

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/02/2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Tamara de Carvalho

**Estudo da Ação de Nanoemulsões contendo Óleo de Copaíba na
Inibição do Zika Vírus**

São José do Rio Preto

2020

Tamara de Carvalho

Estudo da Ação de Nanoemulsões contendo Óleo de Copaíba na Inibição
do Zika Vírus

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon

Coorientadora: Dra. Cíntia Bittar Oliva

São José do Rio Preto

2020

C331e Carvalho, Tamara de
Estudo da ação de nanoemulsões contendo óleo de Copaíba na
inibição do Zika vírus / Tamara de Carvalho. -- São José do Rio Preto,
2020
63 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto
Orientadora: Marília de Freitas Calmon
Coorientadora: Cíntia Bittar Oliva

1. Microbiologia. 2. Virologia. 3. Zika vírus. 4. Antiviral. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Tamara de Carvalho

Estudo da Ação de Nanoemulsões contendo Óleo de Copaíba na Inibição
do Zika Vírus

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior

UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Bruno Moreira Carneiro

Universidade Federal de Rondonópolis - UFR

São José do Rio Preto

20 de fevereiro de 2020

**Dedico esse trabalho aos meus pais,
Wilson de Carvalho Júnior e Sueli
Silva de Carvalho, e meus irmãos,
Raphael de Carvalho e Tamires de
Carvalho, que sempre me apoiaram e
estiveram ao meu lado.**

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon, pelas oportunidades proporcionadas, pelos 4 anos de orientação, ensinamentos e pelo crescimento profissional e pessoal;

À minha coorientadora Profa. Dra. Cíntia Bittar Oliva, por sempre estar presente, me ensinando e tirando minhas dúvidas. Agradeço muito por ter tido a oportunidade de ser sua aluna;

À Profa. Dra. Paula Rahal por ter me acolhido no Laboratório, por seus ensinamentos passados durante as reuniões científicas, que também me ajudaram muito no crescimento profissional;

Às Profa. Dra. Graziella Joanitti e Profa. Dra. Marcela Guimarães Landim, do Laboratório de Compostos Bioativos e Nanotecnologia, da Universidade de Brasília (UNB), pela excelente parceria, sempre se mostrando disponíveis;

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) pela estrutura, e o corpo docente, por todo conhecimento que me foi transmitido durante esses anos;

À banca examinadora, Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior e Prof. Dr. Bruno Moreira Carneiro, e aos seus suplentes Profa. Dra. Ana Elizabete Silva e Profa. Dra. Paola Jocelan Scarin Provazzi Trabulsi, por terem aceito o convite e contribuírem com este trabalho;

Aos meus colegas de Laboratório que me ensinaram e sempre me ajudaram, pelas trocas de conhecimentos e risadas nos momentos de descontração, Ana Emília, Ágata, Dayla, Gabrielinha, Bianca, Maria Letícia, Pâmela, Nayara, Bárbara (B1), Bárbara (B2), Tairine, Guilherme, Ricardo, Lenira e Paola;

À Maria Letícia e Francielly, pela grande amizade desde minha entrada no Laboratório em 2016! Pelas conversas científicas e várias risadas, e por sempre me apoiarem e ajudarem.

À Dayla e a Pâmela, minhas amigas, morar com vocês me trouxe momentos maravilhosos, de muita risada e descontração;

À minha família, meus pais Wilson e Sueli, e meus irmãos, Raphael e Tamires, por sempre me apoiarem, aconselharem, pelas conversas e risadas, e acima de tudo, acreditarem nos meus sonhos e estarem sempre tão presentes;

Ao meu namorado Matheus Henrique, que sempre teve paciência, me apoiou, me fez sorrir e ser forte durante todos os momentos. Sou grata por todo o apoio e companheirismo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

**“Não importa o que aconteça, continue a nadar”
(WALTERS, GRAHAM ; PROCURANDO NEMO, 2003)**

RESUMO

O vírus Zika (ZIKV), pertencente ao gênero dos *Flavivirus*, possui como principais vetores os mosquitos do gênero *Aedes*, e foi isolado pela primeira vez em 1947, na floresta Zika, na Uganda. Porém, a primeira epidemia da febre Zika foi registrada apenas em 2007, e a partir de então o número de casos proliferaram pelo mundo. Os sintomas mais comuns causados pelo ZIKV são febre, dor de cabeça, conjuntivite, dores articulares e musculares, e erupção cutânea. Ainda, o desenvolvimento de doenças neurológicas, como a Síndrome de Guillain-Barré e síndrome congênita do Zika, sendo que, já foram registrados diversos casos de microcefalia. Atualmente, não existem vacinas ou antivirais contra o ZIKV. Assim, faz-se de grande relevância estudos que agregam moléculas ativas como o óleo de copaíba, que já demonstrou diversas atividades antimicrobianas na literatura, associadas à nanoemulsões (NEs), potencializando a atividade e o modo de entrega em sistemas biológicos. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar a ação de NEs contendo óleo de copaíba na inibição do ZIKV. Inicialmente foi realizado o ensaio de viabilidade celular (MTT) em linhagens celulares VERO E6 e HuH-7 e a captação intracelular da droga. A inibição viral foi avaliada inicialmente por ensaio de formação de placas e na sequência foi realizado o ensaio de dose dependência que foi avaliado por qPCR. Por fim, foi realizado o ensaio de tempo de adição para identificar a etapa do ciclo viral que a droga está atuando, também avaliado por qPCR. Os resultados do ensaio de MTT demonstraram que a maior concentração não citotóxica, acima de 80% de viabilidade, 48 horas após o tratamento, foi de 180 µg/mL. As NEs internalizaram em todos os tempos analisados, em ambas as linhagens analisadas. Em sequência, observou-se uma redução relativa no número de focos de aproximadamente 70% e 80%, para a NE vazia (NEV) e contendo óleo de copaíba (NEC), respectivamente. A dose dependência em linhagem VERO E6 infectada com ZIKV, observou-se que para a NEV, a inibição do ZIKV foi similar em todas as concentrações analisadas e, para a NEC, a inibição foi dose dependente. Resultados preliminares do ensaio de tempo de adição demonstraram que a NEC tem efeito virucida inibindo aproximadamente 92,5% da liberação do vírus. Ambos os tratamentos também demonstraram efeito nas etapas pós-entrada, inibindo cerca de 99,1% do RNA intracelular do ZIKV. Até o momento, é possível concluir que, apesar de ambas NEs demonstrarem potencial em inibir o ZIKV, experimentos são necessários para confirmar os resultados e também para entender o modo de ação das NEs, de forma a esclarecer em qual etapa do ciclo viral os tratamentos estão inibindo o Zika.

Palavras chave: Antiviral, Nanoemulsão, Óleo de copaíba, Zika vírus.

