

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO FARMÁCIA

Maria Laura Monteiro Tomasi

Aspectos relacionados ao desenvolvimento de um medicamento fitoterápico: preparação e avaliação biológica de extrato seco padronizado de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)

Florianópolis

2021

Maria Laura Monteiro Tomasi

Aspectos relacionados ao desenvolvimento de um medicamento fitoterápico: preparação e avaliação biológica de extrato seco padronizado de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Angela Machado de Campos

Florianópolis

2021

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

Tomasi, Maria Laura Monteiro
Aspectos relacionados ao desenvolvimento de um
medicamento fitoterápico: preparação e avaliação biológica de
extrato seco padronizado de erva mate (*Ilex paraguariensis*
St. Hil.) / Maria Laura Monteiro Tomasi ; orientadora,
Angela Machado de Campos, 2021.
60 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. 3.
medicamentos fitoterápicos . 4. revisão bibliográfica. 5.
atividade antiviral . I. Campos, Angela Machado de. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Farmácia. III. Título.

Maria Laura Monteiro Tomasi

Aspectos relacionados ao desenvolvimento de um medicamento fitoterápico: preparação e avaliação biológica de extrato seco padronizado de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)

Florianópolis, 11 de maio de 2021.

Profª Dra. Marení Rocha Farias
Coordenadora do Curso
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Profª Dra. Angela Machado de Campos
Universidade Federal de Santa Catarina

Profª Dra. Bianca Ramos Pezzini
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof Dr. Flávio Henrique Reginatto
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus pais, à minha mulher, aos meus familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à vida e os ensinamentos que Deus me permite passar, sendo esta etapa de conclusão um momento muito importante para mim.

À minha mãe, que sempre está ao meu lado, me incentivando e me dando acolhimento, sendo a melhor amiga que eu poderia ter, e ao meu pai, que durante toda a minha vida foi uma figura amiga, e que agora está me acompanhando de cima. Obrigada aos dois, pelos ensinamentos e carinho, amor e acima de tudo, companheirismo. Eu amo vocês.

À minha mulher, minha companheira, minha parceira. Que apareceu no momento certo e desde então não desiste de nós. Essa etapa só está sendo concluída porque tenho você ao meu lado. Obrigada meu amor, eu te amo.

À minha orientadora, Dra. Angela, que me acompanha desde a metade da graduação, e tem sido uma grande professora, não só para assuntos relacionados a faculdade, mas de vida.

À minha avó, querida, que do seu jeitinho sempre tenta me ajudar. Obrigada por ser o norte que muitas das vezes precisamos.

À minha irmã, por mesmo longe, sempre estar aqui pertinho, me incentivando e me lembrando de como a família Tomasi é forte.

Aos meus familiares, amigos e colegas de trajetória, agradeço por cada um contribuir do seu jeito nesse processo.

Às meninas do laboratório da Vita Essência, obrigada por todos os dias me lembrarem como terminar essa etapa é importante, entre outros aprendizados, vocês são demais!

A toda rede acadêmica, que contribuiu de alguma forma a minha trajetória de graduação até este TCC, meu muito obrigada.

À Mari, minha amiga e companheira fiel de desesperos, de escrita e muitas risadas, sem você nada disso teria acontecido. Obrigada por me acolher nesse teu coração enorme.

Por último e não menos importante, ao centro espírita SEARA dos pobres, por me dar suporte que meus olhos não enxergam, mas que meu coração sente. Aos meus amigos de coração, Cris, Jorge, Ju, Tati, Clodine, Elisa, obrigada por tanto.

Meu mais sincero, muito obrigada!

A medicina se fundamenta na natureza, a natureza é a medicina, e somente naquela devem os homens buscá-la. A natureza é o mestre do médico, já que ela é mais antiga do que ele e ela existe dentro e fora do homem (PARACELSO).

RESUMO

Ilex paraguariensis A. St.-Hil, popularmente conhecida como erva-mate, é muito utilizada em bebidas tradicionais na região Sul do Brasil, como chimarrão, tererê e chá-mate. Efeitos como atividade antiherpética, antidiabética, cicatrizante, anti-inflamatória e estimulante, já relatados, estão relacionados diretamente à sua composição química. Estudos anteriores mostraram que a atividade antiherpética está relacionada à concentração de compostos fenólicos, mais especificamente o ácido clorogênico e cafeico. O presente trabalho teve como objetivo elucidar e compreender aspectos do uso de plantas como fonte de medicamentos, tendo enfoque em um estudo de caso sobre *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil, pesquisando seu efeito antiviral conhecido. Para isso, um estudo de caracterização da matéria-prima vegetal foi realizado, constituído de ensaios de perda de dessecação e teor de extrativos, sendo seus resultados 9,65% e 38,28%, respectivamente. Com base em estudos anteriores, a extração foi realizada nas seguintes condições: matéria-prima vegetal a 10% (m/m), líquido extrator uma solução hidroalcoólica na concentração 20% (v/v), técnica de extração a turbulização, com velocidade de extração de 13.500 rpm por 5 minutos. Esta técnica foi utilizada por proporcionar o quase esgotamento da matéria-prima vegetal. A solução extrativa obtida foi caracterizada pela determinação de resíduo seco e concentração de compostos fenólicos. Os resultados obtidos, respectivamente, foram de 3,32% (m/m) e 192,59 (µg/mL). Para a continuidade dos estudos, o extrato foi seco por liofilização. A avaliação da atividade antiviral, foi realizada previamente ensaio de citotoxicidade, com células de linhagem Vero, nas concentrações decrescentes de 2500 a 2,44 µg/mL, sendo os meios MEM e PBS utilizados para diluição. Os resultados de CC₅₀ (concentração de cada amostra capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular) foram de 518,1 e 402,4, não apresentando citotoxicidade na linhagem escolhida. Para avaliação da atividade antiviral, foram utilizadas cepas sensíveis (KOS) e resistentes (29R) ao medicamento Aciclovir, em meios MEM (meio essencial mínimo) e tampão fosfato salino (PBS). O IS (índice de seletividade) foi de 4,86 e 5,58 para as cepas KOS e 29R, respectivamente, quando diluído em MEM, o que poder ser considerado um resultado promissor para um extrato total de planta.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil; ácido clorogênico; ácido cafeico; atividade antiviral; citotoxicidade; solução extrativa.

