

Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de um líquido iônico e de sua atividade antiviral frente ao Zika vírus

Giovanna Dutra Kaminski

Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha, Novo Hamburgo - RS, Brasil
E-mail: giovannakaminski@gmail.com

Matheus Daniel Faleiro

Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha, Novo Hamburgo - RS, Brasil
E-mail: mdfaleiro@gmail.com

Maria Angélica Thiele Fracassi

Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha, Novo Hamburgo - RS, Brasil
E-mail: angelica@liberato.com.br

Henri Stephan Stephan Schrekker

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Novo Hamburgo - RS, Brasil
E-mail: henri.schrekker@ufrgs.br

Ana Luiza Ziulkoski

Universidade Feevale, Novo Hamburgo - RS, Brasil
E-mail: analuiza@feevale.br

RESUMO

O Zika vírus tem gerado preocupação mundial devido à sua associação com a microcefalia e à ausência de medicamentos para combatê-la. Líquidos iônicos são sais que têm despertado grande interesse na microbiologia, porém pouco se sabe acerca de sua atividade antiviral. Com isso, a pesquisa investigou a citotoxicidade do sal (BTAC₁)₂ImCl e sua atividade antiviral frente ao Zika vírus. Para isso, células da linhagem Vero foram expostas por 72h à diferentes concentrações do composto, e a viabilidade celular foi verificada através de dois métodos, nos quais percebeu-se que apenas a mais alta concentração testada (1000µM) apresentou citotoxicidade. As demais concentrações foram aplicadas em ensaio de atividade antiviral, no qual notou-se que todas as concentrações inibiram a replicação viral, com cerca de 54% de inibição na concentração de 125µM. Considerando que é difícil atingir vírus sem danificar as células hospedeiras e que isso representa uma limitação no desenvolvimento de antivirais, os resultados obtidos podem ser considerados promissores.

Palavras-chave: Arboviroses. Sais imidazólicos. Viabilidade celular.

In vitro evaluation of cytotoxicity of an ionic liquid and its antiviral activity against Zika virus

ABSTRACT

Zika virus has been generate worldwide concern because of his association with microcephaly and the absence of drugs for reach it. Ionic liquids are salts which has been awakened high interest in microbiology, but little is now known about its antiviral activity. With this situation, this study evaluated the cytotoxicity of the salt (BTAC₁)₂ImCl and its antiviral activity for Zika virus. For this, Vero cells was exposed for 72h to differents concentrations of the salt and two cytotoxicity tests were performed, in which it was observed that just the highest concentration tested (1000µM) showed up cytotoxicity. The others concentrations were applied in a test of antiviral activity, in which was observed that all the concentrations showed up antiviral activity, and the highest was 54%, in the concentration of 125µM. Having in mind that one of the biggest limitations in the development of antiviral drugs is the difficult of reach virus without generate damage to cells, the results obtained until this moment can be considered promising.

Keywords: Arboviruses. Imidazolium salts. Cellular viability.

RECEBIDO EM: 18/08/2019 | APROVADO EM: 15/02/2020

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde, em fevereiro de 2018, divulgou uma lista de doenças e patógenos para os quais é extremamente necessário priorizar pesquisa e desenvolvimento. A febre de Zika, causada pelo Zika vírus (ZIKV), se faz presente nesta lista tendo em vista seu potencial de gerar novas emergências na saúde pública, associado ao fato de não haver soluções preventivas ou curativas eficientes até o momento.

Os sintomas da febre de Zika, segundo a OMS (2018), geralmente são leves e incluem febre, conjuntivite e dor de cabeça. Entretanto, de acordo com a mesma fonte, a infecção pelo ZIKV durante a gravidez tem sido associada à complicações como microcefalia, malformações congênitas do feto, o parto prematuro e o aborto. Em adultos, a infecção pelo vírus tem sido associada à manifestação de síndromes do sistema nervoso central presente hospedeiro, como a síndrome de *Guillain-Barré*.

A microcefalia de acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (2019), é uma condição em que a cabeça do bebê se desenvolve de maneira menor do que a esperada, devido à má formação do seu cérebro, assim podendo gerar na criança: convulsões, problemas de alimentação, visão, audição e, na condição mais grave, a doença pode ser fatal. De acordo com *Global Virus Network* (2016), entre os anos 2010 e 2014 foram registrados no Brasil, aproximadamente 175 bebês que nasceram com microcefalia por ano. Já em 2015, foram registrados mais de 4000 casos dessa doença em recém nascidos, coincidindo com a chegada do ZIKV no país. Já foi demonstrado que a infecção pelo vírus leva ao desenvolvimento de microcefalia em camundongos (CLERCQ e LI, 2016), além da capacidade do vírus de penetrar a placenta, o que fortalece sua ligação com deficiências congênitas (MINER e DIAMOND, 2017).

