

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) – *Campus* de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia

Gustavo Chagas Lutfala Paulino

Avaliação do extrato de inhame (*Colocasia esculenta*) como agente antiviral contra os vírus Chikungunya e Zika, e como agente larvicida contra mosquitos *Aedes aegypti*

Araraquara, SP

2019

Gustavo Chagas Lutfala Paulino

Avaliação do extrato de inhame (*Colocasia esculenta*) como agente antiviral contra os vírus Chikungunya e Zika, e como agente larvicida contra mosquitos *Aedes aegypti*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia,
Área de Concentração: Virologia, da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
UNESP, como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em Biociências
e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Mondini

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Bernardes Terzian

Araraquara, SP

2019

P328a Paulino, Gustavo Chagas Lutfala.
Avaliação do extrato de inhame (*Colocasia esculenta*) como agente antiviral contra os vírus Chikungunya e Zika, e como agente larvicida contra mosquitos *Aedes aegypti* / Gustavo Chagas Lutfala Paulino. – Araraquara: [s.n.], 2019.
69 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Adriano Mondini.
Coorientadora: Ana Carolina Bernardes Terzian.

1. *Colocasia esculenta*. 2. Extrato. 3. Antiviral. 4. ZIKV. 5. CHIKV.
I. Mondini, Adriano, orient. II. Terzian, Ana Carolina Bernardes, coorient.
III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre estiveram presentes para me apoiar e aconselhar. Obrigado por tudo que fizeram para que eu chegasse até esse momento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me estender a mão nos momentos difíceis e me fazer seguir em frente com lucidez, perseverança e calma.

Ao meu orientador Prof. Dr. Adriano Mondini pela oportunidade de trabalhar na sua equipe, por confiar no meu trabalho e compartilhar seu conhecimento e experiência para o desenvolvimento desse trabalho.

À minha coorientadora Profa. Dra. Ana Carolina Bernades Terzian, por compartilhar seus conhecimentos, experiências e auxiliar de forma fundamental para o desenvolvimento e finalização do trabalho.

Aos colegas e amigos de trabalho diário do laboratório de saúde pública, João, Paulo, Tainá, Arianne, Felipe, Aline, Alef, Carla, Talita, Joselma, Adriana, Vinícius, Fábio, Bruna e Igor, por toda a troca de conhecimento e experiência, além das conversas descontraídas durante os intervalos.

À Marília, amiga que essa caminhada proporcionou, agradeço por sempre estar disposta em ajudar e aconselhar para o que fosse preciso.

Ao Prof. Dr. Cristiano e sua equipe do laboratório PASIQUIBAC, Fernanda, Tamara, Bruna, Patrick e Karina por todo o auxílio durante esse período de trabalho.

À Professora Ângela, e suas orientandas Maria do Carmo e Isabela por todo o auxílio e conhecimento fornecido na área de química, foram fundamentais para o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos do laboratório de Parasitologia, Profa. Dra. Mara Cristina Pinto, Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, Jader, Heloisa, Thiago, Lucas, Flávia, Vicente, Juliana e Rossana, pelas trocas de experiência e conhecimento, além das conversas descontraídas durante o “cafézinho” da manhã e tarde.

Ao Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, e a sua equipe, Leonardo, Bruno, Gislaine, Karina, Thaisa, Manlio, Natália pela oportunidade de aprimorar os conhecimentos no LPV e também por sempre me receberem de “braços abertos”.

À Profa. Dra. Carolina Colombelli Pacca, por sua paciência e ensinamentos, foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho.

À Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros e sua equipe, Júlia, Letícia, Matheus, por sempre ajudarem no que fosse preciso e por toda troca de conhecimento e experiência.

Aos amigos do “Fut Ascar”, “pelas resenhas” às quinta-feira.

Aos grandes amigos de convivência diária, Lucas e Matheus, pelos conselhos, risadas e companheirismo durante esse período.

À minha companheira Natalie, que sempre trouxe luz as minhas dúvidas, calma ao meu desespero, agradeço por sempre me nortear e fazer eu enxergar sempre a solução para os problemas.

Aos meus pais, Alexandro e Tereza Cristina, e aos meus irmãos, Alexandro Júnior, Gabriel e Isabela, por todo o apoio e carinho nos bons e maus momentos, vocês são fundamentais na minha vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 134085/2017-5.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Código de Financiamento 134085/2017-5.

*“ Quem sabe direito o que uma pessoa é?
Antes sendo: julgamento é sempre
defeituoso, porque o que a gente julga é o
passado.”*

João Guimarães Rosa

RESUMO

Arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes. Apresentam grande importância no âmbito da saúde pública devido à morbidade e mortalidade de suas infecções. Nos últimos quatro anos, muitos casos de infecção pelos vírus Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV) foram notificados no Brasil. O controle de seu principal vetor, o mosquito *Aedes aegypti*, é uma das formas de combate a esses vírus. Não há, até o momento, terapia antiviral específica contra infecções causadas por esses vírus, e os meios de controle do vetor, disponíveis, geram resistência e danos ambientais. Assim, compostos naturais, com ação antiviral ou que controlem o vetor, tornam-se uma via importante e atrativa. O extrato de inhame (*Colocasia esculenta*) possui entre suas substâncias a tarina, uma lectina que demonstrou atividade antiviral contra o DENV e HCV, além de atividade larvicida contra mosquitos *Diaphania nitidalis*. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade do extrato de *Colocasia esculenta*, obtidos por dois métodos de extração, quanto a sua atividade antiviral contra o CHIKV e ZIKV, bem como quanto a sua ação larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti*. Os extratos foram obtidos a partir das folhas e do caule do inhame, e extraídos com a utilização de água e metanol. Os extratos aquosos e metanólico foram obtidos por técnica de maceração. Para a avaliação da ação antiviral, os extratos foram utilizados em ensaios de citotoxicidade e de redução de placas em cultura celular, bem como PCR em tempo real (qPCR) para quantificação da carga viral. Para a avaliação da ação larvicida, foi realizado o ensaio utilizando larvas de *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) no quarto estágio de desenvolvimento. Quanto a atividade antiviral, os resultados mostraram que o extrato aquoso foi capaz de inibir a replicação de ZIKV em mais de 90% *in vitro* quando avaliado o fenótipo, por meio da contagem de placas, e de aproximadamente 5% para CHIKV. No entanto, o extrato metanólico não demonstrou ação sobre a replicação viral de ZIKV e CHIKV *in vitro*, pela contagem de placas. Quando avaliado quantitativamente, pelo qPCR, o extrato aquoso demonstrou diminuir atividade replicativa tanto de CHIKV cerca 1 log₁₀ como de ZIKV cerca 3 log₁₀. Já o extrato metanólico inibiu apenas a replicação de CHIKV, cerca 1 log₁₀. Nenhum dos extratos apresentou efeito larvicida nas condições testadas. Os dados indicam que tanto o extrato aquoso como metanólico inibiram a replicação viral *in vitro*. Alguns estudos complementares serão necessários para determinar o real potencial antiviral dos extratos do inhame.

Palavras-chave: *Colocasia esculenta*. Extrato. Antiviral. ZIKV.CHIKV.

ABSTRACT

Arbovirus is the term designated for arthropod-borne viruses. They have a great importance in public health because of morbidity and mortality of their infections. In the last four years, many cases of Zika (ZIKV) and Chikungunya (CHIKV) virus infections have been reported in Brazil. Surveillance of *Aedes aegypti* mosquitoes, is one of the ways to combat these viruses. There is no specific antiviral therapy against infections caused by these viruses, and insecticides to the vector control causes resistance and environmental damage. Thus, natural compounds, with antiviral action or controlling the vector, become an important and attractive aspect. Coconut yam extract (*Colocasia esculenta*) has various compounds, like a lectin that has shown antiviral activity against DENV and HCV, as well as larvicidal activity against *Diaphania nitidalis* mosquitoes. The objective of this work was to evaluate the activity of *Colocasia esculenta* extract, obtained by two extraction solvents, regarding its antiviral activity against CHIKV and ZIKV, as well as its larvicidal action against the *Aedes aegypti* mosquito. Initially, the extracts were obtained from the leaves and stem of the yam, and extracted using water and methanol. The aqueous and methanolic extracts were obtained by maceration technique. For the evaluation of antiviral action, the extracts were used in cytotoxicity and plaque reduction assays in cell culture, as well as real time PCR (qPCR) to quantify viral load. To evaluate the larvicidal action, the assay was performed using *Aedes aegypti* larvae (*Ae. Aegypti*) in the fourth stage of development. Regarding antiviral activity, the results showed that the aqueous extract was able to inhibit ZIKV replication in more than 90% in vitro when the phenotype was evaluated by plaque count and approximately 5% for CHIKV. However, methanolic extract showed no action on viral replication of ZIKV and CHIKV in vitro by plaque count. When evaluated quantitatively by qPCR, aqueous extract was shown to decrease replicative activity of both CHIKV about 1 log₁₀ and ZIKV about 3 log₁₀. Methanolic extract only inhibited CHIKV replication, about 1 log₁₀. None of the extracts showed larvicidal effect under the tested conditions. The data indicate that both aqueous and methanolic extracts have interfered with viral replication in vitro. Further studies will be needed to determine the actual antiviral potential of yam extracts.

Key Words: *Colocasia esculenta*. Extract. Antiviral. ZIKV. CHIKV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fluxograma detalhado das atividades realizadas.....	29
Figura 2 Análise das concentrações citotóxicas do extrato aquoso sobre células Vero E6.....	37
Figura 3 Análise das concentrações citotóxicas do extrato metanólico sobre células Vero E6.....	38
Figura 4 Inibição da replicação de ZIKV em células tratadas com extrato aquoso de <i>C. esculenta</i> segundo % de placas virais formadas, quando comparadas ao controle viral (CV). Eixo Y: % de Redução da replicação. Eixo X: Células expostas a diferentes concentrações do extrato.....	39
Figura 5 Inibição da replicação de ZIKV em células tratadas com extrato metanólico de <i>C. esculenta</i> segundo % de placas virais formadas, quando comparadas ao controle viral (CV). Eixo Y: % de Redução da replicação. Eixo X: Células expostas a diferentes concentrações do extrato.....	40
Figura 6 Inibição da replicação de CHIKV em células tratadas com extrato aquoso de <i>C. esculenta</i> segundo % de placas virais formadas, quando comparadas ao controle viral (CV). Eixo Y: % de Redução da replicação. Eixo X: Células expostas a diferentes concentrações do extrato.....	41
Figura 7 Análise da replicação de CHIKV em células tratadas com extrato metanólico de <i>C. esculenta</i> segundo % de placas virais formadas, quando comparadas ao controle viral (CV). Eixo Y: % de Redução da replicação. Eixo X: Células expostas a diferentes concentrações do extrato.....	42
Figura 8 PCR em tempo real para quantificar a replicação de ZIKV em células Vero E6 tratadas com extrato aquoso de <i>C. esculenta</i> . CV= controle viral e Mock = controle celular.....	43
Figura 9 PCR em tempo real para quantificar a replicação de ZIKV em células Vero E6 tratadas com extrato metanólico de <i>C. esculenta</i> . CV= controle viral e Mock = controle celular.....	44
Figura 10 PCR em tempo real para quantificar a replicação de CHIKV em células Vero E6, tratadas com extrato aquoso de <i>C. esculenta</i> . CV= controle viral Mock = controle celular.....	45
Figura 11 PCR em tempo real para quantificar a replicação de CHIKV em células Vero E6, tratadas com extrato metanólico de <i>C. esculenta</i> . CV= controle viral Mock = controle celular.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Lista de iniciadores e sondas de ZIKV e CHIKV utilizados no PCR em tempo real.....	34
Tabela 2 Representação dos resultados obtidos no ensaio larvicida frente a diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Colocasia esculenta</i>	48
Tabela 3 Representação dos resultados obtidos no ensaio larvicida frente a diferentes concentrações do extrato metanólico de <i>Colocasia esculenta</i>	49

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

AINES	Antiinflamatórios não esteroidais
BAR	Medida de Pressão
CBAs	Carbohidrat Biding Agents
CC	Concentração Citotóxica
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHIKV	Vírus Chikungunya
CMC	Carboximetilcelulose
CO ₂	Dioxido de Carbono
DENV	Vírus da Dengue
E	Envelope
GNA	<i>Galantus Nivalis</i> Aglutinim
Gp E1	Glicoproteína do Envelope 1
Gp E 2	Glicoproteína do Envelope 2
HCV	Vírus da Hepatite C
ILHV	Vírus Ilhéus
Kg	Quilos
Km	Quilômetro
L-15	Leibowitz-15
M	Proteína de Membrana
MAYV	Vírus Mayaro
MEM	Minimum Essential Medium
MI	Mililitro
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
Nm	Nanômetros
NS	Proteína Não Estrutural
NS1	Proteína Não Estrutural 1
NS2	Proteína Não Estrutural 2
NS3	Proteína Não Estrutural 3
NS4	Proteína Não Estrutural 4

NS5	Proteína Não Estrutural 5
OROV	Vírus Oropouche
PFU	Plaquing Unit Forming
qPCR	PCR quantitativo
prM	Proteína Pré- Membrana
RNA	Ácido Ribonucleotídeo
RNA _m	Ácido Ribonucleotídeo Mensageiro
ROCV	Vírus Rocio
Rpm	Rotações por minuto
RT	Enzima Transcriptase Reversa
SLEV	Vírus da Encefalite de Saint Louis
YFV	Vírus da Febre Amarela
WNV	Vírus do Oeste do Nilo
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1.Introdução	16
1.1Arbovírus: Visão Geral	16
1.2. Família <i>Flaviviridae</i> – gênero <i>Flavivirus</i>	17
1.2.1.Vírus Zika (ZIKV)	18
1.3.Família <i>Togaviridae</i> - Gênero <i>Alphavirus</i>	20
1.3.1.Vírus Chikungunya (CHIKV)	20
1.4.Vetores transmissores de arbovírus	21
1.4.1. Ciclo de desenvolvimento do <i>Aedes aegypti</i>	22
1.5.Tratamento, Prevenção e Combate ao Vetor	23
1.6.Plantas como recurso terapêutico	25
1.6.1.<i>Colocasia esculenta</i> (inhame coco)	25
2. Objetivos	28
2.1.Objetivo geral	28
2.2.Objetivos específicos	28
3. Materiais e Métodos	29
3.1 Obtenção do material vegetal	29
3.1.1. Extrato Aquoso	30
3.1.2.Extrato metanólico	30
3.2.Cultura Celular	30
3.2.1. Linhagens Celulares	30
3.2.2.Estoques Virais	31
3.2.3.Titulação Viral	31
3.2.4.Ensaio de Citotoxicidade	31
3.2.5. Ensaio de Redução de Placa	32

3.3.qPCR para avaliação de replicação de ZIKV e CHIKV	32
3.5.Obtenção de larvas e criação de mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	34
3.5.1.Ensaio Larvicida	35
4.Resultados	37
4.1.Ensaio de citotoxicidade-MTT	37
4.2.Ensaio antiviral de redução de placas para avaliação do perfil fenotípico.	38
4.3.PCR em tempo real (qPCR) para avaliar a replicação viral de ZIKV e CHIKV	42
4.4.Ação Larvicida dos Compostos	46
5. Discussão	50
6.Conclusão	54
7. Referências bibliográficas	55

1.Introdução

1.1. Arbovírus: Visão Geral

As arboviroses são doenças causadas por arbovírus, os quais são vírus transmitidos por artrópodes hematófagos a hospedeiros vertebrados suscetíveis. As arboviroses são frequentemente associadas a surtos em seres humanos e animais e representam um problema sério de saúde pública. Apresentam ampla distribuição geográfica, abrangendo todos os continentes, mas estão presentes predominantemente nos trópicos, devido às condições climáticas favoráveis à manutenção do ciclo viral (GUBLER; CLARCK, 1995; WILDER-SMITH et al., 2017). O Brasil é um país tropical que apresenta condições ideais para a ocorrência de arboviroses por apresentar grande extensão territorial 8.515.767,049 km² e mais de 1/3 do território recoberto por florestas tropicais, sendo um ambiente favorável para ocorrência de epidemias (IBGE, 2019).

