

Laurita Boff

**TRIAGEM ANTI-HERPÉTICA DE PLANTAS MEDICINAIS &  
AVALIAÇÃO DO MECANISMO DA AÇÃO DE *Strychnos*  
*pseudoquina* A. St. Hil., LOGANIACEAE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Maria Oliveira Simões  
Coorientador: Dr. Jadel Müller Kratz

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Boff, Laurita

TRIAGEM ANTI-HERPÉTICA DE PLANTAS MEDICINAIS & AVALIAÇÃO DO MECANISMO DA AÇÃO DE *Strychnos pseudoquina* A. St. Hil., LOGANIACEAE / Laurita Boff ; orientadora, Cláudia Maria Oliveira Simões ; coorientador, Jadel Müller Kratz. - Florianópolis, SC, 2016.  
125 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Plantas Mediciniais. 3. *Strychnos pseudoquina*. 4. HSV. 5. Mecanismo de Ação. I. Simões, Cláudia Maria Oliveira . II. Kratz, Jadel Müller . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

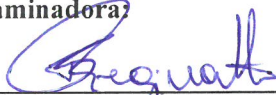
**TRIAGEM ANTI-HERPÉTICA DE PLANTAS MEDICINAIS &  
AVALIAÇÃO DO MECANISMO DA AÇÃO DE *Strychnos*  
*pseudoquina* A. St. Hil., LOGANIACEAE**

**POR**

**Laurita Boff**

Dissertação julgada e aprovada  
em sua forma final pelo(a)  
Orientador(a) e membros da  
Banca Examinadora, composta  
pelos Professores Doutores:

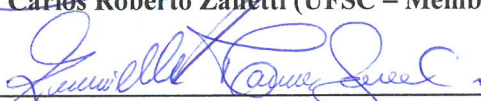
**Banca Examinadora:**



**Prof. Dr. Flávio Henrique Reginato (UFSC – Membro Titular)**



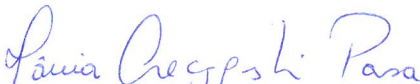
**Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti (UFSC – Membro Titular)**



**Dr.ª Francielle Tramontini Gomes de Sousa Cardozo (USP –  
Membro Titular)**



**Prof.ª Dr.ª Cláudia Maria Oliveira Simões (UFSC – Orientadora)**



**Prof.ª Dr.ª Tânia Beatriz Creczynski Pasa**

**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da  
UFSC**

**Florianópolis, 22 de fevereiro de 2016.**



Dedico este trabalho aos meus pais,  
Lauri e Beatriz, a minha irmã  
Lizandra e a minha nona Angela.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por guiar meus passos e por permitir a conclusão de mais uma etapa importante da minha vida.

Aos meus pais, Lauri e Beatriz, pela educação, pelo apoio, pela compreensão e por me incentivarem a buscar meus objetivos.

A minha irmã Lizandra e a minha nona Angela, pelo companheirismo, amizade, apoio e carinho.

À Professora Cláudia Maria Oliveira Simões pela amizade, motivação, apoio, incentivo, por aceitar me orientar sem me conhecer e pelo imenso aprendizado propiciado, fundamentais para a minha formação acadêmica e profissional.

Ao Dr. Jadel Müller Kratz, pela coorientação, pelas amostras utilizadas na triagem inicial, pelas sugestões e correções.

Ao Professor Eloir Paulo Schenkel (CIF/CCS/UFSC) e à Professora Judith Rollinger (Universidade de Viena, Áustria), por terem gentilmente cedido muitas das amostras do projeto hERGSscreen que foram aqui testadas.

Ao Professor Alexandre de Barros Falcão Ferraz (ULBRA, RS), por ter gentilmente cedido algumas das amostras avaliadas.

À Professora Maique Weber Biavatti e à sua aluna de Doutorado Tamires Cardoso, por terem gentilmente cedido algumas das amostras utilizadas.

Ao Professor João Paulo Leite (Universidade de Viçosa, MG) e à sua aluna de Mestrado Letícia Monteiro Farias, por terem gentilmente cedido as amostras de *Strychnos pseudoquina*.

As minhas amigas e colegas, Clarissa Feltrin, Débora Argenta e Izabella Thaís da Silva, pelos valiosos ensinamentos, conversas e pelo apoio durante a realização do presente trabalho.

Não menos importante, a todos os meus amigos do Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) pela excelente convivência diária. Registro aqui meu muito obrigada a Ana Dominot, Ana Zeredo, Ariadne, Camila, Dóris, Elisabet, ElMahdy, Gislaine, Henrique, Lara, Lucas Garcia, Lucas Marostica, Mariana, Naira, Paula, Talitha, Vanessa e Vitor.

Aos membros da banca examinadora pelas pertinentes contribuições, as quais melhoraram significativamente a qualidade deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) pela infraestrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

Estendo meus agradecimentos a todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desta Dissertação.



## RESUMO

Os produtos naturais constituem uma fonte de grande importância na descoberta de substâncias biologicamente ativas, desempenhando um papel fundamental na pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novas terapias anti-herpéticas, como por exemplo, para o tratamento das infecções de mucosas e pele causadas pelos Herpes Simplex Virus tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2). Atualmente, o arsenal terapêutico anti-herpético é restrito e o surgimento de cepas resistentes ao tratamento de primeira escolha (aciclovir) tem dificultado o manejo dessas infecções. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo realizar uma triagem anti-herpética de plantas medicinais, visando identificar amostras com atividade promissora. Dentre as 103 amostras avaliadas, *Calea phyllolepis* e *Strychnos pseudoquina* apresentaram os melhores resultados. Por questões de ordem prática, a elucidação do mecanismo da ação anti-herpética foi realizada apenas com *S. pseudoquina*. Foram investigados os efeitos anti-HSV do extrato acetato de etila padronizado (EAEP), preparado com as cascas dos caules dessa planta, juntamente com seus dois compostos obtidos por meio de um fracionamento biomonitorado, a saber: quercetina 3-*O*-metil éter (3MQ) e strychnobiflavona (SBF). A SBF apresentou os resultados mais promissores quando comparados aos do EAEP, enquanto que a 3MQ não apresentou ação antiviral significativa, nas condições testadas. Em seguida, no intuito de determinar o mecanismo da ação anti-herpética do EAEP e da SBF, diferentes estratégias metodológicas foram utilizadas. Foi constatado que o mecanismo da atividade anti-herpética destas duas amostras frente ao HSV-1 parece ser mediado, parcialmente, pela sua ação virucida, pela inibição da adsorção, pós-adsorção e penetração viral, bem como pela redução da expressão das proteínas virais  $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\gamma$ . Em relação ao HSV-2, a ação antiviral observada parece ser mediada, também parcialmente, pelo seu efeito profilático e ação virucida, bem como pela inibição da adsorção, pós-adsorção e penetração viral. Em resumo, os resultados apresentados para ambos os vírus, confirmaram que o EAEP e a SBF afetam as fases iniciais do ciclo de replicação dos HSV.

**Palavras-chave:** plantas medicinais, *Strychnos pseudoquina*, extrato acetato de etila padronizado, quercetina 3-*O*-metil éter strychnobiflavona, HSV-1, HSV-2, mecanismo de ação.



## ABSTRACT

Natural products constitute an important source of biologically active substances, playing a key role in the research and development (R&D) of novel antiherpes therapies; for example, in the treatment of skin and epithelial mucosa infections associated with Herpes Simplex Virus types 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2). The current antiherpes drug options are restricted and the treatment of HSV infections with acyclovir has resulted in the emergence of resistant virus strains, hindering the management of such infections. In this study we performed an antiherpes screening of medicinal plants, aiming to identify samples with promising activity. Among the 103 samples tested, *Calea phyllolepis* and *Strychnos pseudoquina* extracts showed the best results. For practical reasons, we only determined the mechanism of action of *S. pseudoquina*. Particularly, we investigated the anti-HSV effects of standardized ethyl acetate extract (SEAE), prepared with the stem barks of this plant, along with two isolated compounds obtained by a bioassay-guided fractionation, namely: quercetin 3-*O*-methyl ether (3MQ) and strychnobiflavone (SBF). The SBF showed the most promising results when compared to those of the SEAE, while 3MQ showed no significant antiviral action at the concentrations and experimental conditions employed here. Then, in order to determine the antiherpes mechanism of action of SEAE and SBF, different methodological strategies were used. It was observed that the mechanism of antiherpes activity of SEAE and SBF against HSV-1 seems to be mediated, partially, by their virucidal action, the inhibition of adsorption, post adsorption and viral penetration, as well as by the reduction of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  proteins expression. Concerning the anti-HSV-2 action, it seems to be mediated, also partially, by their prophylactic effect, virucidal action, and the inhibition of adsorption, post adsorption and viral penetration. In summary, the results presented for both viruses, have confirmed that SEAE and SBF mainly affect the early stages of HSV replication cycle.

**Keywords:** medicinal plants, *Strychnos pseudoquina*, standardized ethyl acetate extract, quercetin 3-*O*-methyl ether, strychnobiflavone, HSV-1, HSV-2, mechanism of action.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estrutura da partícula viral dos HSV. ....	33
Figura 2.2. Ciclo de replicação dos HSV. ....	38
Figura 2.3. Bioativação do aciclovir em trifosfato de aciclovir. ....	45
Figura 2.4. <i>Strychnos pseudoquina</i> A. St. Hil. ....	50
Figura 5.1. Perfil cromatográfico correspondente ao extrato acetato de etila padronizado (EAEP), obtido com as cascas dos caules de <i>Strychnos pseudoquina</i> e estruturas dos compostos majoritários: quercetina 3- <i>O</i> -metil éter (3MQ) e strychnobiflavona (SBF). ....	85
Figura 5.2. Resultados da avaliação da atividade virucida [HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333)] do extrato acetato de etila padronizado (EAEP) de <i>Strychnos pseudoquina</i> e da strychnobiflavona (SBF) dele isolada, por meio da técnica de redução do número das placas de lise, expressos em valores de CV <sub>50</sub> (µg/mL). ....	89
Figura 5.3. Resultados da inativação do HSV-2 (cepa 333), na presença de soluções proteicas (BSA = <i>bovine serum albumine</i> e SFB = soro fetal bovino) e do extrato acetato de etila padronizado (EAEP) de <i>Strychnos pseudoquina</i> e da strychnobiflavona (SBF) dele isolada.....	91
Figura 5.4. Resultados do pré-tratamento e do tratamento simultâneo, expressos em valores de CI <sub>50</sub> do extrato acetato de etila padronizado (EAEP) de <i>Strychnos pseudoquina</i> e da strychnobiflavona (SBF) dele isolada testadas frente ao HSV-1 (cepa KOS) e ao HSV-2 (cepa 333). 97	97
Figura 5.5. Efeitos do extrato acetato de etila padronizado (EAEP) obtido a partir de <i>Strychnos pseudoquina</i> e da strychnobiflavona (SBF) dele isolada na expressão de proteínas do HSV-1 (cepa KOS). ....	99
Figura 5.6. Efeitos do extrato acetato de etila padronizado (EAEP) obtido a partir de <i>Strychnos pseudoquina</i> e da strychnobiflavona (SBF) dele isolada na liberação do HSV-1 (cepa KOS) em células Vero. ....	101
Figura 5.7. Proposta do mecanismo da ação anti-HSV-1 do extrato acetato de etila padronizado (EAEP) obtido a partir de <i>Strychnos pseudoquina</i> e da strychnobiflavona (SBF) dele isolada.....	102
Figura 5.8. Proposta do mecanismo da ação anti-HSV-2 do extrato acetato de etila padronizado (EAEP) obtido a partir de <i>Strychnos pseudoquina</i> e da strychnobiflavona (SBF) dele isolada.....	103



## LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1. Classificação geral dos herpes vírus humanos. ....	26
Quadro 2.2. Propriedades biológicas gerais das subfamílias $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ – <i>Herpesvirinae</i> . ....	27
Quadro 2.3. Glicoproteínas dos HSV. ....	35
Quadro 2.4. Estruturas químicas dos fármacos anti-herpéticos disponíveis e seus alvos moleculares. ....	44
Quadro 4.1. Espécies vegetais avaliadas neste trabalho. ....	54
Quadro 4.2. Proteínas expressas pelo HSV-1 (cepa KOS) analisadas por <i>Western blotting</i> . ....	66
Quadro 5.1. Interpretação de sinergismo e antagonismo em estudos de combinação entre duas ou mais substâncias pelo método de determinação do Índice Combinatório (IC), descrito por Chou (2006). ....	105





## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Soroprevalência do HSV-1 no Brasil por faixa etária. ....	30
Tabela 5.1. Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados. ....	71
Tabela 5.2. Resultados da triagem inicial da citotoxicidade e atividade anti-herpética. ....	73
Tabela 5.3. Resultados da avaliação da citotoxicidade em células Vero e da atividade anti-HSV-1 (cepa KOS). ....	80
Tabela 5.4. Resultados da avaliação da citotoxicidade em células Vero e da atividade anti-HSV-1 (cepa 29-R). ....	82
Tabela 5.5. Resultados da avaliação da citotoxicidade em células Vero e da atividade anti-HSV-2 (cepa 333). ....	83
Tabela 5.6. Resultados da citotoxicidade e da atividade anti-herpética do EAEP de <i>Strychnos pseudoquina</i> e de seus compostos isolados (SBF e 3MQ). ....	87
Tabela 5.7. Resultados do ensaio de inibição da adsorção e da pós-adsorção viral, expressos em valores de $CI_{50}$ do EAEP de <i>Strychnos pseudoquina</i> e da SBF dele isolada. ....	93
Tabela 5.8. Resultados do ensaio de inibição da penetração viral, expressos em valores de $CI_{50}$ do EAEP de <i>Strychnos pseudoquina</i> e da SBF dele isolada. ....	95
Tabela 5.9. Efeitos obtidos na combinação do aciclovir (ACV) com o extrato acetato de etila padronizado (EAEP) obtido a partir de <i>Strychnos pseudoquina</i> e a strychnobiflavona (SBF) dele isolada sobre a atividade anti-HSV-1 e anti-HSV-2. ....	107



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3MQ: Quercetina 3-*O*-metil éter  
ACV: Aciclovir  
CC: Controle celular  
CC<sub>50</sub>: Concentração que reduz em 50 % a viabilidade celular  
CI<sub>50</sub>: Concentração que inibe 50% da infecção viral  
CMC: Carboximetilcelulose  
CV: Controle viral  
CV<sub>50</sub>: Concentração virucida a 50%  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
DO: Densidade ótica  
EAEP: Extrato acetato de etila padronizado  
ECP: Efeito citopático viral  
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético  
FDA: *Food and Drug Administration*  
HIV-1: *Human Immunodeficiency Virus type 1*  
HSV-1: *Herpes Simplex Virus type 1*  
HSV-2: *Herpes Simplex Virus type 2*  
HVEM: *Herpesvirus entry mediator*  
ICP: *Infected cell proteins*  
ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*  
IR: Ineficiência residual  
IS: Índice de seletividade  
LATs: Transcrições associadas à latência  
MEM: *Minimal Essential Medium*  
MOI: *Multiplicity of Infection*  
PBS: *Phosphate Buffered Saline*  
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase  
PSA: Solução contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina  
SA: Sem atividade  
SBF: Strychnobiflavona  
SDS: Dodecil sulfato de sódio  
SFB: Soro fetal bovino  
TK: *Thymidine Kinase*  
UFP/mL: Unidade formadora de placa por mililitro  
Vhs: *Virion host shutoff*  
VP: *Viral protein*



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1. Herpesvírus.....</b>	<b>25</b>
2.1.1. Herpes Simplex Virus (HSV).....	28
2.1.2. Estrutura dos HSV.....	32
2.1.3. Ciclo viral, expressão gênica e replicação dos HSV .....	37
<b>2.2. Terapia antiviral.....</b>	<b>43</b>
<b>2.3. Terapia anti-herpética .....</b>	<b>43</b>
<b>2.4. Compostos antivirais de origem natural .....</b>	<b>47</b>
2.4.1. Gênero <i>Strychnos</i> L.....	48
2.4.2. <i>Strychnos pseudoquina</i> A. St. Hil. ....	49
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. Objetivo geral .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>51</b>
<b>4. MATERIAIS &amp; MÉTODOS .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1. Material vegetal.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2. Culturas celulares.....</b>	<b>56</b>
4.2.1. Células.....	56
4.2.2. Meio de cultura e reagentes.....	56
<b>4.3. Vírus .....</b>	<b>56</b>
4.3.1. Origem das cepas virais.....	56
4.3.2. Preparo das suspensões-estoques virais.....	57
4.3.3. Determinação dos títulos infecciosos virais .....	57
<b>4.4. Avaliação da citotoxicidade.....</b>	<b>59</b>
<b>4.5. Avaliação da potencial atividade antiviral – triagem anti-herpética inicial .....</b>	<b>60</b>
4.5.1. Ensaio de redução do número das placas de lise.....	60
<b>4.6. Avaliação do mecanismo da ação anti-herpética.....</b>	<b>61</b>
4.6.1. Avaliação da ação virucida direta .....	62
4.6.2. Avaliação virucida das amostras na presença de soluções ricas em proteínas .....	63
4.6.3. Avaliação dos efeitos das amostras na adsorção viral.....	63
4.6.4. Avaliação dos efeitos das amostras na penetração viral.....	64
4.6.5. Avaliação dos efeitos do tempo de adição das amostras no ciclo de replicação viral .....	65
4.6.6. Avaliação dos efeitos das amostras na expressão das proteínas do HSV-1 (cepa KOS).....	66
4.6.7. Avaliação dos efeitos das amostras na liberação viral .....	68

<b>4.7. Avaliação dos efeitos antivirais das amostras em combinação com o aciclovir.....</b>	<b>69</b>
<b>4.8. Análise estatística.....</b>	<b>69</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>5.1. Determinação dos títulos infecciosos virais.....</b>	<b>71</b>
<b>5.2. Triagem anti-herpética inicial de plantas medicinais.....</b>	<b>71</b>
<b>5.3. Fracionamento biomonitorado de <i>Strychnos pseudoquina</i>.....</b>	<b>84</b>
5.3.1. Avaliação da citotoxicidade.....	86
5.3.2. Avaliação da atividade anti-herpética.....	86
<b>5.4. Estudo do mecanismo da ação anti-herpética.....</b>	<b>87</b>
5.4.1. Avaliação da ação virucida direta.....	87
5.4.2. Avaliação da ação virucida na presença de soluções ricas em proteínas.....	90
5.4.3. Avaliação dos efeitos das amostras na adsorção viral.....	92
5.4.4. Avaliação dos efeitos das amostras na penetração viral.....	94
5.4.5. Avaliação dos efeitos do tempo de adição das amostras no ciclo de replicação viral.....	95
5.4.6. Avaliação dos efeitos das amostras na expressão das proteínas do HSV-1 (cepa KOS).....	97
5.4.7. Avaliação dos efeitos das amostras na liberação viral.....	100
<b>5.5. Proposta preliminar do mecanismo da ação anti-herpética do EAEP e da SBF.....</b>	<b>101</b>
<b>5.6. Avaliação dos efeitos antivirais das amostras em combinação com o aciclovir.....</b>	<b>104</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>109</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>111</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>113</b>

# 1. INTRODUÇÃO

Algumas das mais importantes doenças humanas são de origem viral, dentre as quais se destacam aquelas provocadas pelos vírus herpéticos simples, causadores de lesões orais, esofágicas, genitais e retais (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013). Atualmente, estima-se que 60-95% da população mundial adulta esteja infectada por, pelo menos, um dos Herpes Simplex Virus (HSV-1 e/ou HSV-2), representando um importante problema de saúde pública, sobretudo pela capacidade desses vírus de causarem infecções agudas e recorrentes bem como por estarem associados a um aumento na transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BRADY; BERNSTEIN, 2004; CELUM, 2004).

O tratamento padrão das infecções causadas pelos HSV emprega o fármaco aciclovir (MAMIDYALA; FIRESTINE, 2006; ROTTINGHAUS; WHITLEY, 2007; DE CLERCQ, 2013a). Embora tal fármaco seja eficaz e seletivo, o surgimento de cepas resistentes tem dificultado o manejo das infecções herpéticas, visto que a maioria dos fármacos compartilha o mesmo mecanismo de ação implicando resistência cruzada (BACON et al., 2003; MORFIN; THOUVENOT, 2003). Uma das grandes dificuldades na pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos antivirais se deve à simplicidade da estrutura viral e à inerente dependência dos processos metabólicos celulares utilizados para replicação e sobrevivência. Assim, agentes que promovem a morte e/ou inibem a replicação viral também apresentam, em diferentes graus, toxicidade às células (WHITE; FENNER, 1994).

Apesar da síntese orgânica desempenhar um papel relevante no processo de P&D de medicamentos, os compostos de origem natural são ainda uma fonte de grande importância na descoberta de novos fármacos para o combate de doenças (BUTLER; NEWMAN, 2008). A

biodiversidade do planeta é composta por um número estimado de mais de 300.000 espécies de plantas e quase dois milhões de espécies de fungos, insetos e organismos marinhos, o que a torna um reservatório inigualável de diversidade biológica e química. Contudo, apesar dos esforços até então despendidos, grande parte dessa biodiversidade ainda não foi adequadamente explorada no contexto terapêutico (GANESAN, 2008; HARVEY, 2008; BOHLIN et al., 2010).

Logo, a busca por novos compostos farmacologicamente ativos obtidos a partir de produtos naturais tem se consolidado como um tema de pesquisa de grande relevância prática (ATANASOV et al., 2015; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Dentre os medicamentos aprovados pela agência norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA), desde o ano de 2000, estima-se que mais da metade seja derivada de fontes naturais. Em um curto período de tempo (aproximadamente três anos), 22 fármacos, que foram introduzidos no mercado farmacêutico mundial, são derivados de substâncias diretamente relacionadas com produtos naturais. Em um futuro próximo, acredita-se que variações totalmente sintéticas de produtos naturais farão parte do arsenal terapêutico utilizado pelos profissionais da saúde para o tratamento dos mais variados tipos de doenças (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Nesse contexto, o grupo de pesquisa vinculado ao Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Maria Oliveira Simões, vem, há vários anos, se empenhando na P&D de novos agentes anti-herpéticos eficazes, com efeitos adversos mínimos e mecanismos de ação diferenciados, que poderão complementar a terapêutica já existente. Assim, o presente trabalho pretende fortalecer e dinamizar essa área de pesquisa já tradicional no Programa de Pós-Graduação em Farmácia, por meio de estratégias experimentais na avaliação biomonitorada de extratos de plantas medicinais com potencial atividade antiviral e na elucidação de seu(s) mecanismo(s) de ação anti-herpética.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Herpesvírus

Os vírus herpéticos foram encontrados em diversos organismos, incluindo os de sangue frio e quente, vertebrados e invertebrados. Esses vírus são patógenos antigos que coevoluíram com o homem e outras espécies ao longo de mais de 200 milhões de anos (FORSGREN; KLAPPER, 2009; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014). Tais vírus fazem parte da família *Herpesviridae*, a qual inclui mais de 200 espécies, sendo oito dessas espécies infecciosas para o homem (Quadro 2.1). De acordo com suas propriedades biológicas, o Grupo de Estudo em Herpesvírus do Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV, 2014) classificou os vírus herpéticos em três subfamílias: *α-Herpesvirinae*, *β-Herpesvirinae* e *γ-Herpesvirinae* (Quadro 2.2).

Quadro 2.1. Classificação geral dos herpes vírus humanos.

<b>Nome oficial</b>	<b>Subfamília</b>	<b>Gênero</b>	<b>Nome comum e abreviação</b>	<b>Sítio de latência</b>
Herpes vírus Humano-1	<i>α-Herpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	Herpes Simplex Virus tipo 1 (HSV-1)	Gânglios nervosos sensoriais
Herpes vírus Humano-2	<i>α-Herpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	Herpes Simplex Virus tipo 2 (HSV-2)	Gânglios nervosos sensoriais
Herpes vírus Humano-3	<i>α-Herpesvirinae</i>	<i>Varicellovirus</i>	Vírus da Varicella-Zoster (VZV)	Gânglios nervosos sensoriais
Herpes vírus Humano-4	<i>γ-Herpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	Vírus Epstein-Barr (EBV)	Leucócitos e células epiteliais
Herpes vírus Humano-5	<i>β-Herpesvirinae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	Citomegalovírus humano (CMV)	Linfócitos B
Herpes vírus Humano-6A	<i>β-Herpesvirinae</i>	<i>Roseolovirus</i>	Vírus Herpes Humano Tipo 6A (HHV-6A)	Linfócitos T (CD4 <sup>+</sup> ) e células epiteliais
Herpes vírus Humano-6B	<i>β-Herpesvirinae</i>	<i>Roseolovirus</i>	Vírus Herpes Humano Tipo 6B (HHV-6B)	Linfócitos T (CD4 <sup>+</sup> ) e células epiteliais
Herpes vírus Humano-7	<i>β-Herpesvirinae</i>	-	Vírus Herpes Humano Tipo 7 (HHV-7)	Linfócitos T (CD4 <sup>+</sup> )
Herpes vírus Humano-8	<i>γ-Herpesvirinae</i>	<i>Rhadinovirus</i>	Herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV)	Linfócitos B e células epiteliais

Fonte: adaptado de FORSGREN; KLAPPER (2009).

Quadro 2.2. Propriedades biológicas gerais das subfamílias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  – *Herpesvirinae*.

Subfamília	Hospedeiros	Ciclo reprodutivo	Infecção
<i><math>\alpha</math>-Herpesvirinae</i>	Variados	Relativamente curto	Disseminação rápida em cultura de células, destruição irreversível das células infectadas e capacidade de estabelecer infecção latente, primariamente, mas não exclusivamente, em gânglios sensoriais.
<i><math>\beta</math>-Herpesvirinae</i>	Restritos	Longo	Processo lento de infecção em cultura de células. Os vírus podem permanecer na forma latente em glândulas secretoras, células linforreticulares, rins e outros tecidos.
<i><math>\gamma</math>-Herpesvirinae</i>	Limitados	Todos se replicam em células linfoblastoides ( <i>in vitro</i> ), sendo que alguns causam infecções com destruição irreversível em certos tipos de células fibroblásticas e epitelioides.	Os vírus são específicos de linfócitos T ou B. Na célula linfocitária, a infecção pode estabelecer-se como latente ou lítica, mas sem produção de uma progênie infecciosa. Com frequência, demonstra-se a presença do vírus latente no tecido linfoide.

Fonte: adaptado de LUPI; PEREIRA JR (2000) e FORSGREN; KLAPPER (2009).

### 2.1.1. Herpes Simplex Virus (HSV)

As infecções pelos HSV dos tipos 1 e 2 são comuns e onipresentes, tendo um impacto considerável na sociedade independente da região geográfica ou da condição socioeconômica da população, as quais estão geralmente associadas a infecções oculares, orofaciais e no trato genital. Os sintomas causados pela infecção são geralmente autolimitantes em indivíduos imunocompetentes, mas podem ser graves e prolongados em pacientes imunocomprometidos (MCALLISTER; SCHLEISS, 2014; NAVID et al., 2014).

Os HSV foram os primeiros vírus herpéticos humanos a serem descobertos e são os mais intensamente estudados (WATANABE, 2010). Apesar dos inúmeros estudos feitos em animais, nenhum modelo animal pode mimetizar exatamente a doença tal como ocorre em humanos; todavia, esses estudos fornecem informações significativas sobre os mecanismos patogênicos da infecção em humanos (FORSGREN; KLAPPER, 2009).

O homem é o único hospedeiro natural dos HSV. A transmissão dos vírus requer o contato direto entre um indivíduo susceptível e outro que liberará ativamente os vírus. A contaminação viral é obtida pela infecção das superfícies mucosas ou por meio de abrasões ou cortes na pele. A replicação dos vírus ocorre no local da infecção e produz uma viremia de curta duração. Esta infecção primária é normalmente assintomática, mas, em uma minoria de casos, pode levar a sintomas locais e até mesmo sistêmicos (STEINER; KENNEDY; PACHNER, 2007; FORSGREN; KLAPPER, 2009).

Geralmente, o HSV-1 é associado a infecções orofaciais e o HSV-2 com infecções do trato geniturinário. Contudo, esta distinção anatômica não é mais considerada tão rígida como antes (STEINER; KENNEDY; PACHNER, 2007; MCALLISTER; SCHLEISS, 2014). Devido ao tropismo específico, o HSV-1 infecta predominantemente as membranas da mucosa e pele da região orolabial; no entanto, nas últimas décadas passou a ser visto com mais frequência na genitália, devido ao aumento do contato orogenital desprotegido. Apesar desse tropismo por regiões “acima e abaixo da cintura”, não existe um local específico para cada tipo de HSV, já que ocorre frequentemente uma coinfeção (GARLAND; STEBEN, 2014). Além disso, infecções oculares por HSV-1 são a principal causa de cegueira em países desenvolvidos, com episódios recorrentes de reativação viral levando a cicatrizes progressivas e opacidade da córnea; o HSV-1 também causa

encefalite e várias desordens do sistema nervoso periférico (SCHUPPE et al., 2008; BELLO-MORALES et al., 2012).