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV), belongs to the genus *Flavivirus*, has as main vectors mosquitoes from *Aedes* genus and was first isolated in 1947 in the Zika forest in Uganda. However, the first epidemic of Zika fever was recorded only in 2007, and since then the number of cases has spread worldwide. The most common ZIKV symptoms are fever, headache, conjunctivitis, joint and muscle pain, and rash. Besides that, it can lead to the development of neurological diseases such as Guillain-Barre syndrome and congenital Zika, so that several cases of microcephaly have been reported. There are currently no vaccines or antivirals against ZIKV. For this reason, studies with different active molecules and drug delivery systems are of great importance. Thus, there is a great relevance of studies that combine active molecules such as copaiba oil, which has already shown different antimicrobial activities in the literature, and nanoemulsions (NEs), enhancing the activity and improving the mode of delivery in biological systems. Therefore, the aim of this study was to analyze the action of NEs containing copaiba oil on ZIKV inhibition. Initially, a cell viability assay (MTT) in VERO E6 and HuH-7 cell lines and intracellular uptake were performed. Viral inhibition was initially assessed by plaque assay and then dose dependence assay was evaluated by qPCR. Finally, the time of addition test was performed to identify the stage of the viral cycle that the drug is acting, also evaluated by qPCR. The results of the MTT assay showed that the highest non-cytotoxic concentration with cell viability above 80%, 48 hour post-treatment, was 180 µg/mL. The internalization of nanoemulsion in cells was confirmed in all times analyzed, in both cell lines. In the general inhibition assay, the relative foci number was reduced by approximately 70% and 80% for the empty nanoemulsion (ENE) and the containing copaiba oil nanoemulsion (CNE), respectively. In the nanoemulsion dose-dependency assay on ZIKV, it was observed that for the NEV inhibition was similar at all concentrations analyzed and for CNE the inhibition was dose dependent. Preliminary results of the time of addition assay show that the copaiba oil nanoemulsion has virucidal effect inhibiting 92.5% of virus release. Both treatments with nanoemulsions also have an effect on the post-entry stage, inhibiting about 99.1% of ZIKV intracellular RNA when compared to the control. Preliminarily, it can be concluded that, although both NEs show potential to inhibit ZIKV, further experiments are needed to confirm the results and also to understand the mode of action of NEs in order to clarify at which stage of the viral cycle treatments are inhibiting Zika.

Key words: Antiviral, Copaiba oil, Nanoemulsions, Zika virus.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

4-HPR: N- (4-hidroxifenil) retinamida

6 MMpr: 6-metilmercaptapurina ribosídeo

25 HC: 5-hidroxicolesterol

C: Proteína do capsídeo do Zika vírus, do Inglês *Core protein*

C: Controle, do Inglês Control

cDNA: DNA complementar, do inglês complementary DNA

CMC: carboximetilcelulose, do Inglês Carboxymethylcellulose

CNE: Nanoemulsão de óleo de copaíba, do Inglês Copaiba oil Nanoemulsion

CO₂: Dióxido de carbono

DENV: vírus da Dengue, do Inglês Dengue virus

DMEM: Meio Eagle Modificado por Dulbecco, do Inglês Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ENE: Nanoemulsão vazia, do Inglês Empty Nanoemulsion

ENV: Proteína do envelope do Zika vírus

EGCG: epigallocatequina galato

FCO: Óleo de copaíba livre, do Inglês Free Copaiba Oil

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

H1N1: Gripe H1N1 ou suína

HIV: Vírus da imunodeficiência humana, do Inglês *Human Immunodeficiency Virus*

HuH: Hepatoma humano, do Inglês Human hepatoma (Referente à linhagem celular)

Kb: kilobase

MMPD: Merimepodib

MTT: Dimetil tiazolio 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NE: Nanoemulsão

NEC: Nanoemulsão contendo óleo de copaíba

NEs: Nanoemulsões

NEV: Nanoemulsão vazia

NPs: Nanopartículas

NS: Proteínas Não estruturais, do Inglês Non-Structural

OMS: Organização Mundial da Saúde

P/S: Referente ao antibiótico de penicilina e estreptomicina, do Inglês *Penicillin/Streptomycin*

PBS: Tampão fosfato salino, do Inglês Phosphate buffered saline

PCR: Reação em cadeia da polimerase, do Inglês Polymerase Chain Reaction

PFU: Unidade formadora de placa, do Inglês Plaque Forming Unit

prM: Proteína precursora de membrana

RNA: Ácido Ribonucleico, do Inglês Ribonucleic Acid

RNA-C: Complexo de proteína viral

FBS: Soro Fetal Bovino, do Inglês Fetal Bovine Serum

WC: Controle de água, do Inglês Water Control

ZIKV: Vírus da Zika, do Inglês Zika virus

Sumário

CAPÍTULO 1	13
Considerações gerais.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Arbovírus.....	14
1.2. Febre do Zika.....	15
1.2.1. O vírus.....	18
1.2.2. Prevenção, tratamento, vacina e estudos de antivirais.....	21
1.3. Óleo de copaíba.....	22
1.4. Nanotecnologia.....	24
2. Objetivo.....	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. Referências Bibliográficas.....	27
CAPÍTULO 2.....	36
Artigo científico.....	36
1. Introduction.....	39
2. Materials and Methods.....	40
2.1. Nanoemulsions.....	40
2.2. Cells and Virus.....	41
2.3. Analysis of nanoemulsion cytotoxicity.....	41
2.4. Intracellular uptake.....	42
2.5. Viral inhibition assay.....	42
2.6. Analysis of the nanoemulsions dose dependence.....	43
2.7. Virucidal effect of nanoemulsions.....	43
2.8. ZIKV entry inhibition assay.....	43
2.9. ZIKV post-entry stages inhibition assay.....	43
2.10. Viral RNA Extraction and cDNA Synthesis.....	44
2.11. ZIKV RNA quantification real time PCR (qPCR).....	44
2.12. Statistical analysis.....	44
3. Results.....	44

3.1. Analysis of nanoemulsion cytotoxicity.....	44
3.2. Intracellular uptake.....	46
3.3. Viral inhibition assay.....	48
3.4. Analysis of the nanoemulsions dose dependence.....	49
3.5. Virucidal effect of nanoemulsions.....	50
3.6. ZIKV entry inhibition assay.....	51
3.7.ZIKV post-entry stages inhibition assay.....	52
4. Discussion.....	53
5. Conclusion.....	56
6. References.....	57
CAPÍTULO III.....	62
Conclusão.....	62
1. Conclusão.....	63

CAPÍTULO I

Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

1.1. Arbovírus

Mais de 500 arbovírus, reconhecidos mundialmente, fazem parte de um grupo constituído por vírus que são transmitidos por vetores artrópodes, como por exemplo, mosquitos, carrapatos (CLETON et al., 2012; YOUNG, 2018), moscas e ácaros, dentre outros (SALIMI;CAIN; KLEIN, 2016). Sendo que desses arbovírus, 150 infectam humanos, causando doenças que podem resultar em epidemias (YOUNG, 2018). Estes vírus pertencem, majoritariamente, às famílias *Togaviridae*, *Bunyaviridae* e *Flaviviridae*, mas também, em menor número, às famílias *Reoviridae* e *Orthomyxoviridae* (CLETON et al., 2012).

Devido à rápida disseminação dos arbovírus, com possibilidade de resultar em surtos na população, estes são considerados um problema de saúde pública mundial (YOUNG, 2018), sendo que, mais de 30% da população do mundo vive em zonas de risco (MOURA-NETO et al., 2019). Na figura 1, podemos observar em rosa, as zonas no mapa com maior incidência de arboviroses.

Figura 1: Na coloração rosa, regiões com maior incidência de arboviroses. Mais de 30% da população vive em áreas de risco.



Fonte: (MOURA-NETO et al., 2019)

No Brasil, primeiramente, haviam relatos da circulação de dez arbovírus de importância clínica médica no país: os vírus Mayaro, Encefalite Equina Venezuelana, Encefalite equina Oriental e Chikungunya, pertencentes à família *Togaviridae*, os vírus

da Dengue (DENV), Febre amarela, vírus do complexo da encefalite japonesa, Encefalite de Saint Louis, West Nile, pertencentes à Flaviviridae, e finalmente, o vírus Oropouche, pertencente à Bunyaviridae (FIGUEIREDO, 2007). Somente depois, no ano de 2015, reportou-se o primeiro relato do décimo primeiro arbovírus circulante no Brasil, o Zika vírus (ZIKV) (ZANLUCA et al., 2015).

Os flavivírus são vírus que pertencem à família Flaviviridae e ao gênero *Flavivirus*, fazem parte das arboviroses que causam doenças humanas (DE ANDRADE et al., 2017; YOUNG, 2018). Os flavivírus: Zika, Dengue e Febre amarela, merecem destaque, em razão da expansão demográfica acelerada, de forma que, o número de casos de infecção proliferam pelo mundo, afligindo e preocupando a população mundial (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017).