Cerca de 537 espécies diferentes de arbovírus estão registradas no CDC (Centers for Disease and Control and Prevention), sendo que 130 delas causam doenças em humanos de forma esporádica, endêmica e/ou epidêmica (GUBLER, 2001, 2002; DASH et al., 2013; HUBALEK et al., 2014; HUANG et al., 2019).

A maioria destes vírus pertence às famílias *Togaviridae* (gênero *Alphavirus*), *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*) e *Peribunyaviridae* (gênero *Orthobunyavirus*). Alguns representantes dos arbovírus, como os vírus Mayaro, vírus chikungunya (CHIKV), (MAYV), Dengue (DENV), Febre Amarela (Yellow Fever – YFV), Rocio (ROCV) e Oropouche (OROV), têm sido responsáveis por mais de 95% dos casos de arboviroses humanas no Brasil (FIGUEIREDO, 2007; VASCONCELOS, 2005).

A manutenção dos arbovírus na natureza ocorre através de ciclos silvestres complexos com participação de espécies de vertebrados silvestres (aves, roedores, marsupiais, primatas, morcegos, répteis e outros) e artrópodes hematófagos (mosquitos, carrapatos, ácaros, simulídeos e tabanídeos). O homem é hospedeiro acidental para a maioria das arboviroses e se infecta ao penetrar em áreas enzoóticas (NATHANSO, 2007). Por outro lado, mudanças ecológicas no habitat natural destes vírus levam a alterações em seus ciclos, ocorrendo adaptação a novos reservatórios e, com isto, aumentando sua multiplicação e o risco de sua emergência (FIGUEIREDO, 2007; PETERS, 2007). Outro mecanismo para manutenção dos

arbovírus é a transmissão transovariana, como ocorre com os vírus da Encefalite Japonesa, Febre Amarela e Dengue (VASCONCELOS, 2005) entretanto, este modo de transmissão não é tão expressivo na disseminação dos arbovírus (RODHAIN, 1995; NATHANSO, 2007).

Após a infecção, há um período de incubação durante o qual ocorre multiplicação viral. A intensidade desta multiplicação e a sua localização determinarão o aparecimento de manifestações clínicas, como febre acompanhada de mal-estar, cefaleia, náuseas, vômitos e mialgia. Neste estágio, a doença pode terminar ou exibir manifestações hemorrágicas secundárias (CDC, 2003).

De uma forma geral, infecções por arbovírus podem levar a quatro formas clínicas distintas (GUBLER, 2001), dentre as quais se destaca a doença febril (causada por praticamente todos os arbovírus patogênicos ao homem), doença febril com exantema, febre hemorrágica (no Brasil, causada apenas pelos vírus do Dengue e Febre Amarela) e encefalite (causada por diversos membros das famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, e *Peribunyaviridae* e *Reoviridae*) (CLETON et al., 2012). No entanto, sintomatologia inespecífica pode ser observada nas infecções por diferentes arbovírus, especialmente na fase aguda, dificultando o diagnóstico clínico (VASCONCELOS, 2005; FONSECA; FIGUEIREDO, 2002).

1.2. Família *Flaviviridae* – gênero *Flavivirus*

Os Flavivirus são vírus esféricos, envelopados, com 40 a 60 nm de diâmetro e possuem projeções na superfície do envoltório de natureza lipoproteica, contendo projeções superficiais. Os vírions maduros são compostos por 6% de RNA, 66% de proteína, 9% de carboidrato e 17% de lipídio. O genoma é constituído por RNA de fita simples, linear e de polaridade positiva, e possui aproximadamente 11 Kb em tamanho, com cap na posição 5' e ausência de cauda poli (A) na posição 3' . O genoma atua como RNAm para a tradução de uma única e longa ORF (open reading frame), a qual é traduzida em uma única poliproteína e processada, por meio de proteases virais e celulares, em três proteínas estruturais e sete não-estruturais (NS), respectivamente, na seguinte ordem: 5'-C-prM(M)-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' (no caso dos Hepacivirus e Pestivirus, a NS5 é dividida em NS5A e NS5B). As funções de todas as proteínas virais ainda não foram totalmente estabelecidas, mas sabe-se que as proteínas estruturais são incorporadas ao virion durante a montagem da partícula e liberação viral e as proteínas não-estruturais são

responsáveis pela replicação nas células infectadas (ROBY; FUNK; KHRAMYKH, 2012; MONATH, 2001).

A família *Flaviviridae* é composta por quatro gêneros: Flavivirus, Pestivirus, Pegivirus, Hepacivirus (STAPLETON et al., 2011). O gênero *Flavivirus* é composto por mais de 70 vírus distribuídos mundialmente, sendo que 43 destes estão associados a doenças humanas, entre elas, o Dengue, Febre Amarela, West Nile, Complexo Encefalite por picada de carrapato e Encefalite Japonesa, sendo consideradas as mais importantes no mundo por causarem alta taxa de morbidade e mortalidade (BURKE; MONATH, 2007; AKAHATA; UENO, 2018).

No Brasil já foram isolados os Flavivirus da Febre Amarela (Yellow Fever Virus – YFV), do Dengue (DENV) 1, 2, 3 e 4, Encefalite de Saint Louis (Saint Louis Encephalitis - SLEV), Rocio (ROCV), Ilhéus (ILHV), Zika (ZIKV), Bussuquara (BSQV), Iguape (IGUV) e Cacipacoré (CACV), West Nile (WNV). Muitos destes vírus são zoonóticos no meio silvestre e podem, eventualmente, infectar o homem, como os vírus YFV, SLE, ROC, ILH e BSQ (DEGALLIER et al., 1998; BATISTA et al., 2012; MARTINS et al., 2019).

1.2.1. Vírus Zika (ZIKV)

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus emergente no Brasil. Foi primeiramente detectado durante um programa de vigilância para febre amarela silvestre, em 1947, sendo isolado de macacos Rhesus que habitavam uma floresta próxima a Kampala, Uganda. Em humanos, a primeira detecção ocorreu em 1952 na Uganda e na Tanzânia (DICK; KITCHEN; HADDOW; 1952). Foi considerado emergente desde 2007 quando causou epidemias na Micronésia e no Gabão (LANCIOTTI et al., 2008). Após alguns anos sem relatos de casos, em 2013 o vírus ressurgiu causando uma grande epidemia na Polinésia Francesa (CAO-LORMEAU et al., 2014). Neste último caso, infecções pelo ZIKV foram relacionadas a um aumento de complicações neurológicas como a Síndrome de Guillain-Barré e malformações congênitas (ENFISSI et al., 2016). Em seguida, o vírus se espalhou pelo Oceano Pacífico (MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU; 2014) e em meados de 2014, um caso de Zika foi confirmado na Ilha de Páscoa (CLOUETI-HUERTA; ALFARO-TOLOZA; RODRÍGUES-MORALES, 2014). Não há consenso sobre a introdução do vírus no Brasil, entretanto, mosquitos *Aedes aegypti* capturados no Rio de Janeiro em 2013 estavam infectados com ZIKV, sendo que estes mosquitos haviam sido capturados

antes da confirmação do primeiro caso autóctone da doença na cidade. (AYLLON et al., 2017).

A respeito dos casos de febre do Zika, segundo a Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009), 39 países reportaram a circulação do vírus desde 2007. Dentre estes, Brasil, Polinésia Francesa, El Salvador, Venezuela, Colômbia e Suriname têm reportado concomitantemente aos casos de infecção o aumento da incidência de casos da Síndrome de Guillain-Barré e de microcefalia, esta última particularmente no Brasil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a). Em pouco tempo, as infecções pelo ZIKV tornaram-se uma realidade e com consequências inimagináveis para uma infecção causada por arbovírus. Embora se atribua as causas de microcefalia e da Síndrome Guillain-Barré ao vírus Zika, muito ainda deve ser investigado. Em 1º de fevereiro de 2016, a WHO declarou que o cluster de microcefalia e ZIKV é uma Emergência de Saúde Pública de Preocupação Internacional (PHEIC -Public Health Emergency of International Concern) (HEYMANN et al., 2016), mostrando a preocupação que este vírus tem causado em nível mundial. Em novembro de 2016, o alerta de emergência foi retirado devido a diminuição dos casos reportados, entretanto, a preocupação continua (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016b).

O ZIKV é geneticamente homólogo a outros arbovírus e a transmissão urbana é realizada pelo mosquito *Aedes aegypti*, o mesmo vetor do vírus Dengue, Chikungunya, e apresenta manifestações clínicas semelhantes as atribuídas a outros arbovírus (IOOS et al., 2014; ROTH et al., 2014).

A síndrome causada por ZIKV é em geral benigna, caracterizada por rash cutâneo, febre e artralgia, com muitos casos assintomáticos (KRUGUER, 2016). Entretanto, a epidemia que ocorreu no Brasil chamou a atenção devido à possível associação do ZIKV com o aumento incomum de casos de microcefalia em recém-nascidos.

A detecção do RNA viral por PCR em tempo real (qPCR) ou o isolamento viral são caros e limitados ao período de viremia, em torno de cinco dias (KRUGUER, 2016). Um outro método diagnóstico suporte para detecção é a pesquisa por anticorpos IgM e IgG. Anticorpos IgM podem ser encontrados no soro do indivíduo a partir do terceiro dia, e IgG no soro na fase aguda ou coalescente após a infecção (LANCIOTTI et al., 2008). Um contraponto a essa técnica é a reação cruzada que

pode acontecer caso tenha ocorrido infecções anteriores com outros flavivírus (DUFFY et al., 2009; MANSFIELD et al., 2011).

1.3. Família *Togaviridae* - Gênero *Alphavirus*

Os vírus deste gênero medem 70 nm de diâmetro, apresentam capsídeo de simetria icosaédrica, circundado por envoltório constituído de espículas em sua superfície. O genoma viral é constituído de RNA de fita única, linear, de polaridade positiva com aproximadamente 11,7 kb distribuídos por oito genes, os quais codificam proteínas não-estruturais (nsP1 a nsP4) envolvidas na replicação viral e proteínas estruturais do envoltório (glicoproteínas E1 e E2), do capsídeo, além de pequenos polipeptídeos E3 e 6Ks. Os Alphavirus se ligam a receptores específicos expressos em muitos tipos celulares de várias espécies, mas cada um apresenta tropismo tecidual diferente o que causa diferentes manifestações da doença (MURRAY, 2006).

Dentre os Alphavirus de importância no Brasil, o vírus Mayaro (MAYV) é responsável por causar a Febre do Mayaro, e vírus Chikungunya (CHIKV) é o responsável pela Febre do Chikungunya (Smith et al., 2018). Ainda apresentam importância dentro do gênero os vírus da Encefalite Equina Venezuelana (Venezuelan Equine Encephalitis – VEEV), da Encefalite Equina do Leste (Eastern Equine Encephalitis – EEEV) e da Encefalite Equina do Oeste (Western Equine Encephalitis – WEEV) os quais são causadores das Encefalites Equinas (POWERS et al., 2001; POWERS et al., 2008; ZACK, 2010)

1.3.1. Vírus Chikungunya (CHIKV)

O vírus foi primeiramente isolado em 1953 no platô Makonde, na Tanzânia (ROBINSON, 1955). Alguns surtos limitados foram descritos nos anos 50 e 60, na Índia e sudeste asiático (KUMAR, 2010); entretanto, a partir de 2004 o vírus se espalhou rapidamente causando surtos massivos em ilhas do Oceano Índico, na Índia e no sudeste asiático, atingindo posteriormente mais de 22 países (ENSERINK, 2006; ARANKALLE et al., 2006; HAPUARACHI et al., 2010).

No Brasil foi introduzido a partir do Caribe, e os primeiros casos autóctones foram relatados em Oiapoque (Amapá) e, logo em seguida, em Feira de Santana (Bahia), em setembro de 2014 (NUNES et al., 2015; FIGUEIREDO, 2017). Atualmente, diversos estados brasileiros apresentam casos de CHIKV (ALBUQUERQUE et al., 2012).

Segundo o Ministério da Saúde, nos anos de 2016, 2017 e 2018 aproximadamente 537.000 casos suspeitos de febre do chikungunya foram notificados

no Brasil e 419 óbitos foram confirmados decorrentes da infecção. Os casos suspeitos concentraram-se predominantemente nas regiões Nordeste e Sudeste do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2016; 2017; 2018). No ano de 2019, segundo o ministério da Saúde, entre os meses de janeiro a março, foram notificados 15.532 casos suspeitos de febre do chikungunya. Essas notificações estão presentes em todas as regiões do país sendo a região Sudeste a que registrou o maior número de casos, cerca de 10.300 notificações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

A febre do Chikungunya é uma doença auto-limitada, caracterizada por febre alta, rash e poliartralgia/poliartrite e intensa mialgia. Estes sintomas geralmente são acompanhados por cefaleia, náuseas, vômitos, diarreia, astenia, edema nas articulações, fotofobia, conjuntivite/hiperemia conjuntival. Estes são sintomas não-específicos que fazem com que a febre do Chikungunya seja muitas vezes clinicamente indistinguível de outras arboviroses como dengue (CUNHA, 2017; CAREY, 1973). Alguns relatos de complicações neurológicas já foram descritos (METHA, 2018).

Os vetores deste vírus são os mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Ae. aegypti*. Entretanto, o *Ae. albopictus* tem se mostrado um importante vetor especialmente nas epidemias ocorridas no Oceano Índico, por apresentar características rurais e urbanas (SWAROOP et al., 2007). Na África, seus principais hospedeiros vertebrados são espécies de primatas não-humanos e outros mamíferos nos ciclos silvestres. No ciclo urbano, o vírus é transmitido diretamente ao homem pela picada do mosquito *Ae. Aegypti* ou *Ae. albopictus* (GRIFFIN, 2012).

1.4. Vetores transmissores de arbovírus

O risco para a emergência de novos arbovírus no Brasil relaciona-se à existência de cidades grandes, populosas e infestadas por mosquitos *Culex sp.* bem como o altamente antropofílico *Aedes aegypti*, os quais são os principais vetores na transmissão da Dengue, CHIKV e ZIKV (MOTA et al., 2016).

Mudanças ecológicas produzidas pelo homem podem aumentar a prevalência do vetor, criando novos reservatórios ou induzindo os arbovirus a se adaptarem a novos ciclos. Além disso, há diversos fatores associados à genética viral e do hospedeiro/vetor, como a epidemiologia, mudanças climáticas, o trânsito de pessoas, animais, plantas e mercadorias entre todos os continentes, o desenvolvimento sócio-econômico, comportamento humano (urbanização e desflorestamento) e o aumento da densidade populacional (humanos, animais e

artrópodes) (WEAVER; REISEN, 2010). Todos esses fatores associados favorecem a propagação contínua dos arbovírus seja de forma esporádica, endêmica, epidêmica (REIHOLD; LAZZARI; LAHINDÉRE, 2018).

1.4.1. Ciclo de desenvolvimento do *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* é originário da África e foi introduzido no Brasil, durante o período colonial, em decorrência do intenso tráfico de escravos; e desde então vem se propagando pelo país (Consoli, Oliveira, 1994). Atualmente pode ser encontrado em todos os estados brasileiros. Devido ao seu comportamento sintrópico, o mosquito é encontrado em áreas tanto intra como peri-domicílio (REITER et al., 1995; LAU et al 2013; GUIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; COELHO, 2012).

Em relação à mobilidade, os mosquitos adultos possuem raios de ação de 0,5 a 1 km (SHANON; DAVIS, 1930; HÓNORIO et al., 2003; REITER, 2007). As fêmeas mantêm-se, em geral, toda a vida, a uma distância de 100 a 150 metros dos locais de oviposição (FREITAS; CODECO; OLIVEIRA, 2007; HARRINGTON et al., 2005; MCDONALD, 1977;), contudo, os ovos ou o mosquito podem acompanhar o homem, viajando longas distâncias. Transporte aéreo ou por navio são umas das formas reconhecidas de disseminação vetorial (TERRA et al., 2018).