O HSV-2 é sexualmente transmissível, sendo responsável por causar meningite em adultos e meningoencefalite em neonatos. Estima-se que 500 milhões de pessoas, em todo o mundo, estejam infectadas por esse tipo viral, calculando-se 23 milhões de novas infecções por ano, o que a torna uma das infecções mais prevalentes do mundo (STEINER; KENNEDY; PACHNER, 2007; LEE et al., 2013; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; MCALLISTER; SCHLEISS, 2014).

A soroprevalência do HSV-1 atinge 50-70% em países desenvolvidos e 100% nos países em desenvolvimento, já o HSV-2 possui uma soroprevalência de 10-40%, podendo atingir de 60-95% em indivíduos infectados com o HIV e profissionais do sexo. Esses dados indicam que existe um grande reservatório desses vírus no mundo (GELLER et al., 2012; LEGOFF; PERE; BELEC, 2014). Ainda, segundo estudo realizado por Bradley et al. (2014), nos EUA, entre 2005 e 2010, a soroprevalência do HSV-1 foi de 53,9% e do HSV-2 foi de 15,7%. De 1999-2004 e de 2005-2010, a soroprevalência do HSV-1 diminuiu cerca de 7%, enquanto que a do HSV-2 não apresentou alterações significativas. O maior declínio foi observado na faixa etária de 14 a 19 anos. A soroprevalência do HSV-2 tende a ser maior nos países em desenvolvimento, com taxas de 80% encontradas em algumas nações da África subsaariana (BRADLEY et al., 2014; MCALLISTER; SCHLEISS, 2014).

Dados mais atuais mostraram que a prevalência do HSV-1, na faixa etária de 0-49 anos, em todo o mundo, no ano de 2012, foi em torno de 67% (correspondendo a aproximadamente 3.709 bilhões de pessoas), sendo maior na África, Sudoeste da Ásia e Pacífico Ocidental. Já para o HSV-2, na faixa etária de 15-49 anos, foi em torno de 11,3% (correspondendo a aproximadamente 417 milhões de pessoas), sendo também maior na África, Sudoeste da Ásia e Pacífico Ocidental. (LOOKER et al., 2015a; LOOKER et al., 2015b).

Existem alguns fatores que influenciam a tendência atual da prevalência do HSV-1 superando o HSV-2 (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014). Em populações não expostas a fatores de risco, a prevalência do HSV-1 tende a aumentar linearmente com a idade, com picos durante a infância e adolescência. Atualmente, essa prevalência é maior que 40% aos 15 anos de idade e de 60-90% em adultos. Em países desenvolvidos, ela é de 20% aos cinco anos de idade e de 40-60% entre 20 e 40 anos. Outro fator contribuinte é a etnia, cuja

prevalência é de 35% em indivíduos afro-americanos e de 18% em caucasianos americanos, aos cinco anos de idade. Com relação ao perfil socioeconômico, em regiões menos industrializadas (Estônia, Índia, Marrocos e Sri Lanka), a taxa de soropositividade do HSV-1 é mais elevada, ocorrendo precocemente na infância. Particularmente no Brasil, os dados epidemiológicos mais atuais são apresentados na Tabela 2.1 (GELLER et al., 2012).

Tabela 2.1. Soroprevalência do HSV-1 no Brasil por faixa etária.

<b>Faixa etária</b>	<b>Soroprevalência</b>
1 a 4	36%
5 a 9	52,4%
10 a 14	68,1%
15 a 19	83,3%
20 a 29	83,6%
30 a 35	95,2%
35 a 44	96%
> 45	94,6%

Fonte: adaptado de GELLER et al. (2012).

Outro aspecto epidemiológico importante é a coinfeção dos tipos do HSV com outros vírus de interesse público. Segundo Gupta, Warren e Wald (2007), a infecção genital pelo HSV aumenta em três vezes o risco de adquirir HIV. O HSV-2, considerado o vírus mais comum causador de úlceras genitais no mundo, possui soroprevalência de 60-90% em pessoas HIV-1+. Os sintomas são geralmente leves ou não reconhecidos na maioria das pessoas infectadas com o HIV-1, mas podem causar úlceras genitais graves em pessoas com AIDS em estágio avançado. Estudos laboratoriais e epidemiológicos também sugerem que o HSV-2 pode aumentar a infecciosidade do HIV-1; todavia, ao utilizar um tratamento adequado para o HSV-2 torna-se possível diminuir a transmissão do HIV-1 (CELUM et al., 2010).

A latência é o ponto chave para o sucesso dos HSV como um importante patógeno humano, permitindo a persistência dos vírus na presença de uma resposta imune e uma infecção desenvolvida ao longo da vida do hospedeiro. A latência pode ser definida como a presença do genoma viral no tecido hospedeiro, sem a produção de partículas virais infecciosas (STEINER; KENNEDY; PACHNER, 2007). Como resultado da reativação periódica dos vírus latentes e a produção de infecções recorrentes, a secreção dos vírus e a transmissão da infecção

aos indivíduos susceptíveis ocorrem em intervalos ao longo da vida, permitindo que os vírus persistam na população (EFSTATHIOU; PRESTON, 2005; FORSGREN; KLAPPER, 2009; SILVA et al., 2010; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013; SON et al., 2013; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; MCALLISTER; SCHLEISS, 2014). Apesar de a maioria das infecções latentes serem clinicamente assintomáticas, o cérebro parece ser um importante sítio de latência, pois o DNA do HSV-1 foi encontrado na massa cinzenta cerebral em 34% de casos de mortes por doenças não neurológicas (WATSON et al., 2013).

Durante a infecção primária, os vírus entram em contato com os receptores cutâneos dos nervos sensoriais locais, ligando-se e penetrando. Uma vez internalizados, os nucleocapsídeos movem-se para a extremidade bulbosa do neurônio, utilizando o fluxo retrógrado axoplasmático de uma célula normal. O DNA viral é liberado, entra no núcleo e imediatamente sofre circularização. A expressão gênica viral é então rigidamente restrita, de modo que a cascata usual dessa expressão e os resultados citopáticos da infecção produtiva não ocorrem. Dessa forma, uma infecção latente nas células nervosas é estabelecida. No estado latente, acredita-se que o vírus exista como DNA circular extracromossômico (análogo a plasmídeos). A resposta imune do hospedeiro elimina rapidamente as partículas virais e células infectadas em regiões periféricas, mas não reconhece o tecido nervoso com infecção latente como abrigo desses vírus, uma vez que não há antígenos virais expressos nas membranas celulares (EFSTATHIOU; PRESTON, 2005; FORSGREN; KLAPPER, 2009; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

O local de latência dos vírus está relacionado com o local da infecção primária: para o HSV-1 usualmente é o gânglio trigêmeo e para o HSV-2 é o gânglio sacral. Outros gânglios da raiz dorsal, incluindo o cervical superior, o vagal e o genicular podem também abrigar o genoma destes vírus (EFSTATHIOU; PRESTON, 2005; FORSGREN; KLAPPER, 2009).

Aparentemente, nenhuma proteína viral é produzida nos neurônios latentemente infectados, mas existem inúmeras transcrições de RNA (vírus específicas) chamadas de transcrições associadas à latência (LATs). Vírus mutantes que não produzem LATs (isto é, LAT-negativas) também são capazes de estabelecer latência. Por pelo menos duas décadas, inúmeros estudos tentaram definir o papel das LATs e, mais recentemente, o papel dos RNAs virais no ciclo de replicação dos HSV. A hipótese de que sejam essenciais para o

estabelecimento da latência é insustentável; acredita-se que as LATs podem ser classificadas como os únicos transcritos virais que se acumulam durante a latência e influenciam na eficiência da mesma (FORSGREN; KLAPPER, 2009; NICOLL; EFSTATHIOU, 2013; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013; CAVALLERO et al., 2014).

Uma infecção recorrente é produzida pela reativação do vírus latente. Uma variedade de desencadeadores não específicos deste processo tem sido descritos, por exemplo, irradiação ultravioleta (UV), lesão aos tecidos inervados pelos neurônios latentes infectados, estresse físico ou emocional, febre, menstruação e desequilíbrio hormonal. No entanto, a base molecular desses desencadeadores ainda não é totalmente compreendida (EFSTATHIOU; PRESTON, 2005; THOMPSON, 2006; FORSGREN; KLAPPER, 2009; WATANABE, 2010; ROIZMAN; WHITLEY, 2013).

Alguns estudos sobre a infecção do HSV-1 em cultura de células embrionárias humanas do gânglio espinal propõem que a saída dos vírus a partir dos nervos sensoriais é feita através de um fluxo axoplasmático anterógrado, em vesículas de transporte. Assim, os vírus liberados infectam as células adjacentes da pele, replicam-se e continuam a infectar outras células por meio da propagação intercelular viral (*cell-to-cell spread*) (FORSGREN; KLAPPER, 2009).

Para o diagnóstico laboratorial das infecções sintomáticas pelos HSV, a cultura da amostra em questão (swab de lesão mucocutânea) em células permissivas é o padrão-ouro, porém para a obtenção do resultado é necessário um tempo bastante longo (até sete dias). No entanto, a imunofluorescência de células infectadas retiradas de uma lesão é mais rápida e com sensibilidade de 95%. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pode também ser utilizada já que fornece uma resposta rápida. A sorologia viral não é tão útil clinicamente na seleção do tratamento, visto que não possibilita diferenciar o tipo 1 do tipo 2, ou infecções duplas (GARLAND; STEBEN, 2014).

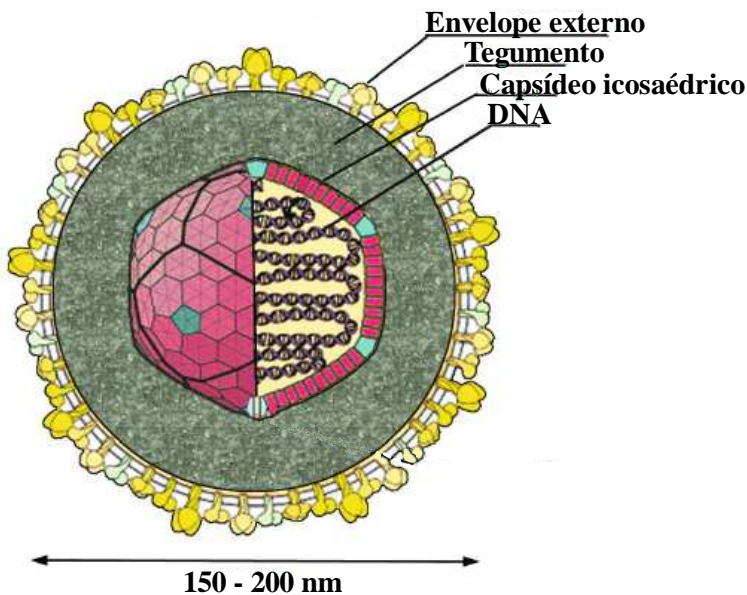
### 2.1.2. Estrutura dos HSV

As partículas virais são esféricas possuindo 186 nm de diâmetro com picos salientes de glicoproteínas, fazendo com que o seu diâmetro total seja de aproximadamente 225 nm (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014). As partículas virais são constituídas por quatro componentes básicos (Figura 2.1): ocupando uma posição excêntrica tem-se o núcleo com DNA de fita dupla linear (152 pb no HSV-1 e 155 pb no HSV-2) rica em GC (68% para o HSV-1 e 69% para o



HSV-2), circundado por um **capsídeo icosaédrico**, que consiste de 162 capsômeros (150 hexâmeros e 12 pentâmeros), rodeado por uma matriz de proteína não estrutural chamada de **tegumento**. Esse consiste em uma camada amorfa com algumas regiões estruturadas contendo filamentos de 7 nm de largura apostos à membrana, sendo composto por 26 proteínas com diversas funções (LUPI; PEREIRA JR, 2000; POST et al., 2004; STEINER; KENNEDY; PACHNER, 2007; WATANABE, 2010; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014). Mais externamente, há o **envelope**, composto por uma bicamada lipídica e 11 glicoproteínas (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL e gM) e, pelo menos, duas proteínas de membrana não glicosiladas (U<sub>L</sub>20 e U<sub>S</sub>9). A fixação inicial das partículas virais nos receptores celulares e a subsequente penetração das mesmas nas células hospedeiras são mediadas pelas glicoproteínas presentes no envelope viral e já foram bastante estudadas (Quadro 2.3) (BERGSTROM; TRYBALA, 1996; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014).

Figura 2.1. Estrutura da partícula viral dos HSV.



Fonte: adaptado de KUKHANOVA; KOROVINA e KOCHETKOV (2014).

As glicoproteínas de superfície são os principais alvos da resposta dos anticorpos na infecção pelos HSV. Alguns epítomos nelas presentes são compartilhados pelos HSV-1 e HSV-2, o que faz com que eles tenham um grau de reatividade cruzada bastante alto. Além disso, as glicoproteínas gB, gC, gD e gE podem desencadear respostas imunes potentes. No entanto, nenhuma reatividade cruzada entre a glicoproteína gG1 do HSV-1 e a gG2 do HSV-2 foi detectada e, por isso, os anticorpos de tais glicoproteínas são utilizados para discriminar o tipo viral por sorologia, quando necessário. As principais diferenças antigênicas entre o HSV-1 e o HSV-2 referem-se aos epítomos tipo-específicos encontrados em algumas das glicoproteínas envolvidas (BERGSTROM; TRYBALA, 1996; FORSGREN; KLAPPER, 2009; LEGOFF; PERE; BELEC, 2014). O Quadro 2.3 inclui algumas informações sobre as glicoproteínas dos HSV.

O HSV-1 e o HSV-2 compartilham homologia genômica de 40%, que atinge 83% para as regiões de codificação de proteínas, o que pode explicar as numerosas semelhanças biológicas e a reatividade antigênica entre eles. Seus genomas codificam pelo menos 80 polipeptídeos estruturais e não estruturais diferentes, incluindo pelo menos 10 glicoproteínas virais diferentes, das quais a maioria está ancorada no envelope viral (GARLAND; STEBEN, 2014; LEGOFF; PERE; BELEC, 2014).

Quadro 2.3. Glicoproteínas dos HSV.

<b>Nomenclatura</b>	<b>Gene</b>	<b>Essencial para a infeciosidade do vírus?</b>	<b>Função</b>
gB	U <sub>L</sub> 27	Sim	Essencial para a entrada dos vírus nas células e também induz anticorpos neutralizantes.
gC	U <sub>L</sub> 44	Não	Envolvida na ligação dos vírus às células e pode ter um papel no bloqueio da resposta do hospedeiro à infecção.
gD	U <sub>S</sub> 6	Sim	Necessária após a ligação dos vírus às células. Interage com os três receptores celulares que permitem a entrada dos vírus nas células e, conseqüentemente, determina o tropismo viral. Permite fusão da partícula viral do envelope com a membrana plasmática por meio da fusão mediada por gB, gH e gL.
gE	U <sub>S</sub> 8	Não	Forma um heterodímero com a gI. O complexo gE-gI constitui um receptor Fc, que está envolvido no rompimento da defesa imunológica do hospedeiro. Esse complexo também facilita a propagação basolateral da progênie viral em células polarizadas, sugerindo um papel no transporte das partículas virais.

(continua)

(continuação)

<b>Nomenclatura</b>	<b>Gene</b>	<b>Essencial para a infecciosidade do vírus?</b>	<b>Função</b>
gG	U <sub>S</sub> 4	Não	Função desconhecida, a gG2 do HSV-2 é maior que a gG1 do HSV-1 e os diferentes determinantes antigênicos podem ser utilizados para a diferenciação de ambos, na resposta imune.
gH	U <sub>L</sub> 22	Sim	Essencial para a infecciosidade viral e para a fusão célula-célula de células infectadas. O transporte da gH a partir do aparelho de Golgi requer interação com a gL solúvel. Ela induz anticorpos neutralizantes.
gI	U <sub>S</sub> 7	Não	Mesmas funções da gE.
gJ	U <sub>S</sub> 5	Não	Menor glicoproteína relacionada e tem como papel bloquear a apoptose.
gK	U <sub>L</sub> 53	Não	Acredita-se que tenha um papel na prevenção da fusão de células infectadas com outras células.
gL	U <sub>L</sub> 1	Sim	Interage com a gH, conforme detalhado acima. Provavelmente, regula a atividade fusogênica da gH.
gM	U <sub>L</sub> 10	Não	Interage com o produto de U <sub>L</sub> 49.5. Parece ser necessária para a embalagem de U <sub>L</sub> 49.5 nas partículas virais.

Fonte: adaptado de FORSGREN; KLAPPER (2009).

### 2.1.3. Ciclo viral, expressão gênica e replicação dos HSV

O ciclo de replicação viral é dividido em cinco etapas:

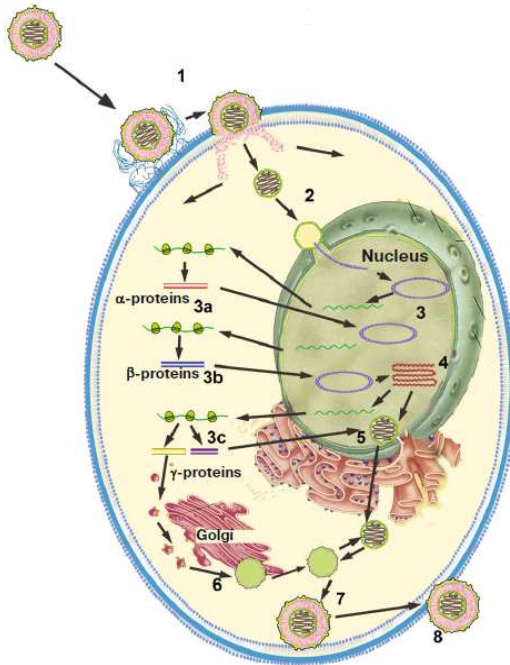
- 1) entrada dos vírus nas células hospedeiras;
- 2) expressão de genes virais;
- 3) replicação propriamente dita;
- 4) montagem das partículas virais; e
- 5) liberação da nova geração de partículas virais.

Resumidamente, para iniciar a infecção, os vírus se ligam aos receptores de superfície celular. Em seguida, ocorre rapidamente a fusão do envelope com a membrana plasmática e a liberação do capsídeo no citoplasma, o qual é transportado para os poros nucleares, pelos quais o DNA é introduzido no núcleo. Isso resulta na transcrição gênica e replicação do DNA viral bem como na montagem dos novos capsídeos.

Em linhagens celulares permissivas, o ciclo de replicação *in vitro* leva aproximadamente 18 a 20 horas, e é citolítico. Até o momento, foram propostas duas vias de entrada para os HSV, que diferem de acordo com as células infectadas. No principal mecanismo (Figura 2.2), as glicoproteínas de superfície viral ligam-se às células hospedeiras (fase essencial deste processo), por meio de receptores específicos. Em seguida, ocorre a fusão do envelope viral com a membrana plasmática e posterior transporte do capsídeo viral para o núcleo. A endocitose da partícula viral envelopada é a via alternativa de entrada dos vírus nas células, seguida da fusão do envelope com vesículas intracelulares (LUPI; PEREIRA JR, 2000; CONNOLLY et al., 2011; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014).

Figura 2.2. Ciclo de replicação dos HSV.

1) fixação da partícula viral e entrada na célula; 2) transporte para o núcleo; 3) expressão dos genes virais: imediato ( $\alpha$ ), precoce ( $\beta$ ) e tardio ( $\gamma$ ); 4) replicação do DNA viral; 5) montagem do nucleocapsídeo; 6) maturação do capsídeo; 7) formação do envelope e 8) liberação da nova partícula viral.



Fonte: adaptado de KUKHANOVA; KOROVINA e KOCHETKOV (2014).

Abaixo seguem detalhes sobre cada uma das etapas do processo de replicação viral:

**Etapa 1 (entrada dos vírus nas células hospedeiras):** Os vírus empregam várias glicoproteínas multifuncionais para mediar a sua entrada nas células hospedeiras. A **adsorção** da partícula viral à superfície celular é mediada pelas glicoproteínas virais gC e gB. No caso do HSV-1, ela parece ser mediada pela gC e, em menor grau, pela gB, enquanto que no caso do HSV-2 a ligação ocorre pela gB, sendo que ambas interagem com os glicosaminoglicanos da superfície celular, em

particular o sulfato de heparana. Em células desprovidas de sulfato de heparana, a interação ocorre com unidades equivalentes de outros glicosaminoglicanos de proteoglicanos da superfície celular, tais como sulfato de condroitina. Embora a gB seja necessária para a fusão dos HSV, sua atividade de ligação ao sulfato de heparana não é essencial para a entrada do vírus na célula hospedeira. A gC não possui função obrigatória na entrada dos HSV, sendo dispensável para a ligação viral *in vitro*. No entanto, a eliminação da gC diminui a eficiência da adsorção (CONNOLLY et al., 2011; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

Na etapa de **ligação**, é necessária a interação da gD com um dos três tipos de receptores celulares: as nectinas-1 e -2, o mediador específico da entrada do vírus herpético [*Herpesvirus Entry Mediator* (HVEM)], ou o 3-*O*-sulfato de heparana sulfatado (3-*O*-S-HS). Por isso, eles são considerados alvos terapêuticos atrativos para o desenvolvimento de fármacos anti-herpéticos (FORSGREN; KLAPPER, 2009; LIU; HOMA, 2009; LEE et al., 2013; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014). O HVEM é expresso em vários tecidos, incluindo linfócitos T e B, células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, sendo considerado um membro da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral. Já as nectinas-1 e -2 são expressas em vários tecidos e tipos celulares, incluindo células epiteliais, fibroblastos e neurônios, as quais são membros da superfamília de receptores de imunoglobulinas (SPEAR, 2004).

A ligação da gD aos receptores celulares desencadeia a **fusão** da membrana celular com o envelope viral por interação com o complexo gB e o heterodímero gH/gL. O mecanismo exato e os participantes desse processo não foram ainda completamente elucidados, mas sabe-se que a região N-terminal da gD interage com os receptores celulares, provocando a liberação do domínio C-terminal, que ativa o complexo gB e gH/gL, desencadeando assim a fusão da membrana. Quando a gD não está ligada, o domínio C-terminal é bloqueado. Outra função interessante da gD é a supressão da apoptose nas células infectadas pelos HSV (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014).

Depois da entrada da partícula viral, o capsídeo sem envelope é transportado para os poros nucleares com posterior transferência para o núcleo. Os HSV viajam através das células por longas distâncias, especialmente em neurônios. Utilizando-se ensaios bioquímicos e microscopia por imunofluorescência indireta, foi demonstrado que o capsídeo viral é transportado para o núcleo ao longo da rede de microtúbulos, por meio da interação da proteína do tegumento U<sub>L</sub>34

com a dineína celular. O genoma viral é então liberado, o capsídeo vazio é deixado no citoplasma e então o DNA viral imediatamente altera sua forma de fita dupla linear para a forma circular (SODEIK; EBERSOLD; HELENIUS, 1997; LIU; HOMA, 2009; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014). A entrada do genoma viral é acompanhada pela entrada das proteínas do tegumento VP16 e *vhs* (*virion host shutoff*). Acredita-se que a proteína *vhs* permaneça no citoplasma, promovendo a degradação do RNA celular e viral, e a VP16, juntamente com as proteínas celulares Oct-1 e HCF-111, promovem a transcrição imediata (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

**Etapa 2 (expressão de genes virais):** Os genes dos HSV são classificados em três grupos, de acordo com a regulação da sua expressão: imediato ( $\alpha$ ), precoce ( $\beta$ ) e tardio ( $\gamma$ ) (WATANABE, 2010). Na chegada a um poro nuclear, o DNA viral é liberado a partir do capsídeo para o núcleo da célula (local onde ocorre a transcrição, replicação do DNA viral e produção de novos capsídeos), onde imediatamente se difunde. Para iniciar a transcrição, o DNA difundido liga-se a uma proteína da célula hospedeira (Oct-1), a uma proteína do tegumento (VP16) e a outros fatores de transcrição para promover a expressão de genes  $\alpha$  (2 a 4 h pós-infecção), que é o primeiro conjunto de genes virais a serem transcritos. A maioria dos genes imediatos codificam proteínas reguladoras, enquanto que os produtos dos genes precoces estão envolvidos na replicação do DNA viral. Muitas das proteínas estruturais são codificadas pelos genes tardios, que não são expressos até a síntese de DNA viral. O DNA viral é transcrito em todo o ciclo replicativo pela RNA polimerase II da célula hospedeira, mas com participação de fatores virais em todas as fases da infecção (LUPI; PEREIRA JR, 2000; FORSGREN; KLAPPER, 2009; LIU; HOMA, 2009; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

Seis genes (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 e  $U_S1.5$ ) são atribuídos ao grupo de genes imediatos; cinco deles (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e  $U_S1.5$ ) ativam a transcrição de genes  $\beta$ , em vários tipos de células, codificando os fatores responsáveis pela transcrição dos genes virais restantes e pela evasão do sistema imune do hospedeiro. Dois desses, ICP4 e ICP27, são essenciais para promover a expressão gênica viral (mutantes nulos não apresentam replicação viral). A ICP27 redistribui os complexos nucleares ribonucleicos e interfere no *splicing* (remoção dos íntrons) dos transcritos  $\alpha$  (HARDY; SANDRI-GOLDIN, 1994). Desta forma, essa proteína se faz necessária para a transição da expressão dos genes  $\alpha$  para a expressão dos genes  $\beta$  e  $\gamma$ . A síntese do



DNA viral é iniciada pela expressão dos genes precoces ( $\beta$ ) enquanto que os genes tardios ( $\gamma$ ) codificam as proteínas estruturais da partícula viral. Proteínas imediatas ( $\alpha$ ) realizam múltiplas funções e executam uma reorganização dos processos celulares de interesse do vírus (POST et al., 2004; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014).

A presença da proteína do tegumento VP16 é importante para que ocorra a transcrição dos genes imediatos ( $\alpha$ ). Ao contrário de outros genes virais, todos os genes  $\alpha$  contêm várias cópias da sequência de consenso, 5'GyATGnTAATGArATTCTTnGGG3', onde y é uma base de pirimidina, r é uma base de purina e n representa qualquer base. A proteína VP16 interage com este fator de transcrição e juntamente com a proteína HCFC1 formam um complexo que ativa a transcrição dos genes  $\alpha$  (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014).

Outra proteína, ICP0, contém o domínio E3, possuindo atividade ubiquitina-ligase para uma vasta gama de substratos. O início da degradação proteossômica de algumas das proteínas, que participam da defesa celular contra a infecção viral, pode ocorrer por meio de interação direta ou indireta e por fosforilação do substrato. Por exemplo, em culturas primárias de fibroblastos, o alvo da ubiquitinação mediada por ICP0 é a proteína IFN- $\gamma$  induzível 16 (IFI16), localizada no núcleo e responsável pela ativação de resposta imune inata, ativada pela presença do DNA viral. A ICP0, semelhantemente à proteína VP16 mencionada acima, também pode ativar a condensação e o relaxamento da cromatina viral (POST et al., 2004; KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014). Outros estudos indicaram que a ICP0 é necessária para a replicação viral eficiente como também para a reativação da latência. Além disso, durante a infecção viral, ela inativa alguns componentes da defesa antiviral celular e de vias de resposta ao estresse. A atividade de ubiquitina-ligase da ICP0 e sua habilidade de estimular a infecção sugerem um funcionamento a favor da replicação viral, seja durante uma infecção primária ou recorrente, tornando-a um alvo atraente para a concepção de fármacos anti-HSV (SMITH; BOUTELL; DAVIDO, 2011).