A rápida disseminação desses arbovírus é resultante da propagação de seus vetores *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* pelo mundo, em razão dos processos de urbanização e desmatamento. A origem e a dispersão desses vetores diferem, de maneira que, o *Ae. aegypt* é nativo da África, enquanto o *Ae. albopictus* é da Ásia, porém, hoje em dia, ambos são encontrados nas Américas e Ásia (DE ANDRADE et al., 2017). Atualmente, as formas de controle para esses vetores são por meio do uso de inseticidas, e campanhas que incentivam a população ao cuidado para evitar o desenvolvimento de habitats desses vetores, tais como: evitar água parada e o acúmulo de lixo (MOYES et al., 2017).

1.2. Febre do Zika

Em abril do ano de 1947, em uma floresta na Uganda, o ZIKV foi isolado pela primeira vez, da amostra de soro de um macaco rhesus (Rhesus 766). Posteriormente, em janeiro de 1948, o ZIKV foi isolado pela segunda vez, proveniente de um mosquito *Ae. africanus* (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; YUN; LEE, 2017). Já o ano de 1952, foi marcado pelos primeiros casos de infecção desse vírus em humanos, na República Unida da Tanzânia e em Uganda, e ainda, pela confirmação da presença do vírus em humanos na Índia (KINDHAUSER et al., 2016).

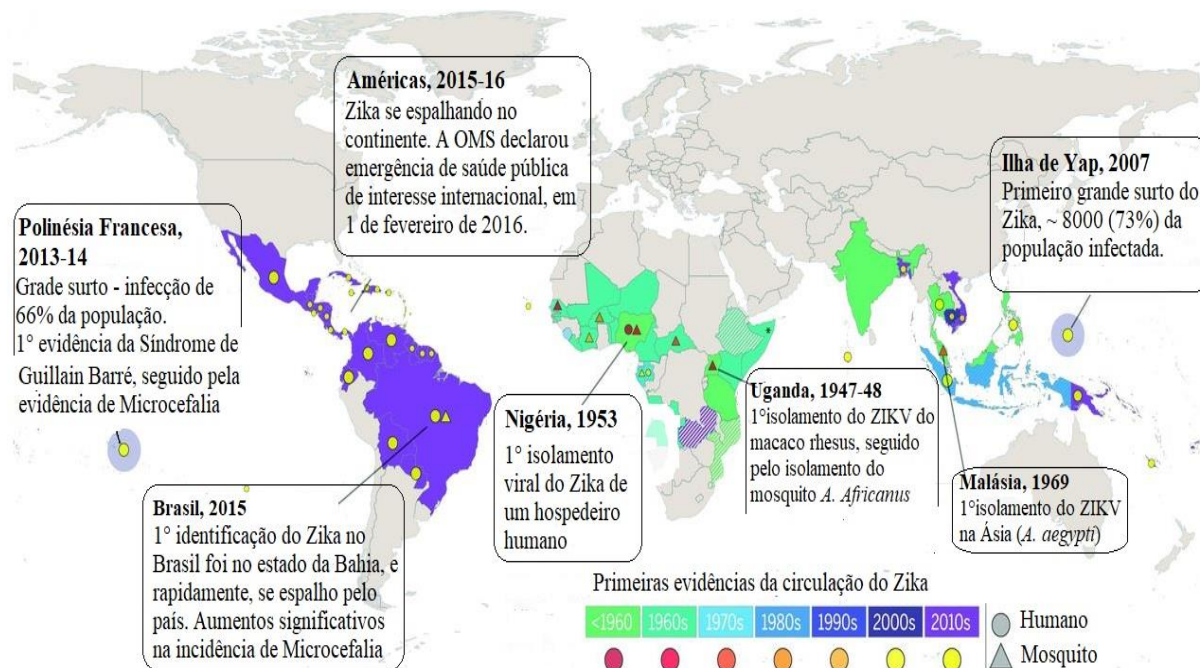
Porém, o primeiro surto causado por esse vírus, só ocorreu no ano de 2007, na Ilha de Yap, nos Estados Federados da Micronésia, em que foram observados os sintomas de febre, erupção cutânea, dor nas juntas e conjuntivite, sendo que, cerca de 70% da população foi infectada, em apenas 13 semanas. Os casos relacionando o ZIKV e o desenvolvimento de doenças neurológicas, a Síndrome de Guillain-Barré e microcefalia

em recém nascidos, acometendo diversas falhas neurológicas, como a paralisia cerebral, só ocorreu a partir do período de 2013-2014, durante um surto na Polinésia Francesa, que afetou 10% da população (KINDHAUSER et al., 2016; SAMPATHKUMAR; SANCHEZ, 2016; WATRIN et al., 2016). Outros surtos também foram registrados nas Ilhas de Páscoa e Cook e na Nova Caledônia (PLOURDE; BLOCH, 2016). Além dos sintomas apresentados, posteriormente, foi descrito na literatura casos de pacientes assintomáticos infectados pelo ZIKV (MUSSO et al., 2014; OLIVEIRA SOUTO et al., 2018)

O Brasil, um país com clima tropical, caracterizado pela sua biodiversidade e florestas tropicais, possui um grande potencial para o desenvolvimento de arboviroses. Dessa forma, em 2015, o Brasil teve seu primeiro caso de infecção por Zika vírus reportado, na cidade de Camaçari, no estado da Bahia. Esse marco foi seguido então, por outros casos de transmissão autóctone em diversos países do continente americano (FIGUEIREDO, 2007; PLOURDE; BLOCH, 2016; WAGGONER; PINSKY, 2016). É importante ressaltar que, nos anos de 2014 e 2015, coincidente com surgimento do ZIKV no Brasil, foi registrada uma grande epidemia de casos de microcefalia, o que levou ao início de investigações de uma possível correlação entre a infecção pelo ZIKV em mulheres grávidas e os casos de microcefalia (FAUCI; MORENS, 2016).

Na figura 2, podemos observar um mapa com os principais marcos históricos do Zika vírus, desde o primeiro isolamento do vírus na Uganda, o primeiro grande surto na Ilhas de Yap, até a chegada do vírus no Brasil.

Figura 2: Mapa com os principais marcos do Zika vírus, desde seu primeiro isolamento em Uganda, até a primeira identificação no Brasil.



Fonte: (LESSLER et al., 2016) – Adaptado.