ABSTRACT

Ilex paraguariensis A. St.-Hil, popularly known as yerba mate, is widely used in traditional drinks in southern Brazil, such as chimarrão, tererê and mate tea. Effects such as anti-heretic, anti-diabetic, healing, anti-inflammatory and stimulating activity, already reported, are directly related to its chemical composition. Previous studies have shown that antiherpetic activity is related to the concentration of phenolic compounds, more specifically chlorogenic and caffeic acid. The present work aimed to elucidate and understand aspects of the use of plants as a source of medicines, focusing on a case study on *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil, researching its known antiviral effect. For this, a study of the characterization of the vegetable raw material was carried out, constituted by tests of loss of desiccation and extractives content, with its results being 9.65% and 38.28%, respectively. Based on previous studies, the extraction was carried out under the following conditions: vegetable raw material at 10% (m/m), extractor liquid, a hydroalcoholic solution at a concentration of 20% (v/v), turbolization extraction technique, with speed of extraction of 13.500 rpm for 5 minutes. This technique was used because it provides the almost depletion of the vegetable raw material. The extractive solution obtained was characterized by the determination of dry residue and concentration of phenolic compounds. The results obtained, respectively, were 3.32% (m/m) and 192.59 ($\mu\text{g}/\text{mL}$). For further studies, the extract was dried by lyophilization. The evaluation of the antiviral activity, previously performed cytotoxicity assay, with cells of lineage Vero, in decreasing concentrations of 2500 to 2.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$, being the MEM and PBS media used for dilution. The results of CC50 (concentration of each sample capable of reducing cell viability by 50%) were 518.1 and 402.4, showing no cytotoxicity in the chosen strain. For evaluation of antiviral activity, sensitive (KOS) and resistant (29R) strains to the drug Acyclovir were used, in MEM media (minimum essential medium) and phosphate buffered saline (PBS). The IS (selectivity index) was 4.86 and 5.58 for the KOS and 29R strains, respectively, when diluted in MEM, which can be considered a promising result for a total plant extract.

Keywords: *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. chlorogenic acid. caffeic acid. antiviral activity. cytotoxicity. extractive solution.

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Teor de extrativos.....	44
Equação 2 - Percentual de viabilidade.....	46
Equação 3 - Porcentagem de inibição.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Figura 1 - Esquema simplificado das etapas da produção de um fitoterápico, adaptado e modificado de Simões et al., 2010.....	27
Figura 2 - Esquema de percolador.....	32
Figura 3 - Etapas envolvidas na percolação.....	32
Figura 4 - Esquema ilustrativo de haste de metal que reduz o tamanho de partícula da MPV, utilizada na técnica de turbo-extração.....	33
Figura 5 - Representação esquemática de extração por Soxhlet.....	34
Figura 6 - Reação entre ácido gálico e o reagente Folin-Ciocalteu, em meio alcalino pela utilização de Na ₂ CO ₃	36
Figura 7 - Árvore de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.....	37
Figura 8 - Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes na <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil sendo (1) Ácido clorogênico e (2) Ácido cafeico.....	39
Figura 9 - Ciclo do vírus HSV-1 nos neurônios sensoriais.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Correlação dos métodos de extração segundo sua capacidade de esgotar a MPV: extração exaustiva ou não exaustiva.....	30
Tabela 2 - Resultados da caracterização dos extratos obtidos por turbo-extração de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil.....	50
Tabela 3 - Resultados da atividade anti-herpética do extrato seco liofilizado de <i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil através do método de inibição da formação de placa de lise.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

HHV Herpesvírus humano

HSV Herpes vírus simples

HSV-1 Herpes vírus simples tipo 1

HSV-2 Herpes vírus simples tipo 2

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

MPV Matéria prima vegetal

OMS Organização Mundial de Saúde

RDC Resolução da Diretoria Colegiada

RPM Rotação por minuto

RS Resíduo seco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	JUSTIFICATIVA	23
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
4.1	PRESENÇA DAS PLANTAS NA HISTÓRIA	25
4.2	LEGISLAÇÃO NO CONTEXTO MUNDIAL E BRASILEIRO DOS FITOTERÁPICOS	26
4.3	MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS	27
4.3.1	Extratos vegetais	28
4.3.1.1	Fatores que influenciam na elaboração de soluções extrativas vegetais	28
4.3.1.2	Extração	29
4.3.1.2.1	<i>Métodos de extração</i>	30
4.3.1.2.1.1	<i>Maceração</i>	30
4.3.1.2.1.2	<i>Infusão</i>	31
4.3.1.2.1.3	<i>Decocção</i>	31
4.3.1.2.1.4	<i>Percolação</i>	31
4.3.1.2.1.5	<i>Turbo-extração</i>	33
4.3.1.2.1.6	<i>Soxhlet</i>	34
4.3.1.3	Caracterização da solução extrativa	35
4.3.1.3.1	<i>Resíduo seco</i>	35
4.3.1.3.2	<i>Quantificação de fenólicos totais por Folin-Ciocalteu</i>	36

4.4	ERVA-MATE (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil)	36
4.4.1	Composição química	38
4.4.2	Aspectos biológicos	39
4.5	HERPES	39
PARTE EXPERIMENTAL: Estudo das etapas iniciais do desenvolvimento de um medicamento fitoterápico		
5	MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.1	MATERIAIS	42
5.1.1	Matérias-primas	42
5.1.2	Solventes	42
5.1.3	Equipamentos	43
5.2	MÉTODOS	43
5.2.1	Aquisição da matéria-prima vegetal (MPV)	43
5.2.2	Caracterização da matéria-prima vegetal	43
5.2.2.1	Perda por dessecação	43
5.2.2.2	Determinação do teor de extrativos	44
5.2.3	Obtenção e caracterização das soluções extrativas	44
5.2.3.1	Preparo da solução extrativa	44
5.2.3.2	Determinação do resíduo seco (RS)	45
5.2.3.3	Teor de composto fenólicos	45
5.2.4	Obtenção dos extratos secos por liofilização	45
5.2.5	Estudo de citotoxicidade	46
5.2.6	Avaliação da atividade antiviral pelo ensaio de inibição da formação das placas de lise	46
6	RESULTADO E DISCUSSÃO	47
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	47
6.1.1	Perda por dessecação	48

