole was first assessed in Vero cells. In vitro antiviral assays were conducted in virucidal and anti-infection modalities, with evaluation by observation of cytopathic effect (microscopy) and by colorimetric assay using *neutral red* (an indicator of cellular metabolism), followed by quantification of viral load by RT-qPCR for the concentrations that proved effective. Additionally, the viral isolates were characterized by bioinformatic analysis of previously generated NGS sequencing data, involving alignment of the clinical viral isolate genomes using the BWA-MEM tool and indexing with the Samtools suite, as well as genomic variant analysis through tools such as LoFreq, Bcftools, and SnpEff. In vitro assays in Vero cells indicated partial preservation of cellular metabolic activity in the face of DENV-1 infection at low concentrations of the essential oils (1.95 µg/mL and 0.97 µg/mL for *E. leptophleba* and *E. staigeriana* in the virucidal assay; 0.97 µg/mL for *E. exserta* in the anti-infection assay); however, the absence of consistent reduction in viral load and the presence of cytopathic effect indicate that the compounds did not exert antiviral activity. The partial preservation of cellular metabolism observed under viral infection in treated samples may be associated with modulation of cellular stress responses by mechanisms not yet elucidated and requiring additional experimental validation. Genomic analysis revealed a predominance of synonymous variants and the presence of missense variants, underscoring the need for future studies with clinical isolates to evaluate potential functional impacts of these variations.

Capítulo 1: Fundamentação teórica

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dengue: condição e agente etiológico

A dengue é uma enfermidade infecciosa viral transmitida pela picada de fêmeas do mosquito *Aedes aegypti*, sendo assim classificada como uma arbovirose. O agente etiológico da doença é o vírus DENV, um vírus de RNA de fita simples sentido positivo (+ssRNA) pertencente à família Flaviviridae, família de vírus característica pela transmissão de suas partículas virais através de artrópodes¹. Dentre os principais vírus pertencentes à família Flaviridae, pode-se destacar os causadores da febre amarela (YFV), vírus do Nilo Ocidental (WNV), Zika vírus e o vírus da encefalite japonesa (JEV)².

A partícula viral do DENV apresenta simetria icosaédrica e aproximadamente 50 nm de diâmetro, sendo sua estrutura composta pelas proteínas C, M e E (proteínas de capsídeo, de membrana e do envelope), responsáveis, respectivamente, pela constituição do capsídeo e da camada glicoproteica externa³. Tal camada glicoproteica apresenta em sua organização 180 cópias de cada uma das proteínas M e E, constituindo uma malha proteica de inserida em uma bicamada lipídica interna derivada da célula hospedeira, sendo indispensável no processo de reconhecimento de tais células através de interações de receptores presentes na superfície da camada glicoproteica com receptores celulares que desencadeiam um processo de endocitose mediada por receptores, fusão com a membrana celular e entrada da partícula viral, onde o RNA genômico é liberado no citoplasma celular³⁻⁵.