Além disso, a síndrome de *Guillain-Barré*, de acordo com Martins (2018), é considerada uma doença neural aguda, em que células do sistema imune passam a atacar células do sistema nervoso central resultando em deficiências no desenvolvimento sensorial e motor do paciente. Até 2017, o ZIKV já havia sido reportado em 84 países ao redor do mundo sendo que, destes, 31 apresentaram um aumento no número de casos de microcefalia relacionados com a infecção pelo vírus, e 24 países relataram um aumento no número de casos de síndromes neurológicas decorrentes da infecção (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

De acordo com Tortora *et al* (2012), nos países desenvolvidos, estima-se que pelo menos 60% de todas as doenças infecciosas sejam causadas por vírus. Porém sabe-se que, desde o desenvolvimento do primeiro medicamento antiviral, em 1963 até o ano de 2016, apenas 90 antivirais foram desenvolvidos e aprovados no mundo (CLERCQ e LI, 2016), sendo estes antivirais específicos para o tratamento de nove doenças infecciosas humanas, e que nenhuma destas doenças é a Zika. Assim sendo, o número de antivirais disponíveis é limitado e está abaixo da demanda existente. Isto se deve, principalmente, ao fato de que o vírus serem parasitas intracelulares obrigatórios, devendo o antiviral interferir apenas nos processos metabólicos do vírus e não causar toxicidade à célula hospedeira. De acordo com Pereira (2012), a seletividade que agentes antivirais devem apresentar é uma das principais barreiras no desenvolvimento de novos medicamentos antivirais. Dentre as moléculas que têm apresentado tal seletividade em estudos realizados, pode-se citar os Líquidos Iônicos.

Esses compostos formam uma classe cuja potencial atividade antimicrobiana tem os tornados candidatos atrativos como novos biocidas. Nos últimos quinze anos, diversos estudos têm sido publicados sobre o potencial biológico de líquidos iônicos, porém, de acordo com Egorova e Ananikov (2018), muito pouco tem se sido publicado acerca de sua atividade antiviral. Na verdade, de acordo com as mesmas autoras, menos de 1% das pesquisas divulgadas entre 2017 e 2018 sobre estes compostos, abordam sua atividade antiviral. Assim, é de grande interesse que pesquisas sobre a atividade antiviral de líquidos iônicos sejam feitas.

Tendo em vista o contexto apresentado, o objetivo desta pesquisa foi investigar o potencial citotóxico do líquido iônico (BTAC₁)₂ImCl frente a linhagem celular Vero e empregar as concentrações de menor citotoxicidade em teste de atividade antiviral frente ao Zika vírus.

2 METODOLOGIA

2.1 Cultivo das células

A linhagem celular Vero, permissiva ao ZIKV, foi obtida pelo Laboratório de Citotoxicidade da Universidade Feevale a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Para cultivo, as células foram incubadas em frasco estéril de poliestireno de 25 cm² contendo o meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) de baixa glicose, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). O frasco foi incubado em estufa à 37°C, umidificada e com 5% de CO₂ (atmosfera padrão).

O meio de cultura foi substituído a cada três ou quatro dias, de acordo com a confluência da monocamada celular e os subcultivos realizados. Os subcultivos da célula, se caracterizam pela remoção da monocamada celular quando ela completava confluência, a fim de manter o cultivo celular. A remoção do tapete celular foi feita pela tripsinização, processo que consiste na remoção do meio de cultivo do frasco e adição da enzima Tripsina, uma enzima que hidrolisa cadeias polipeptídicas, e através disso, promove a desagregação celular (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Após a adição da enzima e desagregação do tapete celular, as células foram adicionadas em um tubo de fundo cônico contendo o dobro de meio em relação a quantidade de tripsina que foi adicionada e centrifugadas a 1000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuspenso em meio de cultivo. Então, a fração da suspensão necessária para manutenção do cultivo foi transferida de volta para o frasco de cultivo, contendo quantidade suficiente de meio.

2.2 Plaqueamento

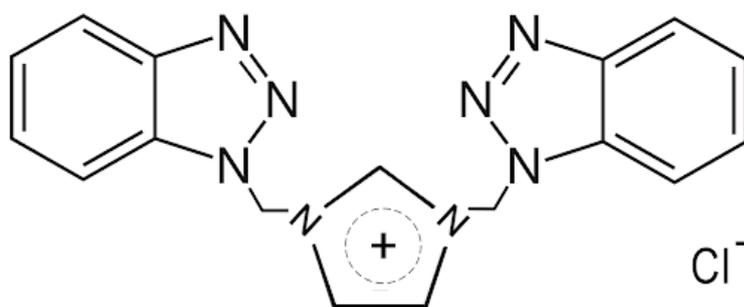
Para desenvolvimento dos testes foi necessário realizar o plaqueamento das células. Estas foram tripsinizadas de acordo com a metodologia padrão de tripsinização e contadas em uma câmara de Neubauer. Após contagem das células e cálculo das quantidades necessárias para os testes, tendo em vista a densidade celular utilizada em cada teste, a ressuspenso celular foi transferida para um tubo de fundo cônico, juntamente com meio DMEM puro, em quantidade necessária para atingir o volume dos poços da placa. A mistura foi homogeneizada, e com auxílio de micropipetador automático, as células foram transferidas para os poços da placa.