6.1.2	Teor de extrativo	48
6.2	OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS	49
6.3	ESTUDO DE CITOTOXICIDADE	50
6.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL PELO ENSAIO DE INIBIÇÃO DAS PLACAS DE LISE	51
7	CONCLUSÃO	53
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

O território brasileiro possui a maior diversidade biológica do mundo, entretanto seu potencial é pouquíssimo explorado (Brasil, 2012). Atualmente, pesquisas no desenvolvimento de produtos fitoterápicos têm crescido no mercado, devido à diversidade de compostos químicos e atividades farmacológicas que as plantas medicinais apresentam. A utilização de medicamentos fitoterápicos para as doenças existentes torna-se uma alternativa terapêutica que aumenta o número de recursos disponíveis para tratamento.

Devido à eficácia de certos medicamentos sintéticos, seu uso torna-se primeira escolha de tratamento. Estudos comprovam que em casos de herpes simplex o medicamento mais utilizado é o Aciclovir, porém há estudos que comprovam a existência de cepas resistentes a este medicamento (Snoeck, 2000).

Em 2015, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou estimativas globais relacionadas à infecção pelo vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), relatando que 67% da população mundial está infectada com HSV-1, e que a faixa etária mais acometida são pessoas com menos de 50 anos. No Brasil, a Sociedade Brasileira de Dermatologia estima que mais de 90% da população tem o vírus alojado no organismo, mesmo não apresentando os sintomas clássicos de herpes.

O vírus do herpes simplex é subcategorizado nos tipos 1 e 2, respectivamente HSV-1 e HSV-2. Ambos podem causar infecção oral e/ou genital. Comumente, o HSV-1 provoca gengivoestomatite, herpes labial e queratite e o HSV-2 geralmente causa lesões genitais. Sua transmissão ocorre no contato do tecido lesionado com o vírus ativo, mas pode ocorrer até mesmo quando estas não estão aparentes (Whitley & Roizman, 2001; Cole, 2020). O tratamento proposto pelo Ministério da Saúde consiste em medicamentos antivirais, como aciclovir, que não erradicam a infecção provocada pelo vírus, porém durante sua reincidência, ajudam a aliviar os sintomas, reduzindo o seu tempo de duração.

A complexidade da composição química presente nas plantas medicinais proporciona um alvo terapêutico de interesse, que inclusive pode auxiliar em situações de resistência microbiana. No caso do herpes, estudos comprovam que a erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) apresenta em sua composição química compostos fenólicos, metilxantinas, saponinas, que estão diretamente relacionados a suas propriedades farmacológicas como atividade antiherpética (Lückmeyer et al., 2012), antidiabética (Pereira et al., 2012), cicatrizante (Romana-Souza et al., 2015), e anti-inflamatória (Puangpraphant et al., 2011).

Com base no exposto acima, este trabalho tem como objetivo a realização de uma revisão bibliográfica sobre aspectos do uso de plantas como fonte de medicamentos, baseado em um estudo experimental para avaliar a atividade antiherpética de um extrato seco obtido a partir de extrato hidroalcoólico de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Discutir a importância do uso de plantas como fonte de medicamentos, tendo como base um estudo prático das etapas preliminares de desenvolvimento de um medicamento fitoterápico a partir da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil), envolvendo a caracterização, extração e avaliação da atividade do extrato obtido.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Levantar informações sobre a importância das plantas como fonte de medicamentos;
- Aprofundar o conhecimento sobre as etapas de transformação de uma planta medicinal em matéria-prima de grau farmacêutico para a obtenção de medicamentos fitoterápicos;
- Caracterizar a matéria prima vegetal (folhas de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil fragmentadas e submetidas ao sapeco) pelas técnicas de teor de umidade e teor de extrativos;
- Preparar e caracterizar extrato de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil obtido pela técnica de turbulização em condições previamente padronizadas;
- Determinar o teor de polifenóis totais nos extratos utilizando a técnica de Folin-Ciocalteu;
- Avaliar a atividade anti-herpética do extrato de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil frente ao HSV-1 pelo ensaio de inibição da formação das placas de lise.

3 JUSTIFICATIVA

A utilização das plantas medicinais é um dos recursos mais antigos para o tratamento das doenças humanas e muito já se conhece a respeito de seu uso a partir da sabedoria popular. Dentre estas, a erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) vêm despertando interesse devido a seu potencial terapêutico. A erva-mate é uma planta originária da parte sul do continente americano, especificamente Argentina, Brasil e Paraguai.

Estudos farmacológicos descritos para *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil, demonstraram atividades antiobesidade (Arçari et al., 2013), antidiabética (Pereira et al., 2012), cicatrizante (Romana-Souza et al., 2015), antiinflamatória (Puangpraphant & De Mejia, 2009) e antioxidante (Morais et al., 2009; Anesini et al., 2012; Valerga et al., 2013; Oh et al., 2013; Souza et al., 2015). Lückemeyer e colaboradores (2011) avaliaram a eficácia de extratos brutos e frações enriquecidas de folhas de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil, obtido por refluxo a 90 °C durante 30 minutos, frente ao vírus HSV-1. Os resultados demonstraram que todas as amostras testadas mostraram atividade anti-herpética. A fração enriquecida de acetato de etila foi a mais ativa para os vírus tipos 1 e 2. Análise posterior por cromatografia em camada delgada constatou a presença dos compostos saponinas, rutina, ácidos cafeico e clorogênico. Os autores sugerem que estes compostos podem ter um efeito sinérgico e serem os responsáveis pela atividade antiviral.