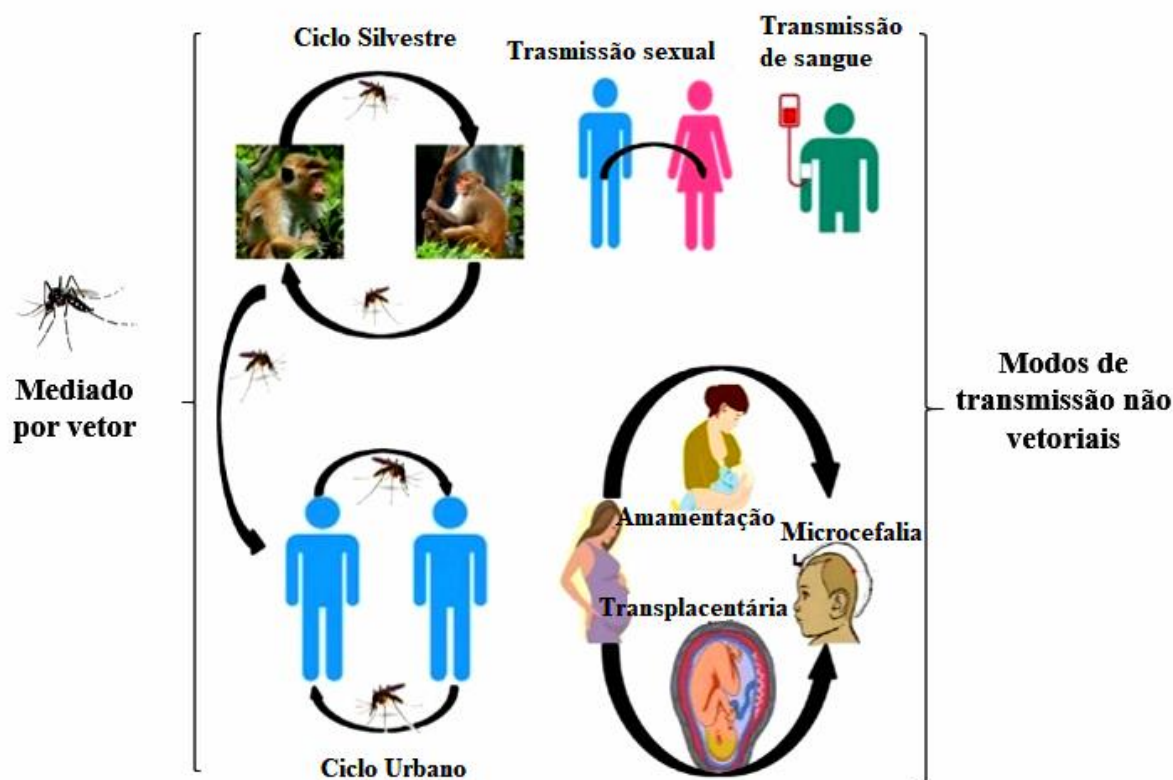
Os casos de infecção por Zika vírus já foram declarados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um grande problema de saúde pública, comparando a gravidade da situação com os anos de 2009, durante a epidemia de H1N1, e de 2014, com os casos de ressurgimento da poliomielite do Paquistão e Síria, e ainda com as infecções por vírus Ebola (SAMPATHKUMAR; SANCHEZ, 2016).

O Zika vírus já foi isolado de diversos mosquitos *Aedes*, como o *Ae. africanus*, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. hensilli*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. furcifer* e *Ae. vittatus* (PAIXAO et al., 2016; GORSHKOV et al., 2018). No ano de 2016, a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), identificou o Zika vírus em mosquitos *Culex quinquefasciatus*, sendo então, um possível vetor do vírus (AGÊNCIA FIOCRUZ, 2016). A transmissão do ZIKV pode ser através de um vetor, em que temos dois ciclos de transmissão, o silvestre e o urbano. O ciclo silvestre compreende primatas não humanos e mosquitos em florestas. Já o ciclo urbano, está relacionado com a transmissão do vírus em humanos e mosquitos nas zonas urbanas (BAUD et al., 2017; SONG et al., 2017).

A transmissão do Zika vírus também pode não envolver necessariamente um vetor, em que, inicialmente, tem-se a infecção de humanos pela picada do mosquito, e

posteriormente, a transmissão sexual, pela propagação do vírus em órgãos reprodutivos. Além disso, podemos observar a transmissão vertical do ZIKV, que seria a congênita ou perinatal, na qual o feto adquire o vírus da mãe durante a gestação (BASU; TUMBAN, 2016; PLOURDE; BLOCH, 2016), e diversos estudos na literatura demonstraram a análise da presença de RNA e proteínas virais em tecidos placentários e no líquido amniótico (MARTINES et al., 2016; OLIVEIRA MELO et al., 2016). Ainda, existe a possibilidade da transmissão do Zika vírus por meio de transfusões de sangue (BAUD et al., 2017; SONG et al., 2017). O esquema com todos esses modos de transmissão apresentados pode ser observado na figura 3.

Figura 3: Modos de transmissão do Zika vírus, mediado por vetor e os seus ciclos silvestre e urbano, ou não mediado por um vetor.



Fonte: (MISHRA; BEHERA, 2016) – Adaptado.

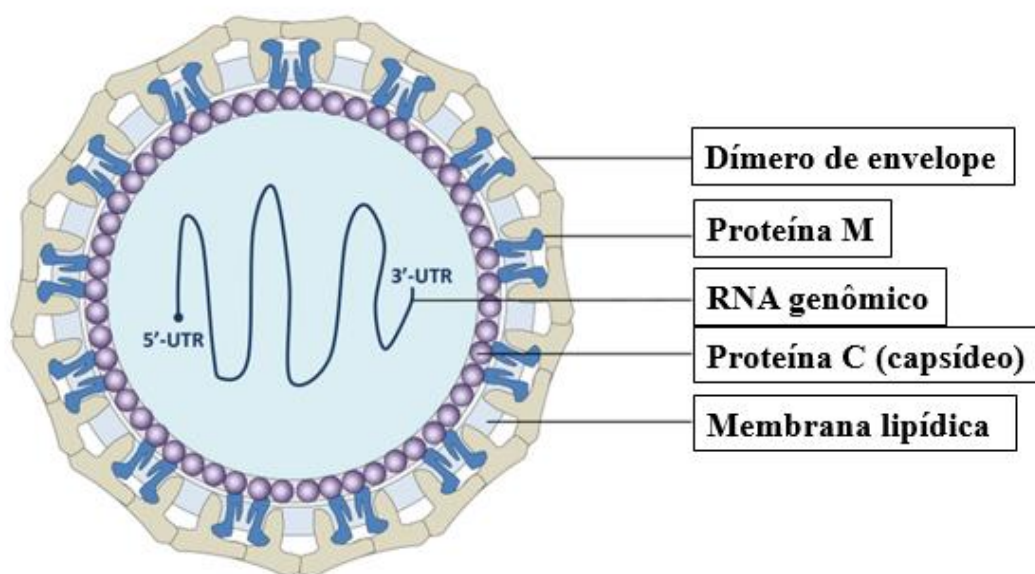
1.2.1. O vírus

O Zika vírus possui um genoma de RNA não segmentado, fita simples e polaridade positiva, e é um vírus envelopado. O genoma do ZIKV de 11kb codifica apenas uma poliproteína, e esta é clivada em várias proteínas individuais. Existem dois tipos de proteínas características do ZIKV: as proteínas estruturais, que são as proteínas

do Capsídeo (C), do envelope (E) e a precursora de membrana (prM), relacionadas a formação da partícula do vírus e aos processos de entrada, montagem e liberação dos vírions; e as não estruturais (NS), que são as proteínas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, e estão relacionadas à processos como replicação e controle da célula hospedeira (HAMEL et al., 2015; ABBINK;STEPHENSON; BAROUCH, 2018; BAZ; BOIVIN, 2019). Na figura 4, é possível observar a partícula do Zika vírus e suas proteínas estruturais e não estruturais.

Figura 4: Partícula do Zika vírus, suas proteínas estruturais: Capsídeo (C), do envelope (ENV) e a precursora de membrana (prM), o RNA genômico, e as proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5. (A) Estrutura do ZIKV (B) RNA genômico do ZIKV.

(A)



(B)

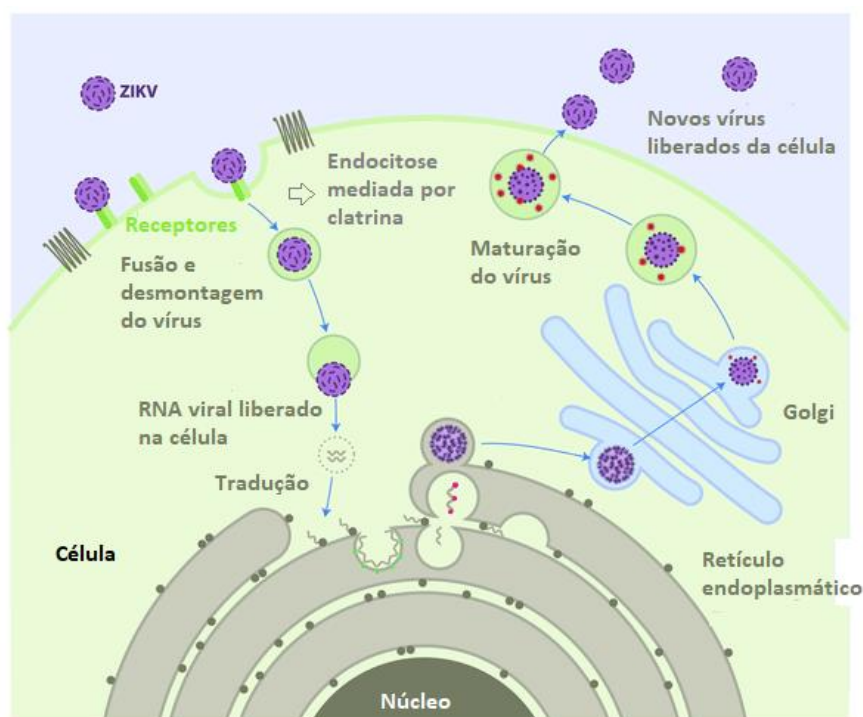


Fonte: (ABBINK;STEPHENSON; BAROUCH, 2018) – Adaptado.