Quanto a alimentação, o hematofagismo é realizado apenas pelas fêmeas as quais necessitam do sangue de animais vertebrados para a maturação dos ovários e para o completo desenvolvimento dos ovos. Os mosquitos machos não realizam o hematofagismo e alimentam-se da seiva proveniente de plantas em geral (MOREIRA et al., 2009).

Para o processo de oviposição, e por se tratar de mosquitos adaptados a locais urbanizados, as fêmeas são capazes de realizar a oviposição nos mais diversos criadouros, sejam estes naturais ou artificiais (vasos, pneus, baldes, calhas). Uma vez que haja a presença do criadouro, a postura dos ovos será realizada nas paredes desses criadouros, preferencialmente, localizados em locais sombreados, contendo água limpa, parada e com matéria orgânica acumulada (GUBLER, 1998; SALEEZA et al., 2011).

Após a digestão do repasto sanguíneo, ocorre a maturação dos ovos. A postura pode gerar, em média, 150 ovos, sendo que as fêmeas realizam diversas posturas abrangendo todo o raio de ação que possam voar (COBERT; CHADEE, 1993). O desenvolvimento dos ovos dependerá das condições climáticas,

especialmente de alta pluviosidade e temperaturas elevadas. Em épocas de seca, os ovos podem resistir a dessecação por até 400 dias (GADELHA; TODA, 1985).

O desenvolvimento dos embriões dura, em média, dois dias, seguido pela fase larval. Nesta fase, inicia-se a alimentação, a qual ocorre pela absorção de material orgânico contido no criadouro. A fase larval é composta por quatro estágios: estágio primário, secundário, terciário e quaternário, os quais duram, aproximadamente, cinco dias ao todo quando em condições ideais para seu desenvolvimento (KHAMBAMPATI et al., 1991). A pupa é o estágio precedente a transformação da larva em mosquito. Neste estágio, com duração aproximada de 30 horas, as pupas não se alimentam e a movimentação é limitada (EISEN et al., 2009). A fase final consiste no aparecimento de características próprias dos mosquitos adultos como asas, probóscide e patas (GADELHA; TODA, 1985).

O mosquito *Aedes aegypti* possui hábitos ligados as atividades doméstica dos seres humanos, realiza o repasto sanguíneo durante o dia e tem preferência por sangue humano (TAUIL, 2001). O mosquito está adaptado a se reproduzir em ambientes domésticos, peridomésticos e faz sua oviposição em recipientes artificiais com água (DA COSTA; DOS SANTOS; BARBOSA, 2009).

Os arbovírus penetram no mosquito quando este exerce o hematofagismo. Após o repasto sanguíneo, o vírus passa pela parede do intestino para alcançar a glândula salivar do mosquito onde poderá transmitir o vírus para outros hospedeiros. Após uma ou duas semanas, o mosquito se torna infeccioso e está apto a realizar a transmissão viral (GUBLER et al., 1998).

1.5. Tratamento, Prevenção e Combate ao Vetor

Cerca de 2,5 bilhões de pessoas que vivem em áreas tropicais e subtropicais estão vulneráveis ao vírus da dengue (CHENG et al., 2016), e esse elevado número leva-nos a questionar as proporções que essas epidemias podem alcançar, sendo a vigilância epidemiológica de extrema importância (DOWNS, 1982). Todavia, no transcorrer da última década, outros arbovírus expandiram-se para áreas geográficas onde DENV era o principal causador de doença febril (PATTERSON; SAMMOM; GARG, 2016).

O tratamento das doenças causadas por CHIKV e ZIKV, ainda é o paliativo, sendo o repouso e a ingestão de líquidos as principais orientações aos acometidos. Atualmente, não existe nenhum antiviral específico ou alguma vacina licenciada para doenças causadas por esses vírus (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Existem medicamentos que são utilizados para aliviar os sintomas gerados após infecção como o paracetamol e acetoaminofem. Outras classes de medicamentos, como os antiinflamatórios não esteroidais (AINES), tem seu uso restringido em casos de suspeitas ou confirmação das doenças, para evitar o risco de complicações, principalmente quadros hemorrágicos (ATIF et al., 2016).

A prevenção e controle dos arbovírus baseia-se principalmente em campanhas de conscientização da população, para o combate ao vetor e o uso de pesticidas para eliminação dos mosquitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016c). Entretanto, no Brasil, os gastos gerados com pesticidas para controle do vetor, tratamento ambulatorial e hospitalar para os pacientes afetados por arbovírus, e as consequências causadas pelo absenteísmo, apresentam grande impacto na saúde pública (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016c).

No ano de 2016, foram gastos com controles de vetores, entre campanhas de prevenção e uso de inseticidas, larvicidas e pesticidas cerca R\$ 1,5 bilhão. Os custos médicos e ambulatoriais foram cerca de R\$ 374 milhões, e os gastos gerados pelo absenteísmo foram cerca de R\$ 431 milhões, quando avaliados as doenças causadas por ZIKV, CHIKV e DENV (TEICHE; ARINELLI; FAHHAM, 2017). As maiores taxas relatadas foram das pessoas que estavam infectadas com CHIKV, por conta de alguns sintomas mais pronunciados da doença, como a artralgia. A síntese desses valores demonstra o tamanho do impacto econômico e social gerado por arbovírus no país anualmente (TEICHE; ARINELLI; FAHHAM, 2017).

Uma das principais formas de redução do risco da transmissão desses arbovírus, são os métodos de controle dos vetores. A eliminação de possíveis criadouros dos mosquitos, em locais onde há o risco da disseminação desses vírus, através da conscientização da população é uma alternativa sustentável e sem impacto negativo ao meio ambiente (PAIXÃO; BALLOUZ; LINDAH, 2019).

O controle de culicídeos é feito principalmente pelo uso de inseticidas biológicos e sintéticos. Porém, sua utilização exagerada tem gerado uma série de consequências negativas, dentre elas a resistência aos inseticidas (CHANDRE et al., 1999). Dessa forma, a busca por alternativas eficientes para controle de vetores é imprescindível. A busca por compostos ecológicos sustentáveis, produtos naturais e metabólitos de origem vegetal que sejam eficientes e gerem resistência mínima, constituem pontos importantes para o desenvolvimento de alternativas para o controle de vetores (AGGARWAL et al., 2007). Portanto para aumentar o arsenal no combate

a esses arbovírus é necessário estimular o desenvolvimento e produção de métodos inovadores para auxiliar o combate a esses vírus (ATYAME et al., 2016).

1.6. Plantas como recurso terapêutico

Na busca por fontes alternativas de tratamento, a “medicina popular” pode servir como fonte de prospecção de novos fármacos, pois tem sua representação em diversos lugares do mundo . Um dos principais focos das terapias advindas dessa fonte são as plantas medicinais e os extratos preparados a partir de partes específicas de alguns espécimes. Muitos extratos despertaram o interesse para estudos mais aprofundados e, em alguns casos, houve a produção medicamentos que são utilizados na medicina tradicional, como alguns chás anti-diabéticos e antibacterianos, os quais utilizaram as plantas *Combretum duarteanum* Cambess (rama-branca) e *Matricaria recutita* (camomila) como base (SOUSA, 2017).

No Brasil, um bom exemplo do estudo e do uso de plantas medicinais para fins terapêuticos são as Farmácias Vivas. Trata-se de um projeto que foi iniciado no ano de 1991, no Ceará. O intuito do projeto é auxiliar as populações que não tem acesso aos serviços de saúde a utilizar de forma consciente as plantas da flora local como recurso terapêutico (SANTOS; FONSECA, 2009).

A utilização de extratos vegetais brutos e os componentes presentes, sendo eles metabólitos primários ou secundários, podem apresentar atividades contra agentes microbiológicos. Neste sentido, os estudos *in vitro* para avaliar a viabilidade do uso de extratos vegetais como ferramenta antiviral, fornece subsídios para o entendimento da dinâmica da interação entre extratos e as células (JUSTO et al., 2015). Entretanto, são necessários sistemas adequados para proteger, transportar, entregar e controlar a liberação de moléculas bioativas extraídas de plantas, sejam elas hidrofílicas ou lipofílicas, para a análise dos efeitos farmacológicos (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

1.6.1. *Colocasia esculenta* (inhame coco)

O inhame coco (*Colocasia esculenta*) é uma planta monocotiledôneada, da família *Acareceae* e nativa da Ásia. Seu rizoma de amido é amplamente consumido em muitos países, devido ao seu alto índice nutritivo. A planta foi introduzida no Brasil pelos japoneses, no início do século 20, sendo inicialmente cultivada no nordeste, com posterior disseminação para as demais regiões do país (JAMES, 1994).

O potencial da *Colocasia esculenta* contra os vírus transmitidos por artrópodes podem auxiliar na elucidação de mecanismos de ação de extratos de

plantas. O desenvolvimento de conhecimento através de estudos científicos das plantas medicinais fortalecem a relação dos profissionais de saúde com os pacientes do SUS (SANTOS; FONSECA, 2009).

O GNA (*galanthus nivalis aglutinina*) é um complexo proteico, pertencente a superfamília das lectinas das plantas, que realiza ligações com açúcares, principalmente com os que contém alto teor de manose. Essas ligações formam uma espécie de glicoproteção impedindo que agentes infecciosos, como vírus, não penetrem nas células e não sejam reconhecidos pelo sistema imunológico (LI et al., 2009). Essa família de lectina requer uma atenção especial, pois possui atividades antivirais, inseticida e antitumoral já descritas na literatura (VAN DAMME; LANOO; PEUMANS, 2008).

Um estudo de Kachko e colaboradores (2013) avaliando a atividade anti-HCV de algumas lectinas incluindo GNA, mostrou que essa lectina possuía um potencial terapêutico superior as demais pois além de inibir a proliferação do vírus, atuou especificamente em glicoproteínas (E1 e E2) presentes apenas no envelope viral (KACHKO et al., 2013). Em outro estudo, Allen e colaboradores (2011) utilizou agentes de ligação a carboidratos (CBAs), dentre eles o GNA, e demonstrou que esses agentes possuíam amplo espectro de ação antiviral frente aos quatro sorotipos do DENV (ALLEN et al., 2011).

A família das lectinas relacionadas ao GNA, incluem uma grande variedade, dentre elas a tarina, uma lectina presente na *Colocasia esculenta* (KACHKO et al., 2013). Um estudo determinou as características estruturais dessa molécula, demonstrando que ela pode ser explorada para fins terapêuticos, pois foi capaz de auxiliar na resposta imunológica, estimulando a produção de linfócitos B (PEREIRA et al., 2015).

As lectinas presentes na planta *Colocasia esculenta* apresentam um potencial inseticida, pois quando utilizadas em concentrações baixas apresentaram taxas significantes de mortalidade para larvas de segundo estágio de *Bactrocera Curcubitae* (TAKUR et al., 2013).

Os estudos de extratos de plantas como o de *Colocasia esculenta*, contra ZIKV (*Flavivírus*) e CHIKV (*Alphavírus*) são extremamente importantes para saúde pública, por trazer mais alternativas de tratamento para a doença. Pode também ser

uma alternativa de combate ao vetor, atuando de maneira letal sobre as fases imaturas do mosquito, auxiliando na prevenção.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente estudo visa avaliar a atividade antiviral de extratos de *Colocasia esculenta* (inhame coco) frente ao ZIKV e CHIKV, além da ação larvicida frente ao *Aedes aegypti*.

2.2. Objetivos específicos

- avaliar diferentes métodos de obtenção do extrato de inhame;
- avaliar a citotoxicidade do extrato de inhame em cultura celular;
- avaliar a ação antiviral dos extratos em cultura celular;
- avaliar a ação larvicida dos extratos em larvas de *Aedes aegypti*.

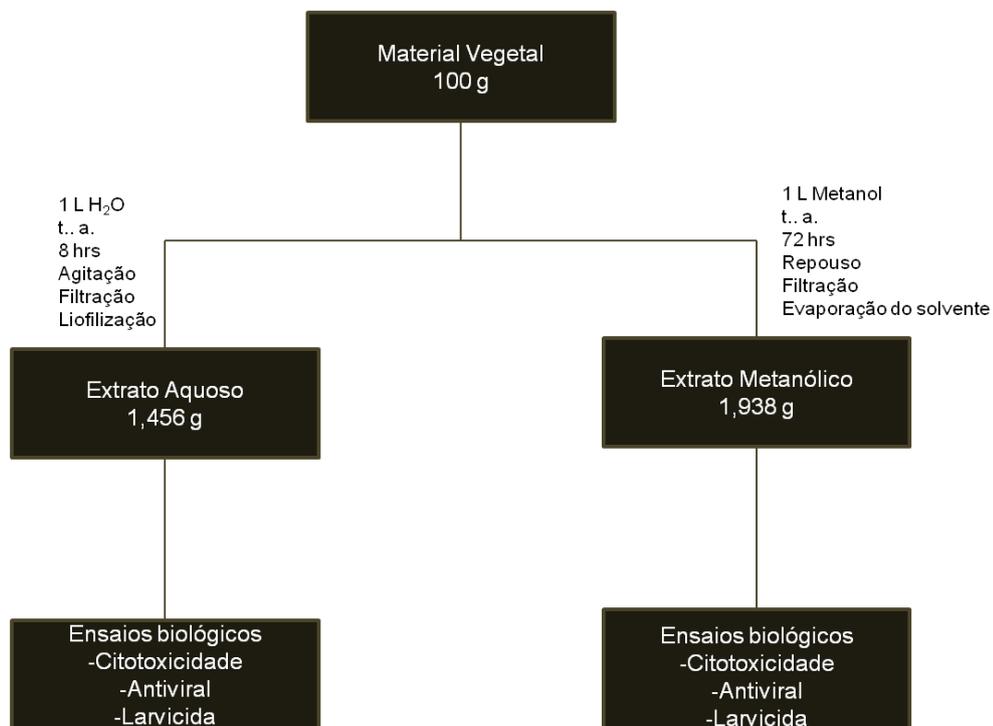
3. Materiais e Métodos

3.1. Obtenção do material vegetal

O material vegetal *Colocasia esculenta* foi obtido de um produtor particular de produtos orgânicos, pelo fato de não usarem agrotóxicos industriais na produção das plantas, evitando interferência dos mesmos no produto final. Fica localizado na cidade de Araraquara, São Paulo (Latitude: 21° 43' 28,98" S Longitude: 48° 11' 24,86" W Altitude: 705m Área: 1008,6 Km²). O material vegetal foi lavado com água, seco a temperatura ambiente e pesado, resultando em 230 gramas das folhas e 1,250 kg dos rizomas. O material foi seccionado com o auxílio de uma faca e colocado para secar em estufa (Tecnal TE-394, Brasil), sob atmosfera de circulação de ar forçado e temperatura de 45° C. Posteriormente as folhas e os rizomas foram misturados e pulverizados em um triturador industrial (Philips Wakita, Brasil).

Foi obtido 250 gramas do material bruto e pulverizado. Desse total, 100 gramas foi submetido ao fracionamento cromatográfico através de extrações com água (extrato aquoso) e metanol (extrato metanólico), de acordo com o Figura 1.

Figura 1 – Fluxograma.



Representação do trabalho realizado para avaliar as propriedades biológicas de *Colocasia esculenta*.

3.1.1. Extrato Aquoso

O extrato aquoso de *Colocasia esculenta* foi preparado utilizando o caule e as folhas da planta. Foram pesados em balança semi-análitica 100 gramas do material seco e pulverizado para 1000 ml de água deionizada. A extração dos princípios ativos foi feita pelo método da maceração em agitador magnético por 8 horas e 400 rpm (Thermo Scientific, EUA). A extração ocorreu à temperatura ambiente, para conservar as substâncias contidas na planta. O volume total obtido na extração foi filtrado em um sistema de filtração a vácuo (200bar). A porosidade do filtro era 0,22um. O volume obtido foi liofilizado, obtendo uma massa de 1, 456 gramas ao final do processo. O extrato foi armazenado na geladeira a 4° C e protegido da exposição a luz, envolvendo o recipiente estoque com papel alumínio.