A produção de um medicamento fitoterápico depende da adequação de técnicas de desenvolvimento e de controle de qualidade que garantam a obtenção de um produto eficiente, seguro e reprodutível, mesmo partindo de uma matriz complexa e variável como é uma planta medicinal. O desenvolvimento e validação de metodologias de quantificação de marcadores químicos, ensaios de caracterização da matéria prima vegetal, métodos extrativos que permitam a extração seletiva e eficaz dos compostos de interesse e fácil passagem de escala, bem como a constatação da atividade biológica pretendida por meio de ensaios farmacológicos padronizados são pontos chave neste tipo de processo.

Este Trabalho de Conclusão de Curso teve como objetivo a realização de uma revisão das técnicas que caracterizam as etapas de transformação de uma planta medicinal em matéria-prima de grau farmacêutico apta para o desenvolvimento tecnológico de um medicamento fitoterápico. Paralelo a esta revisão, um estudo experimental foi conduzido

utilizando como planta modelo a erva mate, com base nos resultados promissores de atividade antiviral obtidos anteriormente, para aplicar na prática os conhecimentos adquiridos com a revisão. O extrato de erva mate obtido neste estudo pela técnica de turboextração e seco por liofilização apresentou atividade anti-herpética promissora, de maneira a abrir uma perspectiva de estudos futuros para um novo medicamento fitoterápico.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 PRESENÇA DAS PLANTAS NA HISTÓRIA

Desde a pré-história, as plantas têm estado presente no cotidiano de diversas gerações, sendo utilizadas das mais variadas formas, como plantas aromáticas, plantas medicinais, temperos, entre outros. O primeiro relato do seu uso vem do período Neandertal, onde se manteve presente durante toda época da história antiga até os tempos modernos (Giannenas et al., 2020). Até hoje, diversos estudos comprovam que o uso de plantas se mantém ativo, sendo um campo de grande investimento para descoberta e aprimoramento de novos produtos.

Como fonte terapêutica, as plantas estão presentes desde a antiguidade. Historicamente, a medicina chinesa é considerada uma das mais antigas da história, em conjunto com outras medicinas como ayurveda, celta, indígena, egípcia, onde todas utilizavam o recurso de plantas como suporte de tratamento. Alguns dos primeiros relatos escritos na história vêm da cultura chinesa, entre 2698 a 2598 aC., feitos pelo fundador da medicina tradicional chinesa, chamado Imperador Amarelo. Suas práticas englobam diversas técnicas, dentre as quais as plantas estavam presentes como fonte terapêutica. As práticas deste período influenciaram todo o oriente a trabalhar baseado nesta medicina (Al-Shura, 2020). Em contrapartida, no lado ocidental do mundo, prevalecia a medicina grega, que propusera um raciocínio oposto ao oriente. Mesmo que ambas trabalhassem com linhas opostas de fundamento, o uso de plantas como fonte terapêutica estava presente nos dois lados do mundo (Brugués, 2017).

Antes do continente americano ser colonizado, o povo indígena era quem habitava unicamente essas terras. Sua cultura e tradição tinha como base o ser humano inserido e pertencente à natureza, utilizando-a não somente como moradia, mas como fonte de nutrição, seja ela para alimentos e medicamentos. Quando houve o processo de colonização deste território, ocorreu um choque entre realidades, dentre elas a cultura medicinal (Sánchez & Ribeiro, 2018).

No território brasileiro, ainda no período colonial, foi onde surgiram os primeiros relatos da implementação da medicina tradicional da Europa pelos portugueses. Porém, diante da ausência dos remédios que compunham o arsenal europeu, os médicos portugueses, trazidos para atuar nas colônias brasileiras, desde cedo puderam reconhecer a importância e a grandeza

das plantas medicinais aqui utilizadas pela cultura indígena, até hoje indispensáveis à medicina convencional (Brasil, 2012).

Em meados do século XX, com o advento da Revolução Industrial e desenvolvimento da Química Orgânica, em paralelo ao desenvolvimento cultural humano, as receitas tradicionais deram lugar aos compostos sintéticos e passaram a ser negligenciadas e associadas a baixo nível educacional, aquisitivo e até mesmo ao misticismo e religião (Brasil, 2012). Atualmente, com todo avanço da indústria farmacêutica nos estudos de novos compostos sintéticos, as plantas medicinais voltam a ser motivo de interesse para o tratamento de doenças em todo o mundo.

4.2 LEGISLAÇÃO NO CONTEXTO MUNDIAL E BRASILEIRO DOS FITOTERÁPICOS

De acordo com o Ministério da Saúde, foram aprovadas leis, decretos, portarias e resoluções no âmbito federal, que preconizavam inicialmente o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos, até abordarem sobre a diversidade biológica e o exercício de fiscalização das atividades farmacêuticas envolvidas nesse processo (Brasil, 2021).

No ano de 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS) emitiu um documento que traz informações legais sobre empresas relacionadas à medicina tradicional e alternativa, de vários países pertencentes à OMS. Neste documento, a fitoterapia está inclusa como terapia alternativa, dentre isso sua definição é trazida como “medicamentos fitoterápicos são produtos ou materiais derivados de plantas (uma ou mais), com benefícios terapêuticos” (WHO, 2001). No Brasil, em 2004, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), elaborou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 48, de 16 de março de 2004 a qual dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Nesta RDC, a ANVISA torna obrigatório no ato de registro, dentre outros documentos, o relatório completo de produção do fitoterápico.

Conforme o decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, foi aprovado pela ANVISA a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que tem como objetivo "garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional".