As etapas de uma infecção viral por Zika (figura 5) são descritas a seguir: primeiramente, ocorrem interações entre glicoproteínas virais e receptores de superfície da célula e como resultado disso tem-se a ligação dos vírions na superfície da célula. Após, ocorre então a internalização na célula por endocitose, mediada por clatras

(WHITE et al., 2016). A liberação do genoma do vírus no citoplasma da célula, com a fusão da membrana do vírus e a membrana endossomal, ocorre devido a uma mudança na conformação do vírion, resultante da diminuição do pH do meio. Então, primeiramente tem-se a tradução do RNA de senso positivo em uma poliproteína, a qual as proteases da célula e do vírus, processam co-traducional e pós-traducionalmente. Essa poliproteína é composta pelas proteínas estruturais: C, prM, ENV, e não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, conforme observado na figura 3 (SONG et al., 2017; ABBINK;STEPHENSON; BAROUCH, 2018). O complexo de replicação, que inclui o RNA viral e proteínas da célula e do vírus, é encontrado nas membranas intracelulares, que é o local de ocorrência da replicação. O processo de replicação envolve a síntese da fita de RNA de senso negativo, utilizada então como o molde para uma outra síntese de várias fitas de RNA de senso positivo. Tem-se então, a montagem dos vírions imaturos, que ocorre primeiro pelo brotamento de um complexo de proteína viral, o RNA-C, no retículo endoplasmático, em que se observa a incorporação da bicamada lipídica e das proteínas do vírus: ENV e prM. O próximo passo é maturação dos vírions imaturos, na via secretora trans-Golgi da célula hospedeira, que leva, finalmente, a liberação de vírions maduros, por exocitose (WHITE et al., 2016; SONG et al., 2017).

Figura 5: Esquema do ciclo replicativo do ZIKV.



Fonte: (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018) – Adaptado.

1.2.2. Prevenção, tratamento, vacina e estudos de antivirais

A infecção por Zika vírus pode ser prevenida de diversas formas. A primeira delas é a proteção de picadas de mosquitos transmissores do vírus, evitando, principalmente, o desenvolvimento de ambientes de proliferação do mosquito, como locais com água parada, e ainda por meio do uso de repelentes. Além disso, como o ZIKV também pode ser transmitido sexualmente, outro modo de prevenção seria por meio do uso de preservativos. Também é de grande importância a realização de uma triagem dos doadores antes de efetivamente iniciar as doações de sangue uma vez que esta pode ser outra forma de transmissão (RELICH; LOEFFELHOLZ, 2017).

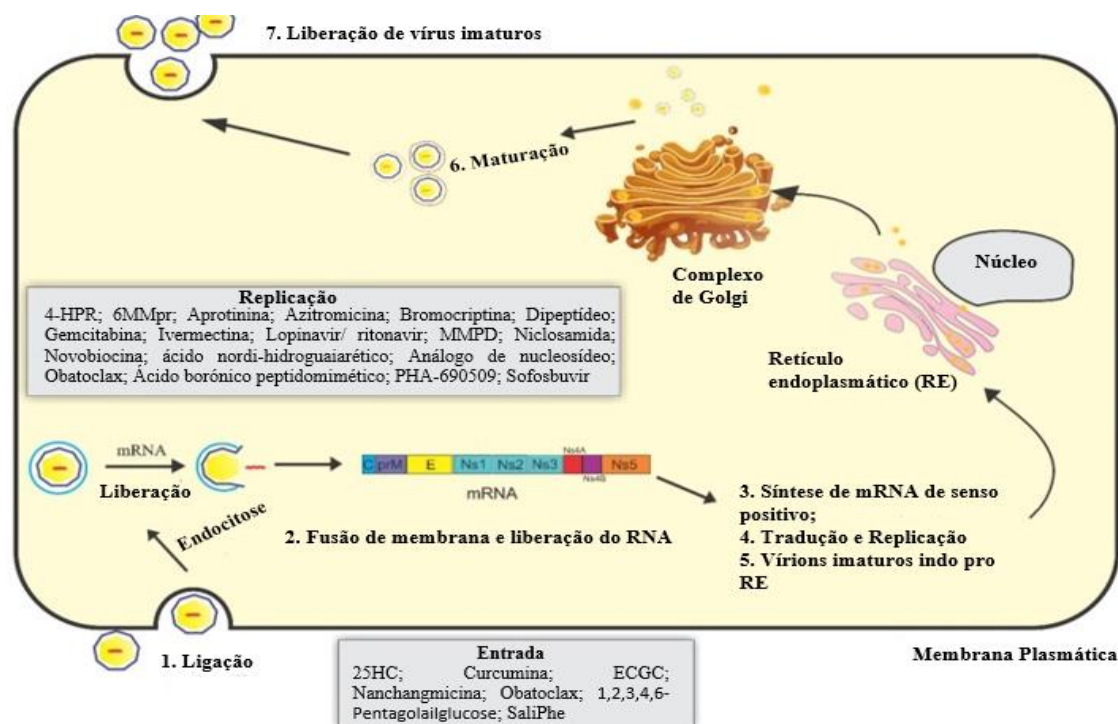
Até os dias atuais, o foco do tratamento para a infecção pelo ZIKV é no alívio dos sintomas básicos sofridos pelo paciente, de forma que, não há nenhuma vacina ou terapia com uso de antivirais ainda (BASARAB et al., 2016). Porém, existem vários estudos com o intuito do desenvolvimento de vacinas para o ZIKV, existindo mais de 50 candidatos em análise e grande probabilidade de futura aprovação de vacinas que são vírus atenuados ou purificados inativos, devido a outras aprovações de vacinas para outros flavivírus (LIN et al., 2018; MAO; CHAO, 2019). Há estudos de desenvolvimento de vacinas que englobam sistema de entrega de antígeno, como por exemplo, vacinas de ácidos nucleicos, e como mencionado anteriormente vírus atenuados e vírions inativos, tendo como foco acelerar o desenvolvimento de uma vacina para o ZIKV (PIERSON; GRAHAM, 2016).

Além da análise de futuras vacinas para o ZIKV, existem também diversos estudos na literatura que buscam moléculas ativas com ação contra o Zika vírus, principalmente englobando compostos naturais, por meio da extração de componentes ativos de plantas, raízes e flores (GACH et al., 2016). Um exemplo de composto natural com ação antiviral é a curcumina, que inibiu a etapa da replicação do ZIKV (MOUNCE et al., 2017), o EGCG, uma molécula do chá verde, que inibiu a etapa de entrada do ZIKV em células de rim de macaco verde africano (VERO E6) (CARNEIRO et al., 2016), e ainda estudos com a berberina e emodin, que demonstraram inativação do vírus Zika (BATISTA et al., 2019).