3.1.2. Extrato metanólico

O extrato metanólico de *Colocasia esculenta* foi preparado utilizando o caule e as folhas da planta. Foram pesados em balança semi-análitica (BIOPRECISA, Brasil) 100 gramas do material seco e triturado, para 1000 ml do solvente. A extração dos princípios ativos foi realizada com o solvente metanol (LS Chemicals, Brasil) pelo método da maceração em repouso. A extração foi realizada por um período de 72 horas (3 dias) e em temperatura ambiente, para conservar as substâncias contidas na planta. O volume total do extrato foi filtrado por um sistema de filtração a vácuo (200 mm Hg), sendo a porosidade do filtro 0,22um. O filtrado foi levado a um evaporador rotativo (Heidolph, Alemanha), a 60° C e 180 rpm (raio do rotor 100) até secura completa do solvente. Ao final do processo foi obtido 1,938 gramas do extrato, sendo armazenado na geladeira a 4° C e protegido da exposição a luz, envolvendo o recipiente estoque com papel alumínio.

3.2. Cultura Celular

3.2.1. Linhagens Celulares

A linhagem celular de *Aedes albopictus* C6/36 foi mantida em meio de cultura Leibowitz-15 (L-15, Cultilab, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil), antibiótico gentamicina (5mg/ml) e antifúngico anfotericina B (1mg/ml) (Cultilab, Brasil), mantido a 28° C (TESH, 1979).

A linhagem celular Vero E6 (célula epitelial oriunda de rim de macaco Vere Africano) foi cultivada em meio Eagle's Minimum Essential Medium (MEM, Cultilab, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil), antibiótico gentamicina (5mg/ml) e antifúngico anfotericina B (1mg/ml) (Cultilab, Brasil). As

células foram mantidas em condições de 5% de CO₂, temperatura de 37°C e umidificada (AMMERMAN et al., 2008).

3.2.2. Estoques Virais

Os estoques virais de ZIKV^{BR} e CHIKV (BHI3762/ H 804917) foram preparados a partir de vírus cedidos pelo Dr. Pedro F. C. Vasconcelos, do Instituto Evandro Chagas.

A linhagem C6/36 foi utilizada para a produção dos estoques virais (FIGUEIREDO, 1990). A monocamada celular, contendo uma confluência celular de aproximadamente 80%, foi infectada com ZIKV ou CHIKV por 1 hora a 28°C. O vírus Chikungunya foi mantido por 24 horas e o Zika por 120 horas, em meio de manutenção (meio L-15 contendo 1 % de soro fetal bovino 100 U/L de Gentamicina e Anfotericina B 1mg/ml). Após a incubação, os sobrenadantes da infecção viral foram coletados, alíquotados e armazenados em freezer -80 °C até o momento do uso.

3.2.3. Titulação Viral

Para estabelecer os títulos virais, foi realizado o ensaio de placa de lise e os valores foram expressos em Unidades Formadoras de Placas (PFU/ml).

Para tanto, foram realizadas diluições seriadas na base 10 dos estoques de CHIKV e ZIKV e, posteriormente, inoculadas na monocamada de células Vero E6, em microplacas de 12 cavidades. Cada diluição, incluindo o controle celular (sem vírus), foi realizado em triplicata. Após uma hora de adsorção, o inóculo viral foi retirado e adicionado meio semi-sólido composto por carboximetilcelulose 1,6% (CMC, LS Chemicals, Brasil), acrescido de soro fetal bovino e meio MEM 2x. As células foram mantidas sob atmosfera umidificada, com 5% de CO₂ e 37°C. O tempo de incubação para CHIKV foi de 24 horas, e para ZIKV foi de 120 horas. Após, o meio semi-sólido foi removido, e a monocamada celular foi fixada com formaldeído a 10% por 30 minutos, seguido de coloração com solução de cristal violeta a 1%, por cinco minutos. Por fim, foi calculado o título de infectividade viral expresso pelo número de Unidades Formadoras de Placa (PFU/ml).

3.2.4. Ensaio de Citotoxicidade

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada em células Vero E6. Para tanto, foi utilizado o ensaio colorimétrico do MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide, Sigma–Aldrich, Germany), proposto por Mosmann (1983), com algumas modificações.

Monocamada de células Vero E6 aderidas em microplaca de 96 cavidades foram expostas a diferentes concentrações, previamente diluídas em água miliQ

(Millipore), dos extratos aquoso e metanólico: 1,8 mg/L, 0,9 mg/L, 0,45 mg/L, 0,22 mg/L, 0,11 mg/L, 0,056 mg/L, 0,028 mg/L, 0,014 mg/L e 0,007 mg/L, em quadruplicata, por cinco dias à temperatura de 37°C com 5% de CO₂. As concentrações foram definidas pela baixa massa dos extratos obtidos e também embasada em artigos correlatos ao trabalho (ALEN et al., 2011). Após incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido para a adição de 10 µL de solução de 5 mg/ml de MTT em 90 µL de meio MEM (1 mg/mL). As placas foram novamente incubadas a 37°C com 5% de CO₂, durante duas horas. Após este período, o sobrenadante foi retirado e adicionado 50µL de isopropanol (Merck) para a solubilização dos cristais formazan. A placa foi agitada por 15 minutos e realizada a leitura no espectrofotômetro Victor X3 (Perkin Elmer, Brasil) a 570 nm. A absorbância obtida é diretamente proporcional a viabilidade celular. A concentração necessária de cada composto para reduzir a viabilidade celular (CC) foi calculada a partir da comparação com o controle de células não tratadas. Os dados foram analisados utilizando o programa Prisma Graph Pad Prisma 6 (Graph Pad, EUA).

3.2.5. Ensaio de Redução de Placa

Este ensaio foi realizado de acordo com metodologia proposta por Lennette (1995), com algumas modificações. Monocamada de células Vero E6, aderidas em microplacas de 12 cavidades (Kasvi, Brasil), foram inoculadas com 25 PFUs/cavidade de suspensão de ZIKV ou CHIKV, em triplicata. Após uma hora de infecção, o inóculo foi substituído por 4mL de meio MEM com 1,6% de CMC contendo diferentes concentrações dos extratos ([0,45mg/L], [0,22mg/L], [0,11mg/L], [0,05mg/L]), separadamente (ALEN et al., 2011). As células foram incubadas a 37°C, com 5% CO₂, durante 120 horas para ZIKV e 24 horas para CHIKV. Em seguida, as placas foram fixadas e coradas de acordo com a metodologia descrita anteriormente no item 3.2.3. Por fim, foi calculada a média e o desvio padrão do número de placas obtidas para cada grupo de células tratadas com as diferentes concentrações de extrato ou não-tratadas, e determinada a porcentagem de inibição da replicação viral. Os dados foram analisados utilizando o programa Prisma Graph Pad Prisma 6 (Graph Pad, EUA).

3.3. qPCR para avaliação de replicação de ZIKV e CHIKV

A curva de crescimento de ZIKV e CHIKV foi avaliada por PCR em tempo real (qPCR) a partir da quantificação das partículas virais.

A monocamada celular de células Vero E6, com aproximadamente 80% de confluência cultivadas em placas de 12 cavidades, foi infectada com 25 partículas virais por well de ZIKV ou CHIKV. Após incubação a 37° C e 5% de CO₂, por 1 hora, o inóculo foi removido para adição dos extratos diluídos (meio de manutenção + solução estoque do extrato) nas concentrações de 0,45 mg/L, 0,22 mg/L, 0,11 mg/L e 0,056 mg/L. Para os controles celular e viral, foi adicionado somente meio de manutenção. O sobrenadante celular foi coletado 24 (CHIKV) e 120 (ZIKV) horas pós-infecção, aliqüotados e armazenados a -80° C para posterior ensaio de q PCR.

Primeiramente, o RNA viral foi extraído a partir de 140ul do sobrenadante celular utilizando o *Qiamp Viral RNA kit (Qiagen)*, de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, foi utilizado primers espécie-específicos (Tabela 1), conforme descrito anteriormente (LANCIOTTI et al., 2007 2008). Para a reação de PCR em tempo real utilizou-se o *GoTaq PROBE 1-step RT-q-PCR system* (Promega, EUA). Foram utilizados 5uL de RNA viral, os quais foram adicionados a reação, a qual consistiu de 6,25 uL do tampão de PCR, 0,3ul RT-mix, 0,125 uL CXR, 0,5uL dos iniciadores de ZIKV e CHIKV (10uM), 0,15uL das sondas de CHIKV e ZIKV (10uM) e água nuclease “free” suficiente para completar o volume final de 15uL. A reação foi incubada a 45° C por 15 minutos, 95° C por 2 minutos seguidos por 40 ciclos de 95° C por 15 segundos, 60° C por 1 minuto. Os resultados obtidos foram comparados à curva padrão obtida para ZIKV e CHIKV. A curva padrão foi desenhada realizando diluições seriadas dos estoques virais utilizados para os ensaios antivirais. Para CHIKV foram realizados 7 diluições da curva padrão (10^{-6} – 10^0) e para ZIKV (10^{-5} – 10^0). Os dados foram analisados utilizando o programa Prisma Graph Pad Prisma 6 (Graph Pad, EUA).

Tabela 1- Iniciadores e sonda para detecção de ZIKV e CHIKV

Iniciador/Sonda	Sequência
ZIKV 1086f	5' CCG CTG CCC AAC ACA AG 3'
ZIKV 1162c	5' CCA CTA ACG TTC TTT TGC AGA CAT 3'
ZIKV 1107-FAM	5' AGC CTA CCT TGA CAA GCA GTC AGA CAC TCA A 3' (BHQ-1) Sonda
CHIKV 856F	5' ACC ATC GGT GTT CCA TCT AAA G 3'
CHIKV 962c	5' GCC TGG GCT CAT CGT TAT T 3'
CHIKV 908	FAM 5' ACA GTG GTT TCG TGT GAG GGC TAC3'(BHQ-1) sonda

3.5. de larvas e criação de mosquitos *Aedes aegypti*

Os ovos de *Aedes aegypti* foram fornecidos pelo Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFar-UNESP). Os ensaios larvicidas foram realizados com larvas de quarto estágio não infectadas.

Os ovos foram colocados em uma bandeja de plástico branca de tamanho de 46 cm de comprimento por 30 cm de largura com capacidade para 5 litros. Foram adicionados ao recipiente 2,5 litros de água deionizada para que os ovos eclodissem. Após, aproximadamente 24 horas, ocorreu a eclosão dos ovos, e as larvas foram transferidas para um segundo recipiente de plástico transparente de tamanho de 20 cm por 10 cm de largura com capacidade para 2 litros. Em cada um dos dois recipientes, foram adicionados 500 ml de água deionizada para que as larvas pudessem se desenvolver. As larvas foram alimentadas com ração para peixe em flocos. Para facilitar o seu uso, a ração foi triturada manualmente até atingir a consistência de pó. Após aproximadamente 7 dias, ao se tornarem adultos, os mosquitos foram transferidos para gaiolas próprias para a criação de mosquitos. Os mosquitos foram alimentados com seiva, composta por uma solução de água deionizada e mel (50:15 ml). A umidade relativa do ar foi mantida entre 65-85% e a temperatura em torno 27° C ±2° C, com foto período de 12:12 (claro/escuro).

Para obtenção de ovos para gerações subsequentes de larvas e mosquitos, as fêmeas dos mosquitos foram alimentadas com sangue desfibrinado de carneiro. Para realizar esse processo, foi montado um sistema que consistia de um banho maria, conectado a duas mangueiras, uma para entrada e outra para saída de água, para esquentar o sangue, o qual ficava dentro de um recipiente de vidro côncavo e internamente vazado para que permitisse a circulação de água sem entrar em contato com o sangue. O fundo do recipiente era fechado com uma película de parafilme, para que a probocida das fêmeas conseguissem penetrar para se alimentar. Esse processo durava aproximadamente 40 minutos. Posteriormente, foi colocado um recipiente de plástico redondo de 5 centímetros de diâmetro e 5 centímetros de altura, contendo 50 mL de água milliQ (Millipore), imerso com um papel de filtro de 10 centímetros de largura por 5 centímetros de altura, no interior da gaiola de criação dos mosquitos, para que as fêmeas realizassem a oviposição. Após cinco dias os ovos foram coletados. (KOVEDAN et al., 2013).

3.5.1. Ensaio Larvicida

Métodos padrão para testar a toxicidade dos extratos e a suscetibilidade de larvas de mosquitos a inseticidas foram realizados de acordo com a Organização Mundial da Saúde OMS (WHO, 2005). O ensaio biológico larvicida foi realizado em temperatura ambiente de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa do ar entre 65-85%, sob um fotoperíodo de 12:12 (claro/escuro).

Para o preparo das soluções dos extratos aquoso e metanólico, a massa de pó seco, descrita no item 3.1, foi pesada em balança, semi-analítica, e posteriormente diluída em água milli-Q (Millipore). Essa primeira diluição de concentração 640mg/L, trata-se da solução estoque. Para ambos os extratos utilizou-se a mesma concentração inicial da solução estoque. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada da solução inicial na proporção 1:2. As concentrações testadas foram 640 mg/L, 320 mg/L, 160 mg/L, 80 mg/L, 40 mg/L, 20 mg/L para ambos os extratos.

Para o experimento, as larvas foram transferidas do recipiente, com o auxílio de pipetas Pasteur de plástico não estéril, para erlenmeyers (Satelit^R), os quais continham 10 larvas de quarto estágio para cada diluição testada. As larvas ficaram expostas por 24 horas a cada diluição dos extratos e, após, foi determinada a toxicidade de cada diluição observando-se a mortalidade larval. Como controle do

experimento, foi mantido um controle de morte larval, contendo etanol 95% e um controle de vida contendo água milli Q (Millipore), nos mesmos volumes das soluções.

A porcentagem de mortalidade foi calculada a partir da média das triplicatas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). A diluição do extrato foi considerada tóxica quando a porcentagem de morte larval fosse maior ou igual à 50%.

4.Resultados

4.1. Ensaio de citotoxicidade-MTT

Foram avaliadas nove concentrações do extrato metanólico e aquoso de *C. esculenta*. Foi observado que não houve toxicidade celular para as concentrações testadas . Entretanto, nas concentrações de 1,8 e 0,9 mg/L, foi observado uma tendência citotóxica, demonstrando uma diminuição na viabilidade celular, ao contrário das demais concentrações (Figura 2 e 3).

Figura 2 - MTT Extrato Aquoso.

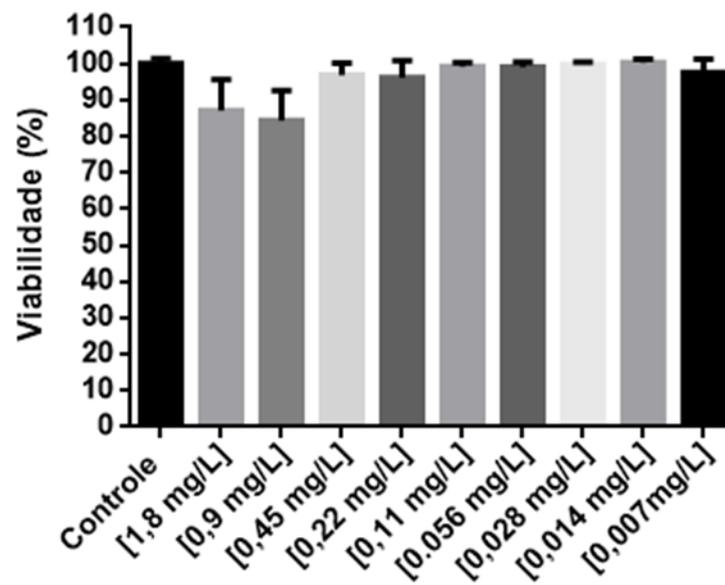


Gráfico das análises das concentrações citotóxicas do extrato aquoso ([1,8 mg/L – 0,007 mg/L]) sobre células Vero E6. Controle mantido com meio de manutenção das células.