Em outubro de 2018, a ANVISA emitiu um documento compilando normas de registro e notificação de fitoterápicos, que tem preconiza todos documentos circunstanciados e

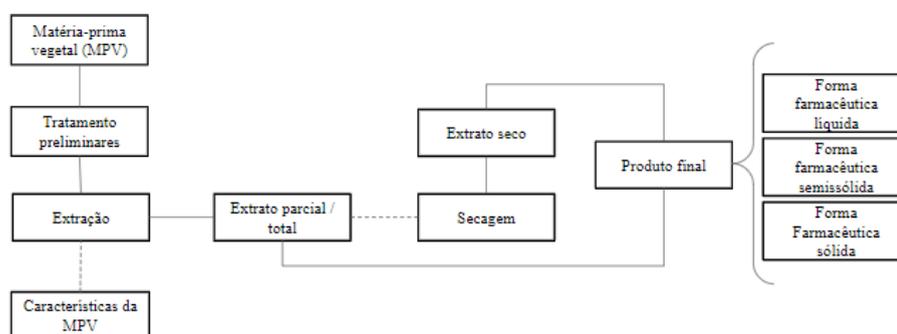
conclusivos em relação ao registro e pós-registro dos medicamentos fitoterápicos, de produtos tradicionais fitoterápicos, medicamentos dinamizados (homeopáticos, antroposóficos e antihomotóxicos), medicamentos específicos e a notificação de medicamentos de baixo risco, gases medicinais, dinamizados e produtos tradicionais fitoterápicos, conforme legislação vigente.

4.3 MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

A ANVISA define na RDC nº 84/2002 que medicamento é todo produto farmacêutico, obtido tecnicamente com finalidade profilática, paliativa, curativa ou para fins diagnósticos. A RDC 14/2010, preconiza que fitoterápicos são medicamentos obtidos somente a partir de matérias-primas ativas vegetais, não podendo incluir substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem estas associadas com extratos vegetais. Assim, como todo medicamento, ele é caracterizado pela sua eficácia e riscos de seu uso, sua reprodutibilidade e constância de sua qualidade.

Para obtenção de um fitoterápico, a matéria prima vegetal (MPV) é submetida à processos desde sua qualificação até procedimentos de transformação (Figura 1), onde o subproduto intermediário ou acabado obtido é forma farmacêutica requerida (Simões et al., 2010; Sonaglio et al., 2010).

Figura 1 - Esquema simplificado das etapas da produção de um fitoterápico, adaptado e modificado de Simões et al., 2010



Fonte: Simões et al., 2010

Dos fitoterápicos registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), apenas alguns são provenientes de espécies nativas brasileiras e quase 100% das matérias primas utilizadas na produção destes medicamentos são de origem estrangeira (Brasil, 2012).

4.3.1 Extratos vegetais

Devido à grande diversidade de compostos químicos das matérias-primas vegetais, faz-se necessário o uso de técnicas que permitam a obtenção de um produto final com estabilidade, qualidade e eficácia. Os extratos padronizados vêm sendo cada vez mais utilizados na indústria farmacêutica por ter seu conteúdo definido pelo teor de um ou mais constituintes, preferencialmente aqueles responsáveis pela atividade terapêutica requerida (ANVISA, 2019). Os extratos padronizados são obtidos a partir de soluções extrativas, produto preliminar da extração, que utiliza solventes para a retirada seletiva de compostos de interesse da matéria-prima vegetal. Esses solventes podem ser aquosos, hidroetanólicos, hidropoligólicos ou oleosos (Simões et al., 2010).

4.3.1.1 Fatores que influenciam na elaboração de soluções extrativas vegetais

Industrialmente, visando explorar a biodiversidade das plantas, a utilização dos extratos vem sendo desenvolvida para aprimorar a extração de compostos químicos, para garantir reprodutibilidade da formulação proposta e possibilitar uma padronização na produção e alguns fatores devem ser avaliados na etapa de desenvolvimento. Conforme Simões et al. (2010), alguns fatores influenciam as etapas envolvidas na preparação dos fitoterápicos, dentre elas temos:

- **Estado de divisão da droga:** O estado de divisão das drogas desempenha influência decisiva nos processos de extração, pois facilita o contato do solvente com as células vegetais.
- **Agitação:** Os processos de extração dependem da difusão e da renovação do solvente em contato com a substância a dissolver.
- **Temperatura:** O aumento da temperatura provoca um aumento da solubilidade dos compostos presentes na MPV.
- **Natureza do solvente:** Está relacionada à seletividade e rendimento da extração. Na prática, poucos são utilizados, pois devem ser inócuos para uso na área farmacêutica

- **pH:** Assume importância decisiva na solubilização de muitos compostos, já que a maioria são ácidos ou bases fracas e em um pH definido podem transformar-se em sais tornando-se solúveis.
- **Tempo de extração:** é variável, depende do grau de divisão da droga, da natureza dos componentes presentes na MPV e do solvente.

4.3.1.2 Extração

Os métodos extrativos são operações físico-químicas de transferência de massa, por um processo de difusão, que consiste em retirar da matéria prima vegetal (MPV), os componentes químicos de interesse através de solventes adequados (Clarke, 1985). A MPV pode ser extraída na sua forma natural ou seca, o que implica na escolha das técnicas extrativas.

A seleção do método de extração depende de vários fatores como: natureza do material de partida, interesse em obter a extração completa ou parcial, eficiência, estabilidade das substâncias extrativas e custos do processo escolhido, considerando a finalidade do extrato que se quer preparar. Dentre os métodos mais utilizados para obtenção de extratos vegetais estão os métodos a frio, que não utilizam calor para extrair as substâncias de interesse: maceração, percolação e turbo-extração. E os métodos a quente, quando o calor aumenta a solubilidade e conseqüentemente a extração dos compostos de interesse da MPV: infusão, decocção, refluxo e Soxhlet (Sonaglio et al., 2010; Simões et al.; 2010).

Os métodos também podem ser classificados como exaustivos quando possuem a capacidade de esgotamento da droga, ou seja, o solvente retira a totalidade das substâncias da MPV a dissolver e não exaustivo, quando a extração ocorre parcialmente (Tabela 1).

Tabela 1 - Correlação dos métodos de extração segundo sua capacidade de esgotar a MPV: extração exaustiva ou não exaustiva.