Para os dois ensaios de citotoxicidade foram utilizadas uma densidade celular de 1 x 10⁵ células por poço, sendo que foram preparadas duas placas de 96 poços cada, uma para cada um, dos dois ensaios. Para o teste de atividade antiviral, foi utilizada uma densidade celular de 2 x 10⁵ por poço, sendo que foi preparada uma placa de 24 poços. As placas foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera padrão por 24h antes da realização dos ensaios, para ocorrer a adesão das células aos poços e formação de uma monocamada celular.

2.3 Diluições do líquido iônico

A estrutura molecular do líquido iônico testado nesta pesquisa, de sigla (BTAC₁)₂ImCl, está representada na Figura 1. A molécula foi sintetizada no Laboratório de Processos Tecnológicos e Catálise da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo que o cátion imidazólico foi escolhido tendo em vista que possui atividades biológicas relatadas na bibliografia e, dentre estas, a atividade antiviral (THOMÉ, 2015; ZANCHETTI, 2018; SOMMER *et al*, 2018); o ânion cloreto foi escolhido tendo em vista sua baixa toxicidade quando comparado à outros ânions inorgânicos (THOMÉ, 2015) e o substituinte benzotriazol foi escolhido pois é altamente hidrossolúvel, o que diminui a citotoxicidade da molécula (BRIGUGLIO *et al*, 2015).

Figura 1. Cloreto de 1,3-dimetil-benzotriazol-imidazol.



Para os testes de citotoxicidade foi adicionado, em tubo de fundo cônico, o volume necessário do meio DMEM puro para a concentração mais alta a ser testada (1000 μM) e sobre o meio foi adicionado o volume adequado de líquido iônico, partindo do LI concentrado, previamente preparado, na concentração de 125 mM μM . Após a homogeneização da maior concentração prosseguiu-se com a diluição seriada 1:2, que resultou nas concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 μM .

Para o teste de atividade antiviral, após preparar todas as diluições seriadas 1:2, foi adicionado sobre os tubos de fundo cônico um volume do espessante carboximetilcelulose (CMC) a fim de dobrar o volume, resultando nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,6 μM .

2.4 Avaliação citotóxica

2.4.1 Exposição das células ao líquido iônico

Após 24h da realização do plaqueamento, as células atingiram a confluência necessária para os ensaios de citotoxicidade. Para exposição das células ao líquido iônico em diferentes concentrações, o meio de cultivo foi retirado dos poços e sobre as culturas de células foram adicionados 200 μL das concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 μM do LI, sendo que todas as concentrações foram avaliadas em quintuplicatas. Para os controles, tanto positivo, quanto negativo, ao invés da adição da diluição do LI, foram adicionados 200 μL do meio DMEM puro. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera padrão. O período de incubação foi de 72h, tendo em vista que esse é o tempo necessário para a posterior realização do teste de atividade antiviral, pois é o tempo de replicação do ZIKV. Sobre o controle positivo, após 71h de incubação, foram adicionados 10 μL com peróxido de hidrogênio 1% e a placa foi incubada novamente por mais 1h.

2.4.2 Ensaio MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

O ensaio redução do sal MTT é um ensaio utilizado para avaliar a atividade mitocondrial das células e baseia-se no fato de que as enzimas desidrogenase mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, são capazes de reduzir o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), um sal amarelo e solúvel em água, a formazan, um pigmento roxo e insolúvel em água, que se acumula nas células e pode, posteriormente, ser dissolvido em solvente adequado, como o dimetilsulfóxido (DMSO), e quantificado por espectrofotometria. Assim, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular (Pedrosa, 2011). O ensaio foi executado de acordo com a metodologia descrita por Mosmann (1983).

Para realização do teste, após 72h de exposição destas às diferentes concentrações do sal, o sobrenadante foi removido dos poços e adicionou-se a cada poço 200 µL de solução de DMEM puro com 4% de MTT 5 mg/mL, ao abrigo da luz pois o MTT é fotossensível. Após 2h de incubação a 37°C em atmosfera padrão, o meio foi substituído por 200 µL de DMSO. As amostras foram homogeneizadas utilizando micropipeta multicanal e o conteúdo da placa foi transferido para microplaca de leitura. Para o branco do teste foi utilizado 100 µL de DMSO. Por fim, a leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca M3 (Molecular Devices®) em 570 nm.

2.4.3 Ensaio Sulforrodamina B

O ensaio de Sulforrodamina B é um ensaio utilizado para medir a densidade celular, baseado na quantidade de proteínas celulares pela coloração destas com o corante Sulforrodamina B (SRB), um corante rosa que, em meio moderadamente ácido, se liga na porção básica dos aminoácidos e se dissocia dos mesmos em meio básico, possibilitando a quantificação do conteúdo proteico através de espectrofotometria (THOMÉ, 2015). Assim, a quantidade de corante extraído é diretamente proporcional ao número de células viáveis. O ensaio foi executado de acordo com a metodologia descrita por Skehan *et al* (1990).

Para realização do teste, após 72h de exposição das células às diferentes concentrações do sal, o meio foi removido com auxílio de micropipeta multicanal e a placa foi lavada três vezes com 100 µL de solução tampão fosfato-salino (PBS) por poço. Em seguida, foram adicionados 50 µL de solução de ácido tricloroacético 10% (TCA) por poço, com o objetivo de desnaturar as proteínas presentes, e a placa foi incubada em geladeira a 4°C, para precipitar e gerar a adesão das proteínas à placa.

Após 1h de incubação o TCA 10% foi descartado, a placa foi lavada cinco vezes com 100 µL de água ultrapura (miliQ) por poço e incubada em geladeira a 4°C. Após o período, 50 µL de solução de SRB 0,4% foram adicionados em cada um dos poços e a placa foi incubada a 21°C, a fim de corar as proteínas precipitadas e fixadas na etapa anterior. Após 30 min de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas quatro vezes com 100 µL de solução de ácido acético 1%, com o objetivo de retirar o excesso de SRB que não havia se ligado às proteínas. Em seguida, a placa permaneceu durante 5 min em temperatura ambiente, a fim de secá-la. Então, sobre os poços foram adicionados 100 µL de tampão Tris pH 10,5 e a placa foi colocada em um agitador de placas durante 5 min em velocidade de 5 RPM, com o intuito de extrair o corante ligado aos aminoácidos na etapa de coloração com SRB. Para o branco do teste foi utilizado 100 µL de tampão Tris pH 10,5. Por fim, o sobrenadante foi transferido para microplaca de leitura e lido em espectrofotômetro de microplaca M3 (Molecular Devices®) em 564 nm.

2.4.4 Análise estatística

Considerando a normalidade das variáveis analisadas, a análise estatística foi realizada pelo método de análise de variância (ANOVA) de uma via, que visa fundamentalmente verificar-se existe diferença significativa entre as médias das absorvâncias das diferentes concentrações testadas e se os fatores exercem influência em alguma variável dependente, seguida do pós-teste de Tukey. Se o teste realizado na ANOVA é significativo, a única certeza é de que existe, no mínimo, um par de médias diferente, mas não se sabe quantas e quais. Para se determinar quais os pares de médias diferentes após a realização da ANOVA, foi realizado o que se denomina pós-teste de Tukey, que permite comparar médias, duas a duas.

O resultado é considerado significativo quando $p < 0,05$. Os resultados são expressos como porcentagem do controle negativo \pm desvio padrão, sendo as células controle consideradas como 100% viáveis, e representam o perfil de resposta de dois experimentos individuais realizados em quintuplicatas. A partir destes dados foi possível se verificar o perfil de citotoxicidade do composto (BTAC₁)₂ImCl frente à linhagem celular Vero, após 72h de incubação.

2.5 Avaliação da atividade antiviral - ensaio de redução de placas de lise

A atividade antiviral do líquido iônico (BTAC₁)₂ImCl frente ao ZIKV foi avaliada a partir do ensaio de redução do número de placas de lise, conforme a metodologia descrita por Burleson *et al* (1992). Este ensaio é utilizado para quantificar o número de focos virais (placas de lise) formados em uma monocamada celular previamente exposta à uma quantidade conhecida de vírus e incubada junto à diferentes concentrações do sal.

O método baseia-se no fato de que, ao invadir as células e replicarem-se, os vírus causam efeitos morfológicos à estas, podendo levar à morte celular. Ao usar-se um agente espessante sobre a monocamada celular em ataque, como o CMC, porém a área afetada pelo vírus é limitada, formando-se focos de ação viral na monocamada, que podem ser posteriormente visualizados e quantificados através de coloração da monocamada com corante adequado. Assim, a atividade antiviral é verificada através da diminuição do número de focos de ação viral na monocamada quando exposta à diferentes concentrações do composto, em comparação com o controle viral, onde o vírus ataca as células sem ação de nenhum tratamento, e é expressa em % de inibição de atividade viral frente ao controle viral.

2.5.1 Diluição do ZIKV

O ZIKV utilizado nesta pesquisa foi o MR766, de cepa africana. A suspensão previamente titulada do vírus foi conservada congelada em ultrafreezer a -80°C , na concentração de $6,8 \times 10^5$ Unidades Formadoras de Placa (UFP)/mL. Para desenvolver o teste de atividade antiviral foi necessário diluir a solução de ZIKV até a concentração de 100 UFP/poço, a fim de facilitar, ao final, a contagem dos focos virais. Assim, instantes antes da realização da inoculação do vírus na placa, foi adicionado em um tubo de fundo cônico, o volume necessário do meio DMEM puro para a diluição e sobre o meio foi adicionado o volume adequado de estoque viral. O meio foi homogeneizado e mantido em geladeira.

2.5.2 Exposição das células ao vírus e ao líquido iônico

Após 24h da realização do plaqueamento, as células atingiram a confluência necessária para o teste. Para exposição das células ao vírus previamente diluído, na concentração de 100 UFP por poço, o meio de cultivo foi retirado dos poços e estes foram lavados com 400 μL de solução salina livre de cálcio e magnésio (CMF), a fim de retirar compostos excretados pelas células durante a etapa de adesão. Após a remoção do CMF, sobre as culturas de células, foram adicionados 400 μL da diluição viral preparada anteriormente.

Para o controle viral do teste, composto apenas de células Vero expostas ao vírus sem nenhum tratamento, foram adicionados 400 µL de diluição viral e, para o controle celular do teste, composto por células Vero expostas ao meio de cultivo padrão, foram adicionados 400 µL de meio DMEM puro. Em seguida, a placa foi incubada a 37°C em atmosfera padrão durante o período de 1h, com o intuito de ocorrer a adesão do vírus às células. A cada 15 min a placa foi agitada a fim de se facilitar a etapa de adesão.

Após 1h de exposição das células ao ZIKV, o sobrenadante foi removido dos poços e estes foram lavados novamente, com 400 µL de CMF. Em seguida, foram adicionados, sobre cada poço, 500 µL da solução do líquido iônico nas concentrações 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,6 µM a 50% do espessante CMC, sendo que todas concentrações foram realizadas em triplicata. Sobre o controle viral e celular foram adicionados 500 µL do meio DMEM a 50% do espessante CMC. A placa foi incubada a 37°C em atmosfera padrão durante o período de 72h, que é o tempo de replicação do ZIKV.

2.5.3 Coloração e contagem do número de placas de lise

Para visualizar as placas de lise formadas pelo vírus após seu período de replicação, a placa foi retirada da estufa, o sobrenadante foi removido dos poços e foram adicionados 500 µL do corante cristal violeta 4 g/L sobre as monocamadas celulares, para melhor visualização dos focos virais. Em seguida, a placa foi mantida em agitador de placas a 5 RPM durante 30 min. Após o tempo de agitação, o corante foi removido dos poços e a placa foi mantida em temperatura ambiente durante cerca de 48h para secagem e posterior contagem do número de focos virais presente em cada um dos poços, com auxílio de contador de colônias.

2.5.4 Análise dos resultados de atividade antiviral

Para análise dos resultados do ensaio de redução do número de placas de lise, o número médio de focos virais de cada concentração foi relacionado com o número de focos virais do controle viral do teste, de acordo com a fórmula abaixo, e assim obteve-se a % de inibição de atividade viral frente ao controle viral de cada uma das concentrações testadas.

Núm. focos virais do controle viral ----- 100% de atividade viral

Núm. focos virais da conc. testada ----- X% de atividade viral

$100\% - X\% = \%$ de inibição de atividade viral

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Análise citotóxica

A análise citotóxica teve como objetivo verificar o comportamento da linhagem celular Vero quando exposta à diferentes concentrações do composto (BTAC₁)₂ImCl.

Na tabela 1, estão apresentados os resultados do ensaio MTT, expressos como valores percentuais em relação ao cultivo controle (100% de atividade mitocondrial) após exposição de 72h das diferentes concentrações do composto em linhagem celular Vero.

Tabela 1. Atividade mitocondrial após 72h de exposição

Concentrações (μM)	Atividade Mitocondrial
Controle negativo	100%
Controle positivo	5,61%
1000	83,64%
500	87,68%
250	95,15%
125	92,11%
62,5	94,70%
31,25	89,51%

Através dos dados da tabela pode-se perceber que com o aumento da concentração do LI, houve uma sutil diminuição da atividade mitocondrial da linhagem celular, que se tornou mais acentuada na concentração de 1000 μM . Na concentração de 31,25 μM houve uma sutil queda desta atividade mitocondrial, porém esta não foi estatisticamente significativa conforme foi verificado, posteriormente, em análise própria.

Na tabela 2, estão apresentados os resultados do ensaio Sulforrodamina B, expressos como valores percentuais em relação ao cultivo controle (100% de conteúdo proteico) após exposição de 72h das diferentes concentrações do composto em linhagem celular Vero.

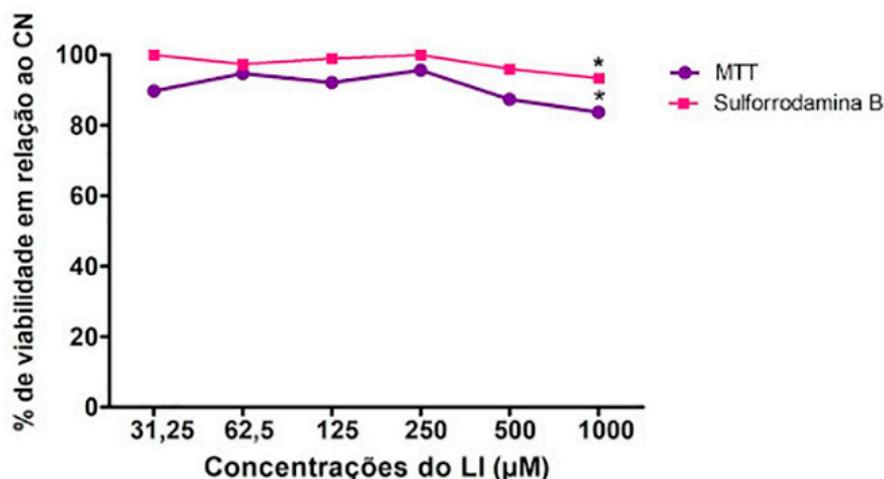
Tabela 2. Conteúdo proteico após 72h de exposição

Concentrações (μM)	Conteúdo proteico
Controle negativo	100%
Controle positivo	18,87%
1000	93,37%
500	96,01%
250	99,99%
125	98,95%
62,5	97,32%
31,25	99,99%

Através dos dados da tabela pode-se perceber que, com o aumento da concentração do LI, houve uma sutil diminuição do conteúdo proteico que se tornou mais acentuada na concentração de 1000 μM .

Para melhor esclarecimento dos resultados obtidos, foi realizada a análise estatística destes através do método ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. Na figura 2, está representado o gráfico gerado com a análise estatística, que demonstra o perfil de citotoxicidade dos dois ensaios realizados.

Figura 2. Alterações da atividade mitocondrial e do conteúdo proteico causado por $(\text{BTAC}_1)_2\text{ImCl}$ em células Vero após 72h de exposição.



Legenda: *Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p \leq 0,05$), ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey.

Com a análise estatística foi possível verificar que, em ambos os testes realizados, a única concentração que se demonstrou estatisticamente diferente do controle negativo, composto por células incubadas somente com meio de cultivo padrão que não sofreram nenhum tipo de tratamento, foi a de 1000 μM , sendo a concentração mais alta testada. Ainda assim, tal atividade tóxica pode ser considerada irrelevante, tendo em vista seu baixo valor. As demais concentrações não mostraram diferença significativa do controle negativo, portanto são consideradas não citotóxicas.

Líquido iônicos de acordo com a bibliografia, tem sua toxicidade relacionada a sua cadeia substituinte. Ranke *et al* (2007), em trabalho sobre efeitos biológicos de sais imidazólicos com diferentes comprimentos de cadeia substituinte em células em cultura, verificou que a toxicidade aumentou proporcionalmente ao aumento de cadeia lateral do substituinte dos sais. Sheldon (2001) afirma que, líquidos iônicos com maior tamanho de cadeia alquílica possuem mais características lipofílicas, tendo maior afinidade pela membrana plasmática de células e tornando-os mais tóxicos, pois aumentam a permeabilidade da membrana plasmática. Desse modo, a baixa citotoxicidade apresentada pela molécula testada nesta pesquisa se deve, provavelmente, ao fato de os dois substituintes benzotriazol presentes na molécula de $(\text{BTAC}_1)_2\text{ImCl}$ conferirem maior hidrossolubilidade a ela, o que diminui sua citotoxicidade (BRIGUGLIO *et al*, 2015). A maior hidrossolubilidade proveniente do grupamento se deve ao fato de que através de seus átomos de nitrogênio, o substituinte pode realizar ligações de hidrogênio com a molécula de água, tendo maior afinidade pela molécula.

3.2 Análise da atividade antiviral

A análise da atividade antiviral teve como objetivo verificar o comportamento do ZIKV frente às diferentes concentrações do LI que não se mostraram estatisticamente diferentes do controle negativo após o desenvolvimento dos ensaios de citotoxicidade.

Na tabela 3, estão apresentados os resultados do ensaio de atividade antiviral, expressos como média do número de focos formados pelo ZIKV em cada uma das concentrações do LI após 72h de exposição.

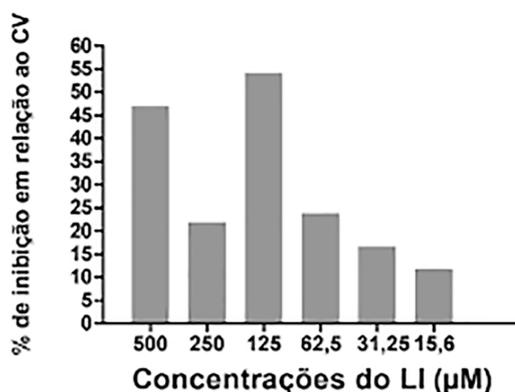
Tabela 3. Média do número de focos virais

Concentrações (µM)	Média do número de focos
Controle celular	0,0
Controle viral	98,56
500	52,25
250	75,55
125	45,13
62,5	74,33
31,25	83,11
15,6	87,00

Através da análise, pode-se perceber que todas as concentrações de (BTAC₁)₂ImCl testadas diminuíram o número de focos virais em comparação com o controle viral, que foi exposto somente ao vírus e que não sofreu nenhum tipo de tratamento. De todas as concentrações, a de 125 µM foi a que demonstrou a menor média do número de focos. Para melhor esclarecimento dos resultados obtidos, foi realizado o cálculo do % de redução da atividade viral de cada concentração. O gráfico da Figura 3 foi elaborado após o cálculo.