Figura 3 - MTT Extrato Metanólico.

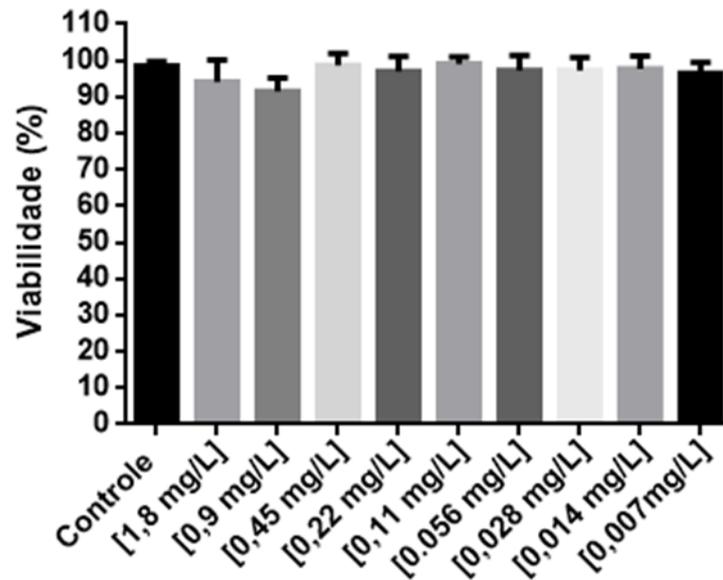


Gráfico das análises das concentrações citotóxicas do extrato metanólico ([1,8 mg/L – 0,007 mg/L]) sobre células Vero E6. Controle mantido com meio de manutenção das células

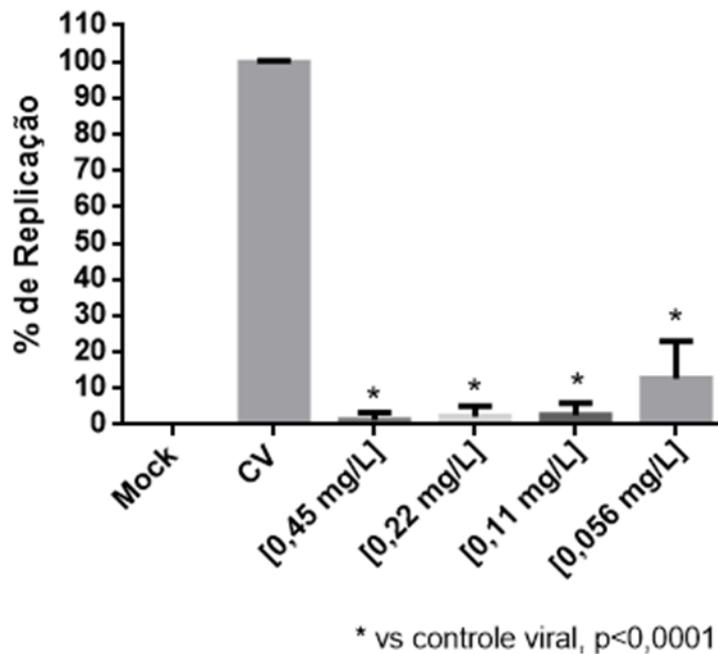
4.2. Ensaio antiviral de redução de placas para avaliação do perfil fenotípico.

4.2.1. Ensaio antiviral do extrato aquoso sobre a replicação de ZIKV

Foram testadas quatro concentrações do extrato aquoso para avaliar sua ação sobre a replicação do ZIKV . Foi observado que as concentrações testadas afetaram a replicação do ZIKV em linhagem celular de Vero E6 (Fig. 4).

Foi observado significância estatística ($p < 0,0001$) entre as concentrações de 0,45, 0,22, 0,11 mg/L e 0,005 mg/L quando comparadas a ao controle viral (Fig. 4). Nas concentrações de 0,45, 0,22, 0,11 mg/L houve uma redução de 95%, enquanto que, na concentração de 0,056 mg/L a redução foi de 88%.

Figura 4 - Ensaio de redução de placas ZIKV.

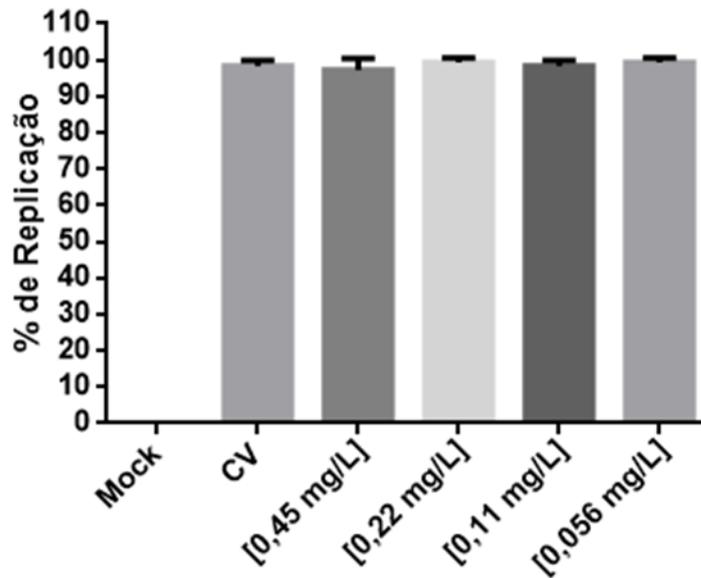


Inibição da replicação de ZIKV em células tratadas com extrato aquoso de *C. esculenta* segundo % de placas virais formadas, quando comparadas ao controle viral (CV). Eixo Y: % de Redução da replicação. Eixo X: Células expostas a diferentes concentrações do extrato. . Mock = células não tratadas com extrato e nem infectadas com o vírus, mantidas com meio de manutenção celular. CV= controle viral onde foi inoculado a mesma quantidade de partículas a mesma quantidade de vírus mantidos com meio de manutenção celular.

4.2.2. Ensaio antiviral do extrato metanólico sobre a replicação de ZIKV

Foram testadas quatro concentrações do extrato metanólico de *C. esculenta* para avaliar sua ação sobre a replicação do ZIKV. Os resultados demonstraram que o extrato metanólico, em diferentes concentrações, não mostrou ação na replicação viral de CHIKV (Fig 5).

Figura 5 - Ensaio de redução de placas ZIKV.

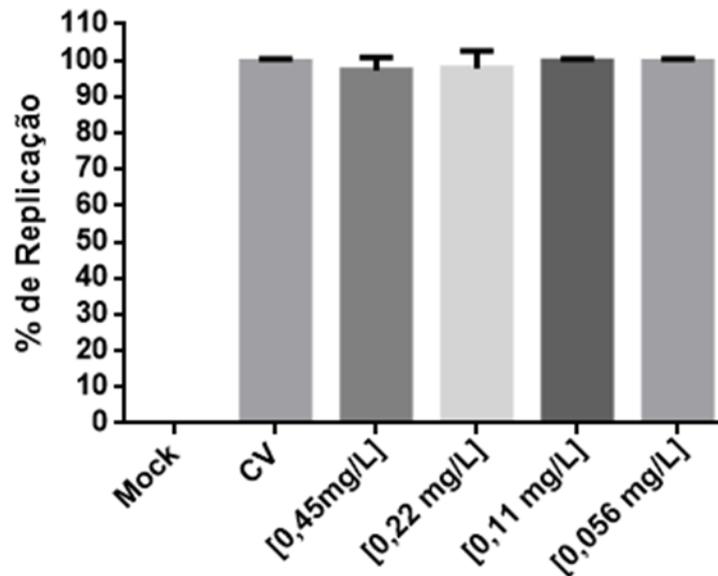


Inibição da replicação de ZIKV em células tratadas com extrato metanólico de *C. esculenta* segundo % de placas virais formadas, quando comparadas ao controle viral (CV). Eixo Y: % de Redução da replicação. Eixo X: Células expostas a diferentes concentrações do extrato. . Mock = células não tratadas com extrato e nem infectadas com o vírus, mantidas com meio de manutenção celular. CV= controle viral onde foi inoculado a mesma quantidade de partículas a mesma quantidade de vírus mantidos com meio de manutenção celular.

4.2.3. Ensaio antiviral do extrato aquoso sobre a replicação de CHIKV

Foram testadas quatro concentrações do extrato aquoso de *C. Esculenta* para avaliar sua ação sobre a replicação do CHIKV. Foi observada uma diminuição de 5 % na formação de placas na concentração de 0,45 mg/L. Foi observado que os extratos nas concentrações de 0,22, 0,11 e 0,056 mg/L agiram estimulando a replicação viral (Fig. 6).

Figura 6 - Ensaio de redução de placas CHIKV.

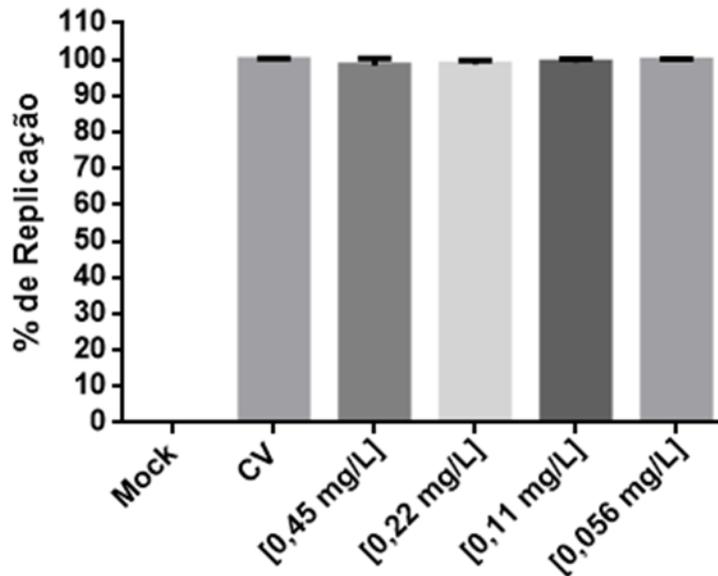


Inibição da replicação de CHIKV em células tratadas com extrato aquoso de *C. esculenta* segundo % de placas virais formadas, quando comparadas ao controle viral (CV). Eixo Y: % de Redução da replicação. Eixo X: Células expostas a diferentes concentrações do extrato. Mock = células não tratadas com extrato e nem infectadas com o vírus, mantidas com meio de manutenção celular. CV= controle viral onde foi inoculado a mesma quantidade de partículas a mesma quantidade de vírus mantidos com meio de manutenção celular.

4.2.4. Ensaio antiviral do extrato metanólico sobre a replicação de CHIKV

Foram testadas quatro concentrações do extrato metanólico de *C. esculenta* para avaliar sua ação sobre a replicação do CHIKV. Foi observado que os extratos nas concentrações de 0,45 mg/L, 0,22 mg/L, 0,11 mg/L e 0,056 mg/L não demonstraram interferir na replicação viral (Fig. 7).

Figura 7 - Ensaio de redução de placas CHIKV.

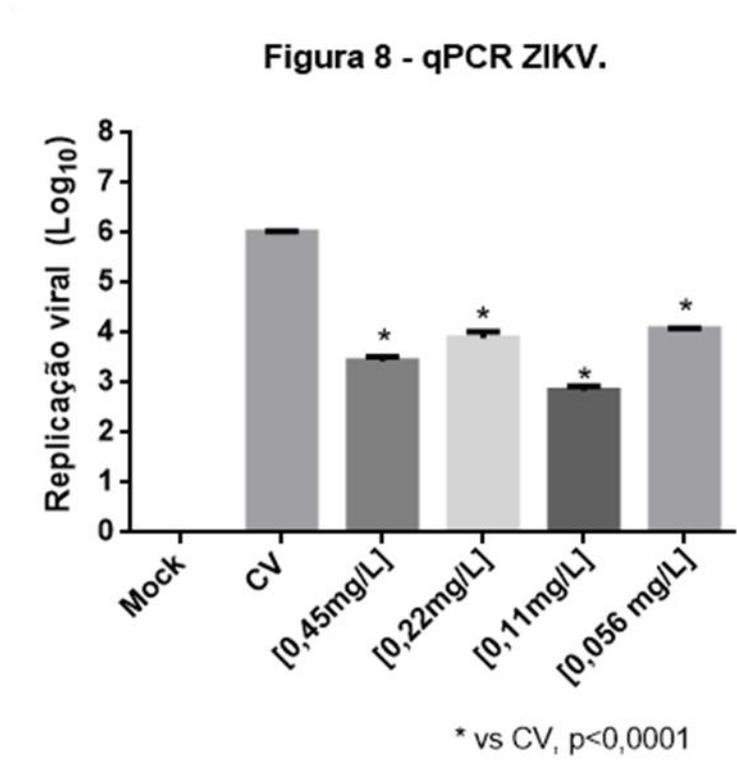


Inibição da replicação de CHIKV em células tratadas com extrato metanólico de *C. esculenta* segundo % de placas virais formadas, quando comparadas ao controle viral (CV). Eixo Y: % de Redução da replicação. Eixo X: Células expostas a diferentes concentrações do extrato. . Mock = células não tratadas com extrato e nem infectadas com o vírus, mantidas com meio de manutenção celular. CV= controle viral onde foi inoculado a mesma quantidade de partículas a mesma quantidade de vírus mantidos com meio de manutenção celular.

4.3. PCR em tempo real (qPCR) para avaliar a replicação viral de ZIKV e CHIKV

4.3.1. Ensaio antiviral do extrato Aquoso sobre a replicação de ZIKV

A avaliação da replicação viral, por qPCR, demonstrou que o extrato aquoso inibiu a replicação de ZIKV em até 3 \log_{10} (Fig. 8).

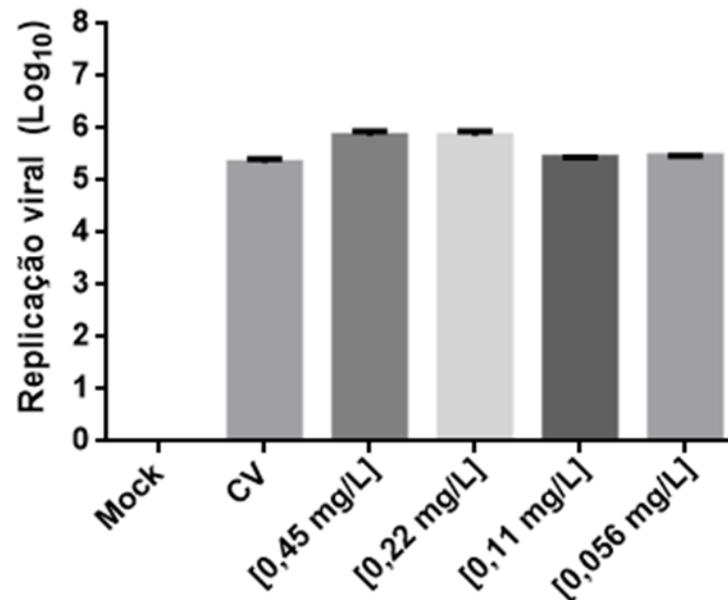


Avaliação da replicação viral por qPCR. PCR em tempo real para quantificar a replicação de ZIKV em células Vero E6 tratadas com extrato aquoso de *C. esculenta*. Mock = células não tratadas com extrato e nem infectadas com o vírus, mantidas com meio de manutenção celular. CV= controle viral onde foi inoculado a mesma quantidade de partículas a mesma quantidade de vírus mantidos com meio de manutenção celular.