Tipos de extração	Métodos
Exaustivo	Percolação
	Turbo-extração
	Soxhlet
Não exaustivo	Maceração
	Infusão
	Decocção

Fonte: autora

4.3.1.2.1 Métodos de extração

Para obtenção dos extratos vegetais, os métodos extrativos classificados, como exaustivos e não exaustivos, serão explanados a seguir e incluem maceração, infusão, percolação, decocção, extração contínua quente (Soxhlet) e turbo-extração.

4.3.1.2.1.1 Maceração

A maceração é um método de extração não exaustivo. Seu mecanismo baseia-se em manter a MPV em um ambiente fechado, em contato com o líquido extrator. O sistema é submetido à agitação ocasional, com variação de temperatura (15° a 20°C) durante um período prolongado de horas ou dias. Além disso, não há a troca do líquido extrator durante a realização desta operação. O contato entre o interior das células da MPV e o líquido extrator ocasiona equilíbrio difusional, que define o método como não exaustivo (Sonaglio et al., 2010; Simões et al., 2010).

Os principais fatores que condicionam a extração nesta técnica são a quantidade, teor de umidade e tamanho de partícula/distribuição granulométrica da MPV, seletividade e quantidade do líquido extrator e as condições de extração, como pH, relação droga:solvente e tempo de extração (Sonaglio et al., 2010).

Considerando as principais limitações desta técnica de extração, relacionadas ao tempo prolongado para atingir o equilíbrio e o não esgotamento da droga, algumas

modificações podem ser introduzidas, permitindo aumentar a eficiência extrativa e dando origem às técnicas derivadas da maceração: (i) acoplar ao sistema fechado uma fonte de calor, mantendo a temperatura constante na faixa de 40 - 60°C (digestão); (ii) fornecer agitação constante durante o procedimento (maceração dinâmica); (iii) nova adição de líquido extrator ao marco ao final da maceração (remaceração) (Simões et al., 2010).

Pelas características e condições abordadas, esta técnica deve ser evitada quando a MPV é rica em substâncias ativas que apresentam estruturas celulares como gomas, resinas e alginatos, que ao entrar em contato com o solvente, poderiam dificultar o processo extrativo devido à formação de géis (Simões et al., 2010).

4.3.1.2.1.2 Infusão

Infusão é uma técnica extrativa muito usada popularmente no preparo de chás. É uma operação simples, fácil e de baixo custo. Trata-se de um sistema aberto, extração a quente, onde o líquido extrator utilizado é a água. Quando o ponto de fervura é atingido, imerge-se a MPV, tampando o recipiente, por um curto tempo. Para aumentar a permeação do líquido extrator no interior das células da MPV, pode-se contundir, pulverizar e/ou cortar a MPV (Simões et al., 2010).

Transcorrido um tempo determinado, o sistema atinge o equilíbrio entre MPV e líquido extrator, finalizando a extração antes do esgotamento dos compostos no interior das células da MPV, caracterizando esta técnica como não exaustiva.

4.3.1.2.1.3 Decocção

Consiste em uma técnica não exaustiva, realizada a quente, na qual a MPV é imersa no líquido extrator, comumente água, em ebulição, durante 20-30 minutos. Esta técnica é utilizada para MPV de caráter duro e de natureza lenhosa, sendo restrita sua utilização devido à possibilidade de alteração de substâncias ativas pelo período prolongado de ebulição (Simões et al., 2010; Sonaglio et al., 2010).

4.3.1.2.1.4 Percolação

A operação de percolação é caracterizada por um sistema aberto, que utiliza um recipiente cônico ou cilíndrico chamado de percolador, que pode ser de vidro ou de metal. No interior há um disco perfurado sobre o qual é depositado o material filtrante (Figura 2), com a função de reter partículas advindas da MPV (Simões et al., 2010).

Figura 2 - Esquema de percolador



Fonte: Chaves (2010)

Para otimização do processo extrativo, a MPV deve ser previamente triturada e então, submetida a uma etapa preliminar de umectação, para que facilite a passagem do solvente e evite a formação de canais preferenciais durante o procedimento de extração (Figura 3). A etapa de umectação, feita com o líquido extrator previamente à extração, dura em torno de 1-2 horas. Após esse processo, a MPV é colocada no percolador onde o líquido extrator atravessa toda a extensão do recipiente, de forma contínua, de cima para baixo.

Figura 3 - Etapas envolvidas na percolação



Fonte: autora

Após a acomodação da MPV no interior do percolador com a formação de uma coluna homogênea e contínua, inicia-se o gotejamento contínuo do líquido extrator na parte superior do percolador e o recolhimento da solução extrativa na parte inferior do mesmo. Desta forma, as substâncias ativas contidas na MPV são arrastadas pela passagem do líquido extrator promovendo o esgotamento da MPV. A difusão que ocorre entre as concentrações do líquido intracelular e do líquido extrator é mais rápida do que nos outros métodos, pois o equilíbrio que satura o líquido extrator e que limita a extração ao não esgotamento, nesse

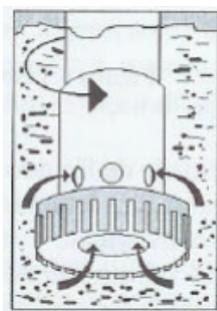
caso, nunca será atingido pois o líquido extrator utilizado é constantemente renovado (Simões et al., 2010; Sonaglio et al., 2010).

A velocidade de fluxo, tamanho da partícula, forma e dimensões do percolador e qualidade do empacotamento, são parâmetros diretamente ligados à eficiência desta técnica. Além disso, é uma das técnicas mais eficientes para a extração de componentes ativos presentes em pequena quantidade na MPV e com baixa solubilidade, e também quando seu preço é relativamente alto (Simões et al., 2010; Sonaglio et al., 2010).