Na literatura, é possível observar outros estudos de antivirais com ação contra o ZIKV, como o Sofosbuvir, um fármaco que já tem ação comprovada em pacientes com infecção crônica pelo vírus da Hepatite C, demonstrou inibição na etapa de replicação do

ZIKV (SACRAMENTO et al., 2017). Diversos análogos de nucleosídeos já foram testados e também demonstraram ação inibitória contra o ZIKV (EYER et al., 2016). Portanto, diversas moléculas com ações em determinadas etapas do ciclo viral do Zika já foram identificados (Figura 6) (DA SILVA; OLIVEIRA SILVA MARTINS; JARDIM, 2018) e ainda há várias moléculas derivadas de plantas, que demonstraram ação inibitório contra o Zika vírus (ZHOU et al., 2017; CLAIN et al., 2019).

Figura 6: Compostos com ação nas etapas de entrada e replicação do ciclo viral do Zika.



Fonte: (DA SILVA; OLIVEIRA SILVA MARTINS; JARDIM, 2018) – Adaptado.

1.3. Óleo de copaíba

Visto o atual cenário apresentado, de estudos que buscam analisar compostos de origem natural e seus potenciais como possíveis antivirais, observa-se interesse no estudo do óleo de copaíba, que é, geralmente, extraído do tronco da árvore conhecida popularmente como Copaíba, pertencente à família Leguminosae e do gênero *Copaifera* (TOBOUTI et al., 2017), encontrada na floresta amazônica (CAMPOS-CARRARO et al., 2018). Na região brasileira, o óleo de copaíba pode ser obtido de diversas espécies de *Copaifera*, alguns exemplos são a *C. reticulata* Ducke, *C. offinalis* L., *C. multijuga* Hayne, dentre outras. Sua composição de óleo puro, geralmente, engloba variações de porcentagens de concentrações dos diterpenos, sesquiterpenos e terpenos (TOBOUTI et

al., 2017; DIEFENBACH et al., 2018). Os principais componentes dos óleos essenciais da *Copaifera officinalis* utilizado nesse estudo foram β -cariofileno, *aloaromadendreno*, germacreno B, β -bisaboleno, δ -cadineno, α -cadineno (DIAS et al., 2014). Esses metabólitos secundários pertencem à classe dos sesquiterpenos e já possuem diversas atividades biológicas demonstradas na literatura, como pró-oxidante, antioxidante, anti-inflamatório, antitumoral, efeito antiparasitário, etc (BARTIKOVA et al., 2014).

As atividades do óleo de copaíba são observadas desde a antiguidade por índios nativos, que descreviam a possibilidade de cura de qualquer ferida por esse óleo. A população amazônica explorou outros usos do óleo, como tratamento de infecções de garganta, assim como também para estimular o apetite. As ações desse óleo sempre chamaram a atenção de diversos estudiosos para maior entendimento das potencialidades do óleo de copaíba. Além do uso medicinal, o óleo também foi utilizado por pintores do século 19, inclusive pelo pintor Van Gogh (TOBOUTI et al., 2017).

Esse óleo já demonstrou diversas propriedades, como atividade anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, antioxidante, antifúngica, analgésica, anti-leishmania, além de demonstrar efeitos sobre a hipertensão arterial pulmonar (DOS SANTOS et al., 2012).

Em relação aos constituintes do óleo de copaíba, os metabólitos secundários de sesquiterpenos já possuem diversas atividades biológicas demonstradas na literatura, como efeito pró-oxidante, antioxidante, anti-inflamatório, antitumoral, antiparasitária, etc (BARTIKOVA et al., 2014). Nos diterpenos, existem diversos subgrupos que possuem atividades biológicas também, demonstrando ação antifúngica, citotóxica, fitotóxica, e ainda, atividade antiviral, dentre outros potenciais (REVEGLIA et al., 2018). Já para os terpenos, existem análises relacionando efeitos desse metabólito e de outros derivados contra bactérias patogênicas (MAHIZAN et al., 2019).

Ainda, as diversas ações antimicrobianas já descritas na literatura para o óleo de copaíba podem estar relacionadas com as características lipofílicas desse óleo, que podem acarretar em alterações na membrana celular, principalmente em relação às atividades antibacterianas já descritas (DIEFENBACH et al., 2018).

Portanto, a associação desse óleo a nanotecnologia faz-se de grande importância, em razão da ampla variedade de vantagens que esses sistemas trazem, como a melhora da entrega de drogas, principalmente as que possuem características lipofílicas, como é o caso de oleaginosas, ainda, também aumentam a biodisponibilidade de compostos, além

de melhorar a internalização nas células (SINGH et al., 2017). A nanotecnologia é um ramo da tecnologia que engloba diversas áreas, como segurança, tecnologia da informação, energia, agricultura, proteção ambiental, e saúde. O uso da nanotecnologia na medicina, com foco no aperfeiçoamento de técnicas para a saúde da população é a área de maior destaque, sendo considerada uma das pesquisas nanotecnológicas mais bem-sucedidas (GÖKÇAY; ARDA, 2015; GAO et al., 2016).

1.4 Nanotecnologia

A aplicação da nanotecnologia em terapias é resultante do estudo das diversas características dos nanomateriais, suas propriedades morfológicas de superfície e a possibilidade de modificações e associações químicas, com o objetivo de melhora dos sistemas de entrega de drogas, com alvos mais definidos e ainda, maior estabilidade. A nanomedicina utiliza então de estratégias da nanotecnologia, não só com o intuito aperfeiçoar terapias, mas também de sistematizar novas metodologias de tratamentos (FAROKHZAD; LANGER, 2006; KIM; AHN; KIM, 2019).

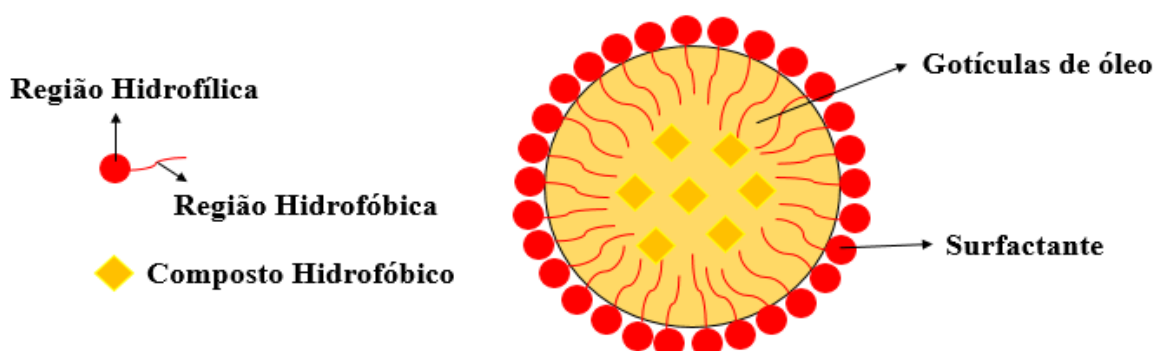
A nanomedicina requer conhecimentos interdisciplinares, de maneira a englobar estudos na química, física e biologia, resultando em um ramo com diversas aplicações, como desenvolvimento de nanomateriais para diagnóstico, a imagiologia e agentes teranósticos; estadiamento de doenças, por meio da amplificação de sinais no sangue ou ativação da detecção de DNA; uso na engenharia de tecido ósseo; carreadores de drogas, com diversas atividades antimicrobianas ou antitumorais, como as nanopartículas ou nanoemulsões (LIU; MIYOSHI; NAKAMURA, 2007; MOLINA et al., 2015; WALMSLEY et al., 2015; SHI; LAMMERS, 2019).