4.3.2. Ensaio antiviral do extrato Metanólico sobre a replicação de ZIKV

A avaliação da replicação viral, por qPCR, demonstrou que o extrato metanólico não inibiu a replicação de ZIKV. Ao contrário do esperado, o extrato metanólico, nas concentrações de 0,45 e 0,22 mg/L, estimulou a replicação viral (Fig. 9).

Figura 9 - qPCR ZIKV.

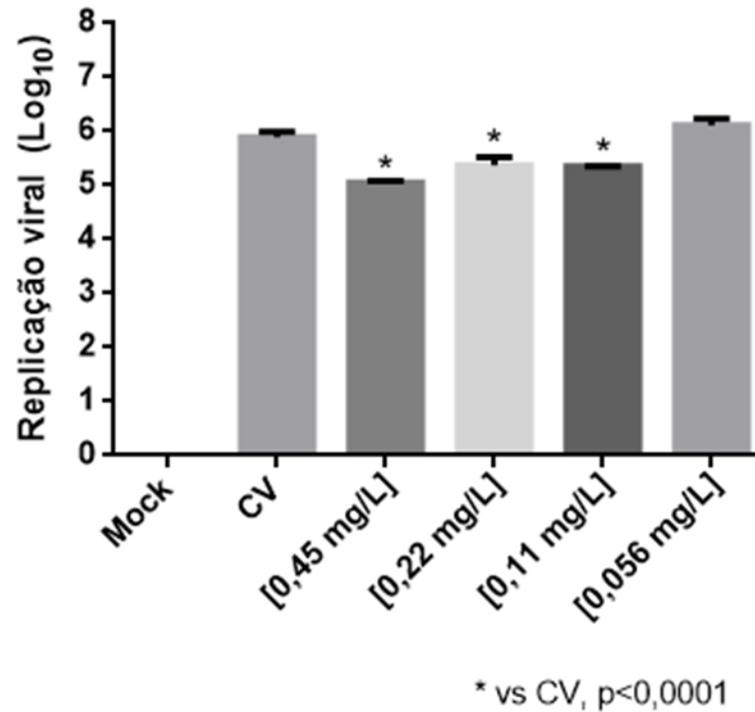


Avaliação da Replicação Viral por qPCR. PCR em tempo real para quantificar a replicação de ZIKV em células Vero E6 tratadas com extrato metanólico de *C. esculenta*. Mock = células não tratadas com extrato e nem infectadas com o vírus, mantidas com meio de manutenção celular. CV= controle viral onde foi inoculado a mesma quantidade de partículas a mesma quantidade de vírus mantidos com meio de manutenção celular.

4.3.3. Ensaio antiviral do extrato Aquoso sobre a replicação de CHIKV

A avaliação da replicação viral, por qPCR, demonstrou que o extrato aquoso inibiu a replicação de CHIKV em até 1 log₁₀, como na concentração de 0,45 mg/mL. Entretanto, na concentração de 0,056 mg/mL, foi observado aumento da replicação viral (Fig. 10).

Figura 10 - qPCR CHIKV.

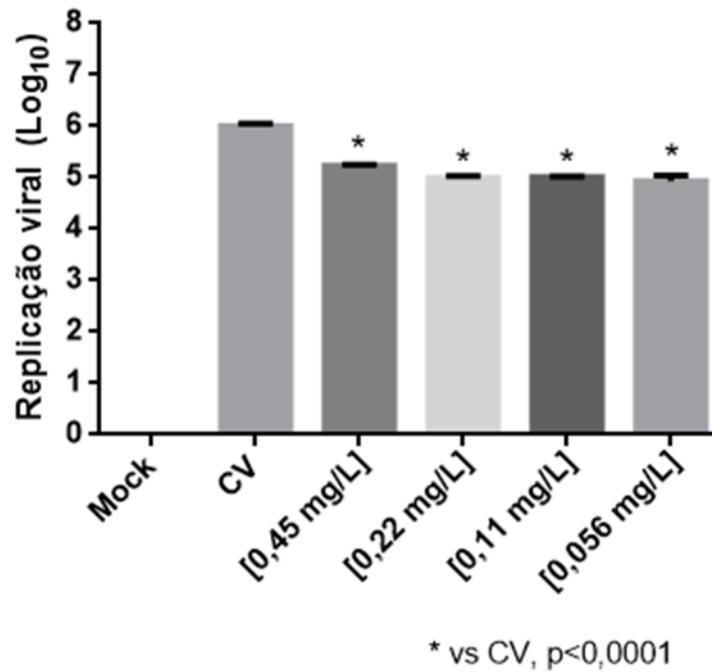


Avaliação da Replicação Viral por qPCR. PCR em tempo real para quantificar a replicação de CHIKV em células Vero E6, tratadas com extrato aquoso de *C. esculenta*. Mock = células não tratadas com extrato e nem infectadas com o vírus, mantidas com meio de manutenção celular. CV= controle viral onde foi inoculado a mesma quantidade de partículas a mesma quantidade de vírus mantidos com meio de manutenção celular.

4.3.4. Ensaio antiviral do extrato Metanólico sobre a replicação de CHIKV

A avaliação da replicação viral, por qPCR, demonstrou que o extrato metanólico inibiu a replicação de CHIKV em até 1 log₁₀ (Fig. 11).

Figura 11 - qPCR CHIKV.



Avaliação da replicação viral por qPCR. PCR em tempo real para quantificar a replicação de CHIKV em células Vero E6, tratadas com extrato metanólico de *C. esculenta*. Mock = células não tratadas com extrato e nem infectadas com o vírus, mantidas com meio de manutenção celular. CV= controle viral onde foi inoculado a mesma quantidade de partículas a mesma quantidade de vírus mantidos com meio de manutenção celular.

4.4. Ação Larvicida dos Compostos

Foram testadas diferentes diluições do extrato aquoso e metanólicos, diluídos a partir de uma mesma solução estoque, para avaliar o poder larvicida. Após 24 horas de exposição aos extratos de *C. Esculenta*, não foi observado morte das larvas (Tabelas 2 e 3).

Tabela - 2 Resultados obtidos no ensaio larvicida após exposição das larvas a diferentes concentrações do extrato Aquoso após 24 horas.

Extrato Aquoso	N de larvas	Vivas	Mortes
640 mg/L	30	30	0
320 mg/L	30	30	0
160 mg/L	30	30	0
80 mg/L	30	30	0
40 mg/L	30	30	0
20 mg/L	30	30	0
Controle Vida	30	30	0
Controle Morte	30	0	30

Tabela - 3 Resultados obtidos no ensaio larvicida após exposição das larvas a diferentes concentrações do extrato Metanólico após 24 horas.

Extrato Metanólico	N de larvas	Vivas	Mortes
640 mg/L	30	30	0
320 mg/L	30	30	0
160 mg/L	30	30	0
80 mg/L	30	30	0
40 mg/L	30	30	0
20 mg/L	30	30	0
Controle vida	30	30	0
Controle Morte	30	0	30

5. Discussão

Os fitoterápicos naturais, em geral possuem menos efeitos colaterais e tóxicos. Esse fato tornam esses compostos uma alternativa para o estudo de novas drogas (RAO; VEERESHAM; ASRES, 2013).

Os estudos de toxicidade são importantes por diversos fatores, no presente estudo foi realizado para avaliar se componentes extraídos da planta, iriam alterar de alguma forma a viabilidade celular. Estudos realizados por Kuete e colaboradores para avaliar a toxicidade de extratos metanólicos de *Colocasia esculenta* expostos as células CCRF/CEM, demonstraram que em concentrações de 4,4 mg/L a viabilidade celular foi de 62%, considerada muito tóxica (KUETE et al., 2016). Chakraborty e colaboradores (2015) avaliaram a toxicidade in vitro de extratos metanólicos de *C. esculenta*, frente as células MG-63. Foi observado que nas concentrações testadas, de 12,5 mg/L a 200 mg/L, a viabilidade foi superior a 95% (CHAKRABORTY et al., 2015). Os resultados obtidos referentes a toxicidade dos extratos demonstram que ambos possuem uma baixa toxicidade nas concentrações avaliadas. Nas maiores concentrações de 1,8 e 0,9 mg/L foram observados os principais efeitos tóxicos.

O ensaio de redução de placas foi realizado para avaliar a eficiência dos extratos após a infecção viral. Foram observados que o extrato aquoso demonstrou atividade antiviral contra ZIKV nas concentrações avaliadas, com taxas de inibição superiores a 90%, e também na maior concentração de CHIKV com aproximadamente 5% de inibição. Esse estudo de pós tratamento também foi avaliado com extratos *Maytenus imbricata* contra alguns flavivírus como DENV, YFV e SLEV, porém os extratos dessa planta não demonstraram atividade antiviral desses, mesmo utilizando concentrações superiores as avaliadas no presente estudo (MARINHO, 2015).

Keyaerts e colaboradores, utilizaram um espectro de concentrações variando de 0,6 mg/L a 60 mg/L para compostos provenientes de *Colocasia esculenta*, para avaliar a atividade antiviral, mostrando uma taxa de inibição da replicação viral em torno de 50% (KEYAERTS et al., 2007). Para os estudos com ZIKV e CHIKV foi utilizado concentrações entre 0,45 a 0,05 mg/L, mostrando inibição da replicação superiores a 90% para ZIKV (Figura 2 e 3) e 5% para CHIKV (Graf. 5), quando avaliados o ensaio de redução de placas virais.

Ensaio recentes, utilizando o DENV, demonstraram que lectinas provenientes de plantas quando introduzidas tardiamente, ou seja em células que já estavam

infectadas com o vírus demonstraram efeito inibitório bem menor (IDRIS; MUHARRAM; DIAH, 2016), mostrando que possivelmente os CBAs podem atuar preventivamente, ou seja protegendo de uma possível infecção. Quando avaliados os ensaios realizados, esses resultados contrastam com os resultados obtidos pelo q-PCR e também pelo ensaio de redução de placas, quando ZIKV e CHIKV foram submetidos ao tratamento com o extrato aquoso de *C. esculenta*, foram observados uma taxa de inibição elevada, mesmo introduzindo o extrato após a infecção com o vírus. Já para os ensaios de redução de placa para CHIKV, submetidos aos dois extratos e para ZIKV, submetido ao extrato metanólico, os resultados corroboram com essa afirmação. Nesses casos o efeito inibitório foi menor, porém significativo.

Os resultados obtidos nos ensaios antivirais, quando avaliados por q-PCR, demonstram que o extrato aquoso interfere na replicação tanto de ZIKV como de CHIKV. Já o extrato metanólico interferiu apenas na replicação de CHIKV. O extrato aquoso reduziu a replicação cerca de 3 log₁₀ para ZIKV e 1 log₁₀ para CHIKV. O extrato metanólico reduziu a replicação de CHIKV 1 log₁₀. Dentro dessa análise, o extrato aquoso demonstrou possuir um espectro maior de ação inibitória que o extrato metanólico. Provavelmente esse fato ocorre, por conta dos diferentes solventes utilizados, que podem extrair substâncias diferentes, confirmadas pelas análises químicas.

A silimarina é um composto natural extraído do *Carduus marianus*. Esse ativo demonstrou interferir na replicação de atividade anti CHIKV, atuando nas replicases virais, quando utilizado células Vero. Foi observado por Lani e colaboradores uma redução do RNA viral de CHIKV de 99%, quando a silimarina foi adicionada após a infecção (LANI et al., 2008). Os resultados com os extratos brutos aquoso e metanólico de *Colocasia esculenta*, mostraram reduções consideráveis de partículas virais de CHIKV e ZIKV no sobrenadante das culturas de células Vero E6, após infecção com os vírus, esses resultados podem indicar que os extratos atuam inibindo o processo de replicação do genoma de ZIKV e CHIKV.

Os resultados da quantificação das partículas virais por qPCR, demonstraram que quando CHIKV foi exposto ao extrato metanólico foi observado uma relação de dose dependência quando avaliado a inibição da replicação viral. Para o extrato aquoso a relação de dose dependência do extrato também foi observado, tendo em vista que todas as concentrações inibiram a replicação. Essa resposta dose

dependência foi demonstrada por estudos anteriores, dados que corroboram com os resultados que foram observados (BALZARINI et al., 1991).

Estudos realizados por Renard-Nozaki com alguns alcalóides isolados de plantas pertencentes a família *Amaryllidaceae*, demonstraram que a atividade dessas substâncias estava ligada a inibição da replicação viral e não relacionada a inativação viral no exterior das células. No presente estudo, foram testados dois extratos brutos. O extrato aquoso foi efetivo quanto a atividade antiviral para os dois vírus.

Estudos in vitro realizados com as folhas de *Caesalpinia echinatasobre*, demonstraram que sua ação antiviral estava relacionado a duas vias de ação diferentes. Uma interferindo a entrada do vírus na célula hospedeira, avaliado por um ensaio tratando a célula pré-infecção, e também por associar a transcriptase reversa, a DNA e RNA polimerase, inibindo o ciclo replicativo viral (LUNA, 2006; MENESES et al., 2009; TANG et al., 2012)

As lectinas realizam ligações específicas à manose, que são alvo de uma grande variedade de vírus, como (BEARTAUX et al., 2007; SWANSON et al., 2010). Essa ligação entre os carboidratos e as lectinas são reversíveis e específicas, como demonstrada por estudos anteriores. Alguns ensaios in vitro, realizados para avaliar como esses CBAs interagem com as células e as partículas virais, mostraram que eles possuem maior afinidade pelas proteínas glicosiladas do envelope viral do que pelas membranas das células (ALEN et al., 2011).

Os agentes ligantes de carboidratos, podem interagir com uma grande variedade de vírus. A superfamília do GNA, ao qual inclui a tarina, uma lectina também presente na *Colocasia esculenta*, interagem, com HIV, HCV, e DENV agindo como ligantes de carboidratos presentes no envelope viral impedindo dessa maneira a entrada dos mesmos nas células (BEARTAUX et al., 2007; BALZARINI et al., 2007; KACHKO et al., 2013). Porém, para outros vírus como o Parainfluenza-3 e Herpes vírus não foi demonstrado atividade antiviral (BALZARINI et al., 2007). Assim, embora a superfamília do GNA apresente ação antiviral sobre vírus envelopados, essa ação não ocorre para todos os vírus envelopados e esse fato pode ser explicado pela seletividade dessas proteínas por alguns carboidratos específicos que provavelmente não estão presentes nos envelopes virais de Parainfluenza-3 e Herpes vírus, indicando que essas lectinas não interagem com todos os tipos de vírus envelopados.

No presente trabalho, os extratos também foram avaliados quanto à atividade larvívica contra larvas de quarto estágio de *Aedes aegypti*. Foi observado ausência de

atividade uma vez que não houve morte larval constatada. A Organização Mundial da Saúde recomenda que para determinar a dose letal de 99% em ensaios larvicidas que ao menos quatro concentrações testadas apresentem letalidade entre 10 e 95% (WHO, 2005).

Estudos realizados por (DASS; MARIAPAN, 2016), onde demonstrou que larvas de quarto estágio do mosquito *Culex quinquefasciatus*, expostas a concentrações de 114mg/L do extrato metanólico, obtiveram uma taxa letal para 50% dessas larvas.

Foram avaliadas concentrações dos extratos cerca de seis vezes maiores quando comparados alguns estudos com alguns óleos essenciais extraídos do milho e também de outras matérias primas. As concentrações variam de 38 mg/L até 350 mg/L (SANTOS et al., 2012; EL-AKHAL et al., 2016).

A ausência de atividade larvicida, contra larvas de quarto estágio de *Aedes aegypti*, extraídos. As variantes presentes para obtenção dos extratos, como tipos de solventes, métodos de extração seguido, tempo e temperatura, podem influenciar nas substâncias extraídas e conseqüentemente na atividade do produto.