4.3.1.2.1.5 Turbo-extração

Técnica extrativa que também pode ser chamada de turbólise ou turbolização, sendo caracterizada pela capacidade exaustiva e de extração a frio. O princípio da técnica se baseia pela capacidade de redução do tamanho de partícula da MPV, concomitantemente à extração. Dentro de uma haste de metal, há lâminas que rotacionam de 5000 a 20000 rpm (rotação por minuto). Esse movimento faz com que a MPV disperse no líquido extrator, entre em agitação e passe por dentro da haste, atingindo as lâminas em rotação, ocasionando o rompimento das células vegetais pelas forças de cisalhamento, resultando na diminuição do tamanho das partículas (Figura 4). Essa redução favorece a solubilidade dos compostos ativos no líquido extrator, diminuindo o tempo total de extração (Simões et al., 2010; Migliato, 2005).

Figura 4 - Esquema ilustrativo de haste de metal que reduz o tamanho de partícula da MPV, utilizada na técnica de turbo-extração



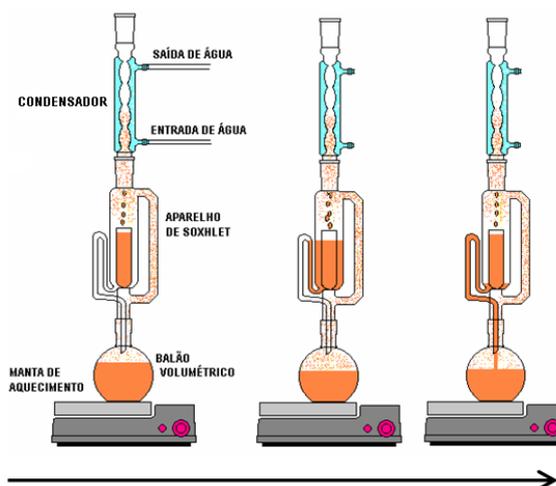
Fonte: Simões et al., 2010

Esta técnica propõe um aumento na eficiência de extração que, aliado à simplicidade, rapidez e versatilidade, proporcionam seu uso fácil em pequenas e médias escalas de trabalho (Simões et al., 2010; Sonaglio et al., 2010; Migliato, 2005). Por outro lado, pode haver um problema relacionado a substâncias voláteis, pois, dependendo do tempo de duração da extração, a força de cisalhamento resulta em liberação de calor no meio. Esta técnica não é recomendada para materiais fibrosos e de maior dureza, como caules, raízes, rizomas e lenhos (Simões et al., 2010; Sonaglio et al., 2010; Migliato, 2005).

4.3.1.2.1.6 Soxhlet

O método Soxhlet é constituído de um sistema fechado, a quente, para extração de MPV utilizando líquidos extratores voláteis. A técnica utiliza um conjunto de materiais e vidrarias, composto de um balão de destilação, o aparelho de Soxhlet propriamente dito e um condensador (Figura 5). A MPV é inserida no aparelho de Soxhlet e o líquido extrator no balão de destilação, onde é submetido a aquecimento. (Simões et al., 2007; Melecchi, 2005; Brazaca, 2016).

Figura 5 - Representação esquemática de uma extração por Soxhlet



Fonte: Gastaldi, 2010

O vapor do líquido extrator, ao chegar à coluna de condensação, se liquefaz e cai sobre a MPV contida no aparelho de Soxhlet, gerando um acúmulo, conforme o procedimento continua. Os compostos a serem extraídos dissolvem-se no líquido extrator ainda quente e no momento em que quase todo espaço contendo a MPV se encontra preenchido, esse é esvaziado por meio de um sifão localizado na lateral do aparelho. Por fim, o líquido extrativo

retorna ao balão de destilação e se completa o ciclo, repetindo-se várias vezes, por tempos prolongados (Simões et al., 2010; Sonaglio et al., 2010).

Suas vantagens incluem fatores relacionados à quantidade reduzida de líquido extrator utilizado, quando comparado a outras metodologias, pois a cada ciclo de extração, a MPV entra em contato com o líquido extrativo renovado, obtendo-se os mesmos resultados qualitativos e quantitativos de outras técnicas. Essa condição favorece com que não haja necessidade de monitoramento constante. Por outro lado, algumas desvantagens associadas a este tipo de extração são a limitação do tipo de MPV que permite a utilização desta técnica, o tempo para sua realização (1-72 horas) e, na maioria dos casos, a falta de seletividade do processo extrativo (Melecchi, 2005; Miguel et al., 1989; Simões et al., 2010; Sonaglio et al., 2010).

4.3.1.3 Caracterização da solução extrativa

A caracterização de extratos vegetais é de fundamental importância no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, objetivando revelar suas características físico-químicas. Considerando a complexidade de uma planta medicinal e das inúmeras variáveis que constituem um processo extrativo, faz-se necessário o uso de técnicas que avaliem a qualidade e reprodutibilidade da solução extrativa, entre elas destacam-se a avaliação do resíduo seco e a quantificação dos marcadores químicos (Cardoso, 2009; Borella & Carvalho, 2011).

Conforme a RDC 14/2013, marcadores são compostos químicos ou uma classe, como alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, presente na MPV, que são utilizados como referência em análises realizadas para o controle de qualidade em todas as etapas de desenvolvimento de um produto fitoterápico.

4.3.1.3.1 Resíduo seco

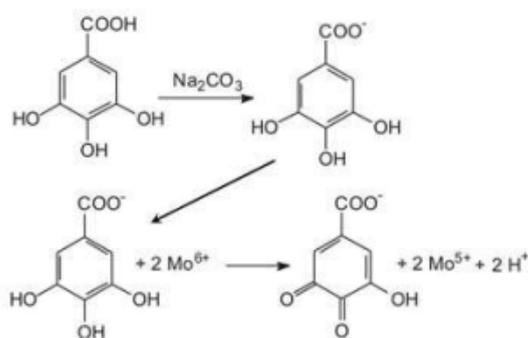
A determinação do resíduo seco da solução extrativa é uma técnica simples que avalia a quantidade de substâncias solubilizadas pelo líquido extrator utilizado, e constitui um parâmetro de qualidade da extração realizada (Borella & Carvalho, 2011). Conforme a Farmacopeia Brasileira 6ª Ed (2019), esta metodologia é aplicada para extratos vegetais

líquidos ou semissólidos. Alíquotas dos extratos são submetidas à secura em banho de água quente, seguido por dessecação em estufa a 100-105°C, durante 3 horas. O teor de resíduo seco é expresso em porcentagem e comparado ao preconizado em literatura.