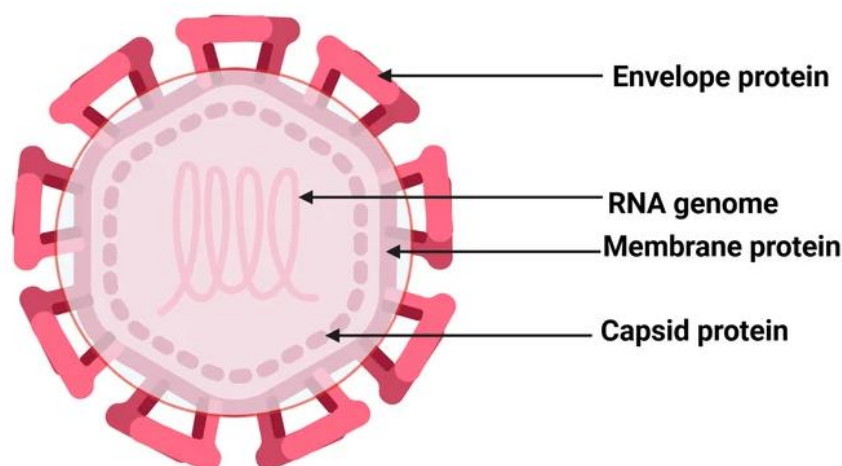


Figura 1: Imagem ilustrativa da partícula viral infectante DENV e seus constituintes principais. Traduções dos termos de inglês para o português: *Envelope protein*: proteína do envelope; *RNA genome*: genoma de RNA; *Membrane protein*: proteína de membrana; *Capsid protein*: proteína do capsídeo. Disponível no link: https://www.researchgate.net/figure/Structure-and-serotype-of-the-dengue-virus-Structure-of-Dengue-virus-with-RNA-genome-and_fig1_386010822.

O genoma viral possui aproximadamente 11 mil nucleotídeos configurados como uma *open reading frame* (fase de leitura aberta), também chamada de ORF, a partir da qual é traduzida, através do uso da maquinaria de tradução celular da célula hospedeira, mais especificamente no interior das membranas do retículo endoplasmático uma cadeia polipeptídica única que, ao ser submetida a processamentos co e pós-tradução, é clivada em dez proteínas distintas, sendo três estruturais, mencionadas anteriormente, e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A NS4B e NS5)⁶, responsáveis por exercer funções ligadas principalmente aos processos de replicação viral, maturação de partículas virais e evasão imune⁷⁻⁹, sendo possível destacar principalmente os papéis de metiltransferase e RNA polimerase RNA dependente pela NS5¹⁰ e de helicase pela NS3^{11,12}.

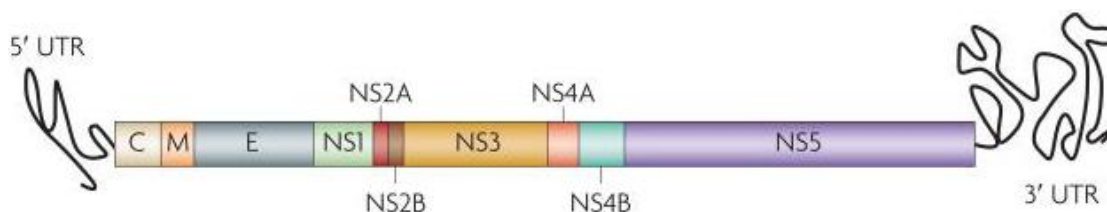


Figura 2: Estrutura do genoma viral DENV, organizado na forma de uma *open reading frame*. Também estão ilustradas as regiões responsáveis pela codificação das dez proteínas virais (C: proteína do capsídeo; M: proteína de membrana; E: proteína do envelope; NS1-NS5: proteínas não estruturais 1 a 5) e as regiões não traduzidas (UTR) 5' e 3'. **Guzman, M. G., et al. Dengue: a continuing global threat. Nature Reviews Microbiology 8, S7-S16 (2010)¹³.**

Existem quatro sorotipos antigenicamente distintos e bem estabelecidos de DENV: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, apresentando cerca de 65% de seu genoma conservado entre os quatro sorotipos^{14,15}, sendo a proteína NS5 a mais conservada entre todos os sorotipos¹⁶. Um quinto sorotipo (DENV-5) foi isolado da amostra de sangue de paciente para diagnóstico de dengue em 2007 na Malásia, na região de Sarawak, tendo sido primeiramente considerado como um caso de infecção pelo sorotipo DENV-4, sendo posteriormente constatadas, após sequenciamento do genoma viral e investigação molecular dos anticorpos produzidos em resposta à infecção causada pelo patógeno, diferenças expressivas em relação aos outros sorotipos, podendo ser caracterizado como um novo sorotipo¹⁷ posteriormente identificado como um patógeno de ciclo silvestre, cuja propagação ocorre entre vetores (artrópodes) e hospedeiros (gênero *Macaca*)¹⁶.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gould, E. A. & Solomon, T. Pathogenic flaviviruses. **371**, (2008).
2. Leur, S. W. Van, Heunis, T., Munnur, D. & Sanyal, S. Pathogenesis and virulence of flavivirus infections ABSTRACT. *Virulence* **12**, 2814–2838 (2021).

3. Perera, R. & Kuhn, R. J. Structural proteomics of dengue virus. *Current Opinion in Microbiology* vol. 11 369–377 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.004> (2008).
4. Zhang, Y. *et al.* Structures of immature flavivirus particles. **22**, (2003).
5. Mazzon, M., Jacobs, M. & Amara, A. Review Pathogenesis of Flavivirus Infections : Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host and Microbe* **5**, 318–328 (2009).
6. Mackenzie, J. Wrapping Things up about Virus RNA Replication. *Traffic* **6**, 967–977 (2005).
7. Glasner, D. R., Puerta-guardo, H., Beatty, P. R. & Harris, E. The Good, the Bad, and the Shocking: The Multiple Roles of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 in Protection and Pathogenesis. **5**, 227–253 (2019).
8. Hannah, N. & L, N. S. Roles and Prospects of Dengue Virus Non- structural Proteins as Antiviral Targets : An Easy Digest. 6–15 (2018).
9. Miller, S., Kastner, S., Krijnse-locker, J., Bu, S. & Bartenschlager, R. The Non-structural Protein 4A of Dengue Virus Is an Integral Membrane Protein Inducing Membrane Alterations in a 2K-regulated Manner *. **282**, 8873–8882 (2007).
10. Sahili, A. El & Lescar, J. Dengue Virus Non-Structural Protein 5. *Viruses* **9**, (2017).
11. Osawa, T., Aoki, M., Ehara, H. & Sekine, S. ichi. Structures of dengue virus RNA replicase complexes. *Molecular Cell* **83**, 2781-2791.e4 (2023).
12. Transactions, T. & Replication, F. R. N. A. The Transactions of NS3 and NS5 in Flaviviral RNA Replication. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1> (2018) doi:10.1007/978-981-10-8727-1.
13. Guzman, M. G. *et al.* Dengue: A continuing global threat. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, S7–S16 (2010).
14. Guzman, M. G. & Harris, E. Dengue. *Lancet* **385**, 453–65 (2015).
15. Tamura, T., Zhang, J., Madan, V., Biswas, A. & Schwoerer, M. P. Generation and characterization of genetically and antigenically diverse infectious clones of dengue virus serotypes 1 – 4 1. **11**, (2022).

16. Lim, S. P., Noble, C. G. & Shi, P. Y. The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. *Antiviral Research* **119**, 57–67 (2015).
17. Normile, D. Surprising New Dengue Virus Throws A Spanner in Disease Control Efforts. *Science* **342**, 2013 (2013).
18. World Health Organization (WHO). Dengue- Global situation. <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2024-DON518> (2024).
19. World Health Organization (WHO). Dengue and severe dengue. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> (2024).
20. Haider, N., Hasan, M. N. & Onyango, J. Global landmark : 2023 marks the worst year for dengue cases with millions infected and thousands of deaths reported. *IJID Regions* **13**, 100459 (2024).
21. Ministério da Saúde. *Dengue Série Histórica Atualizado SE52 2023*. (2024).
22. Ministério da Saúde. *Dengue Óbitos Série Histórica Atualizado SE52 2023*. (2024).
23. Ministério da Saúde. Com previsão de aumento de casos, Ministério da Saúde coordena ações de enfrentamento das arboviroses — Ministério da Saúde. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2023/dezembro/com-previsao-de-aumento-de-casos-ministerio-coordena-acoes-de-enfrentamento-das-arboviroses> (2023).
24. Yoneshigue, B. Dengue: Brasil tem queda de 76,2% nos casos no primeiro semestre de 2025. *O Globo* <https://oglobo.globo.com/saude/noticia/2025/07/17/dengue-brasil-tem-queda-de-762percent-nos-casos-no-primeiro-semester-de-2025.ghtml> (2025).
25. Duangkhae, P. *et al.* Interplay between Keratinocytes and Myeloid Cells Drives Dengue Virus Spread in Human Skin. *Journal of Investigative Dermatology* **138**, 618–626 (2018).
26. Wu, S.-J. L. *et al.* Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *NATURE MEDICINE* **6**, 816–820 (2000).
27. Lozach, P. *et al.* Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3-grabbing Non-integrin (DC-SIGN) -mediated Enhancement of Dengue Virus Infection Is Independent of DC-SIGN Internalization Signals *. **280**, 23698–23708 (2005).

28. Alen, M. M. F. *et al.* Antiviral activity of carbohydrate-binding agents and the role of DC-SIGN in dengue virus infection. *Virology* **387**, 67–75 (2009).
29. Boonnak, K. *et al.* Role of Dendritic Cells in Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection. *Journal of Virology* **82**, 3939–3951 (2008).
30. Durbin, A. P. *et al.* Phenotyping of peripheral blood mononuclear cells during acute dengue illness demonstrates infection and increased activation of monocytes in severe cases compared to classic dengue fever. *Virology* **376**, 429–435 (2008).
31. Kou, Z. *et al.* Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Medical Virology* **80**, 134–146 (2008).
32. Kyle, J. L., Beatty, P. R. & Harris, E. Dengue virus infects macrophages and dendritic cells in a mouse model of infection. *Journal of Infectious Diseases* **195**, 1808–1817 (2007).
33. Martina, B. E. E., Koraka, P. & Osterhaus, A. D. M. E. Dengue virus pathogenesis: An integrated view. *Clinical Microbiology Reviews* vol. 22 564–581 Preprint at <https://doi.org/10.1128/CMR.00035-09> (2009).
34. Azeredo, E. L. *et al.* *Characterisation of Lymphocyte Response and Cytokine Patterns in Patients with Dengue Fever*. vol. 204 (2001).
35. Bozza, F. A. *et al.* Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infectious Diseases* **8**, (2008).
36. Hung, N. T. *et al.* *Dengue Hemorrhagic Fever in Infants: A Study of Clinical and Cytokine Profiles*. *Dengue Hemorrhagic Fever in Infants • JID* vol. 221 (2004).
37. Jadhav, M. *et al.* Clinical Proteomics and Cytokine Profiling for Dengue Fever Disease Severity Biomarkers. *OMICS A Journal of Integrative Biology* **21**, 647–657 (2017).
38. Mangione, J. N. A. *et al.* The association of cytokines with severe dengue in children. *Tropical Medicine and Health* **42**, 137–144 (2014).

39. Mustafa, A. S., Elbishbishi, E. A., Agarwal, R. & Chaturvedi, U. C. Elevated levels of interleukin-13 and IL-18 in patients with dengue hemorrhagic fever. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **30**, 229–233 (2001).
40. Soundravally, R. *et al.* Association between proinflammatory cytokines and lipid peroxidation in patients with severe dengue disease around defervescence. *International Journal of Infectious Diseases* **18**, 68–72 (2014).
41. Costa, L. R., Vírus, P. & Dengue, D. A. Sinalização purinérgica na infecção pelo vírus da dengue. *Scielo Books* 337–350 (2021) doi:<https://doi.org/10.7476/9786586545494.0019>.
42. Ong, A., Sandar, M., Chen, M. I. & Sin, L. Y. Fatal dengue hemorrhagic fever in adults during a dengue epidemic in Singapore. *International Journal of Infectious Diseases* **11**, 263–267 (2007).
43. Pang, T., Cardoso, M. J. & Guzman, M. G. Of cascades and perfect storms: The immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunology and Cell Biology* vol. 85 43–45 Preprint at <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100008> (2007).
44. Agência Brasil. El Niño e altas temperaturas favorecem aumento de casos de dengue. <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2024-01/el-nino-e-altas-temperaturas-favorecem-aumento-de-casos-de-dengue> (2024).
45. Agência Fiocruz de Notícias. Aumento da dengue está associado às mudanças climáticas e ao desmatamento no Brasil. <https://agencia.fiocruz.br/aumento-da-dengue-esta-associado-mudancas-climaticas-e-ao-desmatamento-no-brasil> (2024).
46. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Entrevista: virologista destaca desafios e avanços no combate à dengue. <https://portal.fiocruz.br/noticia/2024/02/entrevista-virologista-destaca-desafios-e-avancos-no-combate-dengue> (2024).
47. Secretaria Municipal da Saúde - Prefeitura de São Paulo. Falta de adesão da população às medidas de prevenção dificulta o combate à dengue na capital. <https://capital.sp.gov.br/web/saude/w/noticias/329561#:~:text=Descuidos da população no combate,para a reprodução do mosquito.> (2022).

48. Agência GOV. Entenda como funciona a vacina contra dengue ofertada pelo SUS. <https://agenciagov.ebc.com.br/noticias/202401/entenda-como-funciona-a-vacina-contradengue-ofertada-pelo-sus> (2024).
49. Pedro Rafael Vilela. Takeda prioritizes dengue vaccine for Brazilian public health system. *Agência Brasil* <https://agenciabrasil.ebc.com.br/en/saude/noticia/2024-02/takeda-prioritizes-dengue-vaccine-brazilian-public-health-system> (2024).
50. Takeda Pharmaceuticals. QDENG A[®].
51. Redação g1 SP. Anvisa publica registro da vacina contra a dengue do Butantan. *globo.com* <https://g1.globo.com/sp/sao-paulo/noticia/2025/12/08/anvisa-publica-registro-da-vacina-contraa-dengue-do-butantan.ghtml> (2025).
52. Araújo, M., Marques, P., Stabile, A., g1 & TV Globo. Ministério da Saúde inicia vacinação contra dengue com dose única em 3 cidades; veja quais. *globo.com* <https://g1.globo.com/saude/noticia/2026/01/07/vacinacao-dengue-dose-unica-cidades.ghtml> (2026).
53. Ministério da Saúde. *Adulto e Criança DENGUE DIAGNÓSTICO E MANEJO CLÍNICO 6ª Edição V E N D A P R O I B I D A V E N D A P R O I B I D A M I N I S T É R I O D A S A Ú D E*. (2024).
54. Ravi, V. *et al.* Clinico-genomic study reveals association of dengue virus genome high frequency mutations with dengue disease severity. *Scientific Reports* 1–16 (2025) doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-025-00462-z> 2.
55. Hapuarachchi, H. C., Choon, R., Chua, R. & Shi, Y. Clinical Outcome and Genetic Differences within a Monophyletic Dengue Virus Type 2 Population. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 1–21 (2015) doi:10.1371/journal.pone.0121696.
56. Chandra Choudhary, M., Gupta, E., Sharma, S., Hasnain, N. & Agarwala, P. Genetic signatures coupled with lineage shift characterize endemic evolution of Dengue virus serotype 2 during 2015 outbreak in Delhi, India. *Tropical Medicine and International Health* **22**, (2015).
57. Silveira, G. F., Strottmann, D. M., Borba, L. De & Mansur, D. S. Single point mutations in the helicase domain of the NS3 protein enhance dengue virus replicative capacity in human

- monocyte-derived dendritic cells and circumvent the type I interferon response. 114–128 (2015) doi:10.1111/cei.12701.
58. Ribeiro, G. D. O. *et al.* Adaptive Evolution of New Variants of Dengue Virus Serotype 1 Genotype V Circulating in the Brazilian Amazon. *Viruses* **13**, (2021).
 59. Nonyong, P. *et al.* Intrahost Genetic Diversity of Dengue Virus in Human Hosts and Mosquito Vectors under Natural Conditions Which Impact Replicative Fitness In Vitro. *Viruses* **15**, (2023).
 60. Herrero, L. J. *et al.* Dengue virus therapeutic intervention strategies based on viral, vector and host factors involved in disease pathogenesis. *Pharmacology & Therapeutics* **137**, 266–282 (2013).
 61. Sessions, O. M. *et al.* Analysis of Dengue Virus Genetic Diversity during Human and Mosquito Infection Reveals Genetic Constraints. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **9**, e0004044 (2015).
 62. Dolan, P. T. *et al.* Principles of dengue virus evolvability derived from genotype-fitness maps in human and mosquito cells. *eLife* **10**, 1–61 (2021).
 63. Simko, K. Ancient healthcare fit for a king. *The British Museum* <https://www.britishmuseum.org/blog/ancient-healthcare-fit-king> (2021).
 64. Mills, S. Y. Chinese herbs in the west. in *Trease and Evans Pharmacognosy* 504–510 (Saunders Ltd., 2009).
 65. Universitätsbibliothek Leipzig. Ebers Papyrus. *Universitätsbibliothek Leipzig* <https://www.ub.uni-leipzig.de/en/about-us/exhibitions/permanent-exhibition/ebers-papyrus/>.
 66. Traditional, Complementary and Integrative Medicine.
 67. Oliveira, S. G. D. *et al.* An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. *Journal of Ethnopharmacology* **140**, 428–437 (2012).
 68. Calixto, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* **91**, (2019).

69. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* vol. 83 770–803 Preprint at <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285> (2020).
70. Akhtar, M. A., Raju, R., Beattie, K. D., Bodkin, F. & Münch, G. Medicinal Plants of the Australian Aboriginal Dharawal People Exhibiting Anti-Inflammatory Activity. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2016**, (2016).
71. World Wide Fund (WWF) for Nature Australia. 5 culturally-significant trees used in Aboriginal and Torres Strait Islander medicine. *World Wide Fund (WWF) for Nature Australia* <https://wwf.org.au/blogs/treetment-5-culturally-significant-trees-used-in-aboriginal-and-torres/> (2023).
72. Western Sydney University Library. Dharawal Pharmacopeia. *Western Sydney University Library* https://library.westernsydney.edu.au/collections/indigenous_resources/dharawal_pharmacopeia.
73. Alipanah, H. *et al.* Nanoemulsion and Nanogel Containing Eucalyptus globulus Essential Oil; Larvicidal Activity and Antibacterial Properties. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* **2022**, (2022).
74. Assaggaf, H. M. *et al.* Singular and Combined Effects of Essential Oil and Honey of In Vivo Findings. *Molecules* **27**, (2022).
75. Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B. & Mazza, G. *Antimicrobial Activity of Individual and Mixed Fractions of Dill, Cilantro, Coriander and Eucalyptus Essential Oils.* (2002).
76. Fayeze, S. *et al.* Eucalyptus-derived essential oils alleviate microbes and modulate inflammation by suppressing superoxide and elastase release. *Frontiers in Pharmacology* **14**, 1–14 (2023).
77. Mieres-castro, D., Ahmar, S. & Shabbir, R. Antiviral Activities of Eucalyptus Essential Oils : Their Effectiveness as Therapeutic Targets against Human Viruses. *Pharmaceuticals* **14**, (2021).
78. Mulyaningsih, S., Sporer, F., Reichling, J. & Wink, M. Antibacterial activity of essential oils from Eucalyptus and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Pharmaceutical Biology* **49**, 893–899 (2011).

79. Tolba, H., Moghrani, H., Benelmouffok, A., Kellou, D. & Maachi, R. Essential oil of Algerian *Eucalyptus citriodora*: Chemical composition, antifungal activity. *Journal de Mycologie Medicale* **25**, e128–e133 (2015).
80. Tulbah, A. S., Bader, A., Xin, H. & Traini, D. In vitro evaluation of nebulized eucalyptol nano-emulsion formulation as a potential COVID-19 treatment. *Saudi Pharmaceutical Journal* **30**, 1691–1699 (2022).
81. Müller, J. *et al.* 1,8-Cineole potentiates IRF3-mediated antiviral response in human stem cells and in an ex vivo model of rhinosinusitis. *Clinical Science* **130**, 1339–1352 (2016).
82. Pries, R., Jeschke, S., Leichtle, A. & Bruchhage, K. L. Modes of Action of 1,8-Cineol in Infections and Inflammation. *Metabolites* **13**, (2023).
83. Barcelos Furtado, F. *et al.* Modulatory effects of *Eucalyptus* spp. essential oils and eucalyptol on cytokines and antiviral activity against SARS-CoV-2. *Future Virology* **20**, 275–284 (2025).
84. Repetto, G., del Peso, A. & Zurita, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nature Protocols* **3**, 1125–1131 (2008).
85. Andrews, S. FastQC . <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
86. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120 (2014).
87. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760 (2009).
88. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
89. Wilm, A. *et al.* LoFreq: A sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic Acids Research* **40**, 11189–11201 (2012).
90. Genovese, G. *et al.* BCFtools/liftover: an accurate and comprehensive tool to convert genetic variants across genome assemblies. *Bioinformatics* **40**, (2024).