**Etapa 3 (replicação propriamente dita):** A expressão dos genes  $\alpha$  leva a ativação dos genes  $\beta$ , que codificam, principalmente, enzimas envolvidas na síntese e replicação do DNA viral: uma subunidade catalítica da DNA polimerase ( $U_L30$ ) e sua proteína acessória ( $U_L42$ ), proteína de ligação ao DNA simples fita (ICP8), complexo helicase-primase formado por 3 proteínas ( $U_L5$ ,  $U_L8$  e  $U_L52$ ), uma proteína de ligação ( $U_L9$ ), além das enzimas envolvidas no metabolismo do ácido

nucleico (por exemplo, ribonucleotídeo redutase, timidina cinases, timidilatosintetase, DNAase alcalina, dUTPase, etc.) e na síntese do DNA (por exemplo, DNA-polimerase, helicase, primase, etc.). O pico de síntese de produtos de genes  $\beta$  é observado entre 5 a 7 horas pós-infecção, e a replicação do DNA viral se inicia quando níveis suficientes destas proteínas acumulam nas células infectadas. A expressão dos genes  $\alpha$  é reduzida significativamente após o início da replicação do DNA, enquanto que os genes tardios começam a ser expressos em níveis elevados. Considera-se que o DNA dos HSV replique por um mecanismo cíclico, empacotando o genoma de DNA no nucleocapsídeo (LUPI; PEREIRA JR, 2000; FORSGREN; KLAPPER, 2009).

**Etapa 4 (montagem das partículas virais):** A síntese do nucleocapsídeo e de todas as outras proteínas estruturais ocorrem devido à indução da expressão dos genes  $\gamma$  (12 h pós-infecção) pelos produtos dos genes  $\beta$ . Os capsídeos dos HSV são montados em torno das proteínas andaimes virais no núcleo das células e, em seguida, outras proteínas virais interagem com o DNA viral replicado para permitir a encapsulação do mesmo. As proteínas do tegumento também migram para o núcleo das células e formam depósitos proteicos sob a membrana nuclear modificada. Os HSV, ao contrário de outros vírus envelopados, são conhecidos por embalarem aproximadamente 20 a 30 proteínas entre o capsídeo e o envelope na região do tegumento. Os capsídeos preenchidos de DNA associam-se com proteínas do tegumento próximo da membrana nuclear. As glicoproteínas virais passam por extensas modificações pós-tradução, durante a passagem pelo aparelho de Golgi, sendo então inseridas nas membranas nucleares (LUPI; PEREIRA JR, 2000; FORSGREN; KLAPPER, 2009; LIU; HOMA, 2009; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

**Etapa 5 (liberação da nova geração de partículas virais):** Os nucleocapsídeos maduros tornam-se infecciosos por meio da germinação da lamela interna da membrana nuclear e recebem seu envelope e tegumento. Assim, as novas partículas virais são liberadas a partir das células infectadas transitando nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso do aparelho de Golgi e nas vesículas de transporte citoplasmático. A infecção produtiva das células hospedeiras resulta na sua destruição, por meio de grandes mudanças estruturais e bioquímicas induzidas pela replicação do vírus (LUPI; PEREIRA JR, 2000; FORSGREN; KLAPPER, 2009; LIU; HOMA, 2009; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

## 2.2. Terapia antiviral

O arsenal terapêutico antiviral é reduzido e complexo, baseando principalmente em duas abordagens: fármacos antivirais que agem diretamente nos vírus e fármacos antivirais que agem na resposta imune do hospedeiro (MARTINEZ et al., 2015). Em contraste com o grande número de medicamentos antibacterianos e antifúngicos disponíveis, o de antivirais é bastante reduzido e eles são originários predominantemente de produtos naturais. Até março de 2014, havia 50 fármacos antivirais devidamente aprovados pelo FDA, sendo 26 deles indicados para o tratamento de pacientes HIV+ ou com AIDS e o restante, usado para tratar as infecções causadas pelos vírus das hepatites B e C, vírus herpéticos e vírus influenza. Essa prevalência de fármacos antirretrovirais deve-se ao surgimento do vírus HIV, que impulsionou a P&D de novos fármacos antivirais, aliada a necessidade de se controlar as infecções persistentes, particularmente as infecções graves para as quais nenhuma vacina está disponível (BACON et al., 2003; DE CLERCQ, 2013b, 2013c; MARTINEZ et al., 2015).

## 2.3. Terapia anti-herpética

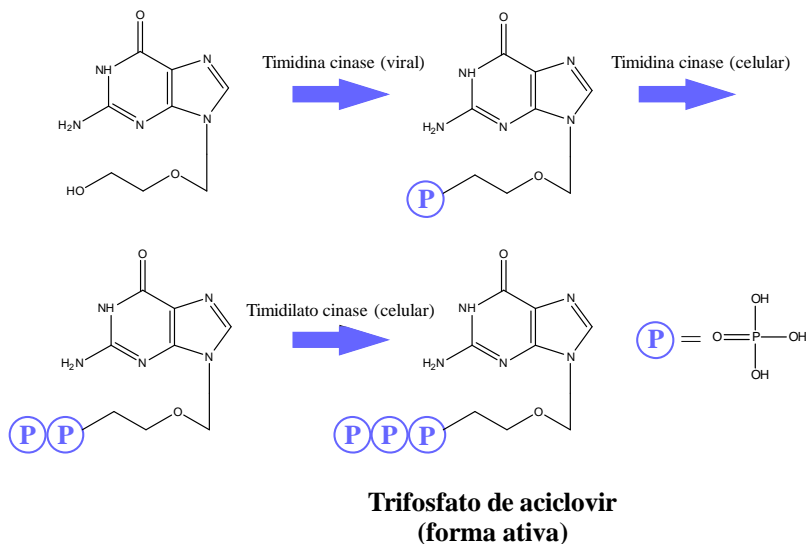
A maioria dos agentes terapêuticos utilizados para o tratamento das infecções herpéticas partilha do mesmo mecanismo de ação, embora possuam diferentes alvos moleculares e vias metabólicas de ativação (pró-fármacos) (Quadro 2.4). Esses fármacos atuam sobre a síntese do DNA viral, através da inibição da DNA polimerase (aciclovir, brivudina, bromodesoxiuridina, cidofovir, citarabina, fanciclovir, fluordesoxiuridina, foscarnet, fomivirsem, ganciclovir, idoxuridina, penciclovir, trifluoruridina, vidarabina, valganciclovir e 5'-aminoidoxuridina). A exceção é o docosanol, que é um inibidor da entrada dos HSV nas células (MAMIDYALA; FIRESTINE, 2006; ROTTINGHAUS; WHITLEY, 2007; JAMES; PRICHARD, 2014).

Quadro 2.4. Estruturas químicas dos fármacos anti-herpéticos disponíveis e seus alvos moleculares.

Inibidores da replicação viral	Inibidor da entrada dos vírus nas células
<p> <b>Aciclovir</b>  <b>Brivudina</b>  <b>Bromodesoxiuridina</b>  <b>Cidofovir</b>  <b>Citarabina</b>  <b>Fanciclovir</b>  <b>Fluordesoxiuridina</b>  <b>Foscarnet</b>  <b>Ganciclovir</b>  <b>Idoxuridina</b>  <b>Penciclovir</b>  <b>Trifluoruridina</b>  <b>Vidarabina</b>  <b>Valganciclovir</b> </p>	<p><b>Docosanol</b></p>

O aciclovir, 9-(2-hidroxietoximetil-guanina), considerado o padrão ouro para o tratamento das infecções herpéticas, é um análogo acíclico de 2-desoxiguanosina. Esse pró-fármaco é convertido intracelularmente em monofosfato de aciclovir pela timidina cinase viral, sendo, posteriormente, fosforilado pelas cinases celulares em trifosfato de aciclovir (forma ativa) (Figura 2.3). O aciclovir trifosfato inibe competitivamente a DNA polimerase viral, atuando como terminador de cadeia, uma vez que a ausência do grupo 3-hidroxila impede a ligação de nucleosídeos adicionais. O aciclovir é, portanto, um agente altamente seletivo, já que é convertido à sua forma ativa apenas nas células infectadas (ROTTINGHAUS; WHITLEY, 2007; EVANS; KUDESIA; MCKENDRICK, 2013; JAMES; PRICHARD, 2014).

Figura 2.3. Bioativação do aciclovir em trifosfato de aciclovir.



Apesar dos análogos de nucleosídeos possuírem a capacidade de inibir a replicação dos HSV, o surgimento de cepas resistentes tem dificultado o manejo das infecções herpéticas, visto que eles compartilham do mesmo mecanismo de ação e possuem resistência cruzada (BACON et al., 2003; MORFIN; THOUVENOT, 2003). Devido à simplicidade da estrutura viral e a inerente dependência dos processos metabólicos celulares utilizados para sua sobrevivência e replicação, agentes que promovem a morte e/ou inibem a replicação dos

vírus geralmente apresentam toxicidade para as células (WHITE; FENNER, 1994). Portanto, a P&D de novos fármacos anti-herpéticos eficazes, com efeitos adversos mínimos e mecanismos de ação diferenciados, que poderão complementar o arsenal terapêutico atualmente disponível, é de grande relevância prática.

Muitos grupos de pesquisa estão envolvidos na busca de uma vacina eficaz para os HSV, que apresente segurança, tolerabilidade e reduzida excreção viral, mas até o momento nenhuma demonstrou êxito. Este desafio é bastante oneroso e complexo. As glicoproteínas virais gB e gD exibem os mais fortes títulos de anticorpos neutralizantes para o HSV-2. Vacinas baseadas nestas proteínas apresentaram diferentes graus de eficácia em modelos animais. O ensaio de neutralização *in vitro* superestima a capacidade de neutralização dos anticorpos *in vivo*; consequentemente, os resultados obtidos com vacinas de subunidades glicoproteicas têm sido decepcionantes. Até o momento, a única vacina eficaz desenvolvida para um vírus herpético humano é a vacina viva atenuada da catapora (varicela), com base na cepa Oka do vírus da varicela zoster (JOHNSTON; KOELLE; WALD, 2014; MCALLISTER; SCHLEISS, 2014).

O estudo clínico da vacina profilática “Herpevac” demonstrou não prevenir a aquisição ou a infecção causada pelo HSV-2, mas se mostrou moderadamente eficaz na prevenção da aquisição e infecção pelo HSV-1 (BELSHE et al., 2012). Os estudos para o desenvolvimento de vacinas profiláticas e terapêuticas contra o HSV-2 continuam, pois novos candidatos, como a G103 (ODEGARD et al., 2015) e modelos murinos experimentais estão sendo intensivamente estudados (DIAZ; KNIPE, 2015). Brevemente, se iniciará um estudo de fase I com uma vacina viva, elaborada com um vírus deficiente em replicação, o HSV529. Outros dois candidatos a vacinas profiláticas contra o HSV-2, que atingiram os estudos de fase II, apresentaram resultados interessantes: a GEN-003, uma vacina contendo gD2 e ICP4, com uma matriz adjuvante para estimular a imunidade das células T, que reduziu a liberação viral em 55%; e a HerpV, uma vacina polipeptídica composta de 32 antígenos do HSV, complexados com a proteína de choque térmico humana 70, que também reduziu a liberação viral, mas somente em 15% (JOHNSTON; COREY, 2016).

Diante do exposto, conclui-se que novas terapias anti-herpéticas são necessárias, não só para o tratamento de infecções resistentes, mas também em terapias de combinação para melhorar a eficácia e a prevenção da resistência, através da utilização de novos agentes antivirais que atuem por diferentes mecanismos de ação.

## 2.4. Compostos antivirais de origem natural

Desde os primórdios da história, as plantas desempenham um papel de grande importância na civilização humana. Juntamente com os animais e os micro-organismos, possibilitaram a geração de inúmeros produtos naturais com potencial atividade biológica bem como farmacológica (NEWMAN; CRAGG, 2007; BUTLER, 2008; LEE, 2010; CRAGG; NEWMAN, 2013; BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014; MARTINEZ et al., 2015; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Durante séculos, os seres humanos têm procurado combater doenças e melhorar sua qualidade de vida. Em muitos países em desenvolvimento, a medicina tradicional (em que a maioria dos tratamentos provém das plantas) é bastante empregada nos cuidados da saúde (LIPIUN et al., 2003). Os compostos de origem natural possuem uma complexa diversidade química estrutural, a qual, muitas vezes considerada como uma desvantagem no que diz respeito à reprodutibilidade por síntese, vem sendo desbravada com êxito devido ao aperfeiçoamento das técnicas e equipamentos usados na síntese orgânica e/ou pela engenharia genética. Apesar da intensa investigação da flora terrestre, estima-se que apenas 6% de cerca de 300 mil espécies de plantas superiores foram sistematicamente investigadas do ponto de vista farmacológico, e apenas 15% do ponto de vista fitoquímico (CLARDY; WALSH, 2004; ROSEN et al., 2009; CRAGG; NEWMAN, 2013; BAUER; BRONSTRUP, 2014).

Preparados à base de plantas vêm sendo amplamente utilizados na medicina tradicional também para o tratamento de muitas doenças infecciosas. Eles representam uma abundante fonte de metabólitos secundários bioativos, sendo de grande interesse para o controle de infecções, como por exemplo, as virais (NAVID et al., 2014). Apesar da grande maioria dos medicamentos antivirais comercializados atualmente ser produzida por síntese, os compostos naturais contribuíram, de forma significativa, para sua P&D, e certamente continuarão a contribuir na P&D de novos fármacos antivirais (MISHRA; TIWARI, 2011; MARTINEZ et al., 2015).

No período de 2005 a 2010, foram introduzidos no mercado farmacêutico mundial 39 fármacos derivados, direta ou indiretamente, de substâncias naturais (por exemplo: peramivir e zanamivir) para o tratamento das mais diversas patologias (NEWMAN; CRAGG, 2012); e de 2010 a 2013, foram 17 novos fármacos também derivados de produtos naturais (BUTLER; ROBERTSON; COOPER, 2014). Dados atuais mostraram que no ano de 2014 foram introduzidos dez novos

fármacos derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Levando em consideração o número reduzido de medicamentos antivirais disponíveis, o surgimento de resistência viral e à existência de vírus para os quais ainda não existe medicação apropriada, o aumento do espectro de fármacos antivirais é altamente necessário. Nesse sentido, a natureza deve continuar a ser estudada com o intuito de contribuir para a P&D de novos agentes terapêuticos e/ou profiláticos para as infecções virais.

#### 2.4.1. Gênero *Strychnos* L.

O gênero *Strychnos* L. é um dos maiores e mais importantes gêneros da família Loganiaceae, incluindo cerca de 200 espécies de árvores, arbustos e trepadeiras, muitas das quais são conhecidas por seus metabólitos secundários bioativos. Este gênero está distribuído na África (em torno de 75 espécies), América do Sul (pelo menos 73 espécies) e Ásia, incluindo Austrália e Polinésia (cerca de 44 espécies) (THONGPHASUK et al., 2003; PHILIPPE et al., 2004; LAGE et al., 2013; ADEBOWALE et al., 2014).

A África, por possuir o maior número de espécies, é considerada o centro de origem do gênero e um número considerável dessas espécies constitui importante fonte de alimento e de produtos usados na medicina tradicional. A correta identificação das espécies do gênero *Strychnos* é de extrema importância, não só para documentar a biodiversidade, mas também para evitar o envenenamento pela ingestão, acidental ou não, de algumas espécies tóxicas desse gênero. Entretanto, a grande similaridade macromorfológica destas plantas, principalmente de suas folhas, tem causado erros no processo de identificação das mesmas (ADEBOWALE et al., 2014).

A toxicidade das espécies de *Strychnos* difere de acordo com a parte da planta utilizada. Algumas espécies são conhecidas por possuírem nas suas sementes o alcaloide estricnina, reconhecido por sua ação tóxica (alcaloide) (THONGPHASUK et al., 2003; PHILIPPE et al., 2004; ADEBOWALE et al., 2014).

Estudos demonstraram a atividade antiviral de algumas espécies de *Strychnos*, como por exemplo, o extrato metanólico das sementes de *S. potatrum* que inibiu o HSV-1 cepa *Seibert* (HATTORI et al., 1995); o extrato etanólico das folhas de *S. minor* que inibiu o vírus do sarampo (LIPIUN et al., 2003); e o extrato metanólico das cascas dos caules de *S. minor* que inibiu o vírus Influenza AP/R/8 (H1N1) (ENKHTAIVAN et al., 2015).



#### 2.4.2. *Strychnos pseudoquina* A. St. Hil.

Esta espécie é conhecida por diversos nomes populares (quina-branca, quina-do-campo, quineira, quina, quina-de-medanha, quina-do-sertão, quina-do-cerrado, quina-grossa, falsa-quina, quina-cruzeiro, quina-da-chapada, quina-de-periquito, quina-de-mato-grosso), e trata-se de uma árvore nativa do cerrado brasileiro, que possui copa alongada e densa, com tronco grosso e cascudo, atingindo de quatro a nove metros de altura. Apresenta folhas simples, de cinco a 12 cm de comprimento, opostas, coriáceas, brilhantes e glabras na face superior, e ferrugíneo-pubescentes na inferior, visivelmente com cinco nervuras na face superior. Suas flores são de coloração creme, perfumadas, e reunidas em pequenas panículas axilares. Os frutos são drupas globosas e comestíveis, e sua multiplicação é feita por sementes (Figura 2.4). Todas as partes da planta possuem um sabor muito amargo e um pouco adstringente, com exceção dos frutos, que possuem sabor adocicado (LORENZI; MATOS, 2008; DE SAINT-HILAIRE, 2009). As cascas da *Strychnos pseudoquina* foram incluídas na 1ª edição da Farmacopeia Brasileira, publicada em 1926, mas foram excluídas das edições subsequentes (COSENZA et al., 2013).

Sua utilização no tratamento de distúrbios orgânicos vem sendo feita com base na tradição popular, embora a eficácia e a segurança do uso desta planta ainda não tenham sido comprovadas cientificamente. Ela é usada como medicação amarga, tônica, febrífuga, indicada principalmente contra moléstias do baço, fígado e estômago. Além disso, é utilizada no tratamento da anemia, dor de cabeça, fraqueza, gases, gripe, perda de cabelo, helmintíase e para “afinar” o sangue (LORENZI; MATOS, 2008; DE SAINT-HILAIRE, 2009; DE MEDEIROS; LADIO; ALBUQUERQUE, 2013).

A principal parte da planta usada na medicina caseira são as cascas dos caules, as quais podem ser utilizadas em infusão ou em pó. Em determinadas regiões do Brasil, é empregada algumas vezes até como substituto da quina-verdadeira para tratar doentes com malária, apesar de não produzir o alcaloide quinina (SANTOS et al., 2006; LORENZI; MATOS, 2008; DE SAINT-HILAIRE, 2009).

Figura 2.4. *Strychnos pseudoquina* A. St. Hil.

Fonte: <http://picssr.com/photos/mercadanteweb/page159?nsid=43256055@N03> e [http://www.kew.org/science/tropamerica/imagedatabase/large1/cat\\_single14009.htm](http://www.kew.org/science/tropamerica/imagedatabase/large1/cat_single14009.htm)

Estudos fitoquímicos revelaram a presença de flavonoides e alcaloides, principalmente nas cascas dos caules, sendo estes últimos diferentes da quinina, e cuja investigação farmacológica demonstrou atividades antiplasmódica e antitumoral (MONACHE; ALDO; MARINI-BETTOLO, 1969; NICOLETTI et al., 1984). Com relação aos flavonoides, foram isolados, de um extrato acetato de etila padronizado obtidos das cascas dos caules, uma biflavona (strychnobiflavona) e uma flavona metoxilada (quercetina 3-*O*-metil éter) e ambas apresentaram ação antimalárica (LAGE et al., 2013).

Existem ainda estudos relatando atividade antiúlcera, tanto para uma fração alcaloídica enriquecida obtida de suas folhas (DA SILVA et al., 2005; BONAMIN et al., 2011), como para o extrato metanólico também obtido de suas folhas (DA SILVA et al., 2005). Além disso, há relatos das ações hipoglicemiantes do extrato etanólico obtido das cascas dos caules (HONORIO-FRANCA et al., 2008), além do potencial genotóxico do extrato metanólico obtido das folhas (SANTOS et al., 2006).

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo geral

Realizar uma triagem anti-herpética de amostras de plantas medicinais, e selecionar a amostra com atividade mais promissora para estudar o seu mecanismo de ação.

### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade das amostras pelo ensaio colorimétrico da sulforrodamina B;
- Realizar a triagem antiviral das amostras, frente ao vírus HSV-1 (cepas KOS e 29-R) e HSV-2 (cepa 333), por meio do ensaio de redução do número das placas de lise;
- Selecionar a amostra com atividade anti-herpética mais promissora e obter, através de uma parceria institucional, os compostos majoritários existentes na planta selecionada;
- Avaliar a ação virucida direta das amostras selecionadas como também na presença de soluções ricas em proteínas;
- Avaliar os efeitos das amostras selecionadas nas fases iniciais da infecção, adsorção, pós-adsorção e penetração viral;
- Avaliar os efeitos do tempo de adição das amostras selecionadas na atividade anti-herpética (pré-tratamento e tratamento simultâneo);
- Avaliar a interferência das amostras selecionadas na expressão proteica do HSV-1 (cepa KOS);
- Avaliar os efeitos das amostras selecionadas na liberação viral;

- Avaliar os efeitos antivirais das amostras selecionadas em associação com o aciclovir; e
- Propor o mecanismo da ação anti-herpética das amostras selecionadas.

## 4. MATERIAIS & MÉTODOS

### 4.1. Material vegetal

As amostras de plantas medicinais foram obtidas localmente<sup>1</sup> e junto a grupos de pesquisa parceiros de universidades europeias e africanas (para detalhes veja o Projeto hERGSscreen – <http://www.uibk.ac.at/pharmazie/pharmakognosie/hergscreen>). Os materiais, provenientes de diferentes partes das plantas, foram coletados ou adquiridos no comércio, possuindo documentação, identificação botânica e números de exsicata registrados. A preparação da maioria dos extratos foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Camp et al. (2012). As espécies vegetais avaliadas neste trabalho são apresentadas no Quadro 4.1.

Foram preparadas as soluções-estoques, sendo pesadas as massas necessárias e solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck®). Para a realização dos ensaios, as soluções-estoques foram diluídas em meio de cultura a fim de obter as concentrações desejadas, não ultrapassando 1% de DMSO. Tal concentração (<1%) não é citotóxica como também não afeta a replicação dos vírus, uma vez que foi utilizada a mesma quantidade deste reagente nos controles não tratados dos ensaios. Além disso, esta concentração de DMSO já foi padronizada no LVA.

---

<sup>1</sup> **Grupos parceiros de pesquisa:**

UFSC, SC – Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel e Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto;

ULBRA, RS – Prof. Dr. Alexandre Ferraz;

UFV, MG – Prof. Dr. João Paulo Leite; e

Projeto hERGSscreen, Marie Curie Foundation, IRSES – Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Judith Maria Rollinger e Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel.

Quadro 4.1. Espécies vegetais avaliadas neste trabalho.

<b>Gênero/Espécie</b>	<b>Autor(es) do binômio</b>	<b>Família</b>
<i>Anchietea pyrifolia</i>	St.-Hil.	Violaceae
<i>Annona squamosa</i>	L.	Annonaceae
<i>Arctostaphylos uvae ursi</i>	(L.) Spreng.	Ericaceae
<i>Artemisia absinthum</i>	L.	Asteraceae
<i>Artemisia vulgaris</i>	L.	Asteraceae
<i>Baccharis sp.</i>		Asteraceae
<i>Boerhavia sp.</i>		Nyctaginaceae
<i>Calamintha menthifolia</i>	L.	Lamiaceae
<i>Calea phyllolepis</i>	Baker	Asteraceae
<i>Calea pinnatifida</i>	(R. Br.) Less.	Asteraceae
<i>Calea uniflora</i>	Less.	Asteraceae
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	(L.) Medik	Brassicaceae
<i>Carlina acaulis</i>	L.	Asteraceae
<i>Carum carvi</i>	L.	Apiaceae
<i>Castanea vesca (C. sativa)</i>	Mill.	Fagaceae
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	L.	Chenopodiaceae
<i>Cordia curasavica</i>	(Jacq.)Roem.&Schult.	Boraginaceae
<i>Drimys brasiliensis</i>	Miers	Winteraceae
<i>Equisetum arvense</i>	L.	Equisetaceae
<i>Eugenia uniflora</i>	L.	Myrtaceae
<i>Eupatorium bupleurifolium</i>	DC.	Asteraceae
<i>Euphrasia officinalis ssp. rostkoviana</i>	Hayne (L.)	Orobanchaceae
<i>Foeniculum vulgare</i>	L.	Apiaceae
<i>Galeopsis tetrahit</i>	L.	Lamiaceae
<i>Ganoderma lucidum</i>	P.Karst	Ganodermataceae
<i>Glechoma hederaceae</i>	L.	Lamiaceae
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	L.	Fabaceae
<i>Hedera helix</i>	L.	Araliaceae
<i>Helianthus annuus</i>	L.	Asteraceae
<i>Hepatica nobilis</i>	Schreb.	Ranunculaceae
<i>Inonotus obliquus</i>	(Ach. ex Pers.) Pilát	Hymenochaetaceae
<i>Kalanchoe brasiliensis</i>	Cambess	Crassulaceae
<i>Lantana camara</i>	L.	Verbenaceae
<i>Liquidambar orientalis</i>	Mill.	Hamamelidaceae
<i>Lycopodium clavatum</i>	L.	Lycopodiaceae

(continua)

(continuação)

<i>Matricaria chamomilla</i>	L.	Asteraceae
<i>Nelumbo nucifera</i>	Gaertn.	Nelumbonaceae
<i>Papaver rhoeas</i>	L.	Papaveraceae
<i>Papaver somniferum</i>	L.	Papaveraceae
<i>Peucedanum ostruthium</i>	(L.) Koch	Apiaceae
<i>Pimpinella anisum</i>	L.	Apiaceae
<i>Pimpinella major</i>	(L.) Huds.	Apiaceae
<i>Piper nigrum</i>	L.	Piperaceae
<i>Plantago lanceolata</i>	L.	Plantaginaceae
<i>Polygala senega</i>	L.	Polygalaceae
<i>Polygala vulgaris</i>	L.	Polygalaceae
<i>Polypodium vulgare</i>	L.	Polypodiaceae
<i>Potentilla anserinae</i>	L.	Rosaceae
<i>Prunella grandiflora</i>	D. Torre & Sarnth.	Lamiaceae
<i>Ribes nigrum</i>	L.	Grossulariaceae
<i>Rosa canina</i>	L.	Rosaceae
<i>Rosmarinus officinalis</i>	L.	Lamiaceae
<i>Ruta graveolens</i>	L.	Rutaceae
<i>Salvia glutinosa</i>	L.	Lamiaceae
<i>Sambucus nigra</i>	L.	Adoxaceae
<i>Scrophularia nodosa</i>	L.	Scrophulariaceae
<i>Solanum dulcamara</i>	L.	Solanaceae
<i>Solanum pseudoquina</i>	A.St.-Hil.	Solanaceae
<i>Solanum sp1</i>		Solanaceae
<i>Solanum sp2</i>		Solanaceae
<i>Stachys officinalis</i>	L.	Lamiaceae
<i>Stachys sylvatica</i>	L.	Lamiaceae
<i>Strychnos pseudoquina</i>	A. St.-Hil.	Loganiaceae
<i>Styrax calamitus</i>	L.	Styracaceae
<i>Teucrium chamaedrys</i>	L.	Lamiaceae
<i>Thymus pulegioides</i>	L.	Lamiaceae
<i>Tilia cordata</i>	Mill.	Malvaceae
<i>Tilia platyphyllos</i>	Scop.	Malvaceae
<i>Tussilago farfara</i>	L.	Asteraceae
<i>Vaccinium vitis-ideae</i>	L.	Ericaceae
<i>Valeriana officinalis</i>	L.	Valerianaceae
<i>Verbascum densiflorum</i>	Bertol.	Scrophulariaceae
<i>Verbena officinalis</i>	L.	Verbenaceae
<i>Veronica officinalis</i>	L.	Plantaginaceae
<i>Viola odorata</i>	L.	Violaceae
<i>Viola tricolor</i>	L.	Violaceae

## 4.2. Culturas celulares

### 4.2.1. Células

Para todos os ensaios biológicos foram utilizadas células Vero (ATCC:CCL 81), que são culturas contínuas de fibroblastos de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*), cultivadas em meio MEM, suplementado com soro fetal bovino (SFB – Cultilab®), a 37°C, em atmosfera umedecida de 5% de CO<sub>2</sub>. Estas células foram escolhidas por serem permissivas à replicação *in vitro* do HSV-1 e do HSV-2 e demonstrarem efeito citopático visível (HU; HSIUNG, 1989). Essa linhagem foi avaliada rotineiramente para detecção da presença de fungos, leveduras, bactérias e micoplasmas.