A utilização das nanopartículas (NP) na área médica iniciou-se na década de 1970, com o uso de nanobioconjugados, seguido então, pela diversidade de aplicações biológicas das nanoestruturas (BOISSELIER; ASTRUC, 2009). As nanopartículas possuem uma variedade de tipos de materiais utilizados na sua elaboração, como por exemplo, lipídios, metal, silício, sílica, polímeros, proteínas e carbono, e as nanoemulsões (NEs) possuem como principal característica a composição por uma fase de óleo interna e outra aquosa externa, com dimensões nanométricas (ASSIS et al., 2012; WOLFRAM et al., 2015). Dá se destaque a ampla aplicação médica de NPs de metais nobres, como prata, ouro e platina, seja no diagnóstico, como também no tratamento de doenças como

câncer, vírus da imunodeficiência humana (HIV), tuberculose e Parkinson (RAI et al., 2016).

Em função das limitações de algumas drogas atuais, como a baixa biodisponibilidade e solubilidade da maioria destas, é muito importante o uso de nanopartículas ou nanoemulsões, como sistemas de entrega, de forma que, o resultado é um aumento na eficácia do tratamento (BI et al., 2017; MIRHADI;REZAEI; MALAEKEH-NIKOUEI, 2018). As NPs ou NEs, possuem diversas características únicas, que podem acarretar na melhora da entrega de compostos, redução de efeitos adversos de drogas, como redução da toxicidade da droga e das doses terapêuticas, aumento da solubilidade e estabilidade em fluídos biológicos, dentre outros (WOLFRAM et al., 2015; DALCIN et al., 2019).

Figura 7: Nanoemulsão de óleo e água com um surfactante para estabilização, contendo um composto hidrofóbico.



Fonte: Autoria própria.

Como dito anteriormente, as NEs podem ser preparadas de forma a utilizar uma fase aquosa e outra de óleo, mas isso é feito juntamente com um surfactante, ou ainda, com um emulsificante, para proporcionar uma estabilização (Figura 7). O uso dessas nanoemulsões se aplica a um campo promissor, incluindo a indústria farmacêutica, alimentícia, cosméticos, dentre outras. As NEs tem proporcionado uma grande melhoria para a entrega de compostos ou drogas, principalmente quando esses possuem características hidrofóbicas (QIN et al., 2016; TAYEB; SAINSBURY, 2018; BONFERONI et al., 2019).

É importante ressaltar que existem diversos estudos na literatura associando nanopartículas ou nanoemulsões como potenciais antivirais, como é o caso do estudo de

6. References

1. Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46(5):509-20.
2. Yun SI, Lee YM. Zika virus: An emerging flavivirus. *J Microbiol.* 2017;55(3):204-19.
3. de Andrade GC, Ventura CV, Mello Filho PA, Maia M, Vianello S, Rodrigues EB. Arboviruses and the eye. *Int J Retina Vitreous.* 2017;3:4.
4. Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koou SY, Dusfour I, et al. Contemporary status of insecticide resistance in the major Aedes vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(7):e0005625.
5. Kindhauser MK, Allen T, Frank V, Santhana RS, Dye C. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull World Health Organ.* 2016;94(9):675-86C.
6. Sampathkumar P, Sanchez JL. Zika Virus in the Americas: A Review for Clinicians. *Mayo Clin Proc.* 2016;91(4):514-21.
7. Watrin L, Ghawché F, Larre P, Neau J-P, Mathis S, Fournier E. Guillain-Barré Syndrome (42 Cases) Occurring During a Zika Virus Outbreak in French Polynesia. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(14):e3257-e.
8. Figueiredo LT. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007;40(2):224-9.
9. Plourde AR, Bloch EM. A Literature Review of Zika Virus. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(7):1185-92.
10. Waggoner JJ, Pinsky BA. Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat. *J Clin Microbiol.* 2016;54(4):860-7.
11. Fauci AS, Morens DM. Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. *New England Journal of Medicine.* 2016;374(7):601-4.
12. Baud D, Gubler DJ, Schaub B, Lanteri MC, Musso D. An update on Zika virus infection. *Lancet.* 2017;390(10107):2099-109.
13. Song BH, Yun SI, Woolley M, Lee YM. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *J Neuroimmunol.* 2017;308:50-64.
14. Basu R, Tumban E. Zika Virus on a Spreading Spree: what we now know that was unknown in the 1950's. *Virol J.* 2016;13(1):165-.
15. Basarab M, Bowman C, Aarons EJ, Cropley I. Zika virus. *BMJ.* 2016;352:i1049.

16. Rigamonte-Azevedo OC, Wadt, P. G. S., Wadt, L. H. O. Copaíba: ecologia e produção de óleo-resina 2004: [28 p. il p.].
17. Dias DS, Fontes LB, Crotti AE, Aarestrup BJ, Aarestrup FM, da Silva Filho AA, et al. Copaiba oil suppresses inflammatory cytokines in splenocytes of C57Bl/6 mice induced with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Molecules*. 2014;19(8):12814-26.
18. Bartikova H, Hanusova V, Skalova L, Ambroz M, Bousova I. Antioxidant, pro-oxidant and other biological activities of sesquiterpenes. *Curr Top Med Chem*. 2014;14(22):2478-94.
19. Dos Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, da Veiga Junior VF, Nakamura CV. Copaiba Oil: An Alternative to Development of New Drugs against Leishmaniasis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:898419.
20. Diefenbach AL, Muniz F, Oballe HJR, Rosing CK. Antimicrobial activity of copaiba oil (*Copaifera* spp.) on oral pathogens: Systematic review. *Phytother Res*. 2018;32(4):586-96.
21. Bi C, Miao XQ, Chow SF, Wu WJ, Yan R, Liao YH, et al. Particle size effect of curcumin nanosuspensions on cytotoxicity, cellular internalization, in vivo pharmacokinetics and biodistribution. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2017;13(3):943-53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.11.004>.
22. Mirhadi E, Rezaee M, Malaekhe-Nikouei B. Nano strategies for berberine delivery, a natural alkaloid of *Berberis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;104:465-73. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.067>.
23. Wolfram J, Zhu M, Yang Y, Shen J, Gentile E, Paolino D, et al. Safety of Nanoparticles in Medicine. *Curr Drug Targets*. 2015;16(14):1671-81. PubMed PMID: 26601723.
24. Dalcin AJF, Vizzotto BS, Bochi GV, Guarda NS, Nascimento K, Sagrillo MR, et al. Nanoencapsulation of the flavonoid dihydromyricetin protects against the genotoxicity and cytotoxicity induced by cationic nanocapsules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019;173:798-805. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.066>.
25. Farokhzad OC, Langer R. Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(14):1456-9. doi: 10.1016/j.addr.2006.09.011.

26. Kim J, Ahn SI, Kim Y. Nanotherapeutics Engineered to Cross the Blood-Brain Barrier for Advanced Drug Delivery to the Central Nervous System. *J Ind Eng Chem.* 2019;73:8-18. doi: 10.1016/j.jiec.2019.01.021.
27. Rai M, Ingle AP, Birla S, Yadav A, Santos CA. Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. *Crit Rev Microbiol.* 2016;42(5):696-719. doi: 10.3109/1040841X.2015.1018131.
28. Lucca LG, de Matos SP, Kreutz T, Teixeira HF, Veiga VF, Jr., de Araujo BV, et al. Anti-inflammatory Effect from a Hydrogel Containing Nanoemulsified Copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). *AAPS PharmSciTech.* 2018;19(2):522-30. doi: 10.1208/s12249-017-0862-6.
29. do Carmo Silva L, Miranda M, de Freitas JV, Ferreira SFA, de Oliveira Lima EC, de Oliveira CMA, et al. Antifungal activity of Copaiba resin oil in solution and nanoemulsion against *Paracoccidioides* spp. *Braz J Microbiol.* 2019. doi: 10.1007/s42770-019-00201-3.
30. Alencar EN, Xavier-Junior FH, Morais AR, Dantas TR, Dantas-Santos N, Verissimo LM, et al. Chemical Characterization and Antimicrobial Activity Evaluation of Natural Oil Nanostructured Emulsions. *J Nanosci Nanotechnol.* 2015;15(1):880-8. doi: 10.1166/jnn.2015.9187.
31. Venturini CG, Bruinsmann FA, Contri RV, Fonseca FN, Frank LA, D'Amore CM, et al. Co-encapsulation of imiquimod and copaiba oil in novel nanostructured systems: promising formulations against skin carcinoma. *Eur J Pharm Sci.* 2015;79:36-43. doi: 10.1016/j.ejps.2015.08.016.
32. Raghavan P. In vitro Inhibition of Zika Virus by Metadichol®, A Novel Nano Emulsion Lipid. *J Immunol Tech Infect Dis.* 2016;5.
33. Raghavan P. Inhibition of Dengue and other enveloped viruses by Metadichol®, a novel Nano emulsion Lipid. *EXPLORE The Journal of Science and Healing outcomes.* 2016;8:19.
34. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1232-9. doi: 10.3201/eid1408.080287.
35. Wong G, He S, Siragam V, Bi Y, Mbikay M, Chretien M, et al. Antiviral activity of quercetin-3-beta-O-D-glucoside against Zika virus infection. *Virol Sin.* 2017;32(6):545-7. doi: 10.1007/s12250-017-4057-9.