Os extratos obtidos da planta *Colocasia esculenta*, após as análises antivirais realizadas com os vírus CHIKV e ZIKV, demonstraram possuir atividade antiviral *in vitro*, nas condições testadas, devido a diminuição das partículas virais nos sobrenadantes das células tratadas com os extratos (Fig. 7,9,10). O extrato aquoso demonstrou possuir um maior espectro de ação nas condições avaliadas, pois, a atividade antiviral foi observada frente aos dois vírus. Não foi observada atividade larvicida nas condições avaliadas para ambos os extratos, portanto, os resultados indicam que as substâncias extraídas, não possuem letalidade para as larvas.

São necessários estudos posteriores para avaliar os mecanismos de atuação dos componentes presentes no extrato de *Colocasia esculenta*, e assim, determinar os melhores solventes e as doses adequadas para que seja determinado os efeitos antiviral e larvicida esperados.

6. Conclusão

Os estudos realizados demonstraram que extratos provenientes de *Colocasia esculenta*, quando extraídos por solvente aquoso e metanólico não interferem na viabilidade das células Vero E6.

Os ensaios para avaliar a atividade antiviral desses extratos mostraram que ambos inibiram a replicação viral *in vitro*, sendo o extrato aquoso o mais promissor, pois, inibiu tanto CHIKV como ZIKV. Porém, há necessidade de estudos complementares para avaliar a atividades desses extratos *in vitro*.

Os extratos não demonstram toxicidade para as larvas de *Aedes aegypti*, há necessidade de testar outros solventes extratores para afirmar que a planta não possui efeito larvicida.

Trata-se de uma planta amplamente consumida em diversos países pelo mundo, estudos para avaliar suas reais atividades, sejam elas benéficas ou tóxicas, são extremamente importantes para que a população realize o consumo de maneira segura e adequada.

7. Referências bibliográficas

ABUSHOUK, A. I.; NEGIDA, A.; AHMED, H. An updated review of Zika virus. **J Clin Virol**, v. 84, p. 53-8, 2016.

AGGARWAL, B. B. et al. Curcumin: The Indian solid gold. **The molecular targets and therapeutic uses in health and disease**, v. 595, p 1-75, 2007.

AKAHATA, Wataru; UENO, Ryuji. **Flavivirus virus like particle**. U.S. Patent Application, n. 10/098, 943, 2018.

ALBUQUERQUE I. G. C. et al. Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p.128-9, 2012.

ALEN, M. M. F et al. Antiviral activity of carbohydrate-binding agents and the role of DC-SIGN in dengue virus infection. **Virology**, v. 387, n. 1, p. 67-75, 2009.

ALEN, M. M. F et al. Broad antiviral activity of carbohydrate-binding agents against the four serotypes of dengue virus in monocyte-derived dendritic cells. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e2165, 2011.

AMMERMAN, N. C. et al. Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. **Curr Protoc Microbiol**, v. 11., n.1, a.4E.1-A.4E.7, Novembro, 2008.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6. ed. Trad, Terezinha Oppido. São Paulo: Premier, 2000.

ARANKALLE, V. A. et al. Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. **J Gen Virol**, v. 88, Pt. 7, p. 1967-76, 2007.

ATYAME, C. M. F. et al. Comparison of Irradiation and Wolbachia Based Approaches for Sterile Male Strategies Targeting *Aedes albopictus*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0146834, 2016.

ATIF, M. et al. Zika Virus Disease: A Current Review of the Literature. **Infection**, v 44, p. 695–705, 2016.

AYLLÓN, T. et al. Early evidence for Zika virus circulation among *Aedes aegypti* mosquitoes, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 8, p. 1411, 2017.

BALZARINI, Jan et al. Alpha-(1-3)-and alpha-(1-6)-D-mannose-specific plant lectins are markedly inhibitory to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus infections in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 3, p. 410-416, 1991.

BALZARINI, Jan; VAN DAMME, Lut. Microbicide drug candidates to prevent HIV infection. **The Lancet**, v. 369, n. 9563, p. 787-797, 2007.

BALZARINI, Jan et al. Carbohydrate-binding agents efficiently prevent dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-directed HIV-1 transmission to T lymphocytes. **Molecular pharmacology**, 2007 v. 71, n. 1, p. 3-11, 2007.

BARAKAT, Mohammed M. et al. Hemodynamic effects of intradialytic food ingestion and the effects of caffeine. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, n. 11, p. 1813-1818, 1993.

BATISTA, P. M et al. Seroepidemiological monitoring in sentinel animals and vectors as part of arbovirus surveillance in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 2, p. 168-73, 2012.

BERTAUX, Claire et al. Entry of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus is selectively inhibited by carbohydrate-binding agents but not by polyanions. **Virology**, v. 366, n. 1, p. 40-50, 2007.

BLACK I. V. et al. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. **Archives of medical research**, v. 33, n. 4, p. 379-388, 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 43 de 2018. **Boletim Epidemiológico** v. 49, n. 48, p. 1-14, Novembro de 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. **Boletim Epidemiológico** v. 48, n. 2, p. 1-11, Dezembro de 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 3, p.1-11, Dezembro de 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019 e Levantamento Rápido de Índices para Aedes aegypti (LIRAA). **Boletim Epidemiológico**, v. 50, n. 13, p. 1-19, Abril de 2019.

BOURJOT, M. et al. Prostratin and 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate are potent and selective inhibitors of chikungunya virus replication. **Journal of natural products**, v. 75, n. 12, p. 2183-2187, 2012.

BURKE D. S.; MONATH, T. P. Flaviviruses. *In*: KNIFE, D.M.; HOWLEY, P.M., (Eds.), **Field Virology**. 4th. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 852-921.

CAO-LORMEAU, Van-Mai et al. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 6, p. 1085, 2014.

CALISHER, C.H.; HIGGS, S. The Discovery of Arthropod-Specific Viruses in Hematophagous Arthropods: An Open Door to Understanding the Mechanisms of Arbovirus and Arthropod Evolution? **Annual Review of Entomology, Annual Reviews**, v. 63, p. 87-103, 2018.

CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 6, p. 653-660, 2016.

CALVEZ, E. et al. Genetic Diversity and Phylogeny of Aedes aegypti, the Main Arbovirus Vector in the Pacific. **Plos Negl Trop Dis**, v. 10, n. 1, p. e0004374, 2016.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika virus outbreak, bahia, brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885, 2015.

CARDOSO, C. W et al. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika, Chikungunya, and Dengue Viruses, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2274, 2015.

CAREY, D. E. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? **Journal of the history of medicine and allied sciences**, v. 26, n. 3, p. 243-62, 1971.

CASSEB, A. do R. et al. Arbovírus: importante zoonose na Amazônia brasileira. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 3, p. 391-403, 2013.

CDC. Syndrome definitions for diseases associated with critical bioterrorism associated agents, 2003.

CHANDRE, F. et al. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato, **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 3, p. 230–234, 1999.

CHANG, H. M.; BUT, P. P. H. **Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica**. New Jersey: World Scientific, v.1, 1986. V. 1.

CHAKRABORTY, P. et al. Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Colocasia esculenta*. **J. Chem. Pharm. Res**, v. 7, n. 12, p. 627-635, 2015.

CHATTOPADHYAY, D.; NAIK, T. N. Antivirals of ethnomedicinal origin: structure-activity relationship and scope. **Mini Rev Med Chem**, v. 7, n. 3, p.275-301, 2007.

CIOTA, A. T.; KRAMER, L. D. Insights into Arbovirus Evolution and Adaptation from Experimental Studies. **Viruses**, v. 2, p. 2594-2617, 2010.

CHENG, Y.-L. et al. Activation of Nrf2 by the dengue virus causes an increase in CLEC5A, which enhances TNF- α production by mononuclear phagocytes. **Scientific reports**, v. 6, p. 32000, 2016.

CLETON, N. et al. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 191-203, 2012.

CORBET, P. S.; CHADEE, D. D. An improved method for detecting substrate preferences shown by mosquitoes that exhibit 'skip oviposition'. **Physiological entomology**, v. 18, n. 2, p. 114-118, 1993.

COCK, I.; KALT, F. R. A modified MS2 bacteriophage plaque reduction assay for the rapid screening of antiviral plant extracts. **Pharmacognosy.Res**, v.2, n.4, p.221-8, 2010.

CONSOLI, R. A. G. B.; DE OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994. 228p.

CUNHA, R. V. D.; E TRINTA, K. S. *Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.112, n. 8, p. 523-531, 2017.

DASS, K.; MARIAPPAN, P. Larvicidal activity of *Colocasia esculenta*, *Eclipta prostrata* and *Wrightia tinctoria* leaf extract against *Culex quinquefasciatus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 139-143, 2016.

DE Clercq, E. Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat Review Drug Discovery*, v. 1, n. 1, p.13-25, 2002.

DEGALLIER, N. Et al. **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**. Belém: Evandro Chagas Institute; 1998.

DEV, S. Ancient-modern concordance in Ayurvedic plants: some examples. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 10, p. 783-789, 1999.

DICK, G. W. A. Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 46, n. 5, p. 521-534, 1952.

DOWNS, W. G. Arboviruses. *In*: EVANS, A. F. (Ed.). **Viral infections of humans**. Boston, MA: Springer, 1982. Chapter 5, p. 95-126.

DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.

European Centre for Disease Prevention and Control. "**Rapid risk assessment: Zika virus infection outbreak, French Polynesia**: 14 February 2014. Stockholm: ECDC; 2014.

EISEN, L.; LOZANO-FUENTES, S. Use of Mapping and Spatial and Space-Time Modeling Approaches in Operational Control of *Aedes aegypti* and Dengue. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 4, p.e411, 2009.

EL-AKHAL, F., GUEMMOUH, R., MANIAR, S., TAGHZOUTIA, K., LALAMI, A.E.O. Larvicidal activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum majorana* (Lamiaceae) against of the malaria vector *Anopheles labranchiae* (Diptera: culicidae). *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, v. 8, p. 372–376, 2016.

ENSERINK, M. *Infectious diseases. Massive outbreak draws fresh attention to little-known virus*. **Science**, v.311, n. 5764, p. 1085, 2006.

FALCAO, M.B. et al. Management of infection by the Zika virus. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v.15, n. 1, p.57, 2016.

FARNSWORTH, N. R.; CHADWICK, D. J.; MARSH, J. E. Ciba Foundation Symposium. John Wiley and Sons, Chichester, **In: Bioactive compounds from plants**, v.174, p.2-21, 1991.

FARAJOHALLI, A. et al. "Bird biting" mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. **Infections, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 7, p. 1577-1585, 2011.

FIGUEIREDO, L.T.M. Large outbreaks of Chikungunya virus in Brazil reveal uncommon clinical features and fatalities. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.50, n. 5, p. 583-584, 2017.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

FREDERICKS, A. C.; FERNANDEZ-SESMA, A. The Burden of Dengue and Chikungunya Worldwide: Implications for the Southern United States and California. **Tropical Medicine in the Era of Global Connectivity**, v. 80, n. 6, p. 466–475, 2014.

FONSECA, B. A. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Febre Amarela. In: VERONESI, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 2002.

FUNASA – FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. Dengue: Instruções para Pessoal de Combate ao Vetor - **Manual de Normas Técnicas**. 3. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde, 2001.

GADELHA, D. P.; TODA, A. T. Biology and behavior of *Aedes aegypti*. **Revista brasileira de malariologia e doenças tropicais. Publicações avulsas**, v. 37, p. 29-36, 1985.

GARCEZ, W. S. Et al. Naturally Occurring Plant Compounds with Larvicidal Activity Against *Aedes aegypti*. **Rev. Virtual Quim**, v.5, n.3, p.363-393, 2013.

GAUNT, M. W. et al. Phylogenies of atp D and rec A support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2037-2048, 2001.

GOULD, E. S. T. Pathogenic flaviviruses. **Lancet**, v.371, n. 9611, p.500–9, 2008.

GRANDADAM, M. et al. Chikungunya virus, southeastern France. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 5, p. 910, 2011.

GRIFFIN, D. E. Alphaviruses. In: KNIPE, DM.; HOWLEY, PM, (editors). **Fields Virology**. 6th. ed. Philadelphia: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS; 2012.

GRIFFIN, D. E., et al. The role of antibody in recovery from alphavirus encephalitis. **Immunological reviews**, v. 159, n. 1, p. 155-161, 1997.

GUBLER, D. J. Epidemic dengue and dengue hemorrhagic fever: a global public health problem in the 21st century. In: **Emerging infections 1**. American Society of Microbiology, p. 1-14, 1998.

GUBLER, D. J.; CLARK, G. G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. **Emerging infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 55, 1995.

GUBLER, D. J.; WILDER-SMITH, A. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. **Med Clin North Am**, v.92, n. 6, p.1377-90, 2008.

GUBLER, D. J. et al. Climate variability and change in the United States: potential impacts on vector-and rodent-borne diseases. **Environmental health perspectives**, v. 109, n. Suppl 2, p. 223, 2001.

HANSON, R. P. Virology and epidemiology of eastern and western arboviral encephalomyelitis of horses. In: BRYANS, J. T. et al. (Editors). **Equine Infectious Diseases**. Basel: Karger Publishers1974. , p. 100-114.

HAPUARACHCHI, H. C. et al., Re-emergence of Chikungunya virus in South-east Asia: virological evidence from Sri Lanka and Singapore. **J Gen Virol**, v.91, Pt. 4, p. 1067-76, 2010.

HARRINGTON, L. C. et al. Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 72, n. 2, p. 209-220, 2005.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. **Vaccine** ,v.30, p. 4301–4306, 2012.

HONÓRIO, N. A. et al. Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 2, p. 191-198, 2003.

HUANG, Yan-Jang S.; HIGGS, Stephen; VANLANDINGHAM, Dana L. Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. **Current opinion in virology**, v. 34, p. 104-109, 2019.

HUBÁLEK, Z.; RUDOLF, I.; NOWOTNY, N. Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. In: **Advances in virus research**. Academic Press, p. 201-275, 2014.

IDRIS, F.; MUHARRAM, S. H.; DIAH, S. Glycosylation of dengue virus glycoproteins and their interactions with carbohydrate receptors: possible targets for antiviral therapy. **Archives of virology**, v. 161, n. 7, p. 1751-1760, 2016.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Consultado em 13 de junho de 2019.

HU, J. M.; HSIUNG, G. D. Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. **Antiviral research**, v. 11, n. 5-6, p. 217-232, 1989.

JASSIM, S. A.; NAJI, M. A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **J Appl Microbiol**, v.95, n. 3, p.412-27, 2003.

JUSTO, O. R. et al. Evaluation of in vitro anti-inflammatory effects of crude ginger and rosemary extracts obtained through supercritical CO₂ extraction on macrophage and tumor cell line: the influence of vehicle type. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 390, 2015.

KACHKO, A. et al. Inhibition of hepatitis C virus by the cyanobacterial protein *Microcystis viridis* lectin: mechanistic differences between the high-mannose specific lectins MVL, CV-N, and GNA. **Molecular pharmaceuticals**, v. 10, n. 12, p. 4590-4602, 2013.

KAUSHIK, R. et al. Larvicidal activity of leaf extract of *Millingtonia hortensis* (Family: Bignoniaceae) against *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. **Journal of vector borne diseases**, v. 45, n. 1, p. 66, 2008.

KAMBHAMPATI, S.; BLACK IV, W. C.; RAI, K. S. Geographic origin of the US and Brazilian *Aedes albopictus* inferred from allozyme analysis. **Heredity**, v. 67, n. 1, p. 85, 1991.

KRISHNAPRIYA, T. V.; SUGANTHI, A. Biochemical and phytochemical analysis of *Colocasia esculenta* (L.) Schott tubers. **International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 3, p. 21-25, 2017.

KNIPE, D. M. et al. Snapshots: chromatin control of viral infection. **Virology**, v. 435, n. 1, p. 141-156, 2013.

KOVEDAN, K.; MURUGAN, K.; KUMAR, P. M.; THIYAGARAJAN, P.; WILLIAM, S. J. Ovicidal, repellent, adulticidal and field evaluations of plant extract against dengue, malaria and filarial vectors. **Parasitology research**, v. 112, n. 3, p. 1205-1219, 2013.