### 4.2.2. Meio de cultura e reagentes

Para o crescimento e manutenção das células Vero foi utilizado o meio MEM (*Minimal Essential Medium* – Cultilab®), acrescido de 2,2 g/L de bicarbonato de sódio para tamponamento de pH 7,4. O meio MEM foi suplementado com 10% de SFB para promoção do crescimento ou 5% para manutenção da linhagem celular. Com o intuito de prevenir a contaminação das células por bactérias, fungos e leveduras, apenas durante os experimentos, foi adicionado 1% de PSA (Cultilab® – 10.000 U de penicilina G, 10.000 µg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B) ao meio de cultivo. Para obtenção de subculturas celulares e realização de experimentos utilizou-se a enzima proteolítica tripsina (tripsina de pâncreas de porco preparada em uma solução de EDTA 1:250, Sigma®), a qual age como um agente dissociador.

## 4.3. Vírus

### 4.3.1. Origem das cepas virais

Os vírus utilizados foram o Herpes Simplex Virus tipo 1 (HSV-1), cepas KOS e 29-R (sensível e resistente ao aciclovir, respectivamente), ambas provenientes da Faculdade de Farmácia, Universidade de Rennes, França. Também foi utilizado o Herpes Simplex Virus tipo 2 (HSV-2), cepa 333, proveniente do Departamento de Virologia Clínica da Universidade de Göteborg, Suécia.



#### 4.3.2. Preparo das suspensões-estoques virais

As suspensões-estoques virais foram preparadas conforme metodologia descrita por Simões, Amoros e Girre (1999). Resumidamente, garrafas de cultura foram semeadas com células Vero, 24 h antes da infecção viral. Decorrido este período, o meio de cultura foi aspirado e a monocamada celular foi lavada 3 vezes com solução tampão fosfato (PBS) para que fossem retirados restos celulares e resquícios de SFB. Em seguida, a monocamada celular foi inoculada com 1 mL da suspensão viral e a garrafa foi incubada por 1 h a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> para permitir a adsorção e penetração viral. Após este período, o excesso de vírus foi retirado por sucção a vácuo e 10 mL de meio MEM sem SFB foram adicionados, por fim a garrafa foi incubada nas mesmas condições descritas acima.

O ciclo de replicação dos HSV-1 e HSV-2 possui duração de 18 h (FLINT et al., 2000); em virtude disso, o efeito citopático viral (ECP) foi monitorado por microscópio invertido a cada ciclo de replicação. Quando a monocamada celular se mostrou totalmente infectada pelo vírus, o frasco foi congelado a -80°C e descongelado a 37°C e esse ciclo foi repetido por 3 vezes para que ocorresse o rompimento total das membranas celulares e, conseqüentemente, a liberação das partículas virais. A suspensão obtida foi centrifugada por 10 min a 350 Xg em centrífuga refrigerada a 4°C, para separação dos restos celulares e dos vírus. O sobrenadante (suspensão viral) resultante foi distribuído em tubos estéreis, titulado e armazenado a -80°C até sua utilização.

#### 4.3.3. Determinação dos títulos infecciosos virais

Antes de realizar a avaliação da potencial atividade antiviral das amostras, é de extrema importância o conhecimento da infecciosidade dos inóculos virais produzidos. A infecciosidade viral pode ser determinada como Unidades Formadoras de Placas (UFP), sendo então possível conhecer a concentração viral por mL, ou seja, o título viral. O título infeccioso de todos os estoques virais foi determinado através do método de contagem de placas de lise, descrito por Burleson, Chambers e Wiedbrauk (1992).

Todos os ensaios foram realizados em placas de 24 cavidades, preparadas da seguinte maneira: suspensões de células Vero, na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/cavidade/0,75 mL, foram cultivadas em meio MEM, suplementado com 5% de SFB e 1% de PSA, e incubadas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> até a confluência (24 h).

Decorrido este período, o meio de cultura de cada cavidade foi aspirado cuidadosamente e a monocamada celular foi lavada com PBS. Essas células foram infectadas com 400 µL da suspensão-estoque viral, diluída em série na razão 1:10, em meio MEM com 1% de PSA sem SFB (três réplicas para cada diluição). As placas foram incubadas durante 1 h, tendo sido agitadas cuidadosamente a cada 15 min para uma melhor distribuição da suspensão viral. Após esse tempo, a suspensão viral foi aspirada e as células mais uma vez lavadas com PBS. A cada cavidade, foram adicionados 500 µL de uma dispersão de carboximetilcelulose<sup>2</sup> (CMC). As placas foram novamente incubadas por 48 h para o HSV-1 e HSV-2. Após este período, o meio foi retirado e as células fixadas e coradas com 400 µL da solução do corante preto de naftaleno<sup>3</sup>, por 30 min, à temperatura ambiente, em agitador mecânico horizontal. Após este tempo, o corante foi aspirado e as placas de cultura foram colocadas para secar a temperatura ambiente. As placas de lise viral foram quantificadas através da visualização em microscópio estereoscópico. Para calcular os títulos virais, foram contados os focos de infecção na última diluição, que se caracterizam por áreas claras de lise celular, chamadas de placas de lise ou focos.

O título viral (T) foi calculado pela equação abaixo, e expresso em Unidades Formadoras de Placas por mililitro (UFP/mL):

$$T = \frac{N \times d}{V}$$

onde  $N$  é o número médio de placas de lise da última diluição, que apresentou focos,  $d$ , a recíproca da última diluição, onde foram contadas as placas de lise, e  $V$ , o volume de inóculo em mL (neste caso, 0,4 mL).

---

<sup>2</sup> **Preparo da solução de carboximetilcelulose (CMC):** Meio MEM 2X + solução aquosa a 1,5% de carboximetilcelulose (Sigma<sup>®</sup>), na proporção 1:1, ambos previamente esterilizados e acrescidos de 1% de PSA.

<sup>3</sup> **Preparo da solução de preto de naftaleno:** 100 mg do corante preto de naftaleno (Sigma<sup>®</sup>) foram dissolvidos em 100 mL de uma solução aquosa a 5% de ácido acético (Merck<sup>®</sup>), sendo o pH ajustado, se necessário, para 2,3-2,5. Esta mistura foi filtrada através de papel filtro e estocada a 4°C, sendo aquecida em banho-maria a 37°C, antes de seu uso.

#### 4.4. Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da viabilidade celular foi realizada através do ensaio colorimétrico com sulforrodamina B (SRB), descrito por Vichai e Kirtikara (2006), e padronizado no Laboratório de Virologia Aplicada por Silva (2009). Este ensaio consiste em um método *in vitro*, que se fundamenta na capacidade da SRB de ligar-se a componentes proteicos de células, previamente fixadas com ácido tricloroacético (TCA), possibilitando a quantificação proteica.

**Procedimento:** uma suspensão de células Vero, contendo aproximadamente  $2,5 \times 10^5$  células/mL, obtida por tripsinização de uma garrafa de cultura celular, foi distribuída em uma placa de 96 cavidades (100  $\mu$ L/cavidade). A placa foi incubada por 24 h, a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub> até a obtenção da confluência. Em seguida, o meio MEM foi substituído por 200  $\mu$ L dos materiais-teste diluídos em MEM 1X, em diferentes concentrações, através de diluições sucessivas na razão 1:2, sendo a placa novamente incubada por 48 h nas mesmas condições de temperatura e CO<sub>2</sub>.

Após este período, sem remover o sobrenadante, as células foram fixadas através da adição de 100  $\mu$ L de uma solução aquosa de TCA a 10% (p/v) em cada cavidade e a placa foi incubada por 1 h a 4°C. As cavidades foram cuidadosamente lavadas 4 vezes com água destilada e deixadas 24 h à temperatura ambiente para secagem. Em seguida, as células fixadas foram coradas com 100  $\mu$ L da solução ácida de sulforrodamina B<sup>4</sup> (0,057% p/v) por 30 min. O corante não ligado às proteínas foi removido através de 4 lavagens sucessivas com uma solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v), e a placa foi seca novamente por 24 h. A partir disso, procedeu-se a extração do corante ligado às proteínas, com a adição de 100  $\mu$ L, em cada cavidade, de uma solução tampão de Tris Base 10 mM (pH 10,5)<sup>5</sup>. A placa foi agitada por 10 min à temperatura ambiente para que todo o corante fosse dissolvido e as absorbâncias foram medidas em um espectrofotômetro (Spectra MD2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) a 510 nm. Os valores de absorbância medidos para as diferentes concentrações de cada material-teste foram transformados em porcentagens de viabilidade

---

<sup>4</sup> **Preparo da solução ácida de sulforrodamina B:** 57 mg de sulforrodamina B (Sigma<sup>®</sup>) foram dissolvidos em 100 mL de uma solução aquosa a 1% de ácido acético (v/v) (Merck<sup>®</sup>).

<sup>5</sup> **Preparo da solução Tris-Base 10 mM:** 242,2 mg de Tris-Base (Sigma<sup>®</sup>) foram dissolvidos em 200 mL de água ultra-pura, e o pH foi ajustado até 10,5.

celular (X%), em relação ao controle celular, o qual é considerado 100% viável, pela seguinte fórmula:

$$X\% = \frac{\text{DO material-teste} \times 100}{\text{DO controle celular}}$$

onde DO representa a Densidade Óptica.

Em seguida, os percentuais calculados referentes às diferentes concentrações das amostras, foram inseridos num gráfico, e através de análise de regressão não linear, foi possível calcular os valores de CC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração de cada amostra que reduziu em 50% a viabilidade celular. Os valores de CC<sub>50</sub> calculados representam a média de três experimentos independentes com seu intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

#### **4.5. Avaliação da potencial atividade antiviral – triagem anti-herpética inicial**

##### **4.5.1. Ensaio de redução do número das placas de lise**

A avaliação da atividade antiviral foi realizada pelo ensaio de redução do número das placas de lise, descrito por Kratz et al. (2008). Com este ensaio, foi realizada inicialmente a triagem anti-herpética (HSV-1 cepas KOS e 29-R; HSV-2 cepa 333) de diferentes amostras de plantas medicinais, bem como das amostras de *Strychnos pseudoquina* obtidas durante o processo de fracionamento biomonitorado (por ter sido a amostra com atividade mais promissora). Foi utilizado como controle positivo o fármaco aciclovir (ACV – Sigma®). Além disso, para cada ensaio foram realizados controles virais, nos quais as células foram infectadas e não tratadas, e controles celulares, onde as células não foram infectadas nem tratadas.

**Procedimento:** células Vero foram cultivadas em placas de 24 cavidades (2,5 x 10<sup>5</sup>/cavidade/0,75 mL) e incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> até a confluência (24 h). Após 24 h, o meio foi aspirado cuidadosamente, a monocamada celular confluenta foi lavada 3 vezes com PBS e 400 µL das suspensões virais (HSV-1 cepas KOS e 29-R; HSV-2 cepa 333) foram adicionados, na concentração de 100 UFP/cavidade ou MOI (*Multiplicity of Infection*) de 0,0004. O MOI representa a relação entre o número de partículas virais infecciosas e o número de células que serão infectadas (CONDIT, 2013). Após a

infecção por 1 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram lavadas com PBS e 500 µL de uma dispersão de CMC diluída em meio MEM 2X (controle viral) foram adicionados; ou esta mesma solução contendo as amostras em diferentes concentrações ou o aciclovir a 10 µM (2,25 µg/mL). As placas foram incubadas por 48 h, a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Decorrido este período, o meio foi aspirado e as células foram coradas conforme descrito no item 4.3.3. Após a contagem das placas, a porcentagem de inibição da replicação viral de cada amostra, com relação aos controles virais, foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \left( 1 - \frac{\text{Número de placas}_{\text{material-teste}}}{\text{Número de placas}_{\text{controle viral}}} \right) \times 100$$

Em seguida, os percentuais calculados foram inseridos em um gráfico, e através da análise de regressão não linear, foi possível calcular os valores de CI<sub>50</sub>, ou seja, da concentração de cada amostra que inibiu 50% a infecção viral. Os valores de CI<sub>50</sub> representam a média de, no mínimo, três experimentos independentes com seu intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

De posse dos valores de CC<sub>50</sub> e CI<sub>50</sub> foi possível calcular o índice de seletividade (IS) de cada amostra, em relação à cepa viral utilizada, utilizando a seguinte fórmula:

$$IS = \frac{CC_{50}}{CI_{50}}$$

Para cada amostra, a relevância da atividade antiviral detectada é indicada pelo valor de IS, ou seja, quanto maior for o valor de IS, mais seletiva será a amostra em relação ao vírus e não às células hospedeiras (COS et al., 2006).

#### 4.6. Avaliação do mecanismo da ação anti-herpética

Após a etapa de triagem inicial, a amostra que se apresentou mais promissora foi submetida a um fracionamento biomonitorado, realizado pelo grupo parceiro da UFV, com o intuito de isolar o(s) composto(s) possivelmente responsável(is) pela atividade anti-herpética detectada.

Para a elucidação do mecanismo da ação anti-herpética destas amostras foram empregadas diversas estratégias experimentais *in vitro*, variantes do ensaio clássico de redução do número das placas de lise e

ensaios de *Western blotting*. A seleção dos ensaios foi feita por meio de uma análise criteriosa dos resultados experimentais obtidos no decorrer do projeto. Cada ensaio avaliou a interação das amostras com possíveis alvos moleculares, envolvidos nas diferentes etapas do ciclo de replicação viral. Tal estratégia já foi descrita em trabalhos publicados previamente pelo nosso grupo de pesquisa (KRATZ et al., 2008; SILVA et al., 2010; BERTOL et al., 2011; CARDOZO et al., 2011; LUCKEMEYER et al., 2012; ARGENTA et al., 2015).

#### 4.6.1. Avaliação da ação virucida direta

Este ensaio foi conduzido para determinar se as amostras seriam capazes de inativar os vírus na ausência de células, ou seja, avaliar a ação direta das amostras sobre as partículas virais, e a consequente diminuição da sua capacidade infecciosa.

**Procedimento:** misturas de 50 µL das diferentes concentrações das amostras e 50 µL de  $4 \times 10^4$  UFP/0,05 mL de cada vírus, em meio MEM sem SFB, ou 50 µL de MEM (controle viral), foram homogeneizadas e incubadas por 15 min a 37°C em banho-maria, ou a 4°C em geladeira. Feito isto, os fluidos virais tratados foram diluídos em série (1:100), a fim de se obter concentrações não inibitórias das amostras, utilizando-se MEM gelado com 1% de PSA. A infecciosidade residual destas suspensões foi determinada pelo método de placas de lise descrito no item 4.5.1. De posse dos números das placas de lise, nos diferentes tratamentos e nos controles virais, foi possível determinar a infecciosidade residual (IR) em % das diluições das amostras, pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ IR} = \frac{\text{Número de placas}_{\text{amostra}}}{\text{Média número de placas}_{\text{controle viral}}} \times 100$$

Em seguida, os percentuais calculados foram inseridos em um gráfico, e por meio da análise de regressão, foi possível calcular os valores de  $CV_{50}$ , ou seja, a concentração de cada amostra que reduz em 50% a infecciosidade viral.

#### 4.6.2. Avaliação virucida das amostras na presença de soluções ricas em proteínas

Este ensaio foi conduzido para avaliar se as amostras são capazes de inativar as partículas virais do HSV-2, em presença de soluções proteicas.

**Procedimento:** volumes equivalentes (25  $\mu\text{L}$ ) das amostras e de diferentes diluições seriadas (razão 1:10) de uma solução de BSA (Albumina Sérica Bovina – 0,00005 a 0,5%) ou de uma solução de SFB (0,0005 a 5%) foram misturados em tubos de fundo cônico e incubados à temperatura ambiente, por 5 min. Em seguida, foram adicionados  $4 \times 10^4$  UFP de HSV-2 (cepa 333) em 50  $\mu\text{L}$  de meio MEM sem SFB e incubados por mais 15 min a 37°C. Foram feitos controles virais com 50  $\mu\text{L}$  de meio MEM + 50  $\mu\text{L}$  da suspensão viral contendo  $4 \times 10^4$  UFP do HSV-2, e também controles utilizando 50  $\mu\text{L}$  das diferentes concentrações das soluções proteicas + 50  $\mu\text{L}$  da mesma suspensão viral. Após esse período, foi realizada a diluição das misturas (1:100) com o intuito de se obter a concentração não inibitória das amostras, usando MEM gelado com 1% de PSA. A infecciosidade residual destas suspensões foi determinada pelo método de placas de lise descrito no item 4.5.1. De posse dos números das placas de lise nos diferentes tratamentos e nos controles virais, foi possível determinar o percentual (%) de inibição da infecciosidade residual exercida pelas amostras, na presença de soluções proteicas, pela fórmula descrita no item 4.5.1.

#### 4.6.3. Avaliação dos efeitos das amostras na adsorção viral

Este ensaio foi realizado para avaliar a capacidade das amostras de inibir a adsorção das partículas virais nas células. O ensaio foi conduzido, em parte a 4°C, temperatura na qual os vírus adsorvem as células, mas não penetram devido à rigidez da membrana celular nessa temperatura.

**Procedimento:** células Vero cultivadas em placas de 24 cavidades ( $2,5 \times 10^5$ /cavidade/0,75 mL) por 24 h, foram resfriadas a 4°C por 30 min em geladeira. As amostras, nas concentrações desejadas, foram misturadas a volumes equivalentes das suspensões virais (HSV-1 ou HSV-2) a 100 UFP e adicionadas (500  $\mu\text{L}$ ) às placas, as quais foram novamente incubadas a 4°C por 2 h. Foram feitos controles celulares, controles virais e controles positivos (0,25  $\mu\text{g/mL}$  – sulfato de dextrana – PM > 500.000 – Sigma®). Após 2 h de incubação em geladeira, o meio foi aspirado e as células lavadas 2 vezes com PBS gelado para

retirar os vírus não adsorvidos e o restante das amostras. Com o objetivo de controlar a metodologia empregada, foi realizada a lavagem de um dos controles virais com tampão citrato<sup>6</sup> (pH 3,0), já que neste valor de pH ocorre a desestabilização das partículas virais adsorvidas nas membranas plasmáticas, fazendo com que os vírus sejam liberados e eliminados após aspiração e lavagem; assim, este controle não deve apresentar placas de lise. Para o término do experimento, 500 µL da dispersão de CMC foram adicionados cuidadosamente às monocamadas celulares e as placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 48 h. O restante do método seguiu as orientações do item 4.5.1.

#### *4.6.3.1. Avaliação dos efeitos das amostras no ensaio de pós-adsorção*

Uma variante do ensaio da adsorção viral foi realizada para avaliar a capacidade das amostras de interferir nas partículas virais quando essas já estão estavelmente adsorvidas nas células.

**Procedimento:** Monocamadas confluentes de células Vero, preparadas e resfriadas como descrito anteriormente, foram infectadas com 100 UFP (HSV-1 ou HSV-2) e as placas foram mantidas em geladeira a 4°C por 2 h para permitir a adsorção. Em seguida, o meio foi aspirado e as células lavadas 2 vezes com PBS gelado para retirar os vírus não adsorvidos. Só então as amostras foram adicionadas, nas concentrações desejadas, dissolvidas em meio MEM sem SFB, e as monocamadas incubadas por mais 2 h a 4°C. Após esse tempo, as células foram novamente lavadas 2 vezes com PBS. Da mesma forma que no ensaio anterior, foram feitos controles celulares, controles virais, controles positivos e controle com tampão citrato. Para o término do experimento, 500 µL da dispersão de CMC foram adicionados cuidadosamente às monocamadas celulares e as placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 48 h. O restante do método seguiu as orientações do item 4.5.1.

#### *4.6.4. Avaliação dos efeitos das amostras na penetração viral*

Este ensaio foi realizado para avaliar a capacidade das amostras de inibirem a penetração das partículas virais nas células, etapa que é

---

<sup>6</sup> **Preparo da solução tampão citrato:** 4,2 g de ácido cítrico (Carlo Erba®), 0,375 g de KCl (Sigma®) e 4,0 g de NaCl (Sigma®) foram dissolvidos em 500 mL de água ultra-pura e filtrados com auxílio de papel filtro. O pH foi ajustado para 3,0, a solução esterilizada por autoclavagem a 121°C e armazenada em geladeira a 4°C até o uso.



crucial para a replicação viral. O ensaio foi conduzido considerando que os vírus adsorvem-se nas células a 4°C, mas só penetram quando a temperatura é aumentada para 37°C.

**Procedimento:** células Vero foram cultivadas em placas de 24 cavidades ( $2,5 \times 10^5$ /cavidade/0,75 mL) até a confluência (24 h) e, após este período, foram resfriadas a 4°C por 30 min em geladeira, infectadas com o HSV-1 ou o HSV-2 (100 UFP) e incubadas por 2 h a 4°C. Decorrido este período, as células foram lavadas 2 vezes com PBS gelado para remover as partículas virais não adsorvidas, sendo que o PBS adicionado para a segunda lavagem foi mantido em contato com as células e as placas foram então incubadas em estufa para que a temperatura do experimento fosse rapidamente elevada a 37°C por 5 min, com o objetivo de potencializar a penetração viral. Após este curto período, foram rapidamente adicionados 400 µL das diferentes concentrações das amostras ou do sulfato de dextrana (8,0 µg/mL – controle positivo), todos diluídos em MEM sem SFB. Foram feitos controles virais e controles celulares. As placas foram novamente colocadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 1 h. Em seguida, o meio com as amostras foi aspirado e as células lavadas com tampão citrato (pH 3,0) a 37°C por 1 min para inativar as partículas virais que não penetraram nas células. O pH foi neutralizado através de uma lavagem com PBS pH 7,0. As células receberam, então, 500 µL da dispersão de CMC, e o restante seguiu as orientações do item 4.5.1.

#### 4.6.5. Avaliação dos efeitos do tempo de adição das amostras no ciclo de replicação viral

Este ensaio foi conduzido para determinar a etapa do ciclo de replicação viral influenciado pelas amostras, por meio de uma avaliação do perfil temporal da atividade anti-herpética.

**Procedimento:** células Vero foram cultivadas em placas de 24 cavidades ( $2,5 \times 10^5$ /cavidade/0,75 mL) até confluência (24 h), e diferentes tratamentos de adição ou remoção dos compostos foram executados.

- **Pré-tratamento (3 h antes da infecção viral):** as amostras, diluídas nas concentrações desejadas, foram adicionadas às células não infectadas, as quais foram incubadas por 3 h, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, as amostras foram aspiradas, as monocamadas lavadas com PBS e então infectadas com 100 UFP de HSV-1 (cepa KOS) ou HSV-2 (cepa 333). As placas foram incubadas por 1 h para possibilitar a infecção viral. Decorrido este período, o meio com o inóculo viral foi

aspirado, as células lavadas com PBS e adicionados 500 µL da dispersão de CMC. Por fim, as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 48 h, e após esse tempo, as placas foram tratadas conforme procedimento descrito no item 4.5.1.

- **Tratamento simultâneo – tempo zero (T<sub>0</sub>):** as amostras, diluídas nas concentrações desejadas, foram adicionadas às células concomitantemente com as suspensões virais contendo 100 UFP/0,4 mL do HSV-1 ou do HSV-2. As placas foram incubadas por 1 h, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Decorrido este período, o meio foi aspirado, as células lavadas com PBS, e 500 µL da dispersão de CMC foram adicionados. As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 48 h e, após esse tempo, as mesmas foram tratadas conforme procedimento descrito no item 4.5.1.

#### 4.6.6. Avaliação dos efeitos das amostras na expressão das proteínas do HSV-1 (cepa KOS)

A avaliação do efeito das amostras na expressão das proteínas virais do HSV-1 (cepa KOS) foi conduzida através do ensaio de *Western blotting*. O objetivo do ensaio foi avaliar se as amostras interferiam na expressão de proteínas específicas, presentes nas diferentes etapas do ciclo viral (Quadro 4.2).

Quadro 4.2. Proteínas expressas pelo HSV-1 (cepa KOS) analisadas por *Western blotting*.

Fase	Gene codificador	Proteína
α (imediate)	U <sub>L</sub> 54	ICP27
β (precoce)	U <sub>L</sub> 42	Proteína acessória da DNA polimerase viral
γ (tardia)	U <sub>L</sub> 27 U <sub>S</sub> 6	gD

**Procedimento:** células Vero, em uma densidade de  $6 \times 10^5$  células/cavidade/2 mL, foram cultivadas em placas de 6 cavidades com meio MEM e 5% de SFB até confluência. Após 24 h, as células foram infectadas ou não (controle celular) com 2 mL de uma suspensão viral do HSV-1 (cepa KOS) com MOI de 0,2, por 1 h a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com 2 mL de PBS, tratadas com as amostras nas concentrações desejadas, e 2 mL de meio MEM foram adicionados nos controles viral e celular. Foi feito um controle positivo

com aciclovir ( $20 \mu\text{M} = 4,50 \mu\text{g/mL}$ ). As placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$ , em estufa de  $\text{CO}_2$ , durante 18 h (1 ciclo de replicação viral). Após este período, o meio foi retirado, as células lavadas 2 vezes com 2 mL de PBS e adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de tampão de lise [RIPA-buffer com 1:200 benzamidina, 1:100 vanadato de sódio e 1:1000 inibidor de proteases (Sigma®)] para a extração das proteínas. O conteúdo das cavidades foi transferido para tubos de fundo cônico previamente identificados e centrifugados a  $20.800 \text{ Xg}$  a  $4^\circ\text{C}$  por 30 min. Após, os sobrenadantes das amostras foram transferidos para novos tubos de fundo cônico e armazenados a  $-20^\circ\text{C}$ . A determinação da concentração proteica foi realizada pelo método clássico de Bradford (BRADFORD, 1976).

As proteínas (aproximadamente 20  $\mu\text{g}$ ) foram analisadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida)/SDS a 10% (SDS-PAGE). Após, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (Bio-Rad Healthcare) em tampão de transferência [25 mM de Tris Base (Sigma®) e 192 mM de glicina (Sigma®) dissolvidos em 100 mL de uma solução aquosa a 20% de metanol (v/v)], a 400 mA. Em seguida, as membranas foram bloqueadas por 1 h com 5% de SkimMilkPowder (Sigma®) em TBS-T [25 mM de Tris Base (Sigma®); 0,15 M de NaCl (Sigma®) e 0,5% de Tween 20 (Sigma®) dissolvidos em 1.000 mL de água ultrapura, com pH ajustado para 7,6 e armazenado a  $4^\circ\text{C}$  até o uso], lavadas 3 vezes por 5 min (cada lavagem) com este tampão. Após, as membranas foram incubadas *overnight*, em geladeira, separadamente e sob agitação, com os seguintes anticorpos primários diluídos em solução contendo 5% de BSA e 0,4% de azida sódica em TBS-T: anticorpo policlonal de cabra contra ICP27 (diluição 1:1000, Millipore, Billerica, MA, EUA); anticorpo monoclonal de coelho contra  $\beta$ -actina (diluição 1:1000, Sigma Aldrich, EUA); anticorpo monoclonal de camundongo contra  $\text{U}_L42$  (diluição 1:1000, Millipore, Billerica, MA, EUA) e anticorpo monoclonal de camundongo contra gD (diluição de 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Após este período, as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 min (cada lavagem) com TBS-T e incubadas com os anticorpos secundários (conjugados à peroxidase), durante 1 h, à temperatura ambiente e sob agitação, de acordo com a origem do anticorpo primário: IgG anticabra (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), IgG anticamundongo (Chemicon, Millipore) e IgG anticoelho (Chemicon, Millipore), todos diluídos 1:1000 em TBS-T. Após o período de incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 min com TBS-T e detectadas pelo kit de quimiluminescência Pierce ECL Western Blotting (Thermo Scientific,

Waltham, MA, EUA), segundo especificações do fabricante, misturando-se 500 µL de cada reagente (reagentes 1 e 2), sendo que esta mistura foi colocada na membrana por 2 min. Após este tempo, eliminou-se o excesso dos reagentes sobre a membrana, e as imagens foram detectadas utilizando-se o equipamento Bio-Rad ChemiDoc TM MP System, e digitalizadas utilizando-se o programa ImageLab (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), versão 4.1. Para a quantificação das bandas foi utilizado o programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, EUA).

#### 4.6.7. Avaliação dos efeitos das amostras na liberação viral

Este ensaio foi realizado com o intuito de avaliar a influência das amostras sobre uma importante etapa da replicação viral, a liberação das novas partículas virais formadas a partir das células infectadas. Desta forma, foi realizada a titulação dos vírus intracelulares e extracelulares, na presença e ausência das amostras.

**Procedimento:** monocamadas confluentes de células Vero (placas de 24 cavidades), foram infectadas (MOI 0,4) e incubadas por 1 h, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Decorrido este período, as placas foram lavadas com PBS para a remoção das partículas virais residuais. Os compostos foram adicionados nas concentrações desejadas e as placas foram novamente incubadas por 24 h a 37°C. Foi feito um controle positivo com a digitoxina, que é um cardenolídeo que apresenta a capacidade de inibir a liberação de vírus herpéticos, como relatado por Su et al. (2008). Após este tempo, o meio de cultura de todas as cavidades (sobrenadantes) foi coletado e armazenado a -80°C. A monocamada celular ainda presente na placa, foi lavada 1 vez com PBS, adicionada de meio MEM com 1% de PSA e congelada/descongelada 3 vezes para provocar a liberação dos vírus intracelulares, sendo que o precipitado celular foi coletado e armazenado a -80°C. Tanto os sobrenadantes quanto os precipitados foram centrifugados a 350 Xg, por 8 min a 4°C e, então, titulados através do método de contagem das placas de lise (item 4.5.1.).

A porcentagem de liberação viral foi calculada pela equação proposta por Su et al. (2008), dada por:

$$\% \text{ liberação} = \frac{Te}{(Te+Ti)} \times 100$$

onde *Ti* é o título viral intracelular, e *Te*, o título viral extracelular.

#### 4.7. Avaliação dos efeitos antivirais das amostras em combinação com o aciclovir

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar se as associações das amostras com o aciclovir seriam capazes de apresentar efeitos sinérgicos.

**Procedimento:** Para este ensaio foi utilizado o método de placas de lise (item 4.5.1) e os tratamentos com cada amostra, sozinha ou em combinação com o ACV, foram adicionados numa relação fixa, equivalente aos seus respectivos valores de  $CI_{50}$  ( $CI_{50} \times 0,25$ ,  $\times 0,5$ ,  $\times 1,0$ ,  $\times 2,0$  e  $\times 4,0$ ) e incubadas por 1 h, a  $37^{\circ}C$  e 5% de  $CO_2$ . O grau de interação entre as amostras foi calculado por meio da equação do índice combinatório (IC), com base no princípio do efeito mediano da lei de ação de massas, empregando o *software* Calculusyn (versão 2.1, Biosoft®). De acordo com o teorema do IC, valores de  $IC < 1$ ,  $= 1$  e  $> 1$  indicam sinergismo, efeito aditivo e antagonismo, respectivamente (CHOU, 2006).

#### 4.8. Análise estatística

Nos experimentos, foram utilizados delineamentos de blocos completamente casualizados (BCC) e um arranjo fatorial dos tratamentos (SOKAL; ROHLF, 1995), onde cada cavidade constituiu uma unidade experimental e os tratamentos foram as diferentes concentrações das amostras testadas. Os tratamentos e os controles positivos e negativos foram distribuídos aleatoriamente entre as cavidades das placas, e as repetições foram feitas em placas e momentos diferentes, garantindo a casualização. Cada placa correspondeu a um bloco, permitindo uma melhor avaliação das possíveis variações entre as repetições.

Os valores de  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$  foram estimados por meio de curvas concentração-resposta por análise de regressão não-linear. Os experimentos foram realizados em triplicata ou duplicata e os resultados expressos por meio da média de experimentos independentes com seu intervalo de confiança de 95% (para as triagens iniciais) e  $\pm$  desvio padrão (para todos os testes do mecanismo de ação).

As diferenças estatisticamente significativas ou não dos tratamentos, com relação aos controles virais, foram realizadas através do teste ANOVA/Dunnett e para separação de médias foi empregado o teste ANOVA/Tukey, utilizando o programa GraphPad Prism® 6,

versão 6.01 para Windows (Graph Pad Software, La Jolla, CA, EUA). O intervalo de confiança adotado foi de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Determinação dos títulos infecciosos virais

Os títulos infecciosos das suspensões-estoques virais preparadas de acordo com as orientações descritas no item 4.3.2 foram determinados conforme metodologia descrita no item 4.3.3. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados.

Vírus	Suspensão estoque viral	Título (UFP/mL)
HSV-1 (cepa KOS)	1	$1,4 \times 10^7$
	2	$2,1 \times 10^7$
HSV-1 (cepa 29-R)	1	$2,6 \times 10^6$
	2	$5,3 \times 10^6$
HSV-2 (cepa 333)	1	$2,5 \times 10^4$

### 5.2. Triagem anti-herpética inicial de plantas medicinais

É de grande importância avaliar previamente a toxicidade das amostras frente às células que compõem o modelo *in vitro* (isto é, as células Vero) empregado na triagem aqui realizada. Tal avaliação garantiu que a triagem anti-herpética fosse conduzida sem a interferência da citotoxicidade.

A citotoxicidade refere-se aos efeitos adversos de uma substância sobre a viabilidade celular. Um fármaco antiviral ideal deve inibir

somente a(s) etapa(s) do ciclo de replicação viral, sem interferir no metabolismo das células hospedeiras, possibilitando que elas se recuperem da infecção e mantenham sua atividade metabólica normal (VANDEN BERGUE; VLIETINCK; VAN-HOOF, 1986). Os efeitos tóxicos sobre as células hospedeiras devem ser considerados na P&D de novos fármacos antivirais, pois a toxicidade excessiva pode inviabilizar a sua aplicação terapêutica (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGUE, 1997).

Para o estudo da citotoxicidade foi empregado o ensaio colorimétrico da sulforrodamina B, conforme descrito no item 4.4. Com base nos resultados obtidos nessa avaliação, foi determinado o valor de  $CC_{50}$  de cada amostra a ser utilizado nas triagens anti-herpéticas subsequentes.

O ensaio de redução do número das placas de lise é considerado o padrão ouro para quantificar infecções virais (JEFFERY; AARONS, 2009). Esta metodologia quantitativa baseia-se na capacidade das partículas infecciosas virais de causar uma área macroscópica de efeito citopático quando em contato com uma monocamada celular. De forma mais específica, se uma célula é infectada por uma única partícula viral, ocorrerá a formação de novos vírus, que poderão infectar as células adjacentes e assim por diante. Após um determinado período de tempo, o foco de infecção inicial se expande e dá origem, após vários ciclos de replicação, à chamada placa de lise, que pode ser facilmente visualizada e identificada com ajuda de um corante celular (CONDIT, 2013).

A atividade antiviral das amostras foi inicialmente avaliada frente a três cepas de vírus herpéticos: HSV-1 [cepa KOS (sensível ao ACV) e 29-R (resistente ao ACV)] e HSV-2 (cepa 333). Foi empregado um *cut-off* (ponto de corte) arbitrário de 40% de inibição para a classificação das amostras como sendo mais ativas. Os resultados são sumarizados na Tabela 5.2.



Tabela 5.2. Resultados da triagem inicial da citotoxicidade e atividade anti-herpética.

Amostras	Partes das plantas utilizadas	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/mL)	IC <sup>b</sup> 95% (µg/mL)	Concen. inicial testada (µg/mL)	Triagem anti-herpética inicial		
					% de inibição		HSV-2 (cepa 333)
					HSV-1 (cepa KOS)	HSV-1 (cepa 29-R)	
<i>Anchietea pyrifolia</i>	Folhas	>100	-	100	2,1±2,1	18,5±0,4	1,1±0,9
<i>Annona squamosa</i>	Sementes	10,2	6,476 a 16,07	5	NR	NR	NR
<i>Arctostaphylos uvae ursi</i>	Folhas	>100	-	100	10,9±6,0	20,0±1,7	0
<i>Artemisia absinthum</i>	Partes aéreas	>100	-	100	20,7±4,4	39,1±4,5	29,9±1,1
<i>Artemisia vulgaris</i>	Partes aéreas	>100	-	100	0	9,7±1,6	0
<i>Baccharis sp.</i>	Folhas	27,6	22,24 a 34,18	15	30,0±3,2	20,3±1,8	0
<i>Boerhavia sp.</i>	Folhas	>100	-	100	18,1±0,9	40,6±9,5	28,2±2,8
<i>Calamintha menthifolia</i>	Partes aéreas	>100	-	100	48,4±2,2	26,7±4,3	38,7±4,5
<i>Calea phyllolepis (extrato bruto)</i>	Folhas	>100	-	100	98,5±2,1	88,4±11,8	81,7±7,8
<i>Calea phyllolepis (fração butanólica)</i>	Folhas	>100	-	100	100	93,0±8,3	100
<i>Calea phyllolepis (fração butanólica A)</i>	Folhas	86,7	64,50 a 116,4	50	11,0±15,6	34,5±2,4	39,9±2,3
<i>Calea phyllolepis (fração butanólica B)</i>	Folhas	>100	-	100	100	48,5±3,4	98,8±4,9
<i>Calea phyllolepis (resíduo aquoso)</i>	Folhas	>100	-	100	48,4±3,4	96,7±0,1	78,8±8,7
<i>Calea pinnatifida (extrato bruto)</i>	Folhas	>100	-	100	84,5±1,8	69,7±4,6	43,5±4,6

(continua)

(continuação)

Amostras	Partes das plantas utilizadas	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/mL)	IC <sup>b</sup> 95% (µg/mL)	Concen. inicial testada (µg/mL)	Triagem anti-herpética inicial		
					Amostras	% de inibição	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/mL)
<i>Calea pinnatifida</i> (fração acetato de etila)	Folhas	>100	-	100	78,6±2,9	89,8±5,9	100
<i>Calea pinnatifida</i> (fração diclorometano rica em furano lactona)	Folhas	67,1	60,85 a 73,96	50	11,8±0,9	74,5±4,7	73,4±6,7
<i>Calea pinnatifida</i> (fração diclorometano)	Folhas	78,9	73,74 a 84,42	50	37,8±4,5	0	17,8±2,3
<i>Calea uniflora</i> (extrato bruto)	Folhas	>100	-	100	43,6±2,6	48,7±4,8	84,5±7,8
<i>Calea uniflora</i> (fração acetato de etila rica em α-hidroxiuteína)	Folhas	64,2	58,83 a 76,51	50	12,4±1,9	0	63,8±8,9
<i>Calea uniflora</i> (fração acetato de etila)	Folhas	>100	-	100	67,4±1,6	63,4±5,1	56,8±9,8
<i>Calea uniflora</i> (fração diclorometano rica em desacetileupaserrina)	Folhas	>100	-	100	42,5±1,3	51,4±3,9	76,7±6,8
<i>Calea uniflora</i> (fração diclorometano rica em noreugenina)	Folhas	>100	-	100	66,7±2,3	71,3±3,9	81,8±9,8
<i>Calea uniflora</i> (fração diclorometano)	Folhas	63,5	56,24 a 71,73	50	39,7±2,3	0	0

(continua)

(continuação)

Amostras	Partes das plantas utilizadas	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/mL)	IC <sup>b</sup> 95% (µg/mL)	Concen. inicial testada (µg/mL)	Triagem anti-herpética inicial		
					Amostras	% de inibição	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/mL)
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Partes aéreas	>100	-	100	0	4,4±1,8	0
<i>Carlina acaulis</i>	Partes aéreas	>100	-	100	29,2±7,4	13,2±3,5	12,9±3,3
<i>Carlina acaulis</i>	Raízes	>100	-	100	5,4±3,2	37,5±4,3	25,7±2,6
<i>Carum carvi</i>	Frutos	>100	-	100	8,6±0,4	32,5±2,7	0
<i>Castanea vesca (C. sativa)</i>	Folhas	>100	-	100	61,5±1,4	48,5±4,4	38,7±3,4
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Folhas	>100	-	100	22,1±8,0	29,7±2,8	12,3±3,9
<i>Cordia curasavica (extrato bruto)</i>	Folhas	36,0	24,97 a 51,81	15	22,6±2,4	32,4±7,3	12,3±2,3
<i>Cordia curasavica (fração hexano)</i>	Folhas	22,6	16,48 a 31,00	10	0	6,7±1,2	0
<i>Drimys brasiliensis</i>	Folhas	>100	-	100	22,0±3,2	7,9±1,1	12,2±1,2
<i>Equisetum arvense</i>	Partes aéreas	>100	-	100	23,5±3,6	26,3±3,7	32,4±2,3
<i>Eugenia uniflora</i>	Folhas	>100	-	100	99,0±1,5	73,4±9,5	76,7±8,9
<i>Eupatorium bupleurifolium (extrato bruto)</i>	Folhas	>100	-	100	46,0±1,8	26,7±1,0	22,3±3,4
<i>Eupatorium bupleurifolium (fração butanólica)</i>	Folhas	97,6	68,57 a 138,8	50	44,6±2,3	12,2±2,7	24,5±2,2
<i>Eupatorium bupleurifolium (resíduo aquoso)</i>	Folhas	>100	-	100	45,6±0,3	12,9±2,5	7,8±2,3
<i>Euphrasia officinalis ssp. rostkoviana</i>	Partes aéreas	>100	-	100	26,4±3,4	19,5±6,3	23,4±2,3

(continua)

(continuação)

Amostras	Partes das plantas utilizadas	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/mL)	IC <sup>b</sup> 95% (µg/mL)	Concen. inicial testada (µg/mL)	Triagem anti-herpética inicial		
					Amostras	% de inibição	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/mL)
<i>Foeniculum vulgare</i>	Frutos	>100	-	100	29,2±7,4	23,5±1,7	33,3±2,8
<i>Galeopsis tetrahit</i>	Partes aéreas	>100	-	100	23,5±3,6	17,7±4,5	18,6±3,4
<i>Ganoderma lucidum</i>	Corpo frutífero	>100	-	100	0	0	0
<i>Glechoma hederaceae</i>	Partes aéreas	>100	-	100	22,5±0,9	14,5±2,5	23,4±3,4
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Raízes	>100	-	100	23,7±0,8	33,9±2,3	33,5±3,3
<i>Hedera helix</i>	Folhas	>100	-	100	23,0±1,4	19,8±3,2	25,6±3,4
<i>Helianthus annuus</i>	Pétalas	>100	-	100	12,7±1,2	18,7±3,8	3,4±1,2
<i>Hepatica nobilis</i>	Folhas	>100	-	100	2,7±3,7	20,5±1,6	8,7±2,1
<i>Inonotus obliquus</i>	Corpo frutífero	>100	-	100	0	0	0
<i>Kalanchoe brasiliensis</i>	Folhas	>100	-	100	0	0,8±0,2	0
<i>Lantana camara</i>	Folhas	9,64	7,261 a 12,79	5	100	29,3±4,9	38,4±3,3
<i>Liquidambar orientalis</i>	Bálsamo	19,5	15,30 a 24,76	10	98,2±2,6	30,0±3,0	36,6±3,9
<i>Lycopodium clavatum</i>	Partes aéreas	>100	-	100	84,8±9,3	81,7±8,5	78,9±8,9
<i>Lycopodium clavatum</i>	Folhas	66,4	54,21 a 81,37	75	2,7±1,3	34,7±2,6	7,8±3,2
<i>Matricaria chamomilla</i>	Folhas	>100	-	100	15,0±1,4	27,5±1,6	12,3±2,3
<i>Nelumbo nucifera</i>	Folhas	>100	-	100	98,0±1,2	20,8±2,6	0
<i>Nelumbo nucifera</i>	Rizoma	76,5	55,23 a 105,8	25	0	0	0
<i>Nelumbo nucifera</i>	Sementes	>100	-	100	0	0	0
<i>Papaver rhoeas</i>	Folhas	>100	-	100	0,4±0,5	22,4±1,8	9,9±3,2
<i>Papaver somniferum</i>	Sementes	>100	-	100	0	14,9±3,4	0
<i>Peucedanum ostruthium</i>	Partes aéreas	>100	-	100	19,7±1,4	28,0±1,3	18,7±3,6

(continua)

(continuação)

Amostras	Partes das plantas utilizadas	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/mL)	IC <sup>b</sup> 95% (µg/mL)	Concen. inicial testada (µg/mL)	Triagem anti-herpética inicial		
					Amostras	% de inibição	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/mL)
<i>Peucedanum ostruthium</i>	Rizoma	29,9	24,03 a 37,20	10	5,7±2,2	2,3±0,3	1,2±0,9
<i>Pimpinella anisum</i>	Flores	>100	-	100	1,4±2,0	32,0±5,7	0,9±0,2
<i>Pimpinella major</i>	Raízes	67,7	50,38 a 91,03	50	1,4±2,0	13,6±3,5	0
<i>Piper nigrum</i>	Sementes	24,0	17,73 a 32,53	10	44,8±5,4	38,7±5,2	33,3±1,2
<i>Plantago lanceolata</i>	Folhas	>100	-	100	0	33,0±3,1	6,5±1,2
<i>Polygala senega</i>	Raízes	9,02	6,428 a 12,67	2,5	NR	NR	NR
<i>Polygala vulgaris</i>	Partes aéreas	>100	-	100	11,4±7,6	20,7±1,3	12,2±1,2
<i>Polypodium vulgare</i>	Rizoma	>100	-	100	28,5±7,3	21,3±3,0	0
<i>Potentilla anserinae</i>	Partes aéreas	>100	-	100	0	28,8±1,2	0
<i>Prunella grandiflora</i>	Partes aéreas	>100	-	100	4,2±2,0	0	0
<i>Ribes nigrum</i>	Folhas	>100	-	100	74,9±2,9	24,1±3,4	0
<i>Ribes nigrum</i>	Frutos	>100	-	100	0	29,7±2,0	0
<i>Rosa canina</i>	Flores	>100	-	100	43,5±3,3	35,7±1,9	33,3±4,5
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Folhas	15,3	11,28 a 20,76	5	NR	NR	NR
<i>Ruta graveolens</i>	Partes aéreas	>100	-	100	98,8±1,7	0	100
<i>Salvia glutinosa</i>	Partes aéreas	>100	-	100	53,5±4,4	14,5±1,3	32,4±3,1
<i>Sambucus nigra</i>	Folhas	>100	-	100	2,5±3,6	21,0±2,8	0
<i>Sambucus nigra</i>	Frutos	>100	-	100	3,3±4,7	19,1±3,8	17,9±3,9
<i>Scrophularia nodosa</i>	Partes aéreas	>100	-	100	2,4±1,4	0	0
<i>Scrophularia nodosa</i>	Raízes	>100	-	100	2,4±1,4	17,6±1,2	0
<i>Solanum dulcamara</i>	Ramos	>100	-	100	1,5±2,1	13,0±2,4	8,9±6,7

(continua)

(continuação)

Amostras	Partes das plantas utilizadas	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/mL)	IC <sup>b</sup> 95% (µg/mL)	Concen. inicial testada (µg/mL)	Triagem anti-herpética inicial		
					Amostras	% de inibição	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/mL)
<i>Solanum pseudoquina</i>	Folhas	>100	-	100	7,9±3,0	16,6±2,6	0
<i>Solanum sp1</i>	Folhas	>100	-	100	32,7±5,3	0	23,4±2,2
<i>Solanum sp2</i>	Folhas	>100	-	100	0	0	0
<i>Stachys officinalis</i>	Partes aéreas	>100	-	100	0	23,3±2,1	0
<i>Stachys sylvatica</i>	Partes aéreas	>100	-	100	17,7±3,0	11,3±2,5	12,3±2,5
<i>Strychnos pseudoquina</i> (fração acetato de etila)	Cascas	53,8	43,44 a 66,55	50	100	89,7±7,9	100
<i>Styrax calamitus</i>	Resina	15,4	11,46 a 20,81	5	29,7±7,1	10,1±0,6	22,3±2,5
<i>Teucrium chamaedrys</i>	Partes aéreas	>100	-	100	17,1±8,3	17,9±3,5	12,7±1,8
<i>Thymus pulegioides</i>	Partes aéreas	>100	-	100	47,0±2,2	0	34,5±3,2
<i>Tilia cordata</i>	Folhas	>100	-	100	4,0±1,7	0	0
<i>Tussilago farfara</i>	Folhas	>100	-	100	22,8±0,5	68,2±1,4	0
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	Folhas	>100	-	100	12,8±5,4	18,5±1,1	4,5±2,4
<i>Valeriana officinalis</i>	Raízes	>100	-	100	18,9±0,2	27,6±3,1	21,2±3,4
<i>Verbascum densiflorum</i>	Folhas	>100	-	100	13,2±6,2	18,4±2,7	3,4±1,2
<i>Verbena officinalis</i>	Partes aéreas	>100	-	100	30,4±1,8	30,5±0,2	27,8±3,4
<i>Veronica officinalis</i>	Partes aéreas	>100	-	100	10,2±2,5	23,6±3,1	2,3±0,9
<i>Viola odorata</i>	Partes aéreas	>100	-	100	0	0	0
<i>Viola tricolor</i>	Partes aéreas	>100	-	100	9,8±1,8	26,5±4,1	0,9±0,1

<sup>a</sup>CC<sub>50</sub> = concentração que reduziu em 50% a viabilidade das células Vero (µg/mL);

NR = não realizado (não foram avaliadas devido à alta toxicidade frente às células Vero);

Os valores representam a média de três ou mais experimentos independentes com seu intervalo de confiança de 95% (<sup>b</sup>IC 95%).

Em seguida, somente para as amostras que apresentaram inibição da replicação viral superior a 40%, foram novamente testadas e calcularam-se os valores de  $CI_{50}$  e de IS ( $IS = CC_{50}/CI_{50}$ ) para cada uma delas. Em relação ao HSV-1 (cepa KOS), foram identificadas 27 amostras ativas, sendo que 11 dessas, referentes a nove plantas, obtiveram os maiores valores de IS (Tabela 5.3). Para o HSV-1 (cepa 29-R), foram identificadas 17 amostras ativas, sendo que cinco dessas, pertencentes a três plantas, obtiveram os maiores valores de IS (Tabela 5.4). Por fim, para o HSV-2 (cepa 333), foram identificadas 16 amostras ativas, sendo que nove dessas, pertencentes a cinco plantas, obtiveram os maiores valores de IS (Tabela 5.5).

Os resultados (Tabelas 5.3-5.5) demonstraram que as espécies mais promissoras foram *Calea phyllolepis* e *Strychnos pseudoquina*. Os extratos e frações obtidos a partir das folhas de *C. phyllolepis* e a fração acetato de etila do extrato padronizado das cascas dos caules de *S. pseudoquina*, inibiram a replicação viral, com os maiores valores de IS, corroborando sua seletividade.

O objetivo principal deste trabalho foi a identificação de uma amostra promissora e o estudo do seu mecanismo de ação. Um dos primeiros testes para se elucidar o mecanismo de ação de uma amostra é a ação virucida direta. Como descrito anteriormente, este ensaio tem como objetivo avaliar se as amostras são capazes de inativar diretamente as partículas virais. Os extratos e frações de *Calea phyllolepis* apresentaram potente ação virucida (100%), em todas as concentrações testadas, demonstrando seu grande potencial como microbicida. Entretanto, por questões de ordem prática (falta de material suficiente para continuar os estudos e impossibilidade de obtê-lo em tempo hábil), esta planta não foi escolhida para realizar este objetivo, e seu potencial como microbicida, será avaliado oportunamente.

Desta forma, neste estudo, a elucidação do mecanismo da ação anti-herpética foi realizada apenas com *Strychnos pseudoquina*. Outro fator motivador para tal escolha foi a parceria com um laboratório da Universidade Federal de Viçosa (UFV-MG), que realiza estudos fitoquímicos com esta planta, o que facilitou o acesso aos compostos dela isolados e permitiu a continuidade do presente trabalho.

Tabela 5.3. Resultados da avaliação da citotoxicidade em células Vero e da atividade anti-HSV-1 (cepa KOS).

Amostra	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	IC <sup>b</sup> 95%	HSV-1 (cepa KOS)			
	(µg/mL)	(µg/mL)	VERO	CI <sub>50</sub> <sup>c</sup>	IC <sup>b</sup> 95%	IS <sup>d</sup>
				(µg/mL)	(µg/mL)	
<i>Calamintha menthifolia</i>	>100	-		212,0	104,6 a 429,7	>0,47
<i>Calea phyllolepis</i> (extrato bruto)	>100	-		16,49	13,12 a 20,71	>6,06
<i>Calea phyllolepis</i> (resíduo aquoso)	>100	-		19,29	15,05 a 24,72	>5,18
<i>Calea phyllolepis</i> (fração butanólica)	>100	-		7,88	5,01 a 12,41	>12,69
<i>Calea phyllolepis</i> (fração butanólica B)	>100	-		65,32	50,03 a 85,30	>1,53
<i>Calea pinnatifida</i> (extrato bruto)	>100	-		655,1	292,3 a 1468	>0,15
<i>Calea pinnatifida</i> (fração acetato de etila)	>100	-		41,91	29,13 a 60,29	>2,39
<i>Calea uniflora</i> (extrato bruto)	>100	-		123,3	83,07 a 183,0	>0,81
<i>Calea uniflora</i> (fração acetato de etila)	>100	-		69,46	48,96 a 98,53	>1,44
<i>Calea uniflora</i> (fração diclorometano rica em desacetileupaserrina)	>100	-		271,6	70,73 a 1042	>0,37
<i>Calea uniflora</i> (fração diclorometano rica em noreugenina)	>100	-		34,85	24,06 a 50,48	>2,87
<i>Castanea vesca</i> (C. sativa)	>100	-		77,29	64,10 a 93,19	>1,29
<i>Eugenia uniflora</i>	>100	-		57,08	48,71 a 66,88	>1,75
<i>Eupatorium bupleurifolium</i> (extrato bruto)	>100	-		80,79	56,50 a 115,5	>1,24
<i>Eupatorium bupleurifolium</i> (resíduo aquoso)	>100	-		86,29	60,47 a 123,1	>1,16
<i>Eupatorium bupleurifolium</i> (fração butanólica)	97,57	68,57 a 138,8		74,73	56,21 a 99,37	1,31
<i>Lantana camara</i>	9,64	7,26 a 12,79		4,46	3,35 a 5,96	2,16
<i>Liquidambar orientalis</i>	19,46	15,30 a 24,76		7,15	5,52 a 9,26	2,72
<i>Lycopodium clavatum</i>	>100	-		44,75	37,76 a 53,03	>2,24

(continua)



(continuação)

<i>Nelumbo nucifera</i>	>100	-	273,1	162,4 a 459,3	>0,37
<i>Piper nigrum</i>	24,02	17,73 a 32,53	10,65	7,98 a 14,23	2,26
<i>Ribes nigrum</i>	>100	-	354,1	141,7 a 884,5	>0,28
<i>Rosa canina</i>	>100	-	244,4	129,0 a 463,0	>0,41
<i>Ruta graveolens</i>	>100	-	28,46	25,27 a 32,04	>3,51
<i>Salvia glutinosa</i>	>100	-	109,5	86,44 a 138,8	>0,91
<i>Strychnos pseudoquina (fração acetato de etila)</i>	53,77	43,44 a 66,55	14,01	11,97 a 16,39	3,84
<i>Thymus pulegioides</i>	>100	-	103,0	57,52 a 184,4	>0,97
<b>ACV</b>	>2.000	-	1,38	0,92 a 1,84	>1449,28

<sup>a</sup>CC<sub>50</sub> = concentração que reduziu em 50% a viabilidade das células Vero (µg/mL);

<sup>c</sup>CI<sub>50</sub> = concentração que inibiu 50% da replicação viral (µg/mL);

<sup>d</sup>IS = índice de seletividade (CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>);

Os valores representam a média de três ou mais experimentos independentes com seu intervalo de confiança de 95% (<sup>b</sup>IC 95%).

Tabela 5.4. Resultados da avaliação da citotoxicidade em células Vero e da atividade anti-HSV-1 (cepa 29-R).

Amostra	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	IC <sup>b</sup> 95%	HSV-1 (cepa 29-R)			
	(µg/mL)	(µg/mL)	VERO	CI <sub>50</sub> <sup>c</sup>	IC <sup>b</sup> 95%	IS <sup>d</sup>
				(µg/mL)	(µg/mL)	
<i>Boerhavia sp.</i>	>100			70,35	52,43 a 94,38	>1,42
<i>Calea phyllolepis (extrato bruto)</i>	>100			33,00	28,43 a 38,30	>3,03
<i>Calea phyllolepis (resíduo aquoso)</i>	>100			49,67	40,04 a 61,62	>2,01
<i>Calea phyllolepis (fração butanólica)</i>	>100			15,15	13,58 a 16,89	>6,60
<i>Calea phyllolepis (fração butanólica B)</i>	>100			52,33	37,09 a 73,81	>1,91
<i>Calea pinnatifida (extrato bruto)</i>	>100			473,1	49,00 a 4569	>0,21
<i>Calea pinnatifida (fração acetato de etila)</i>	>100			30,64	16,95 a 55,36	>3,26
<i>Calea pinnatifida (fração diclorometano rica em furano lactona)</i>	25,36	23,00 a 27,96		21,26	15,85 a 28,53	1,19
<i>Calea uniflora (extrato bruto)</i>	>100			2364	313,8 a 7814	>0,04
<i>Calea uniflora (fração acetato de etila)</i>	>100			94,49	55,95 a 127,6	>1,06
<i>Calea uniflora (fração diclorometano rica em desacetileupaserrina)</i>	>100			180,53	65,67 a 496,3	>0,55
<i>Calea uniflora (fração diclorometano rica em noreugenina)</i>	>100			63,74	43,35 a 93,72	>1,57
<i>Castanea vesca (C. sativa)</i>	>100			137,5	101,8 a 185,8	>0,73
<i>Eugenia uniflora</i>	>100			50,57	45,34 a 56,41	>1,98
<i>Lycopodium clavatum</i>	>100			54,53	42,33 a 70,24	>1,83
<i>Strychnos pseudoquina (fração acetato de etila)</i>	53,77	43,44 a 66,55		17,62	14,47 a 21,45	3,05
<i>Tussilago farfara</i>	>100			235,4	108,6 a 510,6	>0,43
<b>ACV</b>	>2.000	-		SA	-	-

<sup>a</sup>CC<sub>50</sub> = concentração que reduziu em 50% a viabilidade das células Vero (µg/mL); <sup>c</sup>CI<sub>50</sub> = concentração que inibiu 50% da replicação viral (µg/mL); <sup>d</sup>IS = índice de seletividade (CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>); SA = sem atividade nas concentrações testadas.

Os valores representam a média de três ou mais experimentos independentes com seu intervalo de confiança de 95% (<sup>b</sup>IC 95%).

Tabela 5.5. Resultados da avaliação da citotoxicidade em células Vero e da atividade anti-HSV-2 (cepa 333).

Amostra	CC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	IC <sup>b</sup> 95%	HSV-2 (cepa 333)			
	(µg/mL)	(µg/mL)	VERO	CI <sub>50</sub> <sup>c</sup>	IC <sup>b</sup> 95%	IS <sup>d</sup>
				(µg/mL)	(µg/mL)	
<i>Calea phyllolepis</i> (extrato bruto)	>100			26,07	21,21 a 32,03	>3,84
<i>Calea phyllolepis</i> (resíduo aquoso)	>100			28,14	22,70 a 34,88	>3,55
<i>Calea phyllolepis</i> (fração butanólica)	>100			22,88	17,72 a 29,55	>4,37
<i>Calea phyllolepis</i> (fração butanólica B)	>100			33,61	25,25 a 44,74	>2,97
<i>Calea pinnatifida</i> (extrato bruto)	>100			162,3	46,13 a 571,1	>0,62
<i>Calea pinnatifida</i> (fração acetato de etila)	>100			17,72	12,73 a 24,67	>5,64
<i>Calea pinnatifida</i> (fração diclorometano rica em furano lactona)	25,36	23,00 a 27,96		16,39	13,78 a 19,48	1,55
<i>Calea uniflora</i> (extrato bruto)	>100			37,69	25,83 a 55,00	>2,65
<i>Calea uniflora</i> (fração acetato de etila)	>100			231,9	81,75 a 657,5	>0,43
<i>Calea uniflora</i> (fração acetato de etila rica em $\alpha$ -hidroxibuteína)	18,48	15,50 a 22,03		17,69	14,04 a 22,27	1,05
<i>Calea uniflora</i> (fração diclorometano rica em desacetileupaserrina)	>100			599,8	37,25 a 965,8	>0,17
<i>Calea uniflora</i> (fração diclorometano rica em noreugenina)	>100			33,43	22,66 a 49,32	>2,99
<i>Eugenia uniflora</i>	>100			86,27	58,27 a 127,7	>1,16
<i>Lycopodium clavatum</i>	>100			57,93	49,05 a 68,43	>1,73
<i>Ruta graveolens</i>	>100			23,87	20,53 a 27,76	>4,19
<i>Strychnos pseudoquina</i> (fração acetato de etila)	53,77	43,44 a 66,55		8,64	7,64 a 9,79	6,22
<b>ACV</b>	>2.000	-		3,23	2,34 a 4,12	>619

<sup>a</sup>CC<sub>50</sub> = concentração que reduziu em 50 % a viabilidade das células Vero (µg/mL);

<sup>c</sup>CI<sub>50</sub> = concentração que inibiu 50 % da replicação viral (µg/mL); <sup>d</sup>IS = índice de seletividade (CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>);

Os valores representam a média de três ou mais experimentos independentes  $\pm$  com seu intervalo de confiança de 95% (<sup>b</sup>IC 95%).

### 5.3. Fracionamento biomonitorado de *Strychnos pseudoquina*

O isolamento de substâncias ativas pode ser monitorado por ensaios direcionados para a avaliação de uma determinada atividade farmacológica. O fracionamento de um extrato vegetal pode ser iniciado com a partição por solventes orgânicos de polaridade crescente, uma vez que o coeficiente de partição ou de distribuição apresentado por cada substância está relacionado com a concentração de cada um dos componentes em cada uma das fases (DEY; HARBONE, 1991).

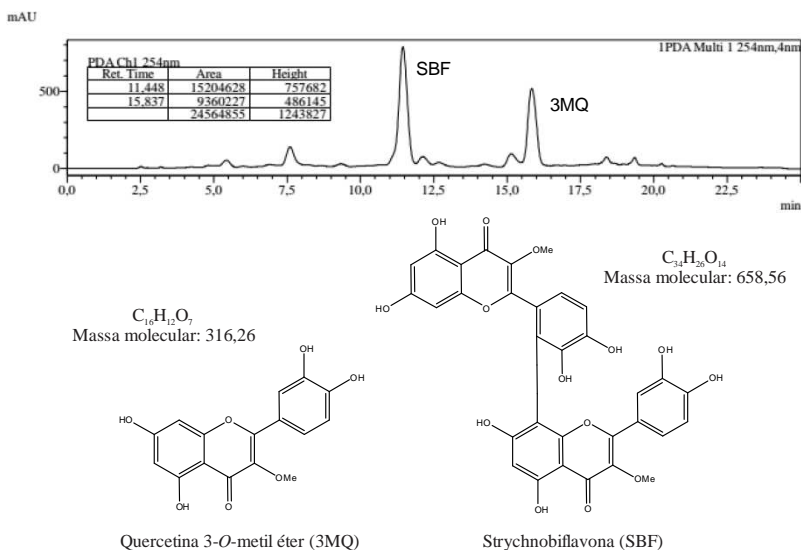
Como relatado na revisão bibliográfica, estudos fitoquímicos revelaram a presença de flavonoides (quercetina 3-*O*-metil éter, isoramnetina e strychnobiflavona) e alcaloides (diabolina, 11-metoxi diabolina e nor-dihidrotoxiferina), principalmente nas folhas e nas cascas desta planta (MONACHE; ALDO; MARINI-BETTOLO, 1969; NICOLETTI et al., 1984; LAGE et al., 2013).

Os vírus envelopados, entre eles os HSV, podem ser mais suscetíveis à ação de compostos fenólicos (ácidos fenólicos, taninos e flavonoides). Tais compostos se ligam às proteínas formando complexos instáveis, podendo assim facilmente interagir com as glicoproteínas de superfície do envelope viral (SERKEDJIEVA; IVANCHEVA, 1999; JASSIM; NAJI, 2003). Os compostos polifenólicos podem atuar também através da associação com os receptores de superfície das células hospedeiras e/ou com as proteínas das partículas virais, resultando na redução e, até mesmo, na inibição parcial ou total da adsorção e penetração viral (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGUE, 1997; ASTANI; NAVID; SCHNITZLER, 2014).

O fracionamento biomonitorado foi realizado pelo Prof. Dr. João Paulo Leite, da UFV, conforme descrito por Lage et al. (2013). As cascas dos caules foram coletadas na região do cerrado, em Uberlândia, MG, e a exsiccata (HUFU 10936) foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Foi empregado como material-teste inicial o extrato acetato de etila padronizado (EAEP), obtido a partir das cascas de *S. pseudoquina*. A partir desse extrato foram isolados dois componentes majoritários: uma biflavona (strychnobiflavona – SBF; 189,51 µg/mg de EAEP) e uma flavona metoxilada (quercetina 3-*O*-metil éter – 3MQ; 105,80 µg/mg de EAEP). A Figura 5.1 mostra um cromatograma representativo, demonstrando a presença dos dois compostos isolados. Informações sobre esta padronização não são aqui apresentadas, pois a aluna de Mestrado do

Prof. João Paulo Leite, que realizou este processo, ainda não defendeu sua Dissertação, nem publicou tais resultados.

Figura 5.1. Perfil cromatográfico<sup>7</sup> correspondente ao extrato acetato de etila padronizado (EAEP), obtido com as cascas dos caules de *Strychnos pseudoquina* e estruturas dos compostos majoritários: quercetina 3-*O*-metil éter (3MQ) e strychnobiflavona (SBF).



<sup>7</sup> **Condições cromatográficas:** A análise por CLAE foi realizada em um equipamento *Shimadzu Prominence UFLC* (Shimadzu, Japão) equipado com um sistema de cromatografia, um sistema de bombeamento LC-20AD, um desgaseificador de solvente *on-line* e um detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A. A aquisição e processamento dos dados foram realizados pelo *Software Labsolution LC-Shimadzu*. As amostras foram separadas por uma coluna de fase reversa (VP-OD5 C18, 250 mm x 4,6 mm ID, 4,8 μm) com uma pré-coluna (10 mm x 4,6 mm ID, 5 μm). Os solventes utilizados foram os seguintes: A, 0,5% de ácido acético em água; e B, metanol. A separação dos compostos foi realizada por um sistema de gradiente de eluição consistindo de: 0-17 min 50-37% A, 17-18 min 37-10% A, 18-20 min manteve-se inalterada (10% A) e 18-21 min voltou à condição inicial (50% de A). Um período de equilíbrio foi utilizado entre as execuções. A taxa de fluxo foi de 1,0 mL/min e a temperatura da coluna foi de 30°C. O detector de arranjo de diodos foi fixado em 254 nm para a aquisição dos cromatogramas e os espectros de UV foram adquiridos entre 190 e 800 nm. O EAEP foi diluído em metanol por sonicção, filtrado em membrana de celulose (0,45 diâmetro do poro) e injetado com um volume de 20 μl.

### 5.3.1. Avaliação da citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade do EAEP e de seus dois compostos isolados (3MQ e SBF), foi empregado o ensaio colorimétrico com sulforrodamina B (VICHAI; KIRTIKARA, 2006), que quantifica as proteínas, conforme descrito no item 4.4. Os valores de  $CC_{50}$  obtidos foram:  $53,77 \pm 14,67 \mu\text{g/mL}$  (EAEP),  $2,32 \pm 0,67 \mu\text{g/mL}$  (3MQ) e  $267,23 \pm 34,55 \mu\text{g/mL}$  (SBF). Tais resultados mostraram que a 3MQ foi muito tóxica para as células Vero, enquanto que o EAEP apresentou toxicidade moderada e a SBF foi a amostra menos citotóxica (Tabela 5.6).

### 5.3.2. Avaliação da atividade anti-herpética

Para avaliar a atividade antiviral *in vitro* do EAEP e de seus compostos isolados, foi utilizado o ensaio de redução do número das placas de lise e os resultados foram expressos em valores de  $CI_{50}$ . De posse dos valores de  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$  foram calculados os valores de IS.

Os resultados mais promissores da SBF foram obtidos frente ao HSV-2 (cepa 333) e ao HSV-1 (cepa KOS), apresentando valores de IS elevados, quando comparados aos do EAEP (Tabela 5.6). A 3MQ não apresentou ação antiviral significativa nas condições testadas. Estes resultados demonstram que a SBF parece ser o componente principal associado à atividade anti-herpética do EAEP, embora outros componentes ativos não possam ser descartados.

A atividade anti-herpética de outras biflavonas já foi avaliada contra o HSV-1 e o HSV-2. Hayashi, Hayashi e Morita (1992) relataram a atividade antiviral da ginkgetina, isolada de *Ginkgo biloba*, com valores de IS=15,1 para o HSV-1 e 13,8 para o HSV-2. Lin et al. (1999) obtiveram valores de IS>5,6 (HSV-1) e >2,1 (HSV-2) para a amentoflavona; valores de IS>11,6 (HSV-1) e >11,8 (HSV-2) para a robustaflavona, e valores de IS> 6,4 (HSV-2) para a rusflavona. Por fim, um trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa (FREITAS et al., 2009), também avaliou a ação anti-herpética (anti-HSV-1, cepa KOS) de biflavonas isoladas de *Araucaria angustifolia*, sendo que as mesmas mostraram valores de IS mais baixos (II-7-O-metil-robustaflavona – IS=3,0 e cupressuflavona – IS=2,98) do que o obtido aqui (strychnobiflavona – IS=22,61).

Tabela 5.6. Resultados da citotoxicidade e da atividade anti-herpética do EAEP de *Strychnos pseudoquina* e de seus compostos isolados (SBF e 3MQ).

Amostras	CC <sub>50</sub> (µg/mL) Células Vero	CI <sub>50</sub> (µg/mL)					
		HSV-1 (cepa KOS)		HSV-1 (cepa 29-R)		HSV-2 (cepa 333)	
		CI <sub>50</sub>	IS	CI <sub>50</sub>	IS	CI <sub>50</sub>	IS
EAEP	53,77 ± 14,67	14,01± 2,56	3,84	17,62± 1,53	3,05	8,64± 0,39	6,22
3MQ	2,32 ± 0,67	SA	-	SA	-	SA	-
SBF	267,23 ± 34,55	11,82± 4,32	22,61	27,64± 1,99	9,67	6,31± 1,42	42,33
ACV	>2.000	1,38± 0,46	>1.449	SA	-	3,23± 0,89	>619

CC<sub>50</sub> = concentração que reduziu em 50% a viabilidade das células Vero;

CI<sub>50</sub> = concentração que inibiu 50% da replicação viral;

IS = índice de seletividade (CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>); SA = sem atividade;

EAEP = extrato acetato de etila padronizado; 3MQ = quercetina 3-*O*-metil éter;

SBF = strychnobiflavona; ACV = aciclovir.

Os valores obtidos representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

## 5.4. Estudo do mecanismo da ação anti-herpética

A elucidação do mecanismo da atividade anti-herpética foi conduzida com o EAEP e a SBF contra o HSV-1 (cepa KOS) e o HSV-2 (cepa 333), uma vez que o HSV-1 (cepa 29-R) foi menos sensível.

### 5.4.1. Avaliação da ação virucida direta

Uma abordagem que possui grande apelo na terapia de doenças sexualmente transmissíveis, incluindo as infecções pelos HSV, é a aplicação tópica de compostos que podem inativar permanentemente as partículas virais (EKBLAD et al., 2010). Isto pode ocorrer diretamente pela desintegração completa das partículas virais, pela solubilização do envelope viral, ou por modificações químicas ou degradação de algumas glicoproteínas essenciais do envelope (BULTMANN; TEUTON; BRANDT, 2007).

Com o objetivo de investigar a possível ação virucida do EAEP e da SBF, este ensaio foi conduzido utilizando-se concentrações dez vezes

superiores aos seus valores de  $CI_{50}$  e foram realizadas dez diluições seriadas (1:2), a partir da maior concentração. O uso de concentrações superiores aos valores de  $CI_{50}$  justifica-se pela necessidade de se ter certeza que a ação anti-herpética, determinada pelo ensaio de redução do número das placas de lise, não foi causada pelo efeito direto das amostras sobre os vírus, antes do contato com as células hospedeiras, mas sim pela sua interferência em alguma etapa do processo de replicação viral. A temperatura de 37°C foi considerada por ser a temperatura corporal humana e aquela da maioria dos experimentos comumente realizados, e a temperatura de 4°C por ser empregada nos ensaios de adsorção, pós-adsorção e penetração viral.

Ambas as amostras apresentaram atividade virucida frente às duas cepas virais testadas (Figura 5.2). A 37°C, tanto o EAEP quanto a SBF causaram inativação da infecciosidade do HSV-1 e do HSV-2 (em concentrações menores que seus valores de  $CI_{50}$ ), apresentando baixos valores de  $CV_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) [HSV-1:  $6,07 \pm 1,51$  (EAEP) e  $3,55 \pm 0,56$  (SBF); HSV-2:  $5,70 \pm 1,24$  (EAEP) e  $9,64 \pm 2,00$  (SBF)]. Por outro lado, quando a temperatura foi reduzida para 4°C, os efeitos das amostras sobre a infecciosidade de ambos os vírus foram reduzidos, principalmente para o HSV-1, com valores mais elevados de  $CV_{50}$ :  $36,06 \pm 4,60$  e  $68,08 \pm 8,98$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente para o EAEP e a SBF. Para o HSV-2, os valores de  $CV_{50}$  foram de  $12,86 \pm 2,70$  e  $7,91 \pm 1,14$   $\mu\text{g/mL}$  para o EAEP e a SBF, respectivamente.

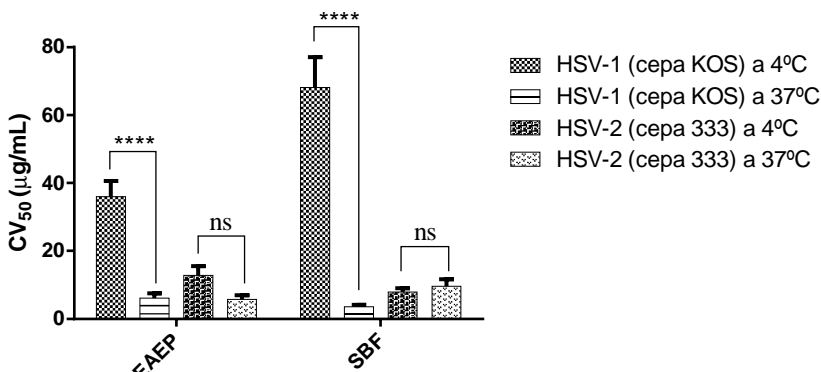
A análise estatística dos dados obtidos para o HSV-1 (cepa KOS) mostrou que as concentrações das amostras, que reduziram a infecciosidade viral em 50% ( $CV_{50}$ ), foram estatisticamente diferentes (ANOVA/Tukey: \*\*\*\* $p < 0,0001$ ) em relação às temperaturas de incubação (4°C ou 37°C). Desta forma, os resultados obtidos nos ensaios realizados a 4°C, mostraram, de maneira geral, a necessidade de concentrações maiores do EAEP e da SBF para neutralizar o vírus, sugerindo que a temperatura é um fator interferente na atividade virucida para o HSV-1 (cepa KOS).

Ao comparar os resultados da ação virucida direta com a  $CI_{50}$  do EAEP (14,01  $\mu\text{g/mL}$ ) e SBF (11,82  $\mu\text{g/mL}$ ), obtida pelo ensaio de redução do número das placas de lise contra o HSV-1 (cepa KOS), verificou-se que a concentração requerida para inativar extracelularmente 50% do HSV-1 é cerca de duas vezes menor a 37°C e três vezes maior a 4°C para o EAEP, e três vezes menor a 37°C e seis vezes maior a 4°C para a SBF. Portanto, a inativação do HSV-1 pelas amostras poderia estar relacionada à ligação dos componentes das mesmas às glicoproteínas virais, inibindo assim, os estágios iniciais da



infecção (adsorção, pós-adsorção e penetração) (LUCKEMEYER, 2009). Com relação ao HSV-2, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas, para as duas temperaturas testadas. Porém, como será discutido nas seções 5.4.3 e 5.4.4, tanto o EAEP quanto a SBF, inibiram a adsorção, a pós-adsorção e a penetração de ambos os vírus, em concentrações não virucidas.

Figura 5.2. Resultados da avaliação da atividade virucida [HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333)] do extrato acetato de etila padronizado (EAEP) de *Strychnos pseudoquina* e da strychnobiflavona (SBF) dele isolada, por meio da técnica de redução do número das placas de lise, expressos em valores de  $CV_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ).



ns:  $p > 0,05$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , 4°C vs 37°C, two-way ANOVA, pós teste Tukey.

Assim, pode-se sugerir que o EAEP e a SBF, pelo seu efeito virucida, poderiam ser utilizados na preparação de formulações microbicidas tópicas. Tem sido dada ênfase no desenvolvimento intravaginal de agentes microbicidas, capazes de reduzir a transmissão viral. Em um estudo realizado por D'Cruz et al. (2000), foi preparado um gel com dupla ação (anti-HIV e espermicida), o qual não apresentou toxicidade, tendo grande potencial clínico como contraceptivo para mulheres que possuem alto risco de contrair o HIV durante as relações sexuais.

A atividade virucida *in vitro* foi também detectada para outra biflavona, ginkgetina, isolada do *Ginkgo biloba*, apresentando uma redução da infeciosidade de aproximadamente 60% (5  $\mu\text{g/mL}$ ) e 80% (50  $\mu\text{g/mL}$ ) (HAYASHI; HAYASHI; MORITA, 1992).

#### 5.4.2. Avaliação da ação virucida na presença de soluções ricas em proteínas

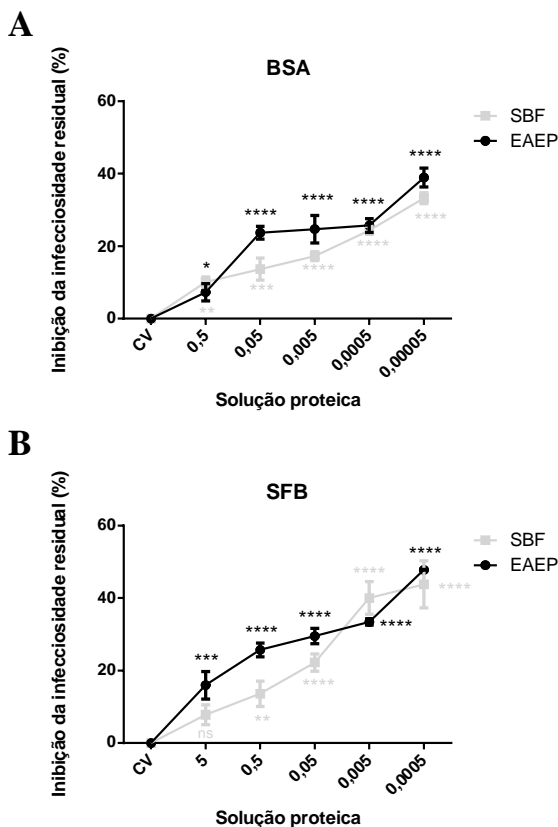
Considerando que o HSV-2 é o principal agente etiológico das infecções herpéticas genitais, e o reconhecimento de que a capacidade virucida de diferentes compostos é relativamente menor em presença de soluções ricas em proteínas (PIRET et al., 2002; ISAACS; JIA; XU, 2004), a atividade virucida das amostras foi também investigada frente ao HSV-2, em presença de soluções proteicas contendo SFB (soro fetal bovino) e BSA (*bovine serum albumine*).

A Figura 5.3 mostra os percentuais de inibição da infecciosidade do HSV-2, na presença de diferentes concentrações de BSA e SFB, e dos valores de  $CV_{50}$  do EAEP e da SBF, obtidos a 37°C ( $5,70 \pm 1,24$  e  $9,64 \pm 2,00$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente), sendo essas últimas reconhecidamente virucidas.

Com base nos resultados apresentados na Figura 5.3 pode-se concluir que a atividade virucida do EAEP e da SBF foi diminuindo à medida que as soluções proteicas estavam mais concentradas, sugerindo que concentrações mais elevadas são necessárias para evitar o efeito de neutralização exercido pelas proteínas.

Somente nas menores concentrações proteicas (BSA – 0,005%, 0,0005 e 0,0005% e SBF – 0,05%, 0,005% e 0,0005%) as amostras reduziram de forma significativa a infecciosidade viral, em relação aos controles virais (0% de redução da infecciosidade residual), demonstrando que as amostras mantiveram a sua atividade virucida na presença de baixas concentrações de SFB e BSA. Isto demonstra que ambas as amostras possuem potencial, a ser explorado futuramente, como microbicidas tópicos.

Figura 5.3. Resultados da inativação do HSV-2 (cepa 333), na presença de soluções proteicas (BSA = *bovine serum albumine* e SFB = soro fetal bovino) e do extrato acetato de etila padronizado (EAEP) de *Strychnos pseudoquina* e da strychnobiflavona (SBF) dele isolada.



Os resultados foram analisados em relação aos controles virais, com e sem as soluções proteicas (0% de inibição) e expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes. ns:  $p > 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; *two-way* ANOVA, pós teste Dunett. As amostras EAEP e SBF foram testadas nas concentrações de 22,80  $\mu\text{g/mL}$  e 38,56  $\mu\text{g/mL}$ <sup>8</sup>, respectivamente.

<sup>8</sup> Considerando que estas concentrações são diluídas quatro vezes no decorrer do experimento com a adição de volumes equivalentes de solução proteica e suspensão viral, na realidade os valores de  $\text{CV}_{50}$  das mesmas são de 5,70 e 9,64  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

#### 5.4.3. Avaliação dos efeitos das amostras na adsorção viral

A adsorção é responsável pelo início da infecção pelos HSV. O sulfato de heparana, um glicosaminoglicano, é considerado o principal receptor da ligação dos HSV, sendo que esse reconhecimento acontece via glicoproteínas do envelope (gB e/ou gD) (CHALLAND; YOUNG, 1998; SPEAR, 2004; ELLERMANN-ERIKSEN, 2005; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013). Experimentalmente, a etapa de adsorção pode ser modulada através da realização de ensaios a 4°C, onde a membrana apresenta rigidez que impede a penetração viral (COLBERE, 1975).

Assim, foram utilizados dois tipos de ensaios de adsorção, envolvendo duas diferentes estratégias metodológicas. Estes ensaios foram conduzidos utilizando concentrações cinco vezes superiores e cinco vezes inferiores aos valores de  $CI_{50}$  do EAEP e da SBF, e realizaram-se dez diluições seriadas (1:2) a partir da maior concentração. Como controle positivo, foi utilizado o sulfato de dextrana, que é conhecido pela sua capacidade de inibição da adsorção viral (AGUILAR; HELD; WAGNER, 2007; SAKDARAT et al., 2009). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.7.

Tanto o EAEP quanto a SBF inibiram a adsorção e a pós-adsorção de ambos os vírus testados. Quando as amostras foram misturadas com as suspensões virais e incubadas (adsorção), o EAEP foi mais ativo contra o HSV-1 (cepa KOS) do que contra o HSV-2 (cepa 333); em relação a SBF, sua atividade anti-herpética não foi diferente, em relação a cepa viral testada. Quando a monocamada celular foi infectada e posteriormente tratada com as amostras (pós-adsorção), tanto o EAEP como a SBF, não mostraram diferenças de intensidade na ação antiviral contra as duas cepas testadas, sendo que a SBF afetou mais intensamente esta etapa do que o EAEP. Esses resultados indicam que essas amostras são capazes de interferir nos eventos iniciais da infecção pelos HSV.

Tabela 5.7. Resultados do ensaio de inibição da adsorção e da pós-adsorção viral, expressos em valores de  $CI_{50}$  do EAEP de *Strychnos pseudoquina* e da SBF dele isolada.

Amostras	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )							
		Adsorção #				Pós-adsorção ##			
		Células Vero	HSV-1 (cepa KOS)		HSV-2 (cepa 333)		HSV-1 (cepa KOS)		HSV-2 (cepa 333)
$CI_{50}$	IS		$CI_{50}$	IS	$CI_{50}$	IS	$CI_{50}$	IS	
<b>EAEP</b>	53,77 $\pm$ 14,67	1,96 $\pm$ 0,39	27,43	6,02 $\pm$ 0,99	8,93	3,12 $\pm$ 1,42	17,23	3,15 $\pm$ 0,21	17,07
<b>SBF</b>	267,23 $\pm$ 34,55	3,05 $\pm$ 0,73	87,63	3,35 $\pm$ 0,74	79,72	1,40 $\pm$ 0,17	191,04	1,11 $\pm$ 0,16	242,35
<b>DEX-S</b>	>500	0,16 $\pm$ 0,06	>3.125	0,10 $\pm$ 0,04	>5.000	0,21 $\pm$ 0,10	>2.380	0,17 $\pm$ 0,08	>2.941

$CC_{50}$  = concentração que reduziu em 50% a viabilidade das células Vero;

$CI_{50}$  = concentração que inibiu 50% da replicação viral;

IS = índice de seletividade ( $CC_{50}/CI_{50}$ );

EAEP = extrato acetato de etila padronizado; SBF = strychnobiflavona; DEX-S = sulfato de dextrana.

# as amostras foram misturadas a volumes equivalentes das suspensões virais e incubadas a 4°C por 2 h. ## a monocamada celular foi primeiramente infectada e mantida a 4°C por 2 h; após esse período, as amostras foram adicionadas e incubadas novamente a 4°C por 2 h. Os valores obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

#### 5.4.4. Avaliação dos efeitos das amostras na penetração viral

Posteriormente ao processo de adsorção dos vírus às células, esses precisam penetrar as membranas plasmáticas celulares para que possam inserir seu material genético e suas proteínas no interior das mesmas. Para que aconteça a inibição ou a desregulação desta etapa, a amostra deve interferir no processo de fusão do vírus com a membrana plasmática e/ou no desnudamento viral (CHALLAND; YOUNG, 1998).

Para que ocorra a penetração por fusão, após a adsorção da partícula viral à superfície celular, é preciso que a gD sofra alterações conformacionais ao interagir com um dos seus diversos receptores. Ainda, é necessário que ocorra a interação com a gB ou com o dímero gH-gL, ocorrendo assim a fusão do envelope viral com a membrana celular (SPEAR, 2004; ELLERMANN-ERIKSEN, 2005).

O efeito das amostras sobre esta etapa específica foi estudado, uma vez que é possível avaliá-la isoladamente por meio da adsorção dos vírus nas células a 4°C, seguida de uma rápida elevação da temperatura, momento em que ocorre a penetração dos vírus (MCCLAIN; FULLER, 1994). Logo, este ensaio foi conduzido utilizando-se concentrações cinco vezes superiores e cinco vezes inferiores aos valores de  $CI_{50}$  do EAEP e da SBF, e realizaram-se dez diluições seriadas (1:2) a partir da maior concentração. O sulfato de dextrana foi utilizado como controle positivo, dada a sua conhecida capacidade de inibição da penetração viral (AGUILAR; HELD; WAGNER, 2007; SAKDARAT et al., 2009). Os resultados obtidos constam na Tabela 5.8, os quais demonstram que tanto o EAEP quanto a SBF também inibiram a penetração viral.

Tabela 5.8. Resultados do ensaio de inibição da penetração viral, expressos em valores de  $CI_{50}$  do EAEP de *Strychnos pseudoquina* e da SBF dele isolada.

Amostras	CC <sub>50</sub> (µg/mL)	CI <sub>50</sub> (µg/mL)			
		Penetração			
		HSV-1 (cepa KOS)		HSV-2 (cepa 333)	
Células Vero	CI <sub>50</sub>	IS	CI <sub>50</sub>	IS	
EAEP	53,77 ±	7,33 ±	7,34	4,47 ±	12,03
	14,67	0,85		0,50	
SBF	267,23 ±	7,92 ±	33,74	5,11 ±	52,29
	34,55	1,87		1,62	
DEX-S	>500	1,78 ±	>1.351	2,39 ±	>909,1
		0,37		0,55	

CC<sub>50</sub> = concentração que reduziu em 50% a viabilidade das células Vero;

CI<sub>50</sub> = concentração que inibiu 50% da replicação viral;

IS = índice de seletividade (CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>);

EAEP = extrato acetato de etila padronizado; SBF = strychnobiflavona; DEX-S = sulfato de dextrana.

Os valores obtidos representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

Portanto, ao analisar os efeitos das amostras nos estágios iniciais da infecção viral, os resultados obtidos mostraram que a adsorção, a pós-adsorção e a penetração do HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333) foram inibidas por ambas as amostras, em diferentes níveis, como pode ser verificado pelos valores de IS (Tabela 5.7 e Tabela 5.8).

#### 5.4.5. Avaliação dos efeitos do tempo de adição das amostras no ciclo de replicação viral

O objetivo deste ensaio foi determinar a(s) etapa(s) do ciclo de replicação viral afetado(s) pelas amostras.

Aqui, foi avaliado o pré-tratamento e o tratamento simultâneo das células infectadas com o EAEP e a SBF para confirmar se estas amostras estariam mesmo atuando nos estágios iniciais da infecção, conforme detectado. O pré-tratamento gera informações acerca de um potencial “profilático”, ou seja, da interação das amostras com as células, e não diretamente com os vírus. Já o tratamento simultâneo engloba diferentes aspectos das etapas iniciais da replicação. Nesse sentido, este ensaio foi conduzido utilizando-se concentrações cinco

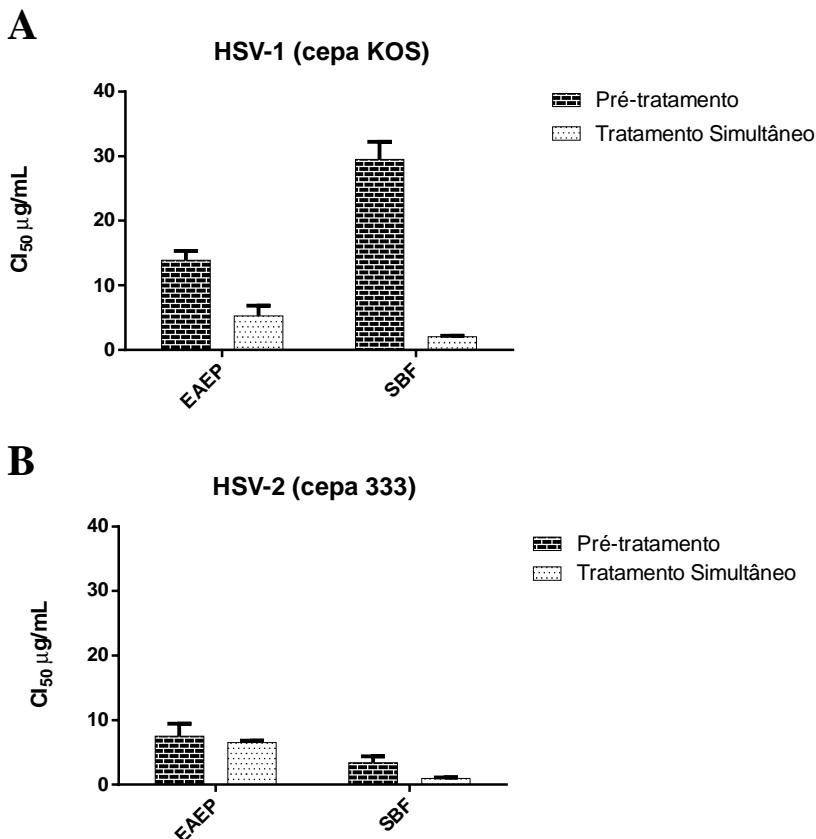
vezes superiores e cinco vezes inferiores aos valores de  $CI_{50}$  do EAEP e da SBF. O ACV foi utilizado como controle positivo.

Os resultados obtidos (Figura 5.4) mostraram que o pré-tratamento das células Vero com o EAEP e a SBF por 3 h afetou a multiplicação do HSV-2 [valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de  $7,56 \pm 1,89$  (EAEP) e  $3,43 \pm 0,98$  (SBF)] de maneira mais intensa do que a do HSV-1 [valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de  $13,89 \pm 1,44$  (EAEP) e  $29,50 \pm 2,73$  (SBF)]. Esses resultados sugerem que ambas as amostras podem proteger as células contra a infecção por HSV-2, em concentrações relativamente baixas. Este efeito corrobora uma potencial aplicação clínica destas amostras como agentes tópicos profiláticos. Contrariamente, a infecção pelo HSV-1 não parece ter sido alterada pelo pré-tratamento das células com o EAEP e a SBF (estas diferenças carecem uma análise mais aprofundada).

O tratamento simultâneo foi realizado através da adição das amostras nas células juntamente com os vírus. Os resultados obtidos confirmaram que o EAEP e a SBF afetam as fases iniciais do ciclo de replicação dos HSV [valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de  $5,29 \pm 1,56$  e  $2,04 \pm 0,16$  para o HSV-1, respectivamente, e de  $6,55 \pm 0,25$  e  $0,99 \pm 0,13$  para o HSV-2, respectivamente]. Os valores de  $CI_{50}$  obtidos com o tratamento simultâneo foram bem menores do que os obtidos com o tratamento pós-infecção [valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) de  $14,01 \pm 2,56$  e  $11,82 \pm 4,32$  para o HSV-1, respectivamente, e de  $8,64 \pm 0,39$  e  $6,31 \pm 1,42$  para o HSV-2, respectivamente], mesmo sendo significativamente reduzido o tempo de incubação das amostras. Este fato ratifica que as etapas iniciais da replicação viral (adsorção, pós-adsorção e penetração) são especialmente afetadas pelas amostras. O ACV não apresentou atividade inibitória no tratamento simultâneo e nas etapas de adsorção, pós-adsorção e penetração, como esperado.



Figura 5.4. Resultados do pré-tratamento e do tratamento simultâneo, expressos em valores de  $CI_{50}$  do extrato acetato de etila padronizado (EAEP) de *Strychnos pseudoquina* e da strychnobiflavona (SBF) dele isolada testadas frente ao HSV-1 (cepa KOS) e ao HSV-2 (cepa 333).



#### 5.4.6. Avaliação dos efeitos das amostras na expressão das proteínas do HSV-1 (cepa KOS)

Por meio do método de *Western blotting*, foi possível analisar a expressão das proteínas virais do HSV-1 (cepa KOS), relacionadas com diferentes etapas da transcrição: ICP27 ( $\alpha$ ),  $U_L42$  ( $\beta$ ) e gD ( $\gamma$ ). A proteína constitutiva celular  $\beta$ -actina foi utilizada como controle do ensaio. A inibição da síntese proteica, em células Vero infectadas com o

HSV-2 (cepa 333), não foi realizada neste estudo, pois o Laboratório não possui os anticorpos específicos para este sorotipo.

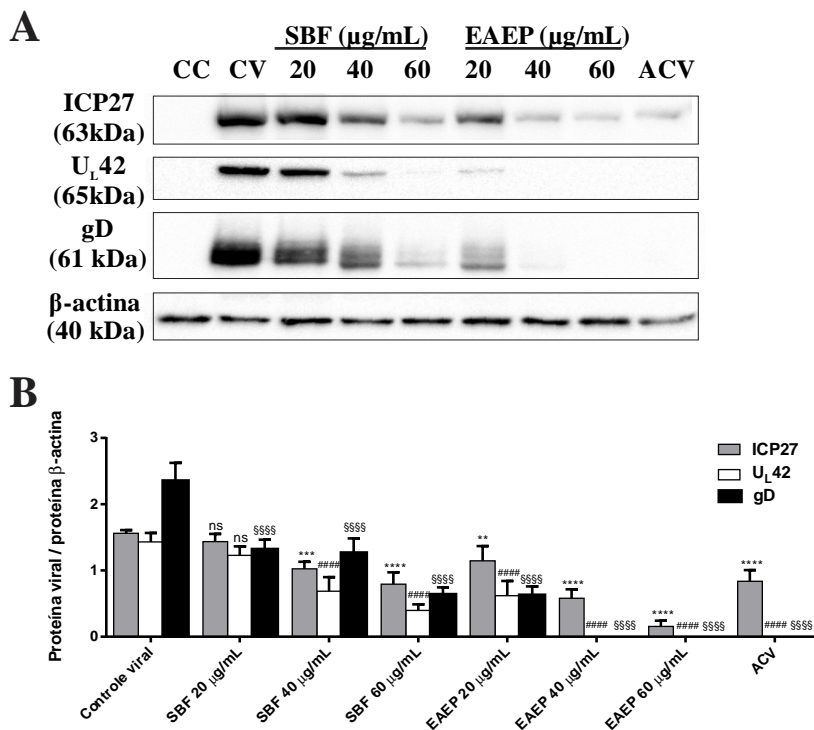
Os tratamentos das células Vero infectadas pelo HSV-1 com o EAEP e a SBF foram feitos separadamente, nas concentrações que inibiram 90 a 100% da replicação viral, ou seja, próximas e superiores aos valores de  $CI_{50}$ , com o intuito de verificar se a inibição da expressão das proteínas ocorria e se era concentração-dependente. Assim, para ambas as amostras, foram utilizadas as concentrações de 20, 40 e 60  $\mu\text{g/mL}$ . O ACV foi utilizado como controle positivo na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$ , inibindo a replicação viral em 100%. Os tratamentos foram realizados após 1 h de infecção viral e o seu término ocorreu 18 h pós-infecção, quando um ciclo de replicação viral foi completado.

Os resultados obtidos estão representados na Figura 5.5. A proteína constitutiva,  $\beta$ -actina, foi expressa em todos os tratamentos, demonstrando que não houve alteração na homeostase celular. Além disso, a  $\beta$ -actina serviu como um controle da quantidade de proteína utilizada para cada amostra avaliada no *Western blotting*.

Foi detectada uma redução estatisticamente significativa da expressão das três proteínas analisadas, ICP27 ( $\alpha$ ),  $U_L42$  ( $\beta$ ) e gD ( $\gamma$ ), dependendo da concentração testada, sendo as mesmas mais afetadas pelo EAEP do que pela SBF. A SBF foi capaz de inibir a expressão da ICP27 ( $\alpha$ ) e da  $U_L42$  ( $\beta$ ) somente nas duas maiores concentrações e da gD ( $\gamma$ ) nas três concentrações utilizadas. O EAEP e o ACV inibiram a expressão de todas as proteínas, nas concentrações testadas.

Como mencionado anteriormente, os genes  $\alpha$  regulam a replicação viral, os genes  $\beta$  são responsáveis pela síntese e empacotamento do DNA, e os genes  $\gamma$  sintetizam os componentes estruturais das partículas virais. Então, com base nos resultados obtidos, pode-se inferir que o EAEP e a SBF provavelmente interferem na síntese do DNA e dos componentes estruturais das partículas virais. Tais resultados sugerem que, no nível molecular, ambas as amostras podem interferir mais intensamente na expressão das proteínas precoces e tardias, do que nas proteínas imediatas. Isto ocorre justamente porque as amostras inibem os eventos iniciais da replicação viral.

Figura 5.5. Efeitos do extrato acetato de etila padronizado (EAEP) obtido a partir de *Strychnos pseudoquina* e da strychnobiflavona (SBF) dele isolada na expressão de proteínas do HSV-1 (cepa KOS).



(A) Células Vero infectadas com HSV-1 (MOI 0,2) foram tratadas com 20, 40 e 60  $\mu\text{g/mL}$  das amostras ou 20  $\mu\text{g/mL}$  de ACV. Os lisados foram recolhidos após 18 h, aplicados em gel SDS-10% PAGE e analisados por meio de anticorpos específicos para as proteínas virais (ICP27, U<sub>L</sub>42 e gD). A mesma quantidade de proteína aplicada foi estimada por meio da análise da proteína  $\beta$ -actina.

CC (controle celular) = células Vero não infectadas e não tratadas; CV (controle viral) = células Vero infectadas e não tratadas; ACV (aciclovir).

(B) Análise densitométrica que mostra a relação de cada proteína viral com a proteína  $\beta$ -actina (ns:  $p < 0,05$ ; \* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ####  $p < 0,0001$ ; #####  $p < 0,0001$  versus os respectivos controles virais, two-way ANOVA, pós teste Dunnet).

#### 5.4.7. Avaliação dos efeitos das amostras na liberação viral

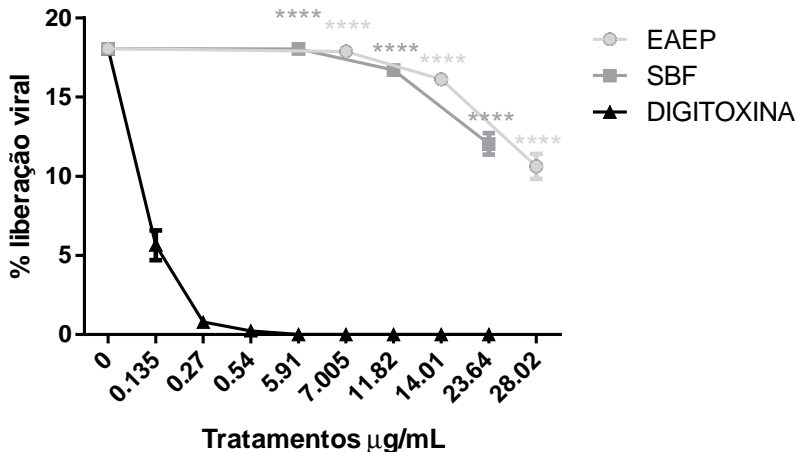
Esta avaliação tornou-se necessária visto que os resultados obtidos no ensaio de redução do número de partículas virais infecciosas (item 4.5.1) possibilitaram formular a hipótese de que o EAEP e a SBF podem inibir a liberação viral.

Tal processo ainda não está totalmente compreendido, uma vez que existem várias teorias descrevendo a forma pela qual as partículas virais deixam as células infectadas para alcançarem as células vizinhas e continuarem se replicando. Por outro lado, existe um senso comum de que os HSV podem ser envelopados na membrana nuclear interna sendo para tal processo necessário que a membrana e a lâmina nuclear passem por extensivos rearranjos executados por, pelo menos, três proteínas virais: U<sub>S</sub>3 PK, U<sub>L</sub>31 e U<sub>L</sub>34. O envelopamento dos capsídeos na membrana nuclear interna é a via mais aceita da liberação dos HSV. Esses capsídeos são envelopados pelas vesículas citoplasmáticas que os transportam até a membrana plasmática celular. Quando liberados das vesículas, são novamente envelopados e seus envelopes externos se fundem à membrana plasmática, sendo assim, liberados no espaço extracelular (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013).

Com o intuito de verificar a dependência da concentração das amostras *versus* atividade antiviral, neste ensaio foram utilizados os valores de CI<sub>50</sub> (Tabela 5.6) de cada amostra, frente ao HSV-1 (cepa KOS) e também o dobro e a metade do CI<sub>50</sub>. Como controle positivo da inibição da liberação viral foi utilizado a digitoxina, tendo em vista que este cardenolídeo foi descrito na literatura como sendo capaz de inibir fortemente esta etapa (SU et al., 2008).

A capacidade do EAEP e da SBF de interferir na liberação dos vírus foi investigada através da determinação dos títulos intracelulares e extracelulares do HSV-1. Ambas as amostras não apresentaram uma redução significativa da liberação viral, visto que nos seus correspondentes valores de CI<sub>50</sub>, o EAEP inibiu somente 10,69% da liberação viral e a SBF inibiu 7,51%, enquanto que a digitoxina (controle positivo) inibiu 95,60% (Figura 5.6).

Figura 5.6. Efeitos do extrato acetato de etila padronizado (EAEP) obtido a partir de *Strychnos pseudoquina* e da strychnobiflavona (SBF) de isolada na liberação do HSV-1 (cepa KOS) em células Vero.



Os resultados representam a média de dois experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , EAEP e SBF *versus* digitoxina, *two-way* ANOVA, pós teste Tukey.

### 5.5. Proposta preliminar do mecanismo da ação anti-herpética do EAEP e da SBF

Baseado nos resultados aqui obtidos (mostrados no item 5.4), pode-se propor um provável mecanismo da ação anti-herpética do EAEP e da SBF, frente ao HSV-1 (cepa KOS), conforme o esquema da Figura 5.7, e frente ao HSV-2 (cepa 333), conforme o esquema da Figura 5.8.

## HSV-1 (cepa KOS)

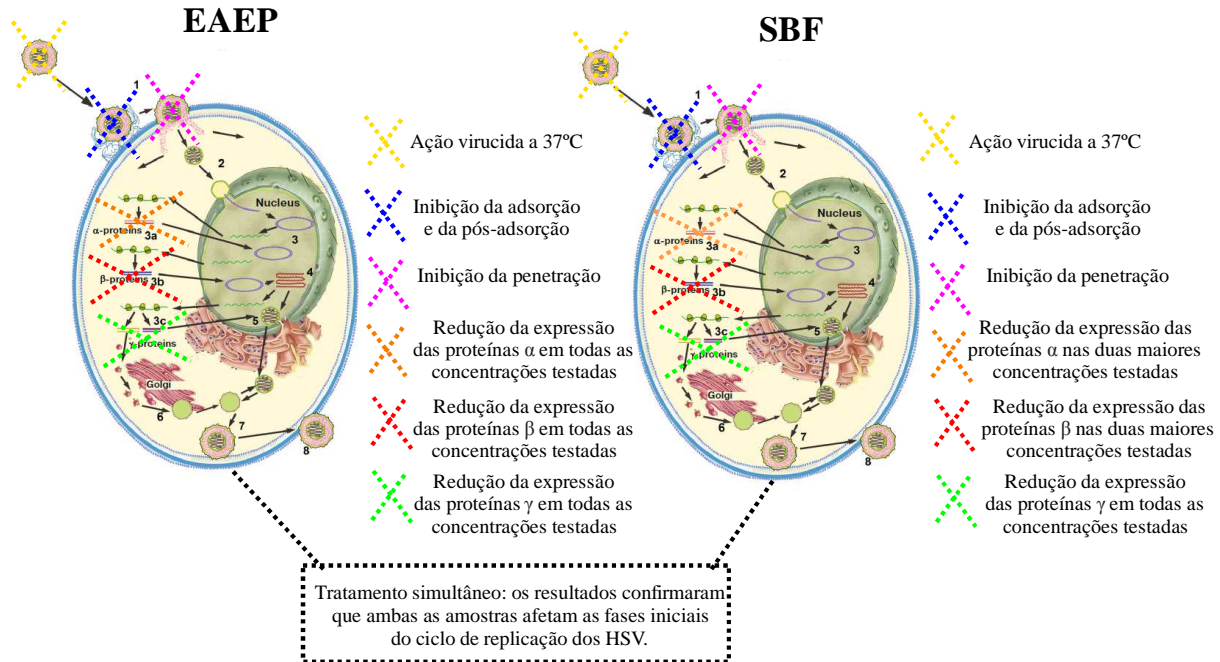


Figura 5.7. Proposta do mecanismo da ação anti-HSV-1 do extrato acetato de etila padronizado (EAEP) obtido a partir de *Strychnos pseudoquina* e da strychnobiflavona (SBF) dele isolada.

## HSV-2 (cepa 333)

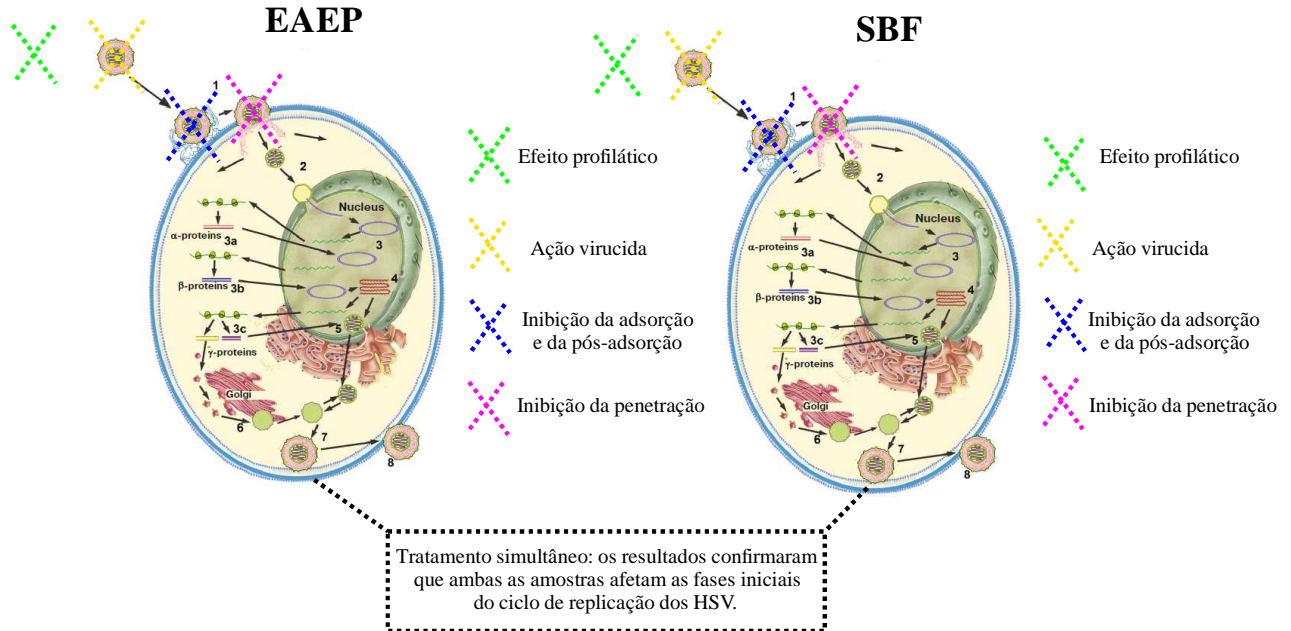


Figura 5.8. Proposta do mecanismo da ação anti-HSV-2 do extrato acetato de etila padronizado (EAEP) obtido a partir de *Strychnos pseudoquina* e da strychnobiflavona (SBF) dele isolada.

OBS: a inibição da síntese de proteínas não foi testada.

## 5.6. Avaliação dos efeitos antivirais das amostras em combinação com o aciclovir

As vantagens do uso de uma combinação de fármacos com diferentes mecanismos de ação englobam o aumento da eficácia do efeito terapêutico; a diminuição da dose (aumentando ou mantendo a mesma eficácia para evitar, ao máximo, a toxicidade); a diminuição ou retardo do desenvolvimento de resistência a esses fármacos; e a otimização da farmacodinâmica e farmacocinética dos mesmos. Para alcançar estes objetivos terapêuticos, combinações de medicamentos são amplamente utilizadas e até se tornaram a principal escolha para o tratamento de doenças graves, tais como o câncer e as doenças infecciosas, como a AIDS (CHOU, 2006; AL-LAZIKANI; BANERJI; WORKMAN, 2012).

O sinergismo pode ser definido como a soma de dois efeitos isoladamente, ou seja, um efeito maior do que apenas um efeito aditivo (via mecanismos de ação complementares); já o antagonismo é considerado um efeito menor que o aditivo (CHOU, 2006).

Para avaliar estes efeitos, foi realizado um experimento combinatório clássico que permite calcular os valores de índice combinatório (IC) para cada uma das combinações testadas. Este índice é derivado de um modelo matemático, que quantifica os efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos entre duas ou mais substâncias. Neste modelo, valores de  $IC < 1$ ,  $=1$  e  $> 1$  indicam sinergismo, efeito aditivo e antagonismo, respectivamente (CHOU; TALALAY, 1981, 1983, 1984; CHOU, 2006). Estes pesquisadores também estabeleceram que diferentes faixas dos valores de IC indicam diferentes efeitos, de acordo com o Quadro 5.1. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 5.9.



Quadro 5.1. Interpretação de sinergismo e antagonismo em estudos de combinação entre duas ou mais substâncias pelo método de determinação do Índice Combinatório (IC), descrito por Chou (2006).

<b>Faixa do IC</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Descrição</b>
< 0,10	+++++	Sinergismo muito forte
0,10 – 0,30	++++	Sinergismo forte
0,30 – 0,70	+++	Sinergismo
0,70 – 0,85	++	Sinergismo moderado
0,85 – 0,90	+	Sinergismo fraco
0,90 – 1,10	±	Aditivo
1,10 – 1,20	-	Antagonismo fraco
1,20 – 1,45	--	Antagonismo moderado
1,45 – 3,30	---	Antagonismo
3,30 – 10	----	Antagonismo forte
> 10	-----	Antagonismo muito forte

Com base nos resultados obtidos (Tabela 5.9), observa-se que o EAEP apresentou sinergismo moderado (IC=0,843) com o ACV, frente ao HSV-1 (cepa KOS), utilizando-se concentrações duas vezes superiores aos seus correspondentes valores de  $CI_{50}$ . Tal efeito sinérgico não é interessante do ponto de vista prático, visto que o dobro do valor do  $CI_{50}$  é requerido para resultar em tal atividade. No entanto, as combinações SBF+ACV e EAEP+ACV, mesmo apresentando um efeito aditivo (IC=0,969 e IC=1,002, respectivamente) são bem mais interessantes, pois nestes casos foram usadas concentrações quatro vezes inferiores aos seus valores de  $CI_{50}$ .

Em relação ao HSV-2 (cepa 333), ambas as amostras apresentaram sinergismo com o ACV, quando foram usadas concentrações duas vezes superiores aos seus valores de  $CI_{50}$  (IC=0,515 para o EAEP e IC=0,603 para a SBF); entretanto, isto não é interessante pelo mesmo motivo citado acima. Por outro lado, a combinação SBF+ACV apresentou efeito aditivo (IC=0,987), utilizando-se concentrações 16 vezes inferiores aos seus valores de  $CI_{50}$ , mostrando que a estratégia combinatória do EAEP e da SBF com o ACV foi confirmada, uma vez que se conseguiu demonstrar a manutenção da eficácia mesmo com a diminuição das concentrações das amostras em ambas as cepas testadas.

A avaliação do efeito das amostras na propagação intercelular viral não foi realizada, pois não se observou redução da área das placas de lise formadas, para ambos os vírus testados (dados não mostrados), sugerindo que as amostras não reduzem a dispersão viral célula a célula (*cell-to-cell spread*).