36. Santos AOd, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus %J Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2008;103:277-81.
37. Balasubramani S, Rajendhiran T, Moola AK, Diana RKB. Development of nanoemulsion from *Vitex negundo* L. essential oil and their efficacy of antioxidant, antimicrobial and larvicidal activities (*Aedes aegypti* L.). *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017;24(17):15125-33. doi: 10.1007/s11356-017-9118-y.
38. Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*. 2015;5(2):123-7. doi: 10.1007/s13205-014-0214-0.
39. Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK, et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J Control Release*. 2017;252:28-49. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.03.008.
40. Le NTT, Cao VD, Nguyen TNQ, Le TTH, Tran TT, Hoang Thi TT. Soy Lecithin-Derived Liposomal Delivery Systems: Surface Modification and Current Applications. *Int J Mol Sci*. 2019;20(19). doi: 10.3390/ijms20194706.
41. Adjei IM, Sharma B, Labhasetwar V. Nanoparticles: cellular uptake and cytotoxicity. *Adv Exp Med Biol*. 2014;811:73-91.
42. Machado FC, Adum de Matos RP, Primo FL, Tedesco AC, Rahal P, Calmon MF. Effect of curcumin-nanoemulsion associated with photodynamic therapy in breast adenocarcinoma cell line. *Bioorg Med Chem*. 2019;27(9):1882-90. doi: 10.1016/j.bmc.2019.03.044.
43. Cadete A, Olivera A, Besev M, Dhal PK, Goncalves L, Almeida AJ, et al. Self-assembled hyaluronan nanocapsules for the intracellular delivery of anticancer drugs. *Sci Rep*. 2019;9(1):11565. doi: 10.1038/s41598-019-47995-8.
44. Panyam J, Labhasetwar V. Sustained cytoplasmic delivery of drugs with intracellular receptors using biodegradable nanoparticles. *Mol Pharm*. 2004;1(1):77-84.
45. Mounce BC, Cesaro T, Carrau L, Vallet T, Vignuzzi M. Curcumin inhibits Zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding. *Antiviral Res*. 2017;142:148-57. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.03.014.
46. Behrendt P, Perin P, Menzel N, Banda D, Pfaender S, Alves MP, et al. Pentagalloylglucose, a highly bioavailable polyphenolic compound present in *Cortex moutan*, efficiently blocks hepatitis C virus entry. *Antiviral Res*. 2017;147:19-28.

47. Albulescu IC, Kovacikova K, Tas A, Snijder EJ, van Hemert MJ. Suramin inhibits Zika virus replication by interfering with virus attachment and release of infectious particles. *Antiviral Res.* 2017;143:230-6.
48. Tiwari SK, Dang J, Qin Y, Lichinchi G, Bansal V, Rana TM. Zika virus infection reprograms global transcription of host cells to allow sustained infection. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6(4):e24. doi: 10.1038/emi.2017.9.
49. Hamouda T, Myc A, Donovan B, Shih AY, Reuter JD, Baker JR, Jr. A novel surfactant nanoemulsion with a unique non-irritant topical antimicrobial activity against bacteria, enveloped viruses and fungi. *Microbiol Res.* 2001;156(1):1-7.
50. Chepurinov AA, Bakulina LF, Dadaeva AA, Ustinova EN, Chepurnova TS, Baker JR, Jr. Inactivation of Ebola virus with a surfactant nanoemulsion. *Acta Trop.* 2003;87(3):315-20. doi: 10.1016/s0001-706x(03)00120-7.
51. Manaargadoo-Catin M, Ali-Cherif A, Pougna JL, Perrin C. Hemolysis by surfactants--A review. *Adv Colloid Interface Sci.* 2016;228:1-16. doi: 10.1016/j.cis.2015.10.011.
52. Ali I, Shah MR, Yousuf S, Ahmed S, Shah K, Javed I. Hemolytic and cellular toxicology of a sulfanilamide-based nonionic surfactant: a niosomal carrier for hydrophobic drugs. *Toxicol Res (Camb).* 2018;7(5):771-8. doi: 10.1039/c8tx00108a.
53. Svetlichny G, Kulkamp-Guerreiro IC, Cunha SL, Silva FE, Bueno K, Pohlmann AR, et al. Solid lipid nanoparticles containing copaiba oil and allantoin: development and role of nanoencapsulation on the antifungal activity. *Pharmazie.* 2015;70(3):155-64.
54. Masson DS, Salvador SL, Polizello ACM, Frade MAC. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera langsdorffii*) oleoresin on bacteria of clinical significance in cutaneous wounds %J *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 2013;15:664-9.
55. Martín-Acebes MA, Jiménez de Oya N, Saiz J-C. Lipid Metabolism as a Source of Druggable Targets for Antiviral Discovery against Zika and Other Flaviviruses. *Pharmaceuticals (Basel).* 2019;12(2):97. doi: 10.3390/ph12020097.
56. Steuer C, Gege C, Fischl W, Heinonen KH, Bartenschlager R, Klein CD. Synthesis and biological evaluation of alpha-ketoamides as inhibitors of the Dengue virus protease with antiviral activity in cell-culture. *Bioorg Med Chem.* 2011;19(13):4067-74. doi: 10.1016/j.bmc.2011.05.015.
57. Sacramento CQ, de Melo GR, de Freitas CS, Rocha N, Hoelz LV, Miranda M, et al. The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. *Sci Rep.* 2017;7:40920. doi: 10.1038/srep40920.

CAPÍTULO III

Conclusão

1. CONCLUSÃO

A realização do presente trabalho foi importante para analisar o potencial antiviral de nanoemulsões contendo óleo de copaíba. Primeiramente, análises da viabilidade celular com os tratamentos com as nanoemulsões vazia e contendo óleo de copaíba, e com o óleo puro, demonstraram a diminuição da citotoxicidade nas linhagens VERO E6 e HuH-7 resultante do encapsulamento do óleo de copaíba. Além disso, foi possível confirmar a internalização das nanoemulsões em todos os tempos analisados.

Foi possível verificar que a nanoemulsão contendo óleo de copaíba apresenta potencial antiviral contra o ZIKV. Os dados indicam que tanto a estrutura da nanoemulsão quanto a associação desta com o óleo apresentam atividade antiviral. Sendo a ação antiviral da nanoemulsão contendo óleo de copaíba dose dependente, enquanto a nanoemulsão vazia apresentou resultados semelhantes para todas as concentrações analisadas, em função da ausência do óleo. As nanoemulsões apresentaram atividade nas diversas etapas do ciclo de replicação do ZIKV, demonstrando atividade virucida, inibição na entrada e em etapas pós-entrada.

Apesar dos resultados obtidos até o momento demonstrarem o potencial de ambas nanoemulsões em inibir o ZIKV, são necessários mais estudos para confirmar o mecanismo de ação que esses sistemas utilizam para levarem a esses efeitos.