KUETE, V. et al. Cytotoxicity of methanol extracts of *Annona muricata*, *Passiflora edulis* and nine other Cameroonian medicinal plants towards multi-factorial drug-resistant cancer cell lines. **Springerplus**, v. 5, n. 1, p. 1666, 2016.

LAMBRECHTS, L.; SCOTT, T. W.; GUBLER, D. J. Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 5, p.e646, 2010.

LANI, R. et al. Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. **Nature Publishing Group**, p. 1–10, 2008.

LAMERS, M. H. et al. Treatment of hepatitis C mono-infection in adults—dutch national guidelines. **Infection**, v. 25, p. 26, 2013.

LANCIOTTI, R. S. et al. Chikungunya Virus in US Travelers Returning from India, 2006 **Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, Colorado, USA**, v. 13, No. 5, 2007.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007 **Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, Colorado, USA**, v.14, No. 8, 2008.

LENETTE, D. A. **General principles for laboratory diagnosis of viral, Rickettsial and chlamydial infections**. Diagnostic procedures for viral, Rickettsial and chlamydial infections. 7th. ed. Washington: American public health Association, 1995. p.3-26.

LI, C. et al. Galanthus nivalis agglutinin (GNA)-related lectins: traditional proteins, burgeoning drugs?. **Current chemical biology**, v. 3, n. 3, p. 323-333, 2009.

LINDENBACH, B. D.; THIEL H.; RICE C. M. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: KNIPE, DM.; HOWLEY, PM, editors. **Fields Virology**. 5th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1101-52.

LINDSEY, N. P. et al. West Nile virus and other nationally notifiable arboviral diseases- United States, 2014. **Centers for Disease Control and Preventionweekly**, v. 64, No.34, 2015.

LUNA, J. S. **Estudo de plantas bioativas**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, 2006.

MACIEL-DE-FREITAS, R.; CODECO, C. T.; LOURENCO-DE-OLIVEIRA, R. Daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* females in Rio de Janeiro, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 76, n. 4, p. 659-665, 2007.

MANSFIELD, K. L. et al. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. **The Journal of general virology**, v. 92, n. Pt 12, p. 2821, 2011.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. F. F. M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, 2015.

MARINHO, P. E. S. **Atividade Antiviral De Extratos De *Maytenes imbricata* Contra *Flavivírus***. 2015. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

MARQUES, G. R. A. M.; SERPA, L. L. N.; BRITO, M. *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Laboratório de Culicídeos. SUCEN – Superintendência de controle de endemias, 2015.

MATOS, F. J. A. **Farmácias Vivas**: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades. rev. e ampl, 4 ed. Fortaleza: EUFC, 2002. p. 262.

MCDONALD, P. T. Population characteristics of domestic *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in villages on the Kenya Coast I. Adult survivorship and population size. **Journal of Medical Entomology**, v. 14, n. 1, p. 42-48, 1977.

MELTZER, E. Arboviruses and viral hemorrhagic fevers (VHF). **Infect Dis Clin North Am**, v.26, n. 2, p.479-96, 2012.

Ministério da Saúde (Brasil). Aquisição de inseticidas para uso em Saúde Pública [Internet]. Portal de Dados Abertos sobre Agrotóxicos. 2016c.

Ministério da Saúde (Brasil). Zica: abordagem clínica na atenção básica. 2016e.

MARTINS, L. C. et al. First isolation of West Nile virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, p. e180332, 2019.

MENESES, Rocío et al. Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, n. 1, p. 8, 2009.

MEDINA, F. et al. Dengue Virus: Isolation, Propagation, Quantification, and Storage, **Current Protocols in Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 15D. 2.1-15D. 2.24, 2012.

METHA, R. et al., *The neurological complications of chikungunya virus: A systematic review*. **Rev Med Virol**, v.28, n. 3, p. e1978, 2018.

MINISTERIO DA SAUDE. Dengue. Guia de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de Vigilância epidemiológica. Normas e Manuais Técnicos. 7ª edição. Série A. p. 9-16, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 16/2017. Boletim Epidemiológico. v.48 (15), p.1-9, 2017.

MONATH, T. P. Yellow fever: an update. **The Lancet Infect Dis**, v.1, p.11-20, 2001.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quím Nova**, v.24, n. 1, p.105-11, 2001.

MOREIRA, L. A. et al. A Wolbachia symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. **Cell**, v. 139, n. 7, p. 1268-1278, 2009.

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

MOWATT, L.; JACKSON, S. T. Chikungunya in the Caribbean: an epidemic in the making. **Infectious diseases and therapy**, v. 3, n. 2, p. 63-68, 2014.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13, 2005.

MURRAY, N. E. A.; QUAM, M. B.; WILDER-SMITH, A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. **Clinical Epidemiology**, v. 5, p. 299–309, 2013.

MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of Zika virus. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 2, p. 359, 2015.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika virus. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 3, p. 487-524, 2016.

NARESH KUMAR, C. V.; SAI GOPAL, D. V. Reemergence of Chikungunya virus in Indian Subcontinent. **Indian J Virol**, v.21, n. 1, p. 8-17, 2010.

NATHANSON, N. Epidemiology. In: KNIPE DMH, P. M., editor. **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia : Wolters Kluwer Health , 2007. p. 424-46.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **J. Nat. Prod**, v.66, n. 7, p.1022–37, 2003.

NEWMAN, D. J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery **J. Med. Chem**, v.51, n. 9, p.2589–99, 2008.

NGOAGOUNIL, C. et al. Invasion of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) into central Africa: what consequences for emerging diseases?. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 191, 2015.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC medicine**, v. 13, n. 1, p. 102, 2015.

PADBIDRI, V. S.; GNANESWAR, T. T. Epidemiological investigations of chikungunya epidemic at Barsi, Maharashtra state, India. **Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology**, v. 23, n. 4, p. 445-451, 1979.

PAIXÃO, M. M.; BALLOUZ, T.; LINDAHL, J. F. Effect of Education on Improving Knowledge and Behavior for Arboviral Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, p. 190170, 2019.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and chikungunya: emerging arboviruses in the New World. **Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p. 671, 2016.

PETERS, C. J. Emerging Viral Diseases. In: KNIPE, DM; HOWLEY, PM, (editors). **Fields Virology**. Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 605-625.

PEREIRA, P. R. et al. Structural analysis and binding properties of isoforms of tarin, the GNA-related lectin from *Colocasia esculenta*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1854, n. 1, p. 20-30, 2015.

PINTO, L. B. Atividade antiviral do maraviroque e participação do receptor de quimiocina CCR5 na infecção de células mononucleares humanas pelo vírus da dengue 2. Ribeirão Preto, 2013.

PEREIRA, P. R. et al. Structural analysis and binding properties of isoforms of tarin, the GNA-related lectin from *Colocasia esculenta*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1854, p.20–30, 2015.

POWERS, A. M. ET AL. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. **J Virol**, v.75, n. 21, p.10118–31, 2001.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - **A Review**. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 11-17, 2013.

POWERS, A. M. Togaviruses: Togaviruses: alphaviruses.. **Encyclopedia of virology** 3rd ed. Oxford: Academic Press, 2008.

REINHOLD, J.; LAZZARI, C.; LAHONDÈRE, C. Effects of the Environmental Temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Mosquitoes: A Review. **Insects**, v. 9, n. 4, p. 158, 2018.

RAO, A. R.; VEERESHAM, C.; ASRES, K. In vitro and in vivo inhibitory activities of four Indian medicinal plant extracts and their major components on rat aldose

reductase and generation of advanced glycation endproducts. **Phytother. Res**, v. 27, p. 753–760, 2013.

REITER, P. Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: implications for the efficacy of control strategies. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 2007, v. 7, n. 2, p. 261-273.

RENARD-NOZAK, J.; KIM, T.; IMAKURA, Y.; KIHARA, M.; KOBAYASHI, S. Effect of alkaloids isolated from Amaryllidaceae on Herpes Simplex Virus. **Research in Virology**, v. 140, p.115-28, 1989.

REZZA, G. et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **The Lancet**, v. 370, n. 9602, p. 1840-1846, 2007.

RODHAIN, F. *Aedes albopictus*: a potential problem in France. **Parassitologia**, v. 37, n. 2-3, p. 115-119, 1995.

ROBINSON, M.C., *An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. I. Clinical Features*. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.49, n. 1, p. 28–32, 1955.

ROBY, J. A.; FUNK, A.; KHROMYKH, A. A. Flavivirus Replication and Assembly. In: Shi P-Y, editor. *Flaviviruses*. **Singapore: Novartis Institute for Tropical Diseases**, 2012.

SANTOS, G. K. N.; DUTRA, K. A.; BARROS, R. A.; CÂMARA, C. A. G.; LIRA, D. D.; GUSMÃO, N. B.; NAVARRO, D .M. A. F. Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. **Ind. Crops Prod**, v. 40, p. 254–260, 2012.

SAKLANI, S.; CHANDRA, S.. Phytochemical screening of garhwal himalaya wild edible fruit *Ficus palmata*. **International Journal of Pharm Tech Research**, v. 4, n. 3, p. 1185-91, 2012.

SANTOS, F. Oficina farmaceutica de fitoterapicos: area fisica, acoplada ou não, aos canteiros de plantas medicinais, aparelhada com equipamentos destinados a rasura e moagem de plantas medicinais e preparação de fitoterapicos, CEARÁ, 2009.

SALEEZA, S. N. R.; NORMA-RASHID, Y.; SOFIAN-AZIRUN, M. Guppies as predators of common mosquito larvae in Malaysia. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 45, n. 2, p. 299, 2014.

SCHAFFNER, F.; MEDLOCK, J. M.; VAN BORTE, W. Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. **ClinMicrobiol Infect**, v. 19, p. 685–692, 2013.

SCHMALJOHN, Alan L.; MCCLAIN, David. Alphaviruses (togaviridae) and flaviviruses (flaviviridae), In: SCHMALJOHN, A. L.; MCCLAIN, D. **Medical Microbiology**. 4. ed, 1996.

SHANNON, R. C.; DAVIS, N. C. The Flight of *Stegomyia Aegypti* (L.) 1. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1, n. 2, p. 151-156, 1930.

SIMIZU, B.; RHIM, J. S.; WIEBENGA, N. H. Characterization of the Tacaribe Group of Arboviruses. 1. Propagation and plaque assay of Tacaribe virus in a line of African Green Monkey Kidney Cells (Vero). **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 125, n. 1, p. 119-123, 1967.

SIVAGNANAME, N.; GUNASEKARAN, K. Need for an efficient adult trap for the surveillance of dengue vectors. **Indian J Med Res**, v. 136, p. 739-749, 2012.

SMITH, J. L. et al. Human Antibody Responses to Emerging Mayaro Virus and Cocirculating Alphavirus Infections Examined by Using Structural Proteins from Nine New and Old World Lineages. **mSphere**, v. 3, n. 2, p. e00003-18, 2018.

DE SOUSA, G. A. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA CASCA DO CAULE E DAS RAÍZES DE *Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. Ex Rowl (Cactaceae) EM MODELOS ANIMAIS, 2017.

STAPLETON, Jack T. et al. The GB viruses: a review and proposed classification of GBV-A, GBV-C (HGV), and GBV-D in genus Pegivirus within the family Flaviviridae. **The Journal of general virology**, v. 92, n. Pt 2, p. 233, 2011.

STHEPHENS, J. M. Dasheen — *Colocasia esculenta* (L.) Schott. Fact Sheet HS-592 from a séries of the Horticultural Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 1994.

STRAUSS, E. G.; STRAUSS, J. H. Structure and replication of the alphavirus genome. In: *The Togaviridae and Flaviviridae*. Boston, MA: Springer, p. 35-90, 1986.

SUNAZUKA, T.; HIROSE, T.; OMURA S. Efficient total synthesis of novel bioactive microbial metabolites. **Acc. Chem. Res**, v.41, n. 2, p.302–14, 2008.

SWAROOP A. Et al. Chikungunya fever. **Journal Indian Academy of Clinical Medicine**, v.8, p.164-8, 2007.

SWEETLOVE, L. Number of species on Earth tagged at 8.7 million. 2011. **Nature**, 24 de Agosto, 2011.

TANG, Leon IC et al. Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 12, n. 1, p. 3, 2012.

TAUIL, P. L. Urbanização e ecologia do dengue. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. S99-S102, 2001.

TERRA, M. R. et al. Aedes aegypti E AS ARBOVÍROSES EMERGENTES NO BRASIL. **REVISTA UNINGÁ REVIEW**, v. 30, n. 3, ISSN 2178-2571, 2018.

THAKUR, K. et al. Purification of Colocasia esculenta lectin and determination of its anti-insect potential towards Bactrocera cucurbitae. **Journal of environmental biology** v. 34, n. 1, p. 31, 2013.

TERZIAN, A. C. B. et al. Evidence of natural Zika virus infection in neotropical nonhuman primates in Brazil. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16034, 2018.

TESH, R. B. A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 28, n. 6, p. 1053-1059, 1979.

THANGAMANI, S. et al. Host immune response to mosquito-transmitted chikungunya virus differs from that elicited by needle inoculated virus. **PloS one**, v. 5, n. 8, p. e12137, 2010.

THAI, K. T. D.; ANDERS, K. L. The role of climate variability and change in the transmission dynamics and geographic distribution of dengue. **ExpBiol Med (Maywood)**, v. 236, p. 944, 2011.

TEICH, V.; ARINELLI, R.; FAHHAM, L. Aedes aegypti e sociedade: o impacto econômico das arbovirozes no Brasil / Aedes aegypti and society: the economic burden of arboviruses in Brazil. **J. bras. econ. Saúde**, v.9, n. 3, p.267-276, 2017.

TESH, R. B. Arthritides caused by mosquito-borne viruses. **Annual review of medicine**, v. 33, n. 1, p. 31-40, 1982.

THOMSON REUTERS INTEGRITY, Disease briefing: Zika vírus infection, 2016.

TRAVASSOS, DA R. I. PRIMEIRO REGISTRO DE EPIDEMIAS CAUSADAS PELO VÍRUS OROPOUCHE NOS ESTADOS DO MARANHÃO E GOIÁS, BRASIL. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 31, n. 4, p. 271-278, 1989.

VAN DAMME, E. J. M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W. J. Plant lectins. In: *Advances in botanical research*. Academic Press, p. 107-209, 2008.

VASCONCELOS, P. F. C. Et al. Arboviroses. In: VERONESI, R. **Tratado de Infectologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu, p. 289-302, 2005.

VILLORDO, S. M. et al. RNA structure duplications and flavivirus host adaptation. **Trends in microbiology**, v. 24, n. 4, p. 270-283, 2016.

VLIENTINCK, A. J.; VANDEN BERGHE, D. A.; VAN HOOFF, L. M. VRIJSEN, R. BOEYÉ. Antiviral activity of 3-methoxyflavones. **J Chemother Prog Clin Biol Res**, v.213, p.537-40, 1986.

WALDOCK, J. et al. The role of environmental variables on *Aedes albopictus* biology and chikungunya epidemiology. **Pathogens and Global Health**, v. 107, n. 5, 2013.

WEAVER, S. C.; REISEN. W. K. Present and future arboviral threats. **Antivir. Res**, v.85, p.328–345. 2010.

WEAVER, S. C. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 8, p.360–363, 2013.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides, 2005.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control - New edition. World Health Organization (WHO) and

Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). ISBN 978 92 4 154787 1, 2009.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Current Zika Product Pipeline; WHO: Geneva, Switzerland, pp. 1–16, 2016.

WILDER-SMITH, A. et al. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. **The Lancet infectious diseases**, v. 17, n. 3, p. e101-e106, 2017.

WILSON, R. M.; DANISHEFSKY, S. J. Small molecule natural products in the discovery of therapeutic agents: the synthesis connection. **J. Org. Chem**, v.71, n. 22, p.8329–51, 2006.

ZACK, M. A.; PAESSLER, S. Encephalitic alphaviruses. **Vet Microbiol**, v.140, p.281–6, 2010.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.