Tabela 5.9. Efeitos obtidos na combinação do aciclovir (ACV) com o extrato acetato de etila padronizado (EAEP) obtido a partir de *Strychnos pseudoquina* e a strychnobiflavona (SBF) dele isolada sobre a atividade anti-HSV-1 e anti-HSV-2.

Razão de combinação das amostras	Concentrações das amostras (µg/mL)			Inibição da replicação viral (%)*					Valores de IC (descrição do efeito)	
	EAEP	SBF	ACV	EAEP	SBF	ACV	EAEP + ACV	SBF+ ACV	EAEP + ACV	SBF +ACV
<b>HSV-1 (cepa KOS)</b>										
4 x CI <sub>50</sub>	56,0	48,0	4,0	99,1	97,4	98,8	100	100	1,687 (---)	1,218 (--)
2 x CI <sub>50</sub>	28,0	24,0	2,0	78,7	68,5	72,0	100	88,8	0,843 (++)	1,323 (--)
1 X CI <sub>50</sub>	14,0	12,0	1,0	42,5	44,0	51,1	81,4	66,5	1,103 (-)	1,577 (---)
0,5 X CI <sub>50</sub>	7,0	6,0	0,5	19,6	18,0	30,6	45,3	39,1	1,127 (--)	1,430 (--)
0,25 X CI <sub>50</sub>	3,5	3,0	0,25	0	0	16,6	18,0	15,5	1,002 (±)	0,969 (±)
<b>HSV-2 (cepa 333)</b>										
2 x CI <sub>50</sub>	18,0	12,0	6,0	77,0	74,3	83,9	97,9	92,5	0,515 (+++)	0,603 (+++)
1 X CI <sub>50</sub>	9,0	6,0	3,0	44,4	46,2	53,6	75,4	63,6	1,321 (--)	1,913 (---)
0,5 X CI <sub>50</sub>	4,5	3,0	1,5	17,7	28,2	41,1	56,5**	35,8	1,394 (--)	2,003 (---)
0,25 X CI <sub>50</sub>	2,25	1,5	0,75	9,5	17,1	31,5	17,6	15,5	1,841 (---)	2,011 (---)
0,125 X CI <sub>50</sub>	1,125	0,75	0,375	6,8	9,6	20,0	14,4	12,3	1,203 (--)	1,287 (--)
0,0625 X CI <sub>50</sub>	0,563	0,375	0,188	0	0	4,4	4,8	10,2	1,521 (---)	0,987 (±)

IC = índice combinatório (medida quantitativa calculada pelo programa Calcsyn, com base no trabalho de Chou (2006), indicando: (+++) = sinergismo; (++) = sinergismo moderado; (+) = sinergismo fraco; (±) = efeito aditivo; (-) = antagonismo fraco; (--) = antagonismo moderado; (---) = antagonismo. \*Os resultados representam a média de dois experimentos independentes. \*\*Foi realizado um número maior de combinações para o HSV-2 (cepa 333), uma vez que utilizando metade do valor do CI<sub>50</sub>, a inibição da replicação viral da combinação do EAEP+ACV foi superior a 50%.



## 6. CONCLUSÕES

- Grande parte das amostras testadas não foi citotóxica nas concentrações avaliadas. Todavia, algumas das amostras apresentaram alta citotoxicidade, inviabilizando a triagem antiviral por meio do modelo empregado neste estudo;
- Do total das amostras testadas, 27,6% foram ativas frente ao HSV-1 (cepa KOS), 17,3% frente ao HSV-1 (cepa 29-R) e 16,3% frente ao HSV-2 (cepa 333);
- A partir da triagem antiviral inicial, concluiu-se que as amostras mais promissoras foram *Calea phyllolepis* (extrato bruto e fração butanólica obtidos das folhas) e *Strychnos pseudoquina* (extrato acetato de etila padronizado obtido das cascas dos caules);
- Dois compostos majoritários foram isolados do EAEP [quercetina 3-*O*-metil éter (3MQ) e strychnobiflavona (SBF)]. Apenas a SBF (detectada nesse extrato em uma concentração 1,8X maior do que a 3MQ) apresentou atividade antiviral. Logo, devido à sua concentração, potência e seletividade, pode ser considerada o principal componente anti-herpético do EAEP;
- O EAEP e a SBF apresentaram ação virucida direta frente às duas cepas virais testadas [HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333)], inclusive na presença de soluções proteicas, indicando assim um potencial microbicida tópico;
- O EAEP e a SBF interferem em várias etapas do ciclo de replicação dos HSV, principalmente nas etapas iniciais (adsorção, pós-adsorção e penetração), como também na expressão das proteínas virais  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , em diferentes intensidades;

- O EAEP e a SBF não apresentaram redução significativa da liberação viral;
- A estratégia combinatória do EAEP e da SBF com o ACV foi confirmada, uma vez que se conseguiu demonstrar a manutenção da eficácia mesmo com a diminuição das concentrações das amostras em ambas as cepas testadas; e
- Vale salientar que os resultados *in vitro* aqui obtidos são preliminares; portanto, ensaios *in vivo* devem ainda ser realizados para verificar a futura aplicabilidade das amostras avaliadas.

## 7. PERSPECTIVAS

- Avaliar a integridade das partículas virais após contato com o EAEP e a SBF por microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar a toxicidade das amostras aqui consideradas frente aos lactobacilos da microbiota vaginal humana normal;
- Avaliar a atividade virucida (anti-HSV-2) do EAEP e da SBF em presença de secreções cervicovaginais;
- Avaliar a possível interferência do EAEP e da SBF na expressão das proteínas virais, durante o ciclo de replicação do HSV-2 (cepa 333), utilizando o ensaio do *Western blotting*;
- Avaliar a potencial genotoxicidade do EAEP e da SBF, em células Vero, por meio do ensaio do Cometa; e
- Aprofundar o estudo da ação virucida de *Calea phyllolepis*.





## REFERÊNCIAS

- ADEBOWALE, A.; NAIDOO, Y.; LAMB, J., et al. Comparative foliar epidermal micromorphology of Southern African *Strychnos* L. (Loganiaceae): taxonomic, ecological and cytological considerations. **Plant Systematics and Evolution**, v.300, n.1, p.127-138, 2014.
- AGUILAR, J. S.; HELD, K. S.; WAGNER, E. K. Herpes simplex virus type 1 shows multiple interactions with sulfonated compounds at binding, penetration, and cell-to-cell passage. **Virus Genes**, v.34, n.3, p.241-248, 2007.
- AL-LAZIKANI, B.; BANERJI, U.; WORKMAN, P. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. **Nature Biotechnology**, v.30, n.7, p.679-692, 2012.
- ARGENTA, D. F.; SILVA, I. T.; BASSANI, V. L., et al. Antiherpes evaluation of soybean isoflavonoids. **Archives of Virology**, v.160, n.9, p.2335-2342, 2015.
- ASTANI, A.; NAVID, M. H.; SCHNITZLER, P. Attachment and penetration of acyclovir-resistant herpes simplex virus are inhibited by *Melissa officinalis* extract. **Phytotherapy Research**, v.28, n.10, p.1547-1552, 2014.
- ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M., et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v.33, n.8, p.1582-1614, 2015.
- BACON, T. H.; LEVIN, M. J.; LEARY, J. J., et al. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.1, p.114-128, 2003.
- BAUER, A.; BRONSTRUP, M. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. **Natural Product Reports**, v.31, n.1, p.35-60, 2014.
- BELLO-MORALES, R.; CRESPILO, A. J.; FRAILE-RAMOS, A., et al. Role of the small GTPase Rab27a during herpes simplex virus infection of oligodendrocytic cells. **BMC Microbiology**, v.12, p.265, 2012.

- BELSHE, R. B.; LEONE, P. A.; BERNSTEIN, D. I., et al. Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. **The New England Journal of Medicine**, v.366, n.1, p.34-43, 2012.
- BERGSTROM, T.; TRYBALA, E. Antigenic differences between HSV-1 and HSV-2 glycoproteins and their importance for type-specific serology. **Intervirolgy**, v.39, n.3, p.176-184, 1996.
- BERTOL, J. W.; RIGOTTO, C.; DE PADUA, R. M., et al. Antitherpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Research**, v.92, n.1, p.73-80, 2011.
- BOHLIN, L.; GORANSSON, U.; ALSMARK, C., et al. Natural products in modern life science. **Phytochemistry Reviews**, v.9, n.2, p.279-301, 2010.
- BONAMIN, F.; MORAES, T. M.; KUSHIMA, H., et al. Can a *Strychnos* species be used as antiulcer agent? Ulcer healing action from alkaloid fraction of *Strychnos pseudoquina* St. Hil. (Loganiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.138, n.1, p.47-52, 2011.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRADLEY, H.; MARKOWITZ, L. E.; GIBSON, T., et al. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and 2 - United States, 1999-2010. **The Journal of Infectious Diseases**, v.209, n.3, p.325-333, 2014.
- BRADY, R. C.; BERNSTEIN, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**, v.61, n.2, p.73-81, 2004.
- BULTMANN, H.; TEUTON, J.; BRANDT, C. R. Addition of a C-terminal cysteine improves the anti-herpes simplex virus activity of a peptide containing the human immunodeficiency virus type 1 TAT protein transduction domain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.5, p.1596-607, 2007.
- BURLESON, F. G.; CHAMBERS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. **Virology: a laboratory manual**. San Diego: Academic, 1992. p.250.
- BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v.25, n.3, p.475-516, 2008.

BUTLER, M. S.; NEWMAN, D. J. Mother Nature's gifts to diseases of man: the impact of natural products on anti-infective, anticholesteremics and anticancer drug discovery. **Progress in Drug Research**, v.65, n.1, p.3-44, 2008.

BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Natural Product Reports**, v.31, n.11, p.1612-1661, 2014.

CAMP, D.; DAVIS, R. A.; CAMPITELLI, M., et al. Drug-like properties: guiding principles for the design of natural product libraries. **Journal of Natural Products**, v.75, n.1, p.72-81, 2012.

CARDOZO, F. T.; CAMELINI, C. M.; MASCARELLO, A., et al. Antitherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. **Antiviral Research**, v.92, n.1, p.108-114, 2011.

CAVALLERO, S.; HUOT, N.; FRANCELLE, L., et al. Biological features of herpes simplex virus type 1 latency in mice according to experimental conditions and type of neurones. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.55, n.12, p.7761-7774, 2014.

CELUM, C. L. The interaction between herpes simplex virus and human immunodeficiency virus. **Herpes**, v.11 Suppl 1, p.36A-45A, 2004.

CELUM, C.; WALD, A.; LINGAPPA, J. R., et al. Acyclovir and transmission of HIV-1 from persons infected with HIV-1 and HSV-2. **The New England Journal of Medicine**, v.362, n.5, p.427-439, 2010.

CHALLAND, R.; YOUNG, R. J. **Antiviral Chemotherapy**. New York: Oxford University, 1998.

CHOU, T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**, v.58, n. 3, p.621-681, 2006.

CHOU, T. C.; TALALAY, P. Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors. **European Journal of Biochemistry**, v.115, n.1, p.207-216, 1981.

CHOU, T. C.; TALALAY, P. Analysis of Combined Drug Effects - a New Look at a Very Old Problem. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.4, n.11, p.450-454, 1983.

CHOU, T. C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**, v.22, p.27-55, 1984.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v.432, n.7019, p.829-837, 2004.

COLBERE, F. L'herpès simplex: structure, replication et biologie. **Bulletin de L'Institut Pasteur**, v.73, p.203-254, 1975.

CONDIT, R. C. Principles of virology. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; COHEN, J. I.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; RACANIELLO, V. R.; ROIZMAN, B. (Ed.). **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.I, 2013. p.21-51.

CONNOLLY, S. A.; JACKSON, J. O.; JARDETZKY, T. S., et al. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. **Nature Reviews - Microbiology**, v.9, n.5, p.369-381, 2011.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V., et al. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v.106, n.3, p.290-302, 2006.

COSENZA, G. P.; SOMAVILLA, N. S.; FAGG, C. W., et al. Bitter plants used as substitute of *Cinchona* spp. (quina) in Brazilian traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.149, n.3, p.790-796, 2013.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830, n.6, p.3670-3695, 2013.

D'CRUZ, O. J.; WAURZYNIAK, B.; YIV, S. H., et al. Evaluation of subchronic (13 weeks) and reproductive toxicity potential of intravaginal gel-microemulsion formulation of a dual-function phenyl phosphate derivative of bromo-methoxy zidovudine (compound WHI-05) in B(6)C(3)F(1) mice. **Contraception**, v.61, n.1, p.69-76, 2000.

DA SILVA, M. A.; RAFACHO, B. P.; HIRUMA-LIMA, C. A., et al. Evaluation of *Strychnos pseudoquina* A. St. Hil. leaves extract on

gastrointestinal activity in mice. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.53, n.8, p.881-885, 2005.

DE CLERCQ, E. Antivirals: past, present and future. **Biochemical Pharmacology**, v.85, n.6, p.727-744, 2013a.

DE CLERCQ, E. Dancing with chemical formulae of antivirals: A panoramic view (Part 2). **Biochemical Pharmacology**, v.86, n.10, p.1397-1410, 2013b.

DE CLERCQ, E. Dancing with chemical formulae of antivirals: a personal account. **Biochemical Pharmacology**, v.86, n.6, p.711-725, 2013c.

DE MEDEIROS, P. M.; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: a macroscale investigation based on available literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v.150, n.2, p.729-746, 2013.

DE SAINT-HILAIRE, A. **Plantas usuelles des brasiiliens**. Paris: Grimbert Libraire, 1828. MOURÃO, C. P. B., SANTIAGO, C. F. (tradução) **Plantas usuais dos brasileiros**. Belo Horizonte: Código Comunicação, 2009. p. 11-16.

DEY, P. M.; HARBONE, J. B. **Methods in plant biochemistry**. San Diego: Academic, v.6, 1991.

DIAZ, F. M.; KNIPE, D. M. Protection from genital herpes disease, seroconversion and latent infection in a non-lethal murine genital infection model by immunization with an HSV-2 replication-defective mutant virus. **Virology**, v.488, p.61-67, 2015.

EFSTATHIOU, S.; PRESTON, C. M. Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. **Virus Research**, v.111, n.2, p.108-119, 2005.

EKBLAD, M.; ADAMIAK, B.; BERGSTROM, T., et al. A highly lipophilic sulfated tetrasaccharide glycoside related to muparfostat (PI-88) exhibits virucidal activity against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v.86, n.2, p.196-203, 2010.

ELLERMANN-ERIKSEN, S. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. **Virology Journal**, v.2, p.59, 2005.

ENKHTAIVAN, G.; MARIA JOHN, K. M.; AYYANAR, M., et al. Anti-influenza (H1N1) potential of leaf and stem bark extracts of selected medicinal plants of South India. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.5, p.532-538, 2015.

EVANS, C. M.; KUDESIA, G.; MCKENDRICK, M. Management of herpesvirus infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.42, n.2, p.119-128, 2013.

FLINT, S. J.; ENQUIST, L. W.; KRUG, R. M., et al. **Principles of virology: molecular, biology, pathogenesis and control**. Washington: ASM, 2000. p. 662-714.

FORSGREN, M.; KLAPPER, P. E. Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. In: ZUCKERMAN, A. J.; BANATVALA, J. E.; SCHOUB, B. D.; GRIFFITHS, P. D.; MORTIMER, P. (Ed.). **Principles and Practice of Clinical Virology**. 6. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. p. 95-131.

FREITAS, A. M.; ALMEIDA, M. T.; ANDRIGHETTI-FROHNER, C. R., et al. Antiviral activity-guided fractionation from *Araucaria angustifolia* leaves extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.126, n.3, p.512-517, 2009.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.12, n.3, p.306-317, 2008.

GARLAND, S. M.; STEBEN, M. Genital herpes. **Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v.28, n.7, p.1098-1110, 2014.

GELLER, M.; SUCHMACHER, M. N.; RIBEIRO, M. G., et al. Herpes Simples: Atualização Clínica, Epidemiológica e Terapêutica. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.24, n.4, p.260-266, 2012.

GUPTA, R.; WARREN, T.; WALD, A. Genital herpes. **Lancet**, v.370, n.9605, p.2127-2137, 2007.

HARDY, W. R.; SANDRI-GOLDIN, R. M. Herpes simplex virus inhibits host cell splicing, and regulatory protein ICP27 is required for this effect. **Journal of Virology**, v.68, n.12, p.7790-7799, 1994.

- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.13, n.19-20, p.894-901, 2008.
- HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v.14, n.2, p.111-129, 2015.
- HATTORI, M.; NAKABAYASHI, T.; LIM, Y. A., et al. Inhibitory effects of various Ayurvedic and Panamanian medicinal plants on the infection of herpes simplex virus-1 in vitro and in vivo. **Phytotherapy Research**, v.9, p.270-276, 1995.
- HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; MORITA, N. Mechanism of action of the antiherpesvirus biflavone ginkgetin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.36, n.9, p.1890-1893, 1992.
- HONORIO-FRANCA, A. C.; MARINS, C. M.; BOLDRINI, F., et al. Evaluation of hypoglycemic activity and healing of extract from amongst bark of "Quina do Cerrado" (*Strychnos pseudoquina* A. St. Hil.). **Acta Cirurgica Brasileira**, v.23, n.6, p.504-510, 2008.
- HU, J. M.; HSIUNG, G. D. Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. **Antiviral Research**, v.11, n.5-6, p.217-232, 1989.
- ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy: 2014 Release**. 2014. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>. Acesso em: fevereiro de 2016.
- ISAACS, C. E.; JIA, J. H.; XU, W. A lipid-peptide microbicide inactivates herpes simplex virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.8, p.3182-3184, 2004.
- JAMES, S. H.; PRICHARD, M. N. Current and future therapies for herpes simplex virus infections: mechanism of action and drug resistance. **Current Opinion in Virology**, v.8, p.54-61, 2014.
- JASSIM, S. A.; NAJI, M. A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, n.3, p.412-427, 2003.
- JEFFERY, K.; AARONS, E. Diagnostic approaches. In: ZUCKERMAN, A. J.; BANATVALA, J. E.; SCHOUB, B. D.; GRIFFITHS, P. D.;

MORTIMER, P. (Ed.). **Principles and Practice of Clinical Virology**. 6. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. p. 1-27.

JOHNSTON, C.; COREY, L. Current Concepts for Genital Herpes Simplex Virus Infection: Diagnostics and Pathogenesis of Genital Tract Shedding. **Clinical Microbiology Reviews**, v.29, n.1, p.149-161, 2016.

JOHNSTON, C.; KOELLE, D. M.; WALD, A. Current status and prospects for development of an HSV vaccine. **Vaccine**, v.32, n.14, p.1553-1560, 2014.

KRATZ, J. M.; ANDRIGHETTI-FROHNER, C. R.; KOLLING, D. J., et al. Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.5, p.437-442, 2008.

KUKHANOVA, M. K.; KOROVINA, A. N.; KOCHETKOV, S. N. Human Herpes Simplex Virus: Life Cycle and Development of Inhibitors. **Biochemistry**, v.79, n.13, p.1635-1652, 2014.

LAGE, P. S.; DE ANDRADE, P. H.; LOPES ADE, S., et al. *Strychnos pseudoquina* and Its Purified Compounds Present an Effective *In Vitro* Antileishmanial Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, p.304354, 2013.

LEE, C. C.; LIN, L. L.; CHAN, W. E., et al. Structural basis for the antibody neutralization of herpes simplex virus. **Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography**, v.69, n.Pt 10, p.1935-1945, 2013.

LEE, K. H. Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach. **Journal of Natural Products**, v.73, n.3, p.500-516, 2010.

LEGOFF, J.; PERE, H.; BELEC, L. Diagnosis of genital herpes simplex virus infection in the clinical laboratory. **Virology Journal**, v.11, p.83, 2014.

LIN, Y. M.; FLAVIN, M. T.; SCHURE, R., et al. Antiviral activities of biflavonoids. **Planta Medica**, v.65, n.2, p.120-125, 1999.

LIPIPUN, V.; KUROKAWA, M.; SUTTISRI, R., et al. Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo. **Antiviral Research**, v.60, n.3, p.175-180, 2003.



- LIU, S.; HOMA, F. L. Atomic structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase. In: CAMERON, C. E.; GÖTTE, M.; RANEY, K. D. (Ed.). **Viral genome replication**. New York: Springer, 2009. p. 363-382.
- LOOKER, K. J.; MAGARET, A. S.; TURNER, K. M., et al. Global and regional estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 1 infections in 2012. **PLoS One**, v.10, n.10, p.e0140765, 2015a.
- LOOKER, K. J.; MAGARET, A. S.; TURNER, K. M., et al. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. **PLoS One**, v.10, n.1, p.e114989, 2015b.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil - Nativas e Exóticas**. 2 ed. Nova Odessa - SP: Instituto Plantarum, 2008. p. 347.
- LUCKEMEYER, D. D. **Avaliação da ação anti-herpética de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae (erva-mate)**. 2009. 133 f. (Dissertação - Mestrado em Farmácia) - Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- LUCKEMEYER, D. D.; MULLER, V. D.; MORITZ, M. I., et al. Effects of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on herpes simplex virus types 1 and 2 replication. **Phytotherapy Research**, v.26, n.4, p.535-540, 2012.
- LUPI, O.; PEREIRA JR, A. C. Herpes Simples. In: LUPI, O.; DA SILVA, A. G.; PEREIRA JR, A. C. (Ed.). **HERPES - Clínica, Diagnóstico e Tratamento**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2000. p. 43-70.
- MAMIDYALA, S. K.; FIRESTINE, S. M. Advances in herpes simplex virus antiviral therapies. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v.16, n.11, p.1463-1480, 2006.
- MARTINEZ, J. P.; SASSE, F.; BRONSTRUP, M., et al. Antiviral drug discovery: broad-spectrum drugs from nature. **Natural Product Reports**, v.32, n.1, p.29-48, 2015.
- MCALLISTER, S. C.; SCHLEISS, M. R. Prospects and perspectives for development of a vaccine against herpes simplex virus infections. **Expert Review of Vaccines**, v.13, n.11, p.1349-1360, 2014.

MCCLAIN, D. S.; FULLER, A. O. Cell-specific kinetics and efficiency of herpes simplex virus type 1 entry are determined by two distinct phases of attachment. **Virology**, v.198, n.2, p.690-702, 1994.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, n.10, p.4769-4807, 2011.

MONACHE, F. D.; ALDO, P. T.; MARINI-BETTOLO, G. B. The occurrence of nor-dihydrotoxiferine in *Strychnos pseudoquina* A. St. Hil. **Tetrahedron Letters**, n.25, p.2009-2010, 1969.

MORFIN, F.; THOUVENOT, D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. **Journal of Clinical Virology**, v.26, n.1, p.29-37, 2003.

NAVID, M. H.; LASZCZYK-LAUER, M. N.; REICHLING, J., et al. Pentacyclic triterpenes in birch bark extract inhibit early step of herpes simplex virus type 1 replication. **Phytomedicine**, v.21, n.11, p.1273-1280, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, n.3, p.461-477, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v.75, n.3, p.311-335, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v.79, n.3, p.629-661, 2016.

NICOLETTI, M.; GOULART, M. O.; DE LIMA, R. A., et al. Flavonoids and alkaloids from *Strychnos pseudoquina*. **Journal of Natural Products**, v.47, n.6, p.953-957, 1984.

NICOLL, M. P.; EFSTATHIOU, S. Expression of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts does not influence latency establishment of virus mutants deficient for neuronal replication. **The Journal of General Virology**, v.94, n.Pt 11, p.2489-2494, 2013.

ODEGARD, J. M.; FLYNN, P. A.; CAMPBELL, D. J., et al. A novel HSV-2 subunit vaccine induces GLA-dependent CD4 and CD8 T cell responses

and protective immunity in mice and guinea pigs. **Vaccine**, v.34, n.1, p.101-109, 2015.

PHILIPPE, G.; ANGENOT, L.; TITS, M., et al. About the toxicity of some *Strychnos* species and their alkaloids. **Toxicon**, v.44, n.4, p.405-416, 2004.

PIRET, J.; ROY, S.; GAGNON, M., et al. Comparative study of mechanisms of herpes simplex virus inactivation by sodium lauryl sulfate and n-lauroylsarcosine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.9, p.2933-2942, 2002.

POST, D. E.; FULCI, G.; CHIOCCA, E. A., et al. Replicative oncolytic herpes simplex viruses in combination cancer therapies. **Current Gene Therapy**, v.4, n.1, p.41-51, 2004.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M.; WHITLEY, R. J. Herpes Simplex Viruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; COHEN, J. I.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; RACANIELLO, V. R.; ROIZMAN, B. (Ed.). **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.I, 2013. p.1823-1897.

ROIZMAN, B.; WHITLEY, R. J. An inquiry into the molecular basis of HSV latency and reactivation. **Annual Review of Microbiology**, v.67, p.355-374, 2013.

ROSEN, J.; GOTTFRIES, J.; MURESAN, S., et al. Novel chemical space exploration via natural products. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.52, n.7, p.1953-1962, 2009.

ROTTINGHAUS, S. T.; WHITLEY, R. J. Current non-AIDS antiviral chemotherapy. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v.5, n.2, p.217-230, 2007.

SAKDARAT, S.; SHUYPROM, A.; PIENTONG, C., et al. Bioactive constituents from the leaves of *Clinacanthus nutans* Lindau. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, n.5, p.1857-1860, 2009.

SANTOS, F. V.; COLUS, I. M.; SILVA, M. A., et al. Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, n.9, p.1585-1589, 2006.

SCHUPPE, H. C.; MEINHARDT, A.; ALLAM, J. P., et al. Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? **Andrologia**, v.40, n.2, p.84-91, 2008.

SERKEDJIEVA, J.; IVANCHEVA, S. Antitherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, n.1, p.59-68, 1999.

SILVA, I. T. **Triagem anti-herpética de alguns táxons da biodiversidade brasileira: fracionamento biomonitorado de *Cecropia glaziovii* Sneth., Urticaceae (embaúba)**. 2009. 133 f. (Dissertação - Mestrado em Farmácia) - Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SILVA, I. T.; COSTA, G. M.; STOCO, P. H., et al. In vitro antitherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in Applied Microbiology**, v.51, n.2, p.143-148, 2010.

SIMÕES, C. M.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. **Phytotherapy Research**, v.13, n.4, p.323-328, 1999.

SMITH, M. C.; BOUTELL, C.; DAVIDO, D. J. HSV-1 ICP0: paving the way for viral replication. **Future Virology**, v.6, n.4, p.421-429, 2011.

SODEIK, B.; EBERSOLD, M. W.; HELENIUS, A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. **The Journal of Cell Biology**, v.136, n.5, p.1007-1021, 1997.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. 3 ed. New York: Freeman, 1995. p. 346-352.

SON, M.; LEE, M.; SUNG, G. H., et al. Bioactive activities of natural products against herpesvirus infection. **Journal of Microbiology**, v.51, n.5, p.545-551, 2013.

SPEAR, P. G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cellular Microbiology**, v.6, n.5, p.401-410, 2004.

STEINER, I.; KENNEDY, P. G.; PACHNER, A. R. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. **The Lancet - Neurology**, v.6, n.11, p.1015-1028, 2007.

SU, C. T.; HSU, J. T.; HSIEH, H. P., et al. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. **Antiviral Research**, v.79, n.1, p.62-70, 2008.

THOMPSON, K. D. Herbal extracts and compounds active against herpes simplex virus. **Advances in Phytomedicine**, v.2, p.65-86, 2006.

THONGPHASUK, P.; SUTTISRI, R.; BAVOVADA, R., et al. Alkaloids and a pimarane diterpenoid from *Strychnos vanprukii*. **Phytochemistry**, v.64, n.4, p.897-901, 2003.

VANDEN BERGUE, D. A.; VLIETINCK, A. J.; VAN-HOOF, L. Plant products as potential antiviral agents. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, v.84, p.101-105, 1986.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v.1, n.3, p.1112-1116, 2006.

VLIETINCK, A. J.; DE BRUYNE, T.; VANDEN BERGUE, D. A. Plant substances as antiviral agents. **Current Organic Chemistry**, v.1, p.307-344, 1997.

WATANABE, D. Medical application of herpes simplex virus. **Journal of Dermatological Science**, v.57, n.2, p.75-82, 2010.

WATSON, A. M.; PRASAD, K. M.; KLEI, L., et al. Persistent infection with neurotropic herpes viruses and cognitive impairment. **Psychological Medicine**, v.43, n.5, p.1023-1031, 2013.

WHITE, D. O.; FENNER, F. **Medical Virology**. 4 ed. San Diego: Academic, 1994. p. 318-346.