91. Cingolani, P. *et al.* A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly* **6**, 80–92 (2012).
92. Clercq, E. De. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. **29**, 695–747 (2016).
93. Rumlová, M. & Ruml, T. In vitro methods for testing antiviral drugs. **36**, 557–576 (2018).
94. Aoki-Utsubo, C., Chen, M. & Hotta, H. Virucidal and Neutralizing Activity Tests for Antiviral Substances and Antibodies. *bio-protocol* **8**, 1–12 (2018).
95. Applied Biological Materials Inc. (abm). What is Multiplicity of Infection (MOI)? *abm* <https://info.abmgood.com/multiplicity-of-infection-moi>.
96. Martin, B. E., Harris, J. D., Sun, J., Koelle, K. & Brooke, C. B. Cellular co-infection can modulate the efficiency of influenza A virus production and shape the interferon response. *PLOS PATHOGENS* 1–30 (2020) doi:10.1371/journal.ppat.1008974.
97. Reichling, J. Antiviral and Virucidal Properties of Essential Oils and Isolated Compounds – A Scientific Approach. *Planta Medica* **88**, 587–603 (2022).
98. Astani, A. & Schnitzler, P. Screening for Antiviral Activities of Isolated Compounds from Essential Oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2011**, (2011).
99. R. da Silva, J. K., Baia Figueiredo, P. L., Byler, K. G. & Setzer, W. N. Essential Oils as Antiviral Agents , Potential of Essential Oils to Treat SARS-CoV-2 Infection : An In-Silico Investigation. *International Journal of Molecular Sciences Article* **21**, (2020).
100. Hierholzer, J. C. & Killington, R. Virus isolation and quantitation. *Virology Methods Manual* 25–46 (2007) doi:10.1016/B978-012465330-6/50003-8.
101. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines : M Inimum I Nformation for Publication of Q Uantitative Real-Time PCR E Xperiments SUMMARY : *Clinical Chemistry* vol. 55 (2009).
102. Taylor, S. C. *et al.* The Ultimate qPCR Experiment : Producing Publication Quality , Reproducible Data the First Time. *Trends in Biotechnology* **37**, 761–774 (2019).

103. Bustin, S. A. & Nolan, T. Pitfalls of Quantitative Real- Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Stephen. *Journal of Biomolecular Tchniques* **15**, 155–166 (2004).
104. Colalto, C. Volatile molecules for COVID-19: A possible pharmacological strategy? *Drug Development Research* **81**, 950–968 (2020).
105. Olganier, D., Nichols, C., He, Z. & Hiscott, J. 188: Dengue infection generates an early NADPH-oxidase dependent ROS production required for antiviral and inflammatory responses. *Cytokine* **63**, 287.
106. Bender, S. & Neufeldt, C. J. Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Article Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell Host and Microbe* **20**, 342–356 (2016).
107. Ahmed, S., Varga, R. D. & Yang, J. The Impacts of Dengue Virus Infection on Mitochondrial Functions and Dynamics. (2025).
108. El-bacha, T. & Poian, A. T. Da. The International Journal of Biochemistry Virus-induced changes in mitochondrial bioenergetics as potential targets for therapy &. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **45**, 41–46 (2013).
109. Singh, B. *et al.* Defective Mitochondrial Quality Control during Dengue Infection Contributes to Disease Pathogenesis. *Journal of Virology* **96**, 1–29 (2022).
110. Ayed, A. *et al.* Antimicrobial , anti-enzymatic and antioxidant activities of essential oils from some Tunisian Eucalyptus species. *Heliyon* **10**, e34518 (2024).
111. Naceur, H. *et al.* Eucalyptus oleosa Essential Oils: Chemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Oils from Different Plant Parts (Stems, Leaves, Flowers and Fruits). 1695–1709 (2011) doi:10.3390/molecules16021695.
112. Miguel, M. G. *et al.* Activities of Corymbia citriodora and the Essential Oils of Eight Eucalyptus Species. *Medicines* **5**, 1–12 (2018).