4.3.1.3.2 *Quantificação de fenólicos totais por Folin-Ciocalteu*

O método Folin-Ciocalteu é uma técnica espectrofotométrica simples baseada em reação de oxirredução (Figura 6) para detecção de compostos fenólicos. Estes compostos, que são excelentes agentes redutores e possuem efeito antioxidante, são encontrados em diversas plantas e alimentos. Esse método consiste na utilização de um reagente chamado Folin-Ciocalteu, que é constituído de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), de coloração amarela. Os compostos fenólicos presentes no extrato vegetal, são submetidos a uma solução alcalina, geralmente carbonato de sódio (Na_2CO_3), formando ânion fenolato pela dissociação do próton presente em sua estrutura. Este ânion reage com os ácidos constituintes do reagente Folin-Ciocalteu, reduzindo-os em óxido de tungstênio (W_8O_{23}) e óxido de molibdênio (Mo_8O_{23}), de coloração azul. A concentração de compostos fenólicos é medida de forma indireta em um espectrofotômetro, comprimento de onda de 760 nm, para posterior cálculo com base na curva de regressão linear de ácido gálico (GA) ou outro fenólico utilizado como padrão (Medina, 2011; Pires et al., 2017).

Figura 6 - Reação entre ácido gálico e o reagente Folin-Ciocalteu, em meio alcalino pela utilização de Na_2CO_3 .



Fonte: Pires et al. (2017)

4.4 ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil)

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) é uma planta originária da parte sul do continente americano, especificamente Argentina, Brasil e Paraguai, tratando-se de uma planta conhecida há 300-400 anos, relacionada ao seu consumo diário para promoção de saúde (Sanz et al., 1991; Bracesco et al., 2011; Heinrichs et al., 2001; Hao et al., 2015).

O Brasil é o maior produtor de erva-mate, conforme dados do IBGE (2017), sendo que o estado do Rio Grande do Sul lidera a produtividade e sua cultura influencia o consumo pelo resto do país com bebidas tradicionais como chimarrão, tererê e chá-mate. Esta característica implica diretamente no comércio regional, que conta com a participação de 558 municípios entre os estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, contribuindo com produções familiares na zona rural, valorizando a produção regional (Andrade, 1999; Suertegaray, 2002).

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) pertence à família Aquifoliaceae, classificada como uma árvore perene (Figura 7) de crescimento lento e porte variável, podendo sua altura variar de 3 até 5 metros quando cultivada e até 25 metros em florestas. Possui um tronco cilíndrico reto ou pouco tortuoso (Suertegaray, 2002).

Figura 7 – Árvore de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.



Fonte: Silva (2011)

Conforme Bracesco et al (2011), as folhas possuem coloração verde escura, margens dentadas e ligeiramente crenadas com base em forma de cunha. Os pecíolos têm até 15 mm de

comprimento e a fase de floração ocorre durante a primavera. Os frutos são globulares, medindo de 4 a 8 mm, coloração vermelho-arroxeadada (Efing, 2008; Habtemariam, 2019).

O uso da erva-mate como fonte de recursos farmacológicos tem estado presente desde a civilização indígena, que utilizava a infusão desta erva para aumentar a resistência à fadiga e diminuir a sensação de fome e sede. Desde então, numerosos estudos investigativos foram conduzidos com objetivo de elucidar sua composição química, responsável ou não por seus efeitos farmacológicos já conhecidos. Atualmente, estão registradas pelo Ministério da Saúde, quatorze preparações derivadas de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil (Berkai & Braga, 2000; Suertegaray, 2002; Valduga, 1995).

4.4.1 Composição química

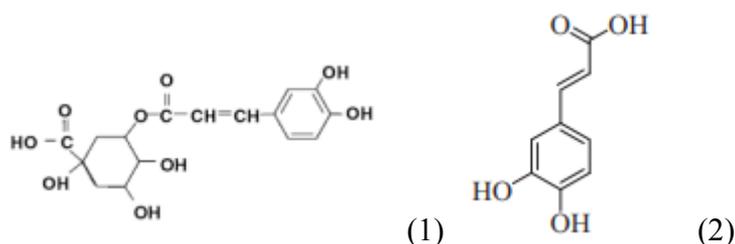
Os metabólitos envolvidos com o crescimento e desenvolvimento da planta, possuindo função estrutural, plástica e de armazenamento de energia são chamados de primários, como proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos. Já os metabólitos secundários, não possuem essa ligação e proporcionam outras propriedades à planta, como garantir sua sobrevivência e propagação (Raven et al., 2001; Santos, 2004; Pagliosa, 2009).

Conforme Suertegaray (2002), diversos fatores como clima, região de plantio, forma de colheita, idade da planta, idade das folhas, luminosidade disponível, entre outros, implicam no teor dos metabólitos secundários podendo acarretar variações químicas da composição de plantas da mesma espécie.

Em relação à composição química das folhas de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil, são elencados a seguir os metabólitos secundários de interesse farmacológico, as metilxantinas como cafeína, teobromina e teofilina (Saldaña et al., 2000; Schubert et al., 2006); saponinas (Bastos & Torres, 2003; Matsubara & Rodriguez-Amaya, 2006; Prediger et al., 2008); óleos essenciais, como linalol e limoneno (Bastos et al., 2006); polifenóis como ácido clorogênico e derivados (Bastos & Torres, 2003; Matsubara & Rodriguez-Amaya, 2006; Prediger et al., 2008); e flavonoides como rutina, campferol, quercetina. Especificamente em relação às metilxantinas e os compostos fenólicos destaca-se o ácido clorogênico e o ácido caféico, respectivamente 1 e 2 (Figura 8), responsáveis por vários efeitos farmacológicos conhecidos da erva-mate (Silveira et al., 2016; Habtemariam, 2019; Bastos & Torres, 2003).

Figura 8 - Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes na *Ilex paraguariensis*

A. St.-Hil sendo (1) