



UFOP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

ESCOLA DE FARMÁCIA



LUIZA PEREIRA CUNHA

**INVESTIGAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO FULEROL EM
MODELOS IN VITRO DE INFECÇÃO POR ORTHOFLAVIVIRUS ZIKAENSE
(ZIKV) E ALPHAVIRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV)**

OURO PRETO

2026

LUIZA PEREIRA CUNHA

**INVESTIGAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO FULEROL EM
MODELOS IN VITRO DE INFECÇÃO POR ORTHOFLAVIVIRUS ZIKAENSE
(ZIKV) E ALPHAVIRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV)**

Monografia apresentada ao Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como parte das exigências para conclusão do Curso de Bacharelado em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Breno de Mello Silva

Coorientador: Wellington Carvalho Malta

OURO PRETO

2026



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

Luiza Pereira Cunha

**INVESTIGAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO FULEROL EM INFECÇÕES POR ORTHOFLAVIVIRUS
ZIKAENSE (ZIKV) E ALPHAVIRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV)**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal
de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutica Generalista

Aprovada em 31 de julho de 2026

Membros da banca

Dr - Breno de Mello Silva - Orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)
Msc - Wellington Carvalho Malta - Co-orientador (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dr - Pedro Alves Machado Junior - Avaliador (Universidade Federal de Ouro Preto)
Dr - Orlando David dos Santos - Avaliador (Universidade Federal de Ouro Preto)

Breno de Mello Silva, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de
Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 26/08/2026



Documento assinado eletronicamente por **Breno de Mello Silva, PROFESSOR DE MAGISTERIO
SUPERIOR**, em 26/08/2026, às 21:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art.
6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
[http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)
[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0) , informando o código verificador **1176583** e
o código CRC **D17D1AA5**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e à Escola de Farmácia pela formação acadêmica e humana proporcionada ao longo da graduação. O compromisso da instituição com a excelência no ensino, na pesquisa e na extensão foi determinante para meu crescimento profissional e pessoal, oferecendo um ambiente estimulante, infraestrutura adequada e inúmeras oportunidades de aprendizado e desenvolvimento científico.

Expresso meu reconhecimento às agências de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo incentivo à pesquisa científica e pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho, contribuindo para o fortalecimento da ciência e da formação de novos pesquisadores.

Ao Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos (LBTM), deixo meu sincero agradecimento pelo acolhimento, pela infraestrutura disponibilizada e pela convivência enriquecedora. O ambiente colaborativo, aliado às constantes discussões científicas e à troca de conhecimentos, teve papel essencial na execução deste estudo e no meu desenvolvimento como pesquisadora.

Ao meu coorientador, Wellington Carvalho Malta, agradeço pela disponibilidade, paciência, incentivo e pelas valiosas contribuições ao longo de todas as etapas deste estudo. Seu acompanhamento e apoio foram indispensáveis para o aprimoramento da pesquisa e para meu crescimento profissional.

À minha família, meu porto seguro e maior fonte de inspiração, dedico um agradecimento especial. Aos meus pais, Rogério e Luciene, por todo o amor, cuidado, dedicação e pelos inúmeros esforços realizados para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Obrigada por acreditarem em mim, por me incentivarem nos momentos difíceis e por celebrarem cada conquista ao meu lado. Aos meus irmãos, Gabriel e Maria Clara, agradeço pelo carinho, companheirismo, incentivo e por estarem sempre presentes. Esta conquista também pertence a vocês.

Aos amigos que a graduação me presenteou — Ana Carolina, Amanda, Carlos, Karol e Vitória — agradeço pela amizade, parceria, incentivo e por todos os momentos compartilhados. As conversas, as risadas, o apoio mútuo e a convivência diária tornaram essa etapa muito mais leve e inesquecível.

Por fim, agradeço ao Programa de Educação Tutorial da Farmácia (PET Farmácia), do qual tive o privilégio de fazer parte. As experiências vivenciadas ao longo dessa trajetória foram essenciais para ampliar minha formação para além da sala de aula, proporcionando crescimento acadêmico, profissional e pessoal. O PET contribuiu significativamente para o desenvolvimento da liderança, do trabalho em equipe, da responsabilidade e do pensamento crítico, desempenhando um papel marcante na construção da profissional que sou hoje.

*"Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo para o sucesso é
tentar mais uma vez."*

— Thomas A. Edison

RESUMO

O *Alphavirus chikungunya* (CHIKV) e o *Orthoflavivirus zikaense* (ZIKV) são arbovírus de grande relevância para a saúde pública mundial. A ausência de terapias antivirais específicas reforça a busca por novas abordagens terapêuticas. Nesse contexto, a infecção por esses vírus induz o estresse oxidativo — caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade de neutralização pelos sistemas antioxidantes celulares, resultando em alterações da sinalização redox e potenciais danos moleculares —, o que torna esse processo um alvo promissor para intervenção. O presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante do fullerol, um nanomaterial carbonáceo com elevada capacidade de sequestro de EROs, em modelo in vitro de infecção por ZIKV e CHIKV. Para isso, células da linhagem VERO foram submetidas à infecção viral (MOI 1,0 para CHIKV e MOI 0,1 para ZIKV) durante um período total de 6 horas, sob tratamento com fullerol na concentração não citotóxica de 3,125 nM em seis diferentes regimes de administração: controle celular (sem infecção/sem tratamento), controle viral (infectado/sem tratamento) e regimes de tratamento durante a infecção em dose única (T0), doses duplas (T0 e T6), doses triplas (T0, T3 e T6) e aplicações contínuas a cada hora (T0 a T6). A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT e a produção intracelular de EROs foi mensurada utilizando a sonda fluorescente Carboxy-H2DCFDA. Os resultados demonstraram que a infecção por CHIKV promoveu um aumento de aproximadamente 30% na produção de EROs em relação ao controle celular, enquanto o ZIKV induziu um aumento de cerca de 13%. O tratamento com fullerol reduziu significativamente os níveis de EROs em ambos os modelos virais. Para o CHIKV, o regime de aplicações contínuas/recorrentes (T0 a T6) apresentou maior eficácia na redução das EROs quando comparado à dose única (T0). Para o ZIKV, embora todos os protocolos de administração tenham reduzido as EROs significativamente, não houve diferença estatística entre a aplicação única e as doses múltiplas. Conclui-se que o fullerol possui relevante atividade antioxidante em modelos de infecção por ZIKV e CHIKV, mitigando o aumento das EROs induzido pelas arboviroses, e que a dinâmica da resposta antioxidante varia de acordo com o vírus e o regime de administração testado.

Palavras-chave: Fullerol, Espécies reativas de oxigênio, *Orthoflavivirus zikaense*, *Alphavirus chikungunya*.

ABSTRACT

Alphavirus chikungunya (CHIKV) and *Orthoflavivirus zikaense* (ZIKV) are arboviruses of major global public health concern. The absence of specific antiviral therapies highlights the need for novel therapeutic approaches. In this context, infection by these viruses induces oxidative stress—characterized by an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the capacity of cellular antioxidant systems to neutralize them, leading to altered redox signaling and potential molecular damage—making this process a promising target for intervention. This study aimed to evaluate the antioxidant capacity of fullerol, a carbonaceous nanomaterial with high ROS-scavenging capability, in an *in vitro* model of ZIKV and CHIKV infection. For this purpose, VERO cells were subjected to viral infection (MOI 1.0 for CHIKV and MOI 0.1 for ZIKV) over a total period of 6 hours, treated with fullerol at a non-cytotoxic concentration of 3.125 nM under six different administration regimens: cellular control (uninfected/untreated), viral control (infected/untreated), and treatment regimens during infection consisting of a single dose (T0), double doses (T0 and T6), triple doses (T0, T3, and T6), and continuous hourly applications (T0 to T6). Cell viability was evaluated by the MTT assay, and intracellular ROS production was measured using the fluorescent probe Carboxy-H2DCFDA. The results demonstrated that CHIKV infection induced an increase of approximately 30% in ROS production relative to the cellular control, whereas ZIKV induced an increase of about 13%. Fullerol treatment significantly reduced ROS levels in both viral models. For CHIKV, the continuous/recurrent application regime (T0 to T6) showed greater efficacy in reducing oxidative stress compared to the single dose (T0). For ZIKV, although all treatment regimens significantly reduced ROS levels, no statistically significant difference was observed between single and multiple doses. In conclusion, fullerol exhibits relevant antioxidant activity in *in vitro* models of ZIKV and CHIKV infection, mitigating the virus-induced increase in ROS, with the dynamics of the antioxidant response varying depending on the virus and the administration regime tested.

Keywords: Fullerol. Oxidative stress. Reactive oxygen species. *Orthoflavivirus zikaense*. *Alphavirus chikungunya*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura e organização genômica do ZIKV.....	18
Figura 2 - Estrutura e organização genômica do CHIKV.....	21
Figura 3 - Estrutura do Fulerol.....	26
Figura 4 - Viabilidade celular após exposição a diferentes protocolos de administração do fulerol	44
Figura 5 - Produção de EROs após tratamento com diferentes protocolos de administração s de Fulerol em infectada com CHIKV por 24 horas	45
Figura 6 - Produção de EROs após tratamento com diferentes protocolos de administração de Fulerol infectada com ZIKV por 24 horas.....	48

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ANOVA – *Analysis of Variance* (Análise de Variância)

ATCC – *American Type Culture Collection*

BOD – *Biochemical Oxygen Demand* (Demanda Bioquímica de Oxigênio)

CBN – *Carbon-Based Nanomaterials* (Nanomateriais à base de carbono)

CHIKV – *Alphavirus Chikungunya*

CMC – *Carboximetilcelulose*

CO₂ – Dióxido de carbono

DCFH-DA – 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMEM-HG – *Dulbecco's Modified Eagle Medium – High Glucose*

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)

EROs – Espécies reativas de oxigênio

HBSS – *Hank's Balanced Salt Solution*

hpi – *hours post infection* (horas pós-infecção)

L15 – Meio Leibowitz

MOI – *Multiplicity of Infection* (multiplicidade de infecção)

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

Nrf2 – *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PFU – *Plaque Forming Units* (Unidades Formadoras de Placa)

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico)

ROS – *Reactive Oxygen Species*

SFB – Soro fetal bovino

ZIKV – Orthoflavivirus zikaense

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Arbovírus.....	16
2.2 Família Flaviviridae, gênero Flavivirus.....	17
2.2.1 Orthoflavivirus zikaense (ZIKV).....	18
2.2.2 Diagnóstico, tratamento e profilaxia ZIKV.....	19
2.3 Família Togaviridae, gênero Alphavirus.....	20
2.3.1 Alphavirus chikungunya (CHIKV).....	21
2.3.2 Diagnóstico, tratamento e profilaxia CHIKV.....	22
2.4 EROs e estresse oxidativo.....	23
2.4.1 Sistemas de defesa antioxidantes.....	25
2.5 Fulerol.....	26
2.5.1 Regulamentação do uso de fulerol.....	28
2.5.2 No mundo.....	29
2.5.3 No Brasil.....	30
2.5.4 Perspectivas de aplicação do fulerol.....	32
3. JUSTIFICATIVA.....	34
4. OBJETIVOS.....	36
4.1 Objetivo Geral.....	36
4.2 Objetivos Específicos.....	36
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
5.1 Linhagens celulares.....	37
5.2 Vírus utilizados.....	37
5.3 Processo de expansão viral.....	38
5.4 Titulação viral.....	38
5.5 Fulerol.....	39
5.6 Ensaio de viabilidade celular por MTT.....	39
5.7 Ensaio de dosagem de EROs intracelular.....	40
5.8 Protocolos de administração do Fulerol.....	41
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

1. INTRODUÇÃO

As arboviroses representam um desafio crítico para a saúde pública global, destacando-se as infecções causadas por CHIKV e ZIKV, ambos transmitidos principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti* (CAMINI et al., 2017; WEAVER et al., 2018). Apesar do elevado impacto socioeconômico e da gravidade das manifestações clínicas agudas e crônicas associadas a esses vírus, ainda não existem tratamentos antivirais específicos amplamente eficazes ou aprovados para a população, sendo a conduta médica majoritariamente baseada no tratamento sintomático e no controle do vetor (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024; PEREIRA, 2020). Esse cenário evidencia a necessidade urgente de investigação de novas estratégias terapêuticas que atuem não apenas na redução da carga viral, mas também na modulação dos processos fisiopatológicos associados à infecção (CAMINI et al., 2017).

Durante o ciclo replicativo de CHIKV e ZIKV, a intensa utilização da maquinaria celular induz um acúmulo excessivo de EROs, decorrente principalmente da disfunção mitocondrial e do estresse do retículo endoplasmático (CAMINI et al., 2017; MEDIGHOUSI et al., 2021). O estresse oxidativo instala-se como uma perda da homeostase redox, caracterizada pelo desequilíbrio quando a produção exacerbada de EROs supera a capacidade dos sistemas antioxidantes endógenos de neutralizá-las (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; SIES, 2015). Esses sistemas incluem componentes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), além de componentes não enzimáticos, como a glutathione reduzida (GSH) e as vitaminas C e E (SIES, 2015). Sob condições normais, essa resposta é regulada pela via Nrf²/Keap1/HO-1; contudo, durante a infecção, a superexpressão de EROs compromete a integridade celular ao promover lipoperoxidação de membranas, degradação de proteínas e danos ao DNA, atuando como modulador positivo da replicação viral e favorecendo a indução da apoptose celular (SCHIEBER; CHANDEL, 2014; TONELLI et al., 2018).

Frente a esse dano oxidativo, o uso de nanomateriais carbonáceos antioxidantes desponta como uma alternativa promissora. O fullerol, um derivado poli-hidroxilado do fulereno com elevada solubilidade em água e alta capacidade de sequestro de radicais livres, tem demonstrado potencial para neutralizar EROs e restabelecer o equilíbrio redox em diversos modelos biológicos (INJAC et al., 2009; MAJOUGA et al., 2020). Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante do fullerol em modelos

in vitro de infecção por ZIKV e CHIKV em células VERO, analisando o impacto de diferentes esquemas posológicos de administração durante a infecção.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Arbovírus

Os arbovírus (*arthropod-borne viruses*) pertencem a um grupo de vírus transmitidos por artrópodes hematófagos, como mosquitos e carrapatos, sendo responsáveis por diversas doenças de relevância médica e veterinária em todo o mundo (TEIXEIRA et al., 2021). Esses vírus apresentam ampla diversidade genética e pertencem a diferentes famílias virais, destacando-se, no contexto da saúde pública, aqueles transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*, como os vírus da dengue, Zika e Chikungunya (TEIXEIRA et al., 2021). As arboviroses representam um importante problema de saúde pública, especialmente em países tropicais como o Brasil, onde condições ambientais favorecem a proliferação dos vetores (BRASIL, 2023; OPAS, 2022).

Nas últimas décadas, a incidência de arboviroses tem aumentado significativamente, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Esse crescimento está associado a fatores como urbanização desordenada, mudanças climáticas, aumento da mobilidade populacional e dificuldades no controle dos vetores, favorecendo a expansão geográfica desses vírus e a ocorrência de surtos e epidemias (TEIXEIRA et al., 2021). No Brasil, a circulação simultânea de múltiplos arbovírus representa um desafio adicional para os sistemas de saúde, dificultando o diagnóstico diferencial e o manejo clínico adequado (TEIXEIRA et al., 2021). O desafio aumenta dentro do sistema público de saúde que além de se responsabilizar pelo cuidado dos infectados, possui também a responsabilidade de dificultar os vetores de transmissão dos arbovírus dentro das comunidades locais.

Esses arbovírus apresentam ciclos de transmissão complexos, envolvendo reservatórios vertebrados e vetores artrópodes. No ambiente urbano, o mosquito *Aedes aegypti* desempenha papel central na transmissão de diversos vírus, devido à sua alta capacidade de adaptação ao ambiente doméstico e à sua eficiência na disseminação viral (MANIERO et al., 2016). A infecção humana ocorre, predominantemente, por meio da picada de fêmeas infectadas, que disseminam o vírus durante o processo de alimentação.

Do ponto de vista clínico, as infecções por arbovírus podem variar desde quadros assintomáticos ou leves até manifestações mais graves, dependendo do vírus envolvido e das condições do hospedeiro. Sintomas comuns incluem febre, exantema, mialgia e artralgia,

podendo evoluir para complicações neurológicas, inflamatórias ou crônicas, como observado em infecções por ZIKV e CHIKV (TEIXEIRA et al., 2021).

Além da transmissão vetorial, algumas arboviroses apresentam vias alternativas de transmissão, como a vertical, sexual e transfusional. No caso do ZIKV, essas formas de transmissão têm implicações importantes, especialmente durante a gestação, devido ao risco de complicações congênitas (TEIXEIRA et al., 2021). A existência dessas múltiplas vias de transmissão amplia a complexidade epidemiológica destas infecções e dificulta ainda mais seu controle.

2.2 Família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*

A família *Flaviviridae* reúne vírus de RNA de fita simples, envelopados, amplamente distribuídos em regiões tropicais e subtropicais. Dentro dessa família, o gênero *Flavivirus* inclui vírus de grande relevância para a saúde pública, como os vírus da dengue, febre amarela e o ZIKV, responsáveis por importantes surtos e epidemias ao longo das últimas décadas (SHAN et al., 2023).

Os flavivírus apresentam uma estrutura relativamente simples, composta por uma partícula viral esférica envolta por um envelope lipídico derivado da célula hospedeira. Seu genoma codifica uma única poliproteína, posteriormente clivada em proteínas estruturais, que formam a partícula viral, e proteínas não estruturais, envolvidas na replicação e na modulação da resposta celular (BARRETO-VIEIRA et al., 2017).

O processo de infecção tem início com a ligação do vírus à célula hospedeira, seguida por sua entrada por endocitose. Após a liberação do RNA viral no citoplasma, ocorre a replicação do material genético e a produção de novas partículas virais. Durante esse processo, o vírus promove alterações no funcionamento celular, criando um ambiente favorável à sua multiplicação (SAIZ et al., 2021).

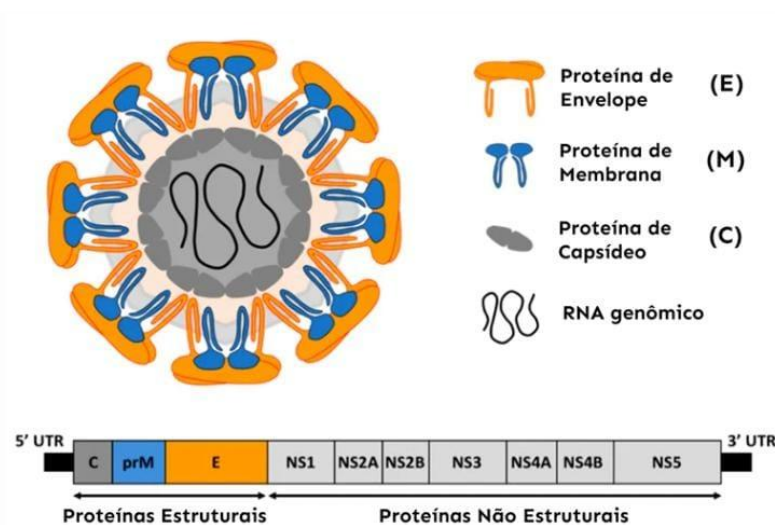
Além das alterações estruturais e metabólicas, a infecção por flavivírus também está associada à indução de estresse oxidativo. O aumento na produção de EROs pode ocorrer tanto como parte da resposta imune do hospedeiro quanto como consequência direta da infecção viral, contribuindo para danos celulares e para a progressão da doença (ALMEIDA, 2020; RAMEZANI; NAHAD; FAGHIHLOO, 2018).

Ao mesmo tempo, as células ativam mecanismos de defesa antioxidante na tentativa de restabelecer o equilíbrio redox. Essa interação entre processos de dano e de proteção evidencia a complexidade da relação entre vírus e hospedeiro, sendo um ponto importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas (SHAN et al., 2023).

2.2.1 *Orthoflavivirus zikaense* (ZIKV)

O ZIKV é um arbovírus do gênero *Flavivirus* que ganhou destaque global após os surtos registrados nas Américas, especialmente entre 2015 e 2016. Embora tenha sido identificado anteriormente, foi nesse período que sua importância para a saúde pública se tornou evidente, principalmente devido às complicações associadas à infecção (MUSSO; KO; BAUD, 2022).

Figura 1 - Estrutura e organização genômica do ZIKV



Fonte - Adaptado de AVILA- PEREZ et al.,2018.

A principal forma de transmissão do ZIKV ocorre pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*, especialmente *Aedes aegypti*. No entanto, outras formas de transmissão também foram descritas, incluindo transmissão sexual, transfusional e vertical, sendo esta última particularmente relevante devido aos riscos associados à gestação (DE ALMEIDA DI et al., 2021).

Na maioria dos casos, a infecção por ZIKV é assintomática ou apresenta sintomas leves, como febre, exantema, conjuntivite e dor articular. Ainda assim, em alguns casos, pode evoluir para complicações neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré. Além disso, a infecção durante a gestação pode resultar em alterações no desenvolvimento fetal, caracterizando a síndrome congênita do Zika, um dos principais fatores que contribuíram para a preocupação global em relação ao vírus (MUSSO; KO; BAUD, 2022).

Do ponto de vista celular, a infecção pelo ZIKV está associada ao aumento da produção de EROs e ao desequilíbrio dos sistemas antioxidantes. Esse estresse oxidativo pode contribuir para danos celulares e morte celular, especialmente em tecidos mais sensíveis, como o sistema nervoso (ALMEIDA, 2020).

Além das manifestações clínicas e das alterações estruturais observadas durante a infecção, estudos recentes têm demonstrado que o ZIKV também interfere na homeostase celular por meio da indução de estresse oxidativo. O aumento da produção de EROs decorrente da interação vírus-hospedeiro pode contribuir para a amplificação dos danos celulares e para a progressão da infecção. Nesse contexto, a busca por estratégias capazes de restaurar o equilíbrio redox, incluindo o uso de compostos antioxidantes, tem se destacado como uma abordagem relevante para a compreensão e o enfrentamento dos efeitos causados pelo vírus (DE ALMEIDA DI et al., 2021).

2.2.2 Diagnóstico, tratamento e profilaxia ZIKV

O diagnóstico da infecção por ZIKV pode ser realizado por diferentes métodos laboratoriais. Durante a fase aguda, a detecção do RNA viral por RT-PCR é considerada a abordagem mais sensível e específica. Em fases posteriores, podem ser utilizados testes sorológicos para detecção de anticorpos, embora estes apresentem limitações devido à possibilidade de reações cruzadas com outros flavivírus (SAIZ et al., 2021).

Atualmente, não existem antivirais específicos aprovados para o tratamento da infecção por ZIKV, sendo o manejo clínico baseado principalmente no alívio dos sintomas, com medidas como repouso, hidratação e uso de medicamentos para dor e febre (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024).

Em relação à prevenção, o controle do vetor continua sendo a principal estratégia, envolvendo a eliminação de criadouros e o uso de medidas de proteção individual. Paralelamente, diferentes vacinas vêm sendo desenvolvidas utilizando plataformas como DNA, RNA e vírus inativados. Apesar dos avanços, ainda não há vacinas aprovadas para uso amplo, em parte devido à dificuldade de realização de estudos de eficácia em cenários com baixa circulação viral (SHAN et al., 2023).

Diante dessas limitações, torna-se evidente a necessidade de novas abordagens terapêuticas. Nesse contexto, a investigação de mecanismos celulares envolvidos na infecção, como o estresse oxidativo, ganha destaque, uma vez que pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias complementares no controle da doença (OLAGNIER et al., 2019).

2.3 Família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*

A família *Togaviridae* compreende vírus de RNA de fita simples, envelopados, amplamente distribuídos em regiões tropicais e subtropicais. Dentro dessa família, o gênero *Alphavirus* reúne vírus transmitidos principalmente por artrópodes, sendo o CHIKV um dos mais relevantes devido ao seu potencial de disseminação e ao impacto clínico associado às infecções (WEAVER; LECUIT, 2022).

Os alfavírus possuem partículas virais esféricas envoltas por um envelope lipídico e um genoma de RNA de fita simples de polaridade positiva. Após a entrada na célula hospedeira, o vírus libera seu material genético no citoplasma, onde ocorre sua replicação utilizando a maquinaria celular. Esse processo está associado a alterações estruturais e funcionais na célula, favorecendo a produção de novas partículas virais e a progressão da infecção (SILVA; DERMODY, 2023).

Durante a infecção, o CHIKV é capaz de modular diferentes vias celulares, incluindo aquelas relacionadas à resposta imune e ao metabolismo celular. Um dos aspectos importantes desse processo é a indução de estresse oxidativo, caracterizada pelo aumento de EROs. Esse desequilíbrio no ambiente redox pode contribuir para danos celulares e intensificação da resposta inflamatória, sendo um fator relevante na patogênese da infecção (DA SILVA CAETANO et al., 2019).

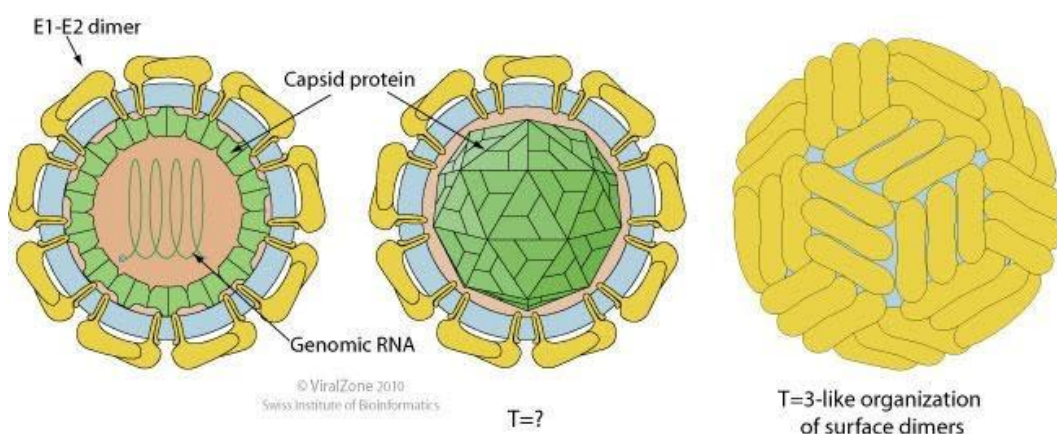
Além disso, a interação entre o vírus e a célula hospedeira envolve um equilíbrio delicado entre mecanismos de dano e de defesa. Enquanto a produção de EROs pode contribuir para a resposta antiviral inicial, seu excesso tende a causar prejuízos celulares, favorecendo a progressão da doença. Esse cenário reforça a importância de compreender essas interações como base para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (OLAGNIER et al., 2019; SIES; JONES, 2020).

Observando além das manifestações clínicas características da infecção por CHIKV, observa-se que a interação entre o vírus e a célula hospedeira está diretamente associada à indução de estresse oxidativo, com aumento significativo na produção de EROs. Esse desequilíbrio pode contribuir não apenas para os danos celulares, mas também para a intensificação da resposta inflamatória e para a persistência dos sintomas, especialmente nas fases crônicas da doença. Nesse sentido, a investigação de estratégias que atuem na modulação do ambiente redox celular torna-se particularmente relevante, destacando o potencial de compostos antioxidantes como abordagem complementar no contexto das infecções por CHIKV (MEHTA; CHAUDHARY; SUNIL, 2024).

2.3.1 *Alphavirus chikungunya* (CHIKV)

O CHIKV é um arbovírus transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*, como *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Nas últimas décadas, o vírus se espalhou por diferentes regiões do mundo, causando surtos expressivos e consolidando-se como um importante problema de saúde pública (WEAVER; LECUIT, 2022).

Figura 2 - Estrutura e organização genômica do CHIKV



Fonte: Adaptado de Swiss Institute of Bioinformatic, 2017.

A infecção por CHIKV é caracterizada, principalmente, por febre alta de início súbito e intensa dor articular, que pode afetar múltiplas articulações. Além disso, sintomas como fadiga, cefaleia, mialgia e exantema são frequentemente observados. Um dos aspectos mais marcantes da doença é a possibilidade de evolução para uma fase crônica, na qual a dor articular pode persistir por meses ou até anos, impactando significativamente a qualidade de vida dos indivíduos afetados (SILVA; DERMODY, 2023).

Em nível celular, a infecção pelo CHIKV está associada à ativação de processos inflamatórios e ao aumento da produção de EROs. Esse estresse oxidativo contribui para danos celulares e pode estar relacionado à persistência dos sintomas, especialmente aqueles de caráter inflamatório e articular (DA SILVA CAETANO et al., 2019).

Esses aspectos reforçam a importância de investigar estratégias que possam atuar na modulação do estresse oxidativo, contribuindo para a redução dos danos celulares e, potencialmente, para a melhora do quadro clínico (MEHTA; CHAUDHARY; SUNIL, 2024).

2.3.2 Diagnóstico, tratamento e profilaxia CHIKV

O diagnóstico da infecção por CHIKV é realizado por meio de métodos laboratoriais que incluem a detecção do RNA viral por RT-PCR, especialmente durante a fase aguda da doença, e testes sorológicos para identificação de anticorpos em fases posteriores. No entanto, o diagnóstico pode ser desafiador em regiões onde há circulação simultânea de outros arbovírus, como ZIKV e dengue, devido à semelhança dos sintomas clínicos (WEAVER; LECUIT, 2022).

Até o momento, não existem antivirais específicos aprovados para o tratamento da infecção por CHIKV. Dessa forma, o manejo clínico é baseado principalmente no controle dos sintomas, incluindo o uso de analgésicos, anti-inflamatórios e acompanhamento médico, especialmente em casos com evolução para manifestações crônicas (SILVA; DERMODY, 2023).

Em relação à profilaxia, o controle do vetor continua sendo uma estratégia fundamental. No entanto, avanços recentes têm sido observados no desenvolvimento de vacinas contra o CHIKV. Em 2023, foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) a

primeira vacina contra o vírus, baseada em vírus atenuado (VLA1553 – Ixchiq), representando um marco importante no controle da doença (FDA, 2023).

Apesar desse avanço, a disponibilidade da vacina ainda é limitada e sua implementação em larga escala depende de fatores como políticas públicas, custo e estratégias de distribuição. Além disso, ainda são necessários estudos adicionais para avaliar sua eficácia em diferentes populações e contextos epidemiológicos (SCHWARTZ; ALBERT, 2024).

Diante desse cenário, embora o desenvolvimento de vacinas represente um avanço significativo, ainda existem lacunas no manejo da infecção por CHIKV. Nesse contexto, a investigação de novas abordagens terapêuticas, especialmente aquelas voltadas à modulação do estresse oxidativo, torna-se relevante, podendo contribuir para a redução dos danos celulares e para a melhora da resposta do organismo frente à infecção (SILVA et al., 2025).

2.4 EROs e estresse oxidativo

As EROs são moléculas ou íons instáveis derivados do metabolismo do oxigênio celular, apresentando alta reatividade química (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Entre as principais EROs fisiologicamente relevantes estão o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; SIES, 2015). Em condições homeostáticas, as EROs desempenham papéis fundamentais na sinalização celular, regulando processos como proliferação, diferenciação, apoptose e resposta imune inata (SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

O equilíbrio redox celular é mantido pela atuação coordenada dos sistemas antioxidantes endógenos, divididos em componentes enzimáticos e não enzimáticos (SIES et al., 2017). O sistema enzimático é composto principalmente pela superóxido dismutase (SOD), que catalisa a conversão do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2); pela catalase (CAT) e pela glutathione peroxidase (GPx), responsáveis por converter o H_2O_2 em água e oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Já o sistema não enzimático inclui compostos de baixo peso molecular, como a glutathione reduzida (GSH), as vitaminas C e E e o ácido úrico, que atuam sequestrando diretamente radicais livres ou funcionando como cofatores de enzimas antioxidantes (SIES, 2015).

O estresse oxidativo é definido como um estado de desequilíbrio metabólico decorrente do aumento excessivo da produção de EROs associado à incapacidade ou sobrecarga dos sistemas antioxidantes celulares em neutralizá-las (SIES, 2015; SIES et al., 2017). Esse desequilíbrio redox pode causar danos oxidativos a macromoléculas essenciais, induzindo lipoperoxidação de membranas, alterações estruturais e funcionais em proteínas, além de mutações ou quebras na molécula de DNA. Como consequência, podem ocorrer disfunção mitocondrial e morte celular por apoptose ou necrose (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

No contexto das infecções virais, a replicação do vírus frequentemente induz uma superprodução de EROs por meio da perturbação do retículo endoplasmático e da disfunção da cadeia respiratória mitocondrial (CAMINI et al., 2017). Em infecções causadas pelo ZIKV e pelo CHIKV, o aumento das EROs exerce um papel ambíguo: embora possa atuar inicialmente como um mecanismo antiviral da célula hospedeira, sua persistência em níveis elevados favorece a patogênese viral, amplificando a resposta inflamatória e contribuindo para a proliferação viral e o dano tecidual (CAMINI et al., 2017; PEREIRA, 2020).

A regulação da resposta antioxidante em mamíferos é mediada principalmente pela via de sinalização do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) (DINKOVA-KOSTOVA; ABRAMOV, 2015). Em condições fisiológicas, o Nrf2 permanece no citoplasma ligado à proteína Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), sendo continuamente direcionado para degradação pelo sistema proteassomal (TONELLI et al., 2018). Sob condições de estresse oxidativo, resíduos de cisteína da Keap1 sofrem modificações que promovem a liberação do Nrf2 (DINKOVA-KOSTOVA; ABRAMOV, 2015). Após sua dissociação, o Nrf2 migra para o núcleo, onde forma heterodímeros com proteínas Maf e se liga aos elementos de resposta antioxidante (ARE), induzindo a expressão de genes envolvidos na defesa antioxidante, como heme oxigenase-1 (HO-1), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e enzimas relacionadas à síntese de glutatona reduzida (GSH) (TONELLI et al., 2018).

Além da atuação dos sistemas antioxidantes endógenos, compostos antioxidantes exógenos representam uma importante estratégia para minimizar os danos provocados pelas EROs (SIES et al., 2017). Nesse contexto, nanomateriais como o fullerol têm despertado interesse por atuarem não apenas como sequestradores diretos (scavengers) de EROs, devido ao seu sistema π conjugado altamente eletronegativo, mas também por apresentarem potencial

para modular vias de sinalização redox celular, como a via Nrf2/Keap1/HO-1. Dessa forma, esses compostos podem contribuir para a restauração da homeostase redox e para a prevenção da morte celular induzida pelo estresse oxidativo em processos infecciosos (PEREIRA, 2020; DINKOVA-KOSTOVA; ABRAMOV, 2015).

2.4.1 Sistemas de defesa antioxidantes

Para manter o equilíbrio redox celular, o organismo dispõe de um conjunto de sistemas de defesa antioxidantes que atuam na neutralização das EROs e na prevenção de danos celulares. Esses sistemas podem ser divididos em enzimáticos e não enzimáticos (NGO; DUENNWALD, 2022; HALLIWELL, 2024).

Os sistemas enzimáticos incluem enzimas como a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, a catalase (CAT), responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, e a glutathione peroxidase (GPx), que atua na redução de peróxidos utilizando glutathione como cofator. Essas enzimas desempenham papel fundamental na manutenção do equilíbrio oxidativo dentro da célula (NGO; DUENNWALD, 2022).

Já os sistemas não enzimáticos incluem moléculas como a glutathione reduzida (GSH), vitaminas antioxidantes (como vitamina C e E) e outros compostos capazes de neutralizar radicais livres. Esses componentes atuam de forma complementar aos sistemas enzimáticos, ampliando a capacidade de defesa celular contra o estresse oxidativo (NGO; DUENNWALD, 2022).

Durante infecções virais, esses sistemas podem ser sobrecarregados devido ao aumento na produção de EROs, resultando em um desequilíbrio que favorece o dano celular. Além disso, alguns vírus são capazes de interferir diretamente nesses mecanismos, reduzindo a eficiência da resposta antioxidante e contribuindo para a progressão da infecção (RAMEZANI; NAHAD; FAGHIHLOO, 2018).

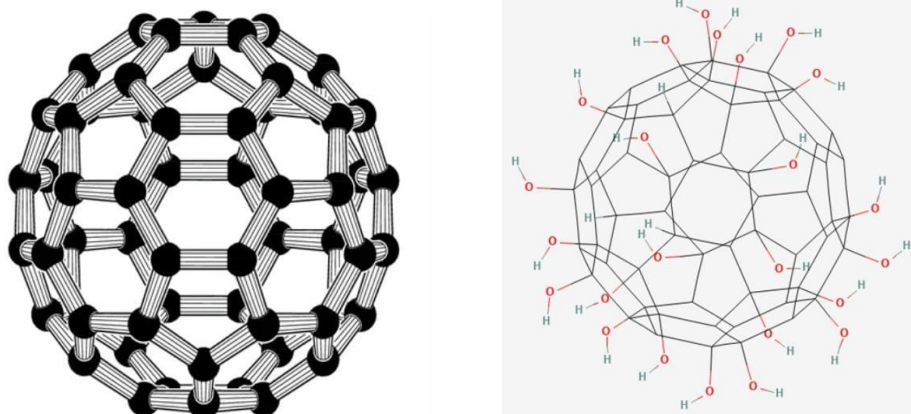
Nesse contexto, a utilização de compostos com propriedades antioxidantes tem sido amplamente investigada como uma estratégia para restaurar o equilíbrio redox e reduzir os danos celulares. Essa abordagem se torna especialmente relevante em infecções em que o

estresse oxidativo desempenha papel central, como no caso das infecções por ZIKV e CHIKV (SAHOO et al., 2023).

2.5 Fulerol

Os fulerenos constituem uma classe de nanomateriais formados exclusivamente por átomos de carbono organizados em estruturas esféricas, apresentando propriedades físico-químicas únicas que despertam interesse em diferentes áreas da ciência, especialmente na biomedicina. No entanto, uma das principais limitações desses compostos para aplicações biológicas é sua baixa solubilidade em água, o que dificulta sua utilização em sistemas celulares e organismos vivos (JELÍNEK; ZBOŘIL; KOLÁŘOVÁ, 2023).

Figura 3 - Estrutura do Fulerol



Fonte: PubChem

Diferentemente do fulereno nativo, o fullerol apresenta grupos hidroxila distribuídos em sua superfície, conferindo elevada solubilidade em meio aquoso e maior compatibilidade com sistemas biológicos. Além disso, sua estrutura baseada em carbono conjugado possibilita elevada afinidade eletrônica, permitindo atuar como sequestrador de EROs ("radical sponge"), mecanismo considerado um dos principais responsáveis por sua atividade antioxidante (INJAC et al., 2023; JELÍNEK; ZBOŘIL; KOLÁŘOVÁ, 2023).

Nesse contexto, derivados hidrossolúveis dos fulerenos foram desenvolvidos com o objetivo de superar essa limitação, destacando-se o fullerol, que apresenta grupos hidroxila em

sua estrutura. Essa modificação confere maior solubilidade em meio aquoso, além de favorecer sua interação com componentes celulares, ampliando seu potencial de aplicação em estudos biológicos (DELLINGER et al., 2013; INJAC et al., 2023; JELÍNEK; ZBOŘIL; KOLÁŘOVÁ, 2023).

O fulerol, caracterizado pela presença de grupos hidroxila em sua estrutura, apresenta elevada capacidade de interação com EROs, atuando como um potente agente antioxidante. Estudos têm demonstrado que o fulerol é capaz de sequestrar radicais livres de forma eficiente, reduzindo o estresse oxidativo e promovendo efeitos citoprotetores em diferentes modelos experimentais. Além disso, sua relativa biocompatibilidade e estabilidade química reforçam seu potencial para aplicações biológicas (PEREIRA, 2020).

A notável atividade antioxidante do fulerol fundamenta-se na presença de uma extensa rede de ligações duplas conjugadas em sua estrutura carbonácea (sistema π conjugado). Essa arquitetura confere ao nanomaterial uma elevada afinidade eletrônica, capacitando-o a atuar como um aceptor contínuo e eficiente de múltiplos elétrons provenientes de radicais livres, sem sofrer degradação estrutural imediata. Esse comportamento, consagrado na literatura como sequestrador de radicais (*radical sponge*), permite a neutralização direta de EROs e a consequente preservação do equilíbrio redox celular sob condições de estresse (INJAC et al., 2023; JELÍNEK; ZBOŘIL; KOLÁŘOVÁ, 2023).

No contexto das infecções virais, o estresse oxidativo tem sido apontado como um dos principais fatores envolvidos na patogênese, contribuindo para danos celulares e agravamento das manifestações clínicas. Dessa forma, compostos com potencial antioxidante, como o fulerol, surgem como alternativas promissoras para a modulação desses processos, podendo atuar na proteção celular e na redução dos efeitos deletérios associados à infecção (ALMEIDA, 2020; RAMEZANI; NAHAD; FAGHIHLOO, 2018).

Apesar das propriedades antioxidantes do fulerol já estarem bem descritas na literatura, (descrever propriedades) ainda são limitados os estudos que avaliam diretamente sua atuação em modelos de infecção viral, especialmente no contexto de arbovírus como ZIKV e CHIKV, evidenciando uma lacuna relevante no conhecimento científico (INJAC et al., 2023; JELÍNEK; ZBOŘIL; KOLÁŘOVÁ, 2023).

Essa lacuna no conhecimento é ainda mais pronunciada em modelos de infecção por arbovírus, tais como ZIKV e CHIKV, onde a avaliação direta do fulerol permanece inédita

(INJAC et al., 2023; JELÍNEK; ZBOŘIL; KOLÁŘOVÁ, 2023). Portanto, a investigação da capacidade antioxidante e da dinâmica posológica desse nanomaterial frente ao desequilíbrio redox induzido por ZIKV e CHIKV torna-se essencial para fundamentar seu potencial como agente terapêutico ou adjuvante no combate a essas arboviroses (JELÍNEK; ZBOŘIL; KOLÁŘOVÁ, 2023).

2.5.1 Regulamentação do uso de fulerol

A crescente aplicação de nanomateriais na área biomédica tem impulsionado o desenvolvimento de diretrizes regulatórias voltadas à avaliação de sua segurança e eficácia (FDA, 2022; OECD, 2022). Entre esses materiais, os derivados de fulerenos, como o fulerol, têm despertado interesse devido ao seu potencial antioxidante e às possíveis aplicações terapêuticas. No entanto, a complexidade estrutural e funcional desses compostos impõe desafios adicionais aos processos regulatórios, especialmente no que se refere à padronização, caracterização e avaliação de riscos.

Diferentemente de fármacos convencionais, os nanomateriais apresentam propriedades que podem variar significativamente de acordo com fatores como tamanho, forma, área de superfície e grau de funcionalização química. Essas características influenciam diretamente seu comportamento biológico, incluindo biodistribuição, interação com células e potencial toxicidade (OECD, 2022; EMA, 2021). Por esse motivo, a regulamentação desses compostos exige abordagens mais específicas e criteriosas.

No cenário internacional, agências reguladoras como a Food and Drug Administration (FDA) e a European Medicines Agency (EMA) têm desenvolvido orientações gerais para produtos que utilizam nanotecnologia. Essas diretrizes enfatizam a necessidade de uma avaliação detalhada caso a caso, considerando que pequenas variações nas propriedades dos nanomateriais podem resultar em diferenças significativas em seus efeitos biológicos (FDA, 2022; EMA, 2021).

Além disso, relatórios recentes destacam que, embora o número de produtos baseados em nanotecnologia esteja em crescimento, ainda há lacunas importantes no conhecimento sobre seus efeitos a longo prazo, especialmente em aplicações médicas. Isso reforça a necessidade de estudos mais robustos e de uma regulamentação adaptativa, capaz de acompanhar o avanço científico nesta área (OECD, 2022).

No caso específico dos fulerenos e seus derivados, como o fullerol, ainda não existem regulamentações específicas para uso clínico amplo, sendo esses compostos majoritariamente restritos ao campo experimental. A ausência de diretrizes específicas reflete não apenas o caráter emergente dessas tecnologias, mas também a necessidade de maior compreensão sobre seus mecanismos de ação, segurança e eficácia (BAKRY et al., 2007; DELLINGER et al., 2013; JELÍNEK; ZBOŘIL; KOLÁŘOVÁ, 2023).

Dessa forma, a regulamentação do fullerol, tanto em nível internacional quanto nacional, insere-se em um contexto mais amplo de desenvolvimento da nanotecnologia aplicada à saúde. O avanço nessa área depende da integração entre pesquisa científica, avaliação regulatória e desenvolvimento tecnológico, visando garantir que esses compostos possam ser utilizados de forma segura e eficaz no futuro (FDA, 2022; EMA, 2021).

2.5.2 No mundo

No cenário internacional, a regulamentação de nanomateriais aplicados à saúde tem avançado de forma gradual, acompanhando o crescimento das pesquisas e o desenvolvimento de novas tecnologias. No entanto, ainda não existe um marco regulatório único e específico para todos os tipos de nanomateriais, sendo adotada, na maioria dos casos, uma abordagem baseada em diretrizes gerais adaptadas às particularidades desses compostos (FDA, 2022; EMA, 2021).

Agências reguladoras como a Food and Drug Administration (FDA), nos Estados Unidos, e a European Medicines Agency (EMA), na União Europeia, têm desempenhado papel central na construção dessas diretrizes. Em vez de estabelecer normas rígidas específicas para cada nanomaterial, essas instituições recomendam uma avaliação caso a caso, considerando fatores como tamanho das partículas, propriedades físico-químicas, comportamento biológico e potencial de toxicidade (FDA, 2022; EMA, 2021).

Essa abordagem reflete a complexidade dos nanomateriais, cujas propriedades podem variar significativamente a partir de pequenas alterações estruturais. No caso de derivados de fulerenos, como o fullerol, modificações no grau de hidroxilação, por exemplo, podem influenciar diretamente sua solubilidade, interação com sistemas biológicos e capacidade

antioxidante, impactando sua segurança e eficácia (JELÍNEK; ZBOŘIL; KOLÁŘOVÁ, 2023; DE LÁTORRE et al., 2022).

Além disso, organismos internacionais como a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) têm destacado a necessidade de padronização de métodos para caracterização e avaliação de nanomateriais, uma vez que a falta de uniformidade nos protocolos experimentais dificulta a comparação de resultados entre estudos e, consequentemente, a tomada de decisões regulatórias (OECD, 2022).

Outro ponto relevante no contexto internacional é a crescente preocupação com os possíveis efeitos a longo prazo desses materiais. Relatórios recentes indicam que, embora muitos nanomateriais apresentem resultados promissores em estudos iniciais, ainda existem lacunas importantes relacionadas à sua toxicidade crônica, biodistribuição e potencial de bioacumulação, especialmente em aplicações médicas (FDA, 2022; EMA, 2021).

No que se refere especificamente ao fulerol, seu uso permanece restrito ao âmbito experimental, não havendo, até o momento, produtos aprovados para uso clínico baseados nesse composto. Essa limitação está diretamente relacionada à necessidade de estudos mais aprofundados que comprovem sua segurança em diferentes sistemas biológicos, bem como à ausência de protocolos padronizados para sua avaliação (JELÍNEK; ZBOŘIL; KOLÁŘOVÁ, 2023).

Dessa forma, o cenário internacional evidencia que, embora haja avanços significativos na regulamentação de nanomateriais, ainda existem desafios importantes a serem superados. A consolidação de diretrizes mais específicas, aliada ao avanço das pesquisas científicas, será fundamental para viabilizar a aplicação segura e eficaz de compostos como o fulerol na prática clínica (FDA, 2022; EMA, 2021).

2.5.3 No Brasil

No Brasil, a regulamentação de nanomateriais aplicados à área da saúde ainda se encontra em processo de consolidação, sendo conduzida principalmente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Embora não exista, até o momento, uma norma específica voltada exclusivamente para fulerenos ou seus derivados, como o fulerol, esses

compostos são enquadrados nas diretrizes gerais aplicáveis a medicamentos, produtos biotecnológicos e novas tecnologias em saúde (ANVISA, 2023; BRASIL, 2024).

A ANVISA adota uma abordagem baseada na avaliação de risco, exigindo que produtos contendo nanomateriais passem por rigorosos estudos de qualidade, segurança e eficácia antes de qualquer autorização para uso clínico. Isso inclui análises físico-químicas detalhadas, estudos toxicológicos, avaliação de biodistribuição, além de ensaios pré-clínicos e clínicos que comprovem seus efeitos no organismo (ANVISA, 2023; BRASIL, 2024).

No caso específico do fullerol, seu uso permanece restrito ao âmbito experimental, principalmente em estudos *in vitro* e em modelos animais. Um dos principais desafios para sua futura aplicação clínica está relacionado à necessidade de melhor compreensão de aspectos como toxicidade a longo prazo, interação com sistemas biológicos e possíveis efeitos cumulativos, que são particularmente relevantes no contexto de nanomateriais (JELÍNEK; ZBOŘIL; KOLÁŘOVÁ, 2023).

Além disso, a ausência de regulamentações específicas para nanotecnologia na área da saúde no Brasil reflete um cenário ainda em desenvolvimento, no qual diretrizes internacionais frequentemente servem como referência. Nesse sentido, documentos e recomendações de órgãos como a Food and Drug Administration (FDA) e a European Medicines Agency (EMA) acabam influenciando a condução de pesquisas e o desenvolvimento de produtos no país (FDA, 2022; EMA, 2021).

Outro ponto relevante diz respeito à necessidade de padronização metodológica nos estudos com nanomateriais, uma vez que variações na síntese, tamanho, funcionalização e estabilidade desses compostos podem impactar diretamente seus efeitos biológicos. Essa variabilidade representa um desafio adicional para os processos regulatórios, que dependem de dados consistentes e reprodutíveis (OECD, 2022; EMA, 2021).

Dessa forma, embora o fullerol apresente potencial promissor para aplicações biomédicas, sua utilização no Brasil ainda depende do avanço de estudos científicos robustos e da evolução do arcabouço regulatório voltado à nanotecnologia. O fortalecimento dessas diretrizes será fundamental para viabilizar a transição desses compostos do ambiente experimental para a prática clínica, garantindo segurança e eficácia no seu uso (ANVISA, 2023; OECD, 2022).

2.5.4 Perspectivas de aplicação do fullerol

O crescente interesse por compostos antioxidantes no contexto biomédico tem impulsionado a investigação de nanomateriais como o fullerol, especialmente devido às suas propriedades únicas. Sua capacidade de atuar como sequestrador de radicais livres e de modular o estresse oxidativo torna esse composto um candidato promissor para aplicações terapêuticas (WANG et al., 2022).

Além das aplicações investigadas no contexto das infecções virais, o fullerol tem demonstrado potencial em diversas outras áreas da biomedicina. Estudos experimentais indicam que suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias podem contribuir para a redução de danos celulares associados a cardiomiopatias, especialmente aquelas relacionadas ao estresse oxidativo e à disfunção mitocondrial (CHAUDHURI et al., 2022). Algumas pesquisas envolvendo doenças parasitárias, como a leishmaniose, têm apontado que nanomateriais derivados de fulerenos podem atuar na modulação da resposta inflamatória e na proteção tecidual, representando uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (TORRES-SANGUINO et al., 2022). Mesmo que a maioria desses estudos ainda estejam restritos ao ambiente experimental, os resultados obtidos reforçam a versatilidade biológica do fullerol e seu potencial para aplicações futuras em diferentes condições patológicas.

Nesse mesmo sentido, derivados de fulerenos também têm despertado interesse na indústria cosmética devido à sua elevada capacidade antioxidante. Em países asiáticos, especialmente Japão e Coreia do Sul, já existem produtos para cuidados com a pele contendo derivados de fulerenos em suas formulações, incluindo sérums, cremes faciais e máscaras cosméticas (TSUDA et al., 2021). Nesses produtos, os compostos são empregados com a proposta de auxiliar na neutralização de radicais livres, reduzir danos relacionados ao envelhecimento cutâneo e proteger a pele contra fatores ambientais, como radiação ultravioleta e poluição. Embora a eficácia clínica desses produtos ainda seja objeto de investigação contínua, sua presença no mercado demonstra o potencial de uso diverso derivados de fulerenos e demonstra de maneira prática o crescente interesse por tecnologias baseadas em nanotecnologia para o cuidado da saúde e da estética (TSUDA et al., 2021).

No contexto das infecções virais, como aquelas causadas por ZIKV e CHIKV, as propriedades antioxidantes e citoprotetoras do fullerol sugerem que esse composto possa

contribuir para a redução dos danos celulares associados ao excesso de EROs. Dessa forma, o fullerol representa um candidato promissor para investigação como agente adjuvante em estratégias terapêuticas voltadas ao controle dos danos induzidos por essas infecções (SAHOO et al., 2023).

Apesar desses avanços, ainda são necessários estudos adicionais para compreender de forma mais aprofundada seus mecanismos de ação, sua segurança em diferentes modelos biológicos e sua eficácia em condições clínicas. Nesse sentido, investigações experimentais, como a proposta neste trabalho, são fundamentais para ampliar o conhecimento sobre o fullerol e suas possíveis aplicações (JELÍNEK; ZBOŘIL; KOLÁŘOVÁ, 2023).

3. JUSTIFICATIVA

A despeito da relevância clínica do CHIKV e do ZIKV na saúde pública, a carência de agentes terapêuticos direcionados a mitigar a disfunção celular induzida por essas arboviroses permanece como um gargalo científico significativo (CAMINI et al., 2017; PEREIRA, 2020). Embora o papel patogênico da perda da homeostase redox nesses modelos virais seja reconhecido (CAMINI et al., 2017; MEDIGHOUSI et al., 2021), a busca por estratégias capazes de interceptar esse desequilíbrio ainda é incipiente, residindo aí uma lacuna fundamental no conhecimento.

Diversos antioxidantes convencionais — tais como a N-acetilcisteína, a vitamina C, o alfa-tocoferol (vitamina E), a quercetina, o resveratrol e a melatonina — vêm sendo explorados em modelos biológicos de estresse oxidativo (SIES, 2015). Contudo, a aplicação desses compostos clássicos enfrenta entraves consideráveis, incluindo baixa estabilidade química em meio fisiológico, rápida degradação metabólica, curta meia-vida celular e a necessidade de doses micromolares ou milimolares elevadas para alcançar modulação redox biologicamente relevante (SIES, 2015; SIES et al., 2017).

Nesse contexto, a opção por um nanomaterial carbonáceo como o fulerol justifica-se por suas propriedades físico-químicas e reativas ímpares, que superam os gargalos das moléculas pequenas antioxidantes tradicionais (PEREIRA, 2020). A gaiola esférica de carbono dotada de um extenso sistema de ligações π conjugadas confere ao fulerol uma elevada afinidade eletrônica e a capacidade de atuar como um aceptor contínuo de múltiplos radicais livres sem sofrer degradação estrutural imediata (INJAC et al., 2023; JELÍNEK; ZBOŘIL; KOLÁŘOVÁ, 2023). A funcionalização com grupos hidroxila agrega solubilidade aquosa, biocompatibilidade e elevada área superficial, permitindo maior estabilidade em meio de cultura e uma retenção e permanência intracelular prolongada em concentrações extremamente baixas, na faixa nanomolar (INJAC et al., 2023; PEREIRA, 2020).

Ademais, tratando-se de um composto inovador desenvolvido e em fase de consolidação no âmbito do nosso grupo de pesquisa (PEREIRA, 2020), a investigação da sua ação antioxidante torna-se indispensável para preencher a lacuna de dados sobre sua eficácia e comportamento em modelos infecciosos arbovirais.

É fundamental ressaltar que o presente estudo concentra-se na caracterização preliminar *in vitro* do impacto do fulerol sobre a redução dos níveis de EROs e a preservação

da viabilidade celular durante a infecção por ZIKV e CHIKV. A principal contribuição desta pesquisa reside em fornecer a primeira prova de conceito sobre a capacidade do nanomaterial em conter o aumento de EROs agudo provocado por essas arboviroses em modelo celular VERO. Dessa forma, os achados obtidos estabelecem o arcabouço experimental necessário para fundamentar e direcionar futuros estudos mecanísticos, avaliações do impacto sobre a carga viral e possíveis ensaios pré-clínicos *in vivo*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade antioxidante do fulerol em modelos celulares de infecção por ZIKV e CHIKV, avaliando sua capacidade de modular o aumento de EROs induzido pela infecção viral.

4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar se o fulerol reduz a viabilidade celular em células VERO por meio do ensaio de MTT, estabelecendo uma concentração segura para os experimentos.
- Quantificar a produção de EROs em células infectadas por ZIKV e CHIKV tratadas com fulerol utilizando o ensaio com Carboxy-H₂DCFDA.
- Comparar os níveis de EROs entre células infectadas e não infectadas, na presença e ausência do tratamento com fulerol.
- Avaliar o efeito de diferentes protocolos de administração do fulerol (dose única e doses sucessivas) sobre a modulação da produção de EROs induzido pela infecção viral.
- Comparar a resposta antioxidante promovida pelo fulerol nos modelos experimentais de infecção por ZIKV e CHIKV.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas Células da linhagem C6/36, de *Aedes albopictus*, obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), o cultivo foi realizado com meio Leibovitz (L'15) (Sigma-Aldrich), com suplementação de soro fetal bovino (SFB) (10%) (Gibco), com Penicilina/Estreptomicina (200 U/mL) (Sigma-Aldrich) e Anfotericina B (2,5 µg/mL) (Sigma-Aldrich), o crescimento foi realizado em estufa de incubação a 28°C. Esta linhagem foi utilizada para a replicação dos vírus ZIKV e CHIKV. Células da linhagem VERO, isoladas do rim de *Cercopithecus aethiops* (macaco verde africano), obtidas da ATCC, gentilmente cedidas por colaboradores do departamento de bioquímica da UFMG, cultivadas em meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco com alto nível de glicose (DMEM-HG, Sigma-Aldrich), suplementado com 5% de SFB (Gibco) e antibióticos Penicilina/Estreptomicina (200 U/mL) (Sigma-Aldrich) e Anfotericina B (2,5 µg/mL) (Sigma-Aldrich). Mantida em estufa de atmosfera umidificada, a 37°C e 5% de CO₂, para manutenção, eram repicadas entre 3 a 5 dias com taxas de subcultivo de 1:2 a 1:6. A escolha da linhagem deve-se à permissividade à infecção pelo ZIKV e CHIKV, e apresentarem as características necessárias às metodologias empregadas (BARRETO-VIEIRA et al., 2017; SUDEEP, et al., 2019).

5.2 Vírus utilizados

Orthoflavivirus zikaense – ZIKV (ZIKA/H. sapiens/Brazil/PE 243/215/ GenBank :KX197192), com origem de um paciente sem complicações clínicas, no estado de Pernambuco, Brasil.

Alphavirus chikungunya – CHIKV (S27-African), gentilmente cedida pelo professor Dr. Eurico Arruda Neto (USP – Ribeirão Preto).

5.3 Processo de expansão viral

Os estoques virais foram propagados em garrafas de cultura média (75cm²) com células C6/36, para cada vírus, utilizando uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 (vírus/célula). Incubou-se a garrafa por 1 hora em estufa BOD (28 °C), agitada a cada 10 minutos para adsorção viral, após o período adicionou-se meio L15 suplementado com 1% de SFB em um volume final de 12ml. A incubação em estufa foi mantida até a observação de efeitos citopáticos (3 – 7 dias), o meio de cultura da garrafa foi coletado e clarificado por centrifugação (5 minutos, 3000g a 4 °C), o sobrenadante foi coletado e armazenado em alíquotas em microtubos de 200ul a -80 °C.

5.4 Titulação viral

A titulação viral foi realizada pelo método descrito por Dulbecco (1952). Foram preparadas placas de 6 poços com confluência de 90% (cerca de 1 x 10⁶ células/poço) de VERO, mantidas em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO². O vírus a titular foi diluído em série (10⁻³ a 10⁻⁷) a um volume de 200ul, diluição foi acrescentada aos poços. A adsorção do vírus ocorreu em estufa por 1 hora, com agitação a cada 10 minutos, em seguida a suspensão de vírus foi removida e adicionou-se 2mL de meio DMEM-HG suplementado com 2,5% de SFB e adição de carboximetilcelulose 1,5% (CMC). A placa foi incubada em estufa por 3 dias, em seguida adicionou-se formol a 10%, mantendo por cerca de 1 hora para a fixação da camada celular. A placa foi lavada e corada com cristal violeta, o título viral foi expresso pelo número de Unidades Formadoras de Placas/mL, pela equação 1.

$$\text{Título viral (PFU/mL)} = n \times fc \times 10^d \quad (1)$$

onde, n é o número de unidade de lise médio entre as duas placas, obtido pela contagem no poço em que a diluição viral apresentava entre 30 e 300 placas, fc é o fator de correção do volume convertido para mL e d é o inverso da diluição relativa ao poço utilizado na contagem (DULBECCO, R., 1952).

5.5 Fulerol

O fullerol (C₆₀OH₂₂₋₂₄) foi obtido pelo processo de poli hidroxilação do fulereno C₆₀, o composto foi sintetizado e fornecido por colaboradores do laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física da UFMG. As alíquotas foram armazenadas em tubos plásticos estéreis, protegidos da luz, à -20°C, em estoques de 1mM. Antes do uso o composto era colocado em banho ultrassônico pelo tempo mínimo de 30 minutos, para completa homogeneização da alíquota.

5.6 Ensaio de viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT, realizado pela redução do brometo 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il) – 2,5 – difeniltetrazólio (MTT) em cristais insolúveis de formazan, realizado somente por células com mitocôndrias viáveis. Células VERO foram semeadas em placas de 96 poços (4 x 10⁴ células/ poço), incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após o período de adesão celular, o meio foi removido, as células lavadas com tampão PBS, em seguida adicionou-se o fullerol na concentração de 3,125nM, diluído em meio DMEM-HG. A repetição das aplicações do fullerol foi realizada diluindo o fullerol a 3,125nM em 1 µl de meio DMEM-HG, o número de aplicações variou por cada grupo, não passando ao fim do tratamento de um volume final de 110µl por poço, o mesmo volume de meio sem o fullerol foi adicionado aos demais grupos para manter os controles (Mock). Após os tratamentos as placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 48 horas. Após o período de tratamento o meio foi retirado e adicionou-se 30µl de MTT (2 mg/mL – Sigma-Aldrich) por poço, seguido de incubação em estufa, protegido da luz, por 90 minutos, em seguida adicionou-se 100 µl de DMSO por poço, para solubilização dos cristais de formazan gerados, seguido de leve agitação das placas por 15 minutos para completa homogeneização. A quantidade de formazan gerada foi mensurada pelo leitor de microplacas VICTOR X3 (PerkinElmer) por leitura de absorbância a 490 nm. Os resultados de viabilidade foram expressos em relação ao controle de células (Mock) não tratadas com fullerol.

5.7 Ensaio de dosagem de EROs intracelular

A dosagem de EROs foi realizada utilizando o marcador fluorogênico 6-carboxy-2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (Carboxy-H2DCFDA – ThermoFisher, C400). Essa sonda, ao ser oxidada pelas EROs intracelulares, é convertida em diclorofluoresceína (DCF), uma molécula altamente fluorescente, permitindo a mensuração da fluorescência nos comprimentos de onda de excitação de 485 ± 10 nm e emissão de $530 \pm 12,5$ nm.

Para a análise de EROs intracelulares, foram utilizadas placas pretas de fundo transparente com 96 poços, contendo células VERO na densidade de 4×10^5 células/poço, incubadas por 24 horas para adesão celular. Após esse período, as células foram cuidadosamente lavadas com solução balanceada de Hank's (HBSS) [0,4 g/L KCl; 0,09 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,06 g/L KH_2PO_4 ; 0,14 g/L CaCl_2 ; 0,10 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g/L $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$; 0,35 g/L NaHCO_3 ; 8 g/L NaCl; q.s.p. H_2O Milli-Q], adicionada gota a gota para evitar o desprendimento da monocamada celular.

Em seguida, foram realizados os tratamentos e a infecção viral, mantendo-se as células em meio DMEM-HG sem fenol. Na última hora do período experimental, foi realizada inicialmente a leitura do branco da placa para correção da autofluorescência celular. Posteriormente, adicionou-se a sonda Carboxy-H2DCFDA na concentração final de 50 μM , diluída em meio de cultivo sem fenol e aplicada diretamente aos poços da placa. As células permaneceram incubadas por 1 hora em estufa, protegidas da luz.

A fluorescência foi mensurada em leitor de placas Victor X3, utilizando comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 535 nm, à temperatura de 37 °C. Uma leitura inicial do branco foi realizada antes da adição da sonda (T0). Após a incubação adicional de 1 hora em estufa, protegidas da luz, foi realizada a leitura final (T1). O aumento percentual da fluorescência foi calculado utilizando a Equação Normalizadora 1.

$$[(F_{t_1} - F_{t_0})/F_{t_0} \times 100] \quad (1)$$

Onde, F_{t1} é a leitura da fluorescência no tempo 1 hora e F_{t0} é a leitura de fluorescência no tempo 0 (Branco da placa). Os resultados foram expressos em porcentagem, por valor relativo pelo controle celular (WANG, H; JOSEPH, JA., 1999).

5.8 Protocolos de administração do Fulerol

Para avaliar o efeito de novos protocolos de aplicação do fullerol, foi utilizada a concentração de 3,125nM, concentração mais efetiva em reduzir EROs, estabelecida em trabalhos anteriores do grupo, divididos em 6 grupos de estudo:

- Controle celular (CC), células VERO sem adição do tratamento com fullerol, estabelecido como o Mock.
- Controle Viral (CV), células VERO infectadas por ZIKV ou CHIKV, sem tratamento com fullerol.
- Tratamento padrão (T0), células VERO infectadas por ZIKV ou CHIKV, tratado com fullerol em uma única dose, no momento da infecção (adição do vírus ao tratamento), protocolo testado nos estudos anteriores.
- Tratamento experimental (T0 e T6), células VERO infectadas por ZIKV ou CHIKV, tratado com fullerol no tempo 0, com uma segunda dose 6 horas após a inoculação do vírus (hpi),totalizando 2 doses.
- Tratamento experimental (T0-T3-T6), células VERO infectadas por ZIKV ou CHIKV, tratado com fullerol no tempo 0, seguido de doses de reforço, nos tempos 3 hpi e 6 hpi, totalizando 3 doses.
- Tratamento experimental (T0 a T6), células VERO infectadas por ZIKV ou CHIKV, tratado com fullerol no tempo 0, seguido de doses de reforço a cada hora, pelo tempo total de 6 hpi (1-6 hpi), totalizando 7 doses ao fim.

Durante os tratamentos as células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, sendo retiradas somente por um período de breve para repetição das doses. As células foram incubadas por um período de 24 horas, a iniciar no tempo 0 de infecção por um dos vírus. O tempo foi definido em estudos anteriores, sendo o momento em que ambos os vírus apresentam um pico considerável na geração de EROs no modelo celular proposto.

5.9 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do GraphPad Prism 9, utilizando ONE-WAY ANOVA com pós testes de Dunnett e Tukey, foi adotado um valor de $P < 0,05$, a média e o desvio padrão foram mostrados em todos os gráficos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

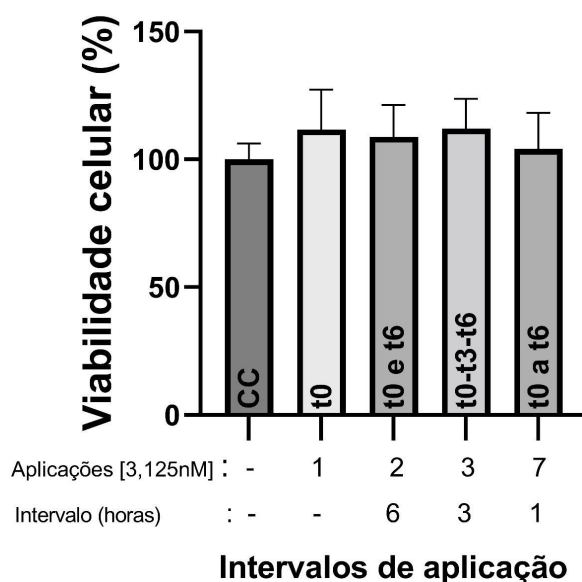
Em estudo anterior, Malta (2023) avaliou concentrações variando de 12,5 a 0,781 nM e demonstrou que 3,125 nM foi a mais eficiente na redução da produção de EROs. No presente trabalho, essa mesma concentração manteve sua elevada capacidade antioxidante em modelos de infecção por ZIKV e CHIKV, reduzindo significativamente os níveis de EROs induzidos por ambos os vírus. Esses resultados reforçam a reprodutibilidade dos achados anteriores e indicam que a concentração de 3,125 nM representa uma condição experimental adequada para a modulação do dano oxidativo em diferentes modelos de infecção por arbovírus.

Além disso, Malta (2023) observou uma tendência de redução da atividade antioxidante em concentrações superiores a 12,5 nM, possivelmente em decorrência da cristalização estado de agregação do fulerol em solução, fenômeno que pode comprometer sua estabilidade coloidal e, conseqüentemente, reduzir sua interação com o meio biológico (ASSEMI *et al.*, 2010). Por outro lado, concentrações inferiores a 3,125 nM apresentaram menor eficiência antioxidante, provavelmente devido à rápida saturação do nanomaterial (MALTA, 2023). Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo reforçam que a concentração de 3,125 nM proporciona o melhor equilíbrio entre estabilidade e atividade antioxidante, justificando sua utilização em investigações futuras sobre o potencial terapêutico do fulerol frente às arboviroses.

Os resultados da análise de viabilidade celular demonstraram que o fulerol, na concentração de 3,125 nM, não reduziu a viabilidade das células VERO em nenhum dos protocolos avaliados. Esses achados indicam que o nanocomposto não apresentou citotoxicidade, mesmo após múltiplas aplicações (Figura 1)

A ausência da redução da viabilidade celular observada neste estudo corrobora com trabalhos anteriores de nosso grupo, onde Pereira SH (2020), demonstrou que o fulerol não compromete a viabilidade de células, reforçando a biocompatibilidade do nanomaterial e seu potencial para aplicações biológicas.

Figura 4 - Viabilidade celular após exposição a diferentes protocolos de aplicação do fulerol. As células expostas não apresentaram diferença estatística em relação ao controle celular para $p < 0,001$, utilizando One-Way ANOVA com pós teste de Tukey.



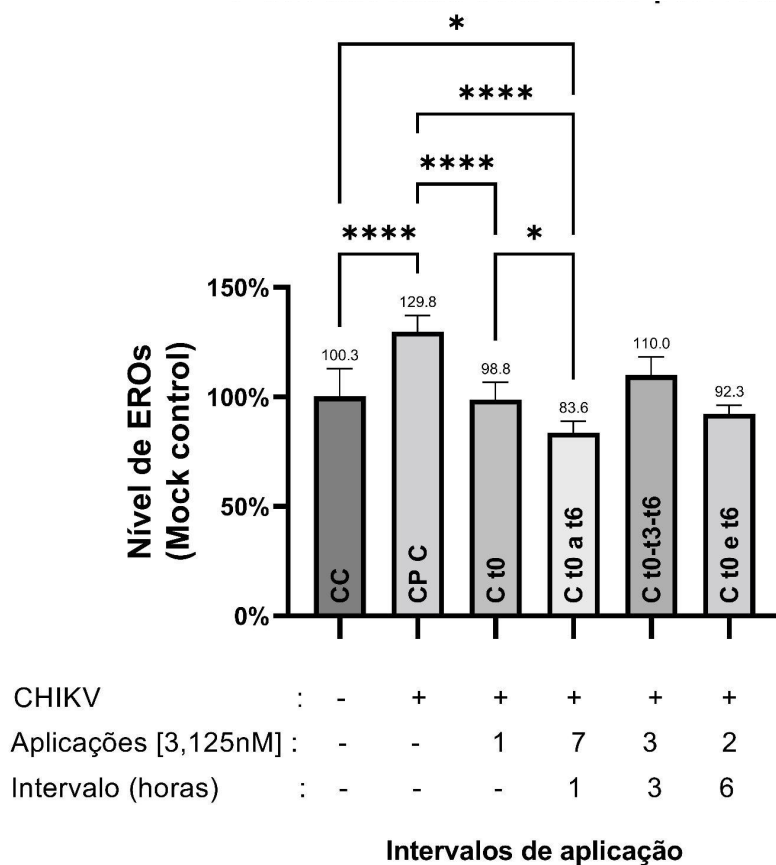
Fonte - próprio autor

Na análise das EROs para o *CHIKV*, observou-se que, após 24 horas de infecção, houve um aumento aproximado de 30% na produção de EROs em comparação ao Controle Celular (CC). Esse achado está em concordância com estudos que demonstram que a infecção por alfavírus desencadeia um importante desequilíbrio redox, favorecendo a produção de EROs e contribuindo para a ativação de vias inflamatórias e para a patogênese da doença (CAMINI et al., 2017; DE CASTRO-JORGE et al., 2019). Embora os mecanismos moleculares envolvidos ainda não estejam completamente elucidados, evidências sugerem que a ativação do inflamassoma NLRP3 e o aumento da produção de EROs desempenham papel importante na resposta inflamatória induzida pelo CHIKV (SOARES-SCHANOSKI et al., 2019). Dessa forma, os resultados obtidos reforçam a hipótese de que o aumento da produção de EROs constitui um dos principais eventos associados à infecção por CHIKV, embora estudos adicionais ainda sejam necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos e sua relação com a progressão da doença. Neste estudo, todos os tratamentos realizados com a dose de 3,125 nM foram capazes de reduzir esse aumento induzido pelo vírus.

Entretanto, os melhores resultados foram observados nas aplicações realizadas de T0 a

T6, que promoveram uma redução de 46% em relação ao Controle Positivo (CP C) e de 16% em relação ao CC. Já o tratamento aplicado apenas em T0 apresentou menor eficácia, reduzindo a produção de EROs em 32% em relação ao CV e apenas 2% quando comparado ao CC. Dessa forma, os resultados indicam que, no caso do CHIKV, um tratamento contínuo realizado a cada hora pode ser mais benéfico

Figura 5 - Produção de EROs após tratamento com diferentes protocolos de administração de Fulerol em células VERO infectadas com CHIKV por 24 horas. As barras representam a diferença estatística entre as células infectadas e tratadas com fullerol [3,125nM] em diferentes protocolos, utilizando one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (*) representa $p < 0,05$; (****) $p < 0,0001$.



Fonte - próprio autor

Esse comportamento pode estar relacionado à intensa resposta oxidativa induzida pelo CHIKV durante a infecção. No presente estudo, observou-se um aumento aproximado de 30% na produção de EROs após 24 horas de infecção, resultado que sugere a participação do dano oxidativo na resposta celular ao vírus. Embora os estudos sobre a produção de EROs especificamente durante a infecção por CHIKV ainda sejam limitados, evidências obtidas

com o vírus Mayaro (MAYV), pertencente à mesma família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus*, demonstram que o aumento da produção de EROs está diretamente relacionado à patogênese viral (CAMINI *et al.*, 2017; DE CASTRO-JORGE *et al.*, 2019). Além disso, De Castro-Jorge *et al.* (2019) demonstraram que CHIKV e MAYV apresentam mecanismos patogênicos semelhantes, incluindo a participação do inflamassoma NLRP3. Corroborando esses achados, Soares-Schanoski *et al.* (2019) verificaram que a infecção por CHIKV induz a produção de interleucina-1 β em macrófagos por meio de um mecanismo dependente da ativação do inflamassoma NLRP3, cuja ativação pode ser desencadeada pelo aumento da produção de EROs.

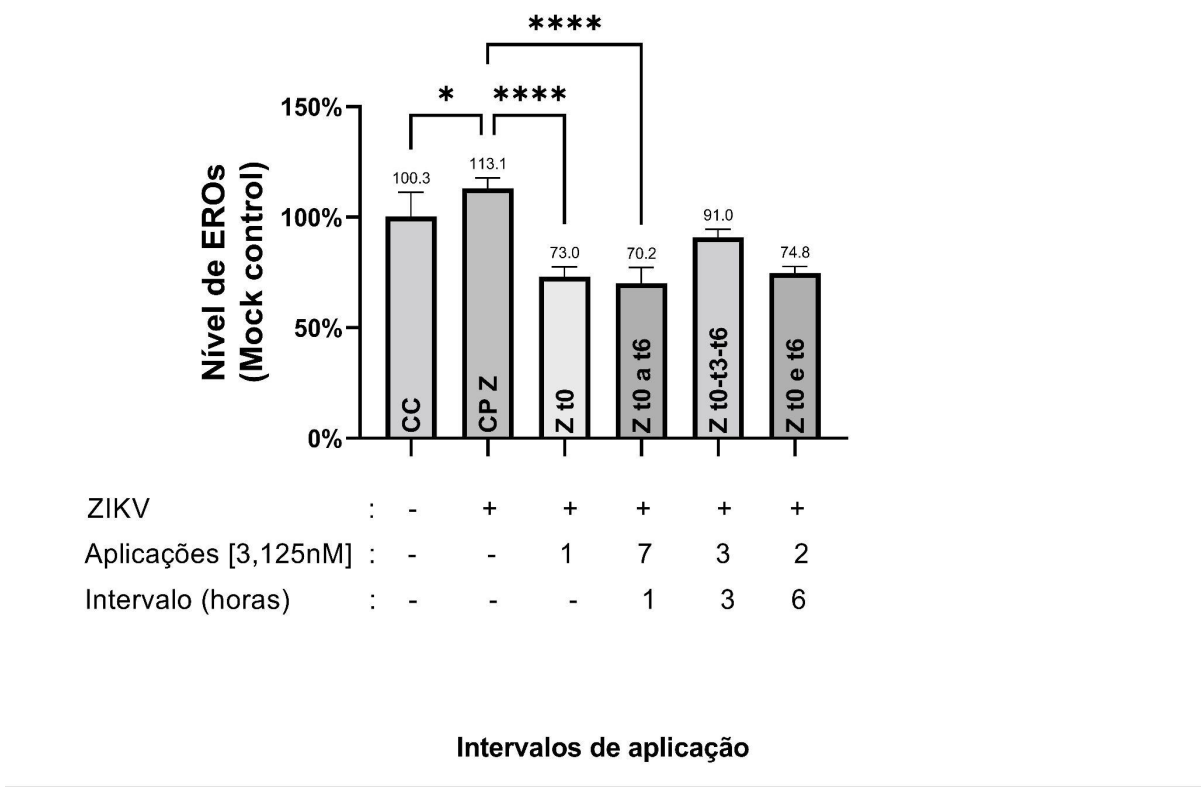
Dessa forma, esses achados sugerem que a administração contínua do fulerol potencializa sua atividade antioxidante, possivelmente por manter concentrações efetivas do composto durante todo o período de produção de EROs induzida pela infecção viral. Esse resultado está de acordo com estudos que demonstram que o fulerol apresenta elevada capacidade sequestradora de radicais livres, contribuindo para a manutenção da homeostase redox celular e para a redução dos danos oxidativos (PEREIRA, 2020; JELÍNEK; ZBOŘIL; KOLÁŘOVÁ, 2023). Além disso, considerando que a infecção por CHIKV promove uma produção contínua de EROs ao longo do ciclo replicativo viral, um tratamento repetido pode oferecer maior proteção celular ao neutralizar de forma mais eficiente essas espécies reativas, reduzindo o dano oxidativo e seus efeitos deletérios (DA SILVA CAETANO *et al.*, 2019; MEHTA; CHAUDHARY; SUNIL, 2024). Nesse sentido, os resultados indicam que, no caso do CHIKV, um regime de tratamento contínuo, com aplicações sucessivas do fulerol, pode representar uma estratégia mais eficaz para o controle da produção de EROs induzido pela infecção. Os dados obtidos podem ser observados na Figura 2.

Para o ZIKV observou-se que, após 24 horas de infecção, houve um aumento de aproximadamente 13% na produção de EROs em comparação ao Controle Celular (CC). O aumento da produção de EROs observado após a infecção pelo ZIKV corrobora achados previamente descritos na literatura, que demonstram que esse vírus, assim como outros membros da família *Flaviviridae*, incluindo HCV, DENV, JEV, WNV e TBEV, promove um desequilíbrio redox caracterizado pela elevação dos níveis intracelulares de EROs, favorecendo o estabelecimento do estresse oxidativo (ZHANG *et al.*, 2019; FOO *et al.*, 2022; MEUREN *et al.*, 2022). A elevação da produção de EROs constitui uma resposta inicial da célula hospedeira ao processo infeccioso. Entretanto, diversos vírus desenvolveram mecanismos capazes de explorar esse desequilíbrio redox, modulando diferentes vias

celulares para intensificar a geração de EROs e ativar processos apoptóticos. Essas alterações criam um ambiente favorável à replicação viral e à propagação da infecção. Embora os mecanismos envolvidos ainda não sejam totalmente compreendidos, estudos indicam que proteínas não estruturais virais desempenham papel importante na modulação dessas vias por meio da interação com componentes da célula hospedeira (CHRISTIAN; SONG; MING, 2019; RÍOS-OCAMPO et al., 2019; FOO et al., 2022). Todos os tratamentos realizados foram capazes de reduzir esse aumento induzido pelo vírus.

Entretanto, os tratamentos aplicados de T0 a T6 apresentaram melhores resultados, promovendo uma redução de 43% em relação ao Controle Positivo (CP C) e de 30% em relação ao CC. O tratamento realizado apenas em T0 também demonstrou efeito antioxidante relevante, reduzindo a produção de EROs em 40% quando comparado ao CV e em 27% em relação ao CC. Apesar de os tratamentos realizados de T0 a T6 apresentarem os menores níveis de EROs, quando comparados ao tratamento em dose única (T0), essa diferença não foi estatisticamente significativa. Apesar da ausência de diferença estatística, nota-se uma tendência de maior capacidade antioxidante no tratamento recorrente. Esse resultado pode estar relacionado às características da infecção pelo ZIKV, que, quando comparada à infecção por CHIKV, tende a induzir um aumento de EROs menos intenso em determinados modelos celulares (CAMERON et al., 2017; OLAGNIER et al., 2016). Além disso, estudos demonstram que o estresse oxidativo induzido pelo ZIKV está intimamente associado à sua interação com a mitocôndria e à ativação de mecanismos celulares específicos, podendo variar de acordo com a linhagem celular utilizada e o tempo de infecção (LEDUR et al., 2020; HEATON; RANDALL, 2011). Nessa perspectiva, a produção de EROs gerada pela infecção pode ter sido suficientemente controlada por uma única administração de fulerol, não havendo benefício adicional mensurável com aplicações sucessivas do composto. Esses resultados reforçam o potencial antioxidante do fulerol e sugerem que sua eficácia pode depender da intensidade do estresse oxidativo desencadeado por cada vírus e das características do modelo biológico avaliado. Os resultados obtidos podem ser observados na figura 3.

Figura 6 - Produção de EROs após tratamento com diferentes protocolos de administração de Fulerol em VERO infectada com ZIKV por 24 horas. As barras representam a diferença estatística entre as células infectadas e tratadas com fullerol [3,125nM] em diferentes protocolos utilizando one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (*) representa $p<0,05$; (****) $p<0,0001$.



Fonte - próprio autor

A diferença observada entre os resultados obtidos para os dois vírus pode estar relacionada às particularidades da interação de cada vírus com a célula hospedeira. No presente estudo, o CHIKV promoveu um aumento mais expressivo da produção de EROs em comparação ao ZIKV após 24 horas de infecção. Embora ambos sejam capazes de induzir estresse oxidativo, estudos demonstram que o CHIKV desencadeia intensa ativação de vias inflamatórias, incluindo a ativação do inflamassoma NLRP3 e a produção de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para uma resposta oxidativa mais exacerbada (SOARES-SCHANOSKI *et al.*, 2019; FREPPEL *et al.*, 2024). Em contrapartida, no ZIKV, o aumento da produção de EROs está relacionado principalmente à disfunção mitocondrial, ao estresse do retículo endoplasmático e à modulação da via antioxidante Nrf2, mecanismos que

participam tanto da resposta antiviral quanto da regulação do estresse oxidativo (OLAGNIER *et al.*, 2019). Em vista disso, considerando que CHIKV e ZIKV pertencem, respectivamente, às famílias Togaviridae e Flaviviridae, era esperado que apresentassem diferenças na intensidade e nos mecanismos de indução do aumento na produção de EROs durante a infecção. Além disso, o CHIKV apresenta rápida replicação citoplasmática e induz uma resposta inflamatória mais intensa, enquanto o ZIKV é capaz de modular mecanismos antioxidantes da célula hospedeira, como a via Nrf2, atenuando parcialmente a resposta oxidativa nas fases iniciais da infecção (OLAGNIER *et al.*, 2019; FREPPEL *et al.*, 2024). Essas diferenças podem explicar, ao menos em parte, o maior aumento da produção de EROs observado nas células infectadas pelo CHIKV em comparação ao ZIKV nas primeiras 24 horas de infecção.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que o fulerol apresenta potencial como modulador do dano oxidativo induzido pelas infecções por ZIKV e CHIKV, especialmente quando administrado de forma contínua, uma vez que essa estratégia promoveu maior redução dos níveis de EROs. Esses achados corroboram estudos que demonstram a elevada capacidade antioxidante do fulerol, atribuída à sua estrutura rica em grupos hidroxila, capaz de sequestrar EROs e contribuir para a manutenção da homeostase redox celular (PEREIRA, 2020; JELÍNEK; ZBOŘIL; KOLÁŘOVÁ, 2023; WANG *et al.*, 2022). Além disso, o emprego de sistemas nanoestruturados de liberação controlada tem sido apontado como uma estratégia promissora para aumentar a estabilidade, a biodisponibilidade e o tempo de permanência de compostos bioativos, potencializando seus efeitos terapêuticos e reduzindo a necessidade de administrações frequentes (MOHAMED *et al.*, 2021; NETA *et al.*, 2023). Desse modo, os resultados obtidos sugerem que o desenvolvimento de uma nanoformulação farmacêutica de liberação prolongada contendo fulerol, pode representar uma estratégia promissora para otimizar sua atividade antioxidante frente às infecções por ZIKV e CHIKV.

Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese e avaliar se a redução das EROs está diretamente associada à diminuição da replicação viral. Nesse contexto, recomenda-se investigar a atividade antiviral do fulerol na concentração de 3,125 nM, tanto em esquema de dose única quanto em tratamento contínuo (T0 a T6), bem como avaliar diferentes intervalos entre as administrações, como a cada 6 ou 8 horas, buscando protocolos de tratamento mais viáveis do ponto de vista farmacêutico e clínico.

Por fim, a avaliação da atividade antiviral do fullerol na concentração de 3,125 nM associada ao tratamento contínuo (T0 a T6) poderá esclarecer se existem benefícios reais quanto à ação antiviral do composto, especialmente frente ao ZIKV, para o qual já foram observados efeitos antivirais nas concentrações de 12,5 e 6,25 nM (PEREIRA,2020).

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o fulerol apresentou relevante atividade antioxidante em modelos celulares de infecção por ZIKV e CHIKV, sendo capaz de reduzir significativamente a produção de EROs induzida por ambos os vírus. Ademais, a avaliação de viabilidade celular confirmou que o composto na concentração de 3,125 nM não diminuiu a viabilidade das células VERO, assegurando sua biocompatibilidade nas condições experimentais avaliadas.

A análise comparativa entre os diferentes protocolos de aplicação evidenciou que a dinâmica da resposta antioxidante do fulerol varia em função do modelo de infecção analisado. Na infecção por CHIKV, o regime de administração contínua promoveu uma redução mais acentuada dos níveis de EROs quando comparado à dose única, sugerindo a necessidade de aportes recorrentes frente ao acentuado dano oxidativo provocado por esse vírus. Em contrapartida, na infecção por ZIKV, tanto o tratamento contínuo quanto a aplicação em dose única demonstraram eficácia equivalente na modulação do estresse oxidativo, sem diferenças estatisticamente significativas entre os protocolos.

Em conjunto, esses achados indicam que o fulerol é um nanomaterial promissor para a modulação do estresse oxidativo associado a infecções por arbovírus, atuando na atenuação dos danos celulares decorrentes da perda da homeostase redox. Contudo, por se tratar de uma caracterização preliminar *in vitro*, os resultados sugerem que futuras investigações sobre diferentes estratégias de administração, incluindo o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, bem como estudos *in vivo* e análises dos mecanismos moleculares envolvidos, poderão esclarecer com maior precisão o seu potencial e confirmar seu potencial de aplicação biológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, Leticia Trindade. **Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes na infecção pelo vírus Zika in vitro e in vivo**. 2020. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2020. Orientadora: Cintia Lopes de Brito Magalhães.

ASSEMI, S.; TADJIKI, S.; DONOSE, B. C.; *et al.* **Aggregation of fullerol C60(OH)₂₄ nanoparticles as revealed using flow field-flow fractionation and atomic force microscopy**. *Langmuir*, Washington, v. 26, n. 20, p. 16063–16070, 2010. DOI: 10.1021/la102942b

BAKRY, R. *et al.* Medicinal applications of fullerenes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2, n. 4, p. 639–649, 2007. PMCID: PMC2676800. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2676800/>. Acesso em: 2 ago. 2026.

BARRETO-VIEIRA, Debora Ferreira *et al.* **Structural investigation of C6/36 and Vero cell cultures infected with a Brazilian Zika virus**. *PLOS ONE*, v. 12, n. 9, e0184397, 2017.

BELLEZZA, I. *et al.* Oxidative stress in age-related macular degeneration: **Nrf2 as therapeutic target**. *Frontiers in Pharmacology*, Lausanne, v. 9, p. 1280, 2018. DOI: 10.3389/fphar.2018.01280.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e zika)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2023.

CAMINI, Fernanda Caetano *et al.* Oxidative stress in Mayaro virus infection. **Virus research**, v. 236, p. 1-8, 2017.

CHAUDHURI, S. *et al.* **Fullerene-based antioxidants and their biomedical applications**. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 10, n. 15, p. 2772-2789, 2022.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DE MUNICÍPIOS (CNM). **Zika também pode estar relacionado ao aumento de casos da síndrome de Guillain-Barré**. Disponível em: <https://cnm.org.br/comunicacao/noticias/zika-tambem-pode-estar-relacionado-ao-aumento-de-casos-da-sindrome-de-guillan-barre>. Acesso em: 5 maio 2026.

DA SILVA CAETANO, Camila Carla *et al.* **Mayaro virus induction of oxidative stress is associated with liver pathology in a non-lethal mouse model.** *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

DE CASTRO-JORGE, Luiza A. *et al.* The NLRP3 inflammasome is involved with the pathogenesis of Mayaro virus. **PLoS pathogens**, v. 15, n. 9, p. e1007934, 2019.

DE LÁTORRE, P. *et al.* Hydroxylated fullerenes (fullerenols): chemistry, biological properties and biomedical applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, 2022.

DELLINGER, A. *et al.* Application of fullerenes in nanomedicine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 1191–1208, 2013. DOI: 10.2147/IJN.S41256. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S41256>. Acesso em: 2 ago. 2026.

DI ALMEIDA, Fátima Cristiane Pinho *et al.* **Vertical transmission of chikungunya virus: a systematic review.** *PLOS ONE*, v. 16, n. 4, e0249266, 2021. DOI doi.org. Disponível em: plos.org. Acesso em: 11 jul. 2026.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; ABRAMOV, A. Y. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, p. 179-188, 2015.

DULBECCO, Renato. **Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 38, n. 8, p. 747–752, 1952.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Reflection paper on nanotechnology-based medicinal products for human use.** London: EMA, 2021.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology.** Silver Spring: FDA, 2022.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **First chikungunya vaccine (Ixchiq) approved.** Silver Spring: FDA, 2023.

FREPPPEL, W.; SILVA, L. A.; STAPLEFORD, K. A.; HERRERO, L. J. **Pathogenicity and virulence of chikungunya virus.** *Virulence*, v. 15, n. 1, 2024. DOI: 10.1080/21505594.2024.2396484.

GHAZI-KHANSARI, M. et al. Fullerene C60 and its derivatives: dynamic nanostructures in biomedical applications. **Toxicol Appl Pharmacol**, 2013.

HALLIWELL, B. **Understanding mechanisms of antioxidant action in health and disease.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 25, p. 13-33, 2024. DOI: 10.1038/s41580-023-00645-4.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 5th ed. Oxford: Oxford University Press, 2015.

HERENG, A.; THYRSTED, J.; HOLM, C. K. **NRF2 in viral infection.** *Antioxidants*, Basel, v. 10, n. 9, p. 1491, 2021. DOI: 10.3390/antiox10091491

INJAC, R. **Potential Medical Use of Fullerenols After Two Decades of Oncology Research.** *Technology in Cancer Research & Treatment*, v. 22, 2023. DOI: 10.1177/15330338231201515.

JELÍNEK, R.; ZBOŘIL, R.; KOLÁŘOVÁ, K. Fullerenes and fullerols in biomedicine. **Nanomaterials**, v. 13, n. 8, p. 1385, 2023. DOI: 10.3390/nano13081385. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nano13081385>. Acesso em: 2 ago. 2026.

KRATCHANOVA, M. et al. Free radical scavenging activity of fullerlenols. **Free Radical Research**, v. 39, n. 11, p. 1151-1158, 2005.

KUZMENKO, Yulia V. *et al.* **Nonstructural protein 1 of tick-borne encephalitis virus induces oxidative stress and activates antioxidant defense by the Nrf2/ARE pathway.** *Intervirology*, v. 59, n. 2, p. 111–117, 2016.

MALAVÉ-MALAVÉ, Mayra. **Zika: 10 anos do surto que mudou a história da saúde materno e infantil no Brasil.** Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), 2025. Acesso em: 5 maio 2026.

MAJOUGA, A. et al. Fullerenols as nanotherapeutics: synthesis, antioxidant properties and biomedical applications. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, p. 45, 2020.

MALTA, Wellington Carvalho. **Caracterização da atividade antioxidante do fullerol em infecções por Zika virus e Chikungunya virus.** 2023. 96 f. Dissertação (Mestrado em

Biotecnologia) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2023.

MANIERO, Viviane C. *et al.* **Dengue, chikungunya e zika vírus no Brasil: situação epidemiológica, aspectos clínicos e medidas preventivas.** Almanaque Multidisciplinar de Pesquisa, v. 1, n. 1, p. 54-69, 2016.

MEDIGHOUSI, A. *et al.* Mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress in Flavivirus and Alphavirus infections. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 14, p. 5421–5438, 2021.

MEHTA, D.; CHAUDHARY, S.; SUNIL, S. **Oxidative stress governs mosquito innate immune signalling to reduce chikungunya virus infection in Aedes-derived cells.** *Journal of General Virology*, v. 105, 2024. DOI: 10.1099/jgv.0.001966.

MUSSO, Didier; KO, Albert I.; BAUD, Didier. **Zika virus infection — after the pandemic.** *The New England Journal of Medicine*, v. 387, n. 2, p. 123–134, 2022.

NGO, V.; DUENNWALD, M. L. **Nrf2 and oxidative stress: a general overview of mechanisms and implications in human disease.** *Antioxidants*, Basel, v. 11, n. 12, p. 2345, 2022. DOI: 10.3390/antiox11122345.

OLAGNIER, David *et al.* **Cellular oxidative stress response controls the antiviral and apoptotic programs in Zika virus-infected cells.** *Redox Biology*, Amsterdam, v. 24, p. 101156, 2019. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101156.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Nanomaterials in health: regulatory challenges and future perspectives.** Paris: OECD, 2022.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Atualização Epidemiológica: Arboviroses nas Américas.** Washington, D.C.: OPAS, 2022.

PAIXÃO, E. S.; TEIXEIRA, M. G.; RODRIGUES, L. C. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. **BMJ Global Health**, v. 3, n. Suppl 1, p. e000530, 2018.

PEREIRA, Samille Henriques. **Avaliação da atividade antioxidante do fulerol em infecções por Zika vírus**. 2020. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2020. Orientador: Breno de Mello Silva.

RAMEZANI, Ali; NAHAD, Mehdi Parsa; FAGHIHLOO, Ebrahim. **The role of Nrf2 transcription factor in viral infection**. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 119, n. 8, p. 6366–6382, 2018.

SAHOO, B. R. et al. **Redox regulation and metabolic dependency of Zika virus replication: inhibition by Nrf2-antioxidant response and NAD(H) antimetabolites**. *Journal of Virology*, v. 97, n. 2, 2023. DOI: 10.1128/jvi.01363-22.

SCHWARTZ, Olivier; ALBERT, Marc L. **Biology and pathogenesis of chikungunya virus**. *Nature Reviews Microbiology*, v. 22, n. 5, p. 275-288, 2024.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453-R462, 2014.

SHAN, Chao et al. **Zika virus vaccines: progress and challenges**. *Cell Host & Microbe*, v. 31, n. 4, p. 631-645, 2023.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. **Oxidative stress**. *Annual Review of Biochemistry*, Palo Alto, v. 86, p. 715–748, 2017. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037.

SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic **physiological signalling agents**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, London*, v. 21, n. 7, p. 363–383, 2020. DOI: 10.1038/s41580-020-0230-3.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180-183, 2015.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 715-748, 2017.

SILVA, Luis A.; DERMODY, Terence S. **Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies**. *Journal of Clinical Investigation*, v. 133, n. 5, e164551, 2023.

SILVA, R. C. et al. **Chikungunya virus: unveiling its global impact (2002–2024). Reviews in Medical Virology**, 2025.

SOARES-SCHANOSKI, A.; JURADO, T.; CORTÉS, A.; et al. **Chikungunya virus induces NLRP3 inflammasome activation and interleukin-1 β production in murine bone marrow-derived macrophages**. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, 2019.

SOUZA, W. M. et al. **Arboviroses emergentes e reemergentes no Brasil: desafios e perspectivas**. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 27, n. 3, p. 845-856, 2022.

SUDEEP, Anakkathil Balan et al. **Differential susceptibility and replication potential of Vero E6, BHK-21, RD, A-549, C6/36 cells and Aedes aegypti mosquitoes to three strains of chikungunya virus**. *The Indian Journal of Medical Research*, v. 149, n. 6, p. 771-778, 2019.

TEIXEIRA, Maria Glória et al. **Epidemiologia das arboviroses no Brasil**. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 37, n. 10, e00234520, 2021.

TONELLI, C. et al. Transcriptional regulation by Nrf2. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 29, n. 17, p. 1727-1745, 2018.

TORRES-SANGUINO, G. et al. **Antileishmanial activity of fullerol and its liposomal formulation in experimental models of visceral leishmaniasis**. *Parasitology International*, v. 87, p. 102513, 2022.

TSUDA, T. et al. **Market trends and clinical efficacy of fullerene-based products in health and cosmetics**. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 17, n. 4, p. 512-527, 2021.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **BMM 160 – Microbiologia básica para farmácia: cultivo, isolamento e quantificação dos vírus**. São Paulo: USP, 2019. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/course/view.php?id=70549>. Acesso em: 25 maio 2021.

WANG, H.; JOSEPH, J. A. **Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader**. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 27, n. 5-6, p. 612-616, 1999.

WANG, Y. et al. **Fullerenol nanoparticles as potent antioxidants: mechanisms and biomedical applications**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, 2022.

WEAVER, Scott C.; LECUIT, Mathieu. **Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease**. The New England Journal of Medicine, v. 386, n. 13, p. 1231–1239, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO guidelines for clinical management of arboviral diseases. **Geneva: World Health Organization**, 2024. Disponível em: [WHO Guidelines for Clinical Management of Arboviral Diseases](#). Acesso em: 14 jul. 2026.

YU, Daliang et al. **Improved detection of reactive oxygen species by DCFH-DA: new insight into self-amplification of fluorescence signal by light irradiation**. Sensors and Actuators B: Chemical, v. 339, p. 129878, 2021.

DECLARAÇÃO DE USO DE FERRAMENTAS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

Durante a elaboração do presente Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), a autora utilizou a ferramenta de Inteligência Artificial ChatGPT, versão GPT-5.5, desenvolvida pela OpenAI, com os seguintes objetivos:

- Auxiliar na revisão ortográfica, gramatical e na melhoria da clareza, coesão e fluidez dos parágrafos;
- Sugerir aprimoramentos na organização e estrutura do texto acadêmico, sem alterar o conteúdo científico produzido pela autora.

Declaro que todas as contribuições geradas pela ferramenta de Inteligência Artificial foram cuidadosamente revisadas, validadas e supervisionadas por mim. A IA não foi utilizada para a geração autônoma de resultados científicos, análise conclusiva de dados, interpretação dos resultados ou substituição do julgamento crítico da autora.

Assumo total e exclusiva responsabilidade pelo conteúdo intelectual, originalidade, precisão e integridade ética do material apresentado.

Mariana – MG, 15 de julho de 2026.

Luiza Pereira Cunha

Autora

Prof. Dr. Breno de Mello Silva

Orientador