113. Dermene, A., Elohi, K., Simalou, O. & Assiki, B. A Comparative Study on the Antioxidant and Insecticidal Activities of Eucalyptus camaldulensis Essential Oil and Hydrosol. *International Journal of Pharmacy and Chemistry* **10**, 10–17 (2024).
114. Hadj-moussa, H. *et al.* Chemical characterization of Eucalyptus (Eucalyptus globulus) leaf essential oil and evaluation of its antifungal, antibacterial and antioxidant activities. *Cellular and Molecular Biology* **70**, 1–9 (2024).
115. Moura Rufino, M. do S. *et al.* Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). *Embrapa* 3–6 (2006).
116. Moura Rufino, M. do S. *et al.* Metodologia Científica : Determinação Da Atividade Antioxidante Total Em Frutas Pela Captura Do Radical Livre. *Embrapa* (2007).
117. Kedare, S. B. & Singh, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* **48**, 412–422 (2011).
118. Yang, D. *et al.* Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells. *Experimental Eye Research* **85**, 462–472 (2007).
119. Naik, E. & Dixit, V. M. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *The Journal of Experimental Medicine* **208**, 417–420 (2011).
120. Chu, D. & Wei, L. Nonsynonymous , synonymous and nonsense mutations in human cancer-related genes undergo stronger purifying selections than expectation. *BMC Cancer* **19**, 1–12 (2019).
121. Wieder, N. *et al.* Differences in 5 ' untranslated regions highlight the importance of translational regulation of dosage sensitive genes. *Genome Biology* **25**, 1–16 (2024).
122. Borges de Souza, U. J. *et al.* Circulation of Dengue Virus Serotype 1 Genotype V and Dengue Virus Serotype 2 Genotype III in Tocantins State, Northern Brazil, 2021–2022. *Viruses* **15**, (2023).
123. Vanblargan, L. A. *et al.* Dengue Virus Serotype 1 Conformational Dynamics Confers Virus Strain-Dependent Patterns of Neutralization by Polyclonal Sera. *Journal of Virology* **95**, 1–14 (2021).

124. Suzuki, R., de Borba, L., Duarte dos Santos, C. N. & Mason, P. W. Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: characterization of a temperature- sensitive mutation in NS1. *Virology* **362**, 374–383 (2008).
125. Zou, J. *et al.* Characterization of Dengue Virus NS4A and NS4B Protein Interaction. *Journal of Virology* **89**, 3455–3470 (2015).
126. Smith, S. A. *et al.* Dengue Virus prM-Specific Human Monoclonal Antibodies with Virus Replication-Enhancing Properties Recognize a Single. *Journal of Virol* **90**, 780–789 (2016).
127. Caraballo, G. I., Rosales, R., Viettri, M., Castillo, M. & Cruz, R. The Dengue Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) Interacts with the Putative Epigenetic Regulator DIDO1 to Promote Flavivirus Replication in Mosquito Cells. *Journal of Virology* **1**, (2022).
128. Kiemel, D. *et al.* Pan-serotype dengue virus inhibitor JNJ-A07 targets NS4A-2K-NS4B interaction with NS2B / NS3 and blocks replication organelle formation. *Nature Communications* **15**, (2024).
129. Galiano, V., Garcia-Valtanen, P., Micol, V. & Encinar, J. A. Looking for inhibitors of the dengue virus NS5 RNA-dependent RNA-polymerase using a molecular docking approach. *Drug Design, Development and Therapy* **10**, 3163–3181 (2016).