Figura 3. Ensaio de redução do número de placas de lise.

Ensaio de redução do número de placas de lise



Com a análise dos resultados foi possível observar que as concentrações de 500 e de 125 µM foram as que mais apresentaram capacidade de reduzir a ação do Zika vírus, sendo elas de, respectivamente, 44,41% e 54,34%. De acordo com a bibliografia, a atividade antiviral de líquidos iônicos ainda não está totalmente elucidada. Dentre os poucos estudos publicados acerca da atividade antiviral de líquidos iônicos, destaca-se o estudo de Sommer *et al* (2018), que verificou que um vírus envelopado testado mostrou maior sensibilidade aos líquidos iônicos, provavelmente, devido à alta lipossolubilidade apresentada pelas cadeias laterais testadas. Em contrapartida, as moléculas hidrossolúveis, como a molécula testada nesta pesquisa, dificultam a lise celular e a liberação vírica (WU *et al*, 2018; LEUNG *et al*, 2011). Assim, a capacidade de reduzir a ação viral apresentada pelas concentrações de (BTAC₁)₂ImCl se deve, provavelmente, ao fato destas concentrações inibirem a saída do vírus da célula, impedindo sua proliferação (PEREIRA, 2012). Ainda assim, novos estudos são necessários para comprovar o mecanismo de ação da molécula testada.

4 CONCLUSÃO

A partir dos ensaios realizados nesta pesquisa, foi possível verificar que o composto cloreto de 1,3-dimetil-benzotriazol-imidazol apresentou menos de 10% de toxicidade somente na maior concentração testada (1000 μM) enquanto que, nas demais concentrações, o composto não se mostrou citotóxico, podendo ser caracterizado como biocompatível nestas concentrações. Em contrapartida, o composto apresentou capacidade de reduzir o número de focos virais em todas as concentrações testadas, sendo que a maior porcentagem de redução da atividade viral, até o momento, foi de 54%, exercida pela concentração de 125 μM . Desse modo, conclui-se que os objetivos da pesquisa foram atingidos.

O fato de vírus serem parasitas intracelulares obrigatórios e de que é relativamente difícil atingi-los sem danificar a célula hospedeira é uma das maiores limitações para o desenvolvimento de antivirais atualmente. Desta forma, os resultados obtidos com a pesquisa podem ser considerados promissores e servirem de referência para futuros estudos na área.

A continuação da pesquisa se dará na realização de um novo teste de avaliação da atividade antiviral, com o LI nas concentrações de 80; 100; 125; 150; 250 e 500 μM , a fim de investigar profundamente a capacidade da molécula de reduzir a proliferação do vírus em concentrações próximas da faixa entre 125 e 500 μM . Além disso, pretende-se realizar novos testes de citotoxicidade, através da metodologia de incorporação do corante Vermelho Neutro, e realização de novo teste de avaliação da atividade antiviral, através da metodologia *Tissue Culture Infective Dose* (TCID).

Tendo em vista a ampla quantidade de combinações cátion-ânion possíveis na síntese de líquidos iônicos, no futuro, os dados gerados com as pesquisas podem fornecer informações e auxiliar na síntese de novos protótipos, através de alterações estruturais e o planejamento através de bioinformática. Além disso, é interessante que a possível atividade antiviral da molécula testada na presente pesquisa seja avaliada frente a outros *Flavivírus* de preocupação mundial, como o vírus da febre amarela e o vírus da dengue.

REFERÊNCIAS

- BRIGUGLIO, I. *et al.* Benzotriazole: An overview on its versatile biological behavior. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 612 - 648, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523414009179>>. Acesso em: 08 jun. 2019.
- BURLESON, F.G.; CHAMBERS, T.M.; WIEDBRAUK, D.L. **Virology: a laboratory manual**. San Diego: Academic Press, 1992. 250p
- CENTERS for Disease Control and Prevention. **Zika vírus**. 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/about/index.html>>. Acesso em: 06 fev 2019.
- CLERCQ, Erik de. LI, Guangdi. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n° 3, p. 695. 2016. Disponível em: <<https://cmr.asm.org/content/cmr/29/3/695.full.pdf>>. Acesso em: 06 mar. 2019.
- EGOROVA, Ksenia S.; ANANIKOV, Valentine P. Fundamental importance of ionic interactions in the liquid phase: A review of recent studies of ionic liquids in biomedical and pharmaceutical applications. **Journal of Molecular Liquids**, v. 272. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167732218335499>>. Acesso em: 11 fev. 2019.
- GLOBAL Virus Network. **Frequently asked questions related to Zika virus**. 2016. Disponível em <<https://gvn.org/programs/zika-virus-task-force/faq-zika/>>. Acesso em: 06 fev. 2019.

GUIMARÃES; Anna *et al.* **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. v. 2. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010.

LEUNG, Jason Yat-Sing; NG, Mary Mah-Lee; CHU, Justin Jang Hann. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. **Advances in virology**, v. 2011, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22312336>>. Acesso em: 15 jul 2019. Geneva

MARTINS, Rhubia Silveira. **Desenvolvimento de ensaios in vitro para prospecção e avaliação de compostos com atividade citoprotetora ou inibitória do vírus zika**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/332113/1/Martins_RhubiaSilveira_M.pdf>. Acesso em: 27 abr. 2019.

MINER, Jonathan J.; DIAMOND, Michael S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host and Microbe**, v. 21, 134 - 142. 2017. Disponível em: <<https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/...>>. Acesso em: 27 maio 2019.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63,1983. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0022175983903034>>. Acesso em: 02 fev. 2019.

WHO Research and Development Blueprint. **Annual review of diseases prioritized under the Research and Development Blueprint**. Geneva, 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/2018prioritization-report.pdf?ua=1>>. Acesso em: 07 fev. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Situation report: Zika virus, microcephaly, Guillain-Barré Syndrome**. 2017. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254714/...>>. Acesso em: 28 maio 2019.

PEDROSA, Rozangela Curi. **Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT**. Disponível em:<<https://bit.ly/30AWS19>>. Acesso em: 23 maio 2019.

PEREIRA, Sofia Luzia Gonçalves. **Moléculas – Que futuro?**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto. Disponível em: <<https://core.ac.uk/download/pdf/61014972.pdf>>. Acesso em: 28 maio 2019.

RANKE, J. *et al.* Lipophilicity parameters for ionic liquids cations and their correlation to in vitro cytotoxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, n. 3, p. 430 - 438, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651306001795>>. Acesso em 09 mai. 2020.

SHELDON, R. Catalytic reactions in ionic liquids. **Chem. Commun**, v. 23, p. 2399–2407, 2001. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/ko/content/articlelanding/2001/cc/b107270f/unauth#!divAbstract>>. Acesso em: 09 mai. 2020.

SKEHAN, P. *et al.* New colorimetric assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jnci/article-abstract/82/13/1107/970741>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

SOMMER, Julia *et al.* Virucidal or Not Virucidal? That Is the Question—Predictability of Ionic Liquid's Virucidal Potential in Biological Test Systems. **International journal of molecular sciences**, v. 19, 2018. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5877651/>>. Acesso em: 06 fev 2019.

THOMÉ, Chairini Cássia. **Avaliação da atividade antitumoral de líquidos iônicos imidazólicos em linhagens de glioblastoma humano e glioma de rato**. 2015. Dissertação (Bacharelado em Medicina) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/...>>. Acesso em: 15 jun. 2019.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CHRISTINE, L. CASE. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

WU, Shuanggen *et al.* Assessment of the cytotoxicity of ionic liquids on *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf-9) cell lines via *in vitro* assays. **Journal of Hazardous Materials**, v. 348, p. 1-9, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304389418300281?via%3Dihub>>. Acesso em: 15 jul. 2019.

ZANCHETTI, Joana de Conto. Síntese de novos sais imidazólicos com potencial atividade antiviral frente aos vírus Mayaro e Zika. In: **Anais do Salão UFRGS 2018: XXX Salão de Iniciação Científica da UFRGS - SIC**. Porto Alegre: UFRGS. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/191518>>. Acesso em: 31 maio 2019.

Giovanna Dutra Kaminski é aluna do curso técnico de Química da Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha, em Novo Hamburgo - RS. Atualmente, é estagiária na indústria química e busca aprovação no curso de engenharia química.

Matheus Daniel Faleiro é aluno do curso técnico de Química da Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha, em Novo Hamburgo - RS. Atualmente, é estagiário na indústria química e busca aprovação no curso de medicina.

Maria Angélica Thiele Fracassi é Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Atualmente, é agente educacional no curso técnico de Química da Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha, em Novo Hamburgo - RS.

Henri Stephan Schrekker é doutor em Química Industrial pela Vrije Universiteit Amsterdam - Holanda/ Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie - Alemanha. Atualmente, é professor Associado III no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ana Luiza Ziulkoski é doutora em Ciências Biológicas - Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Atualmente, é professora titular na Universidade Feevale, em Novo Hamburgo - RS.

Essa pesquisa foi desenvolvida na Universidade Feevale - Campus II, em parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e apoiado financeiramente pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. Os alunos que desenvolveram a pesquisa são provenientes do Curso Técnico de Química integrado ao ensino médio da Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha.

Contribuição de autoria. Giovanna Dutra Kaminski, Matheus Daniel Faleiro: concepção, coleta de dados e análise de dados, elaboração do manuscrito, redação. Maria Angélica Thiele Fracassi, Henri Stephan Schrekker, Ana Luiza Ziulkoski: orientação, redação e revisão do manuscrito.



COMO CITAR ESSE ARTIGO (ABNT NBR 60230):

KAMINSKI, G. D.; FALEIRO, M. D.; FRACASSI, M. A. T.; SCHREKKER, H. S.; ZIULOSKI, A. L.. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de um líquido iônico e de sua atividade antiviral frente ao Zika vírus. **Scientia Prima**, v. 6, n.1, p. 34-47, maio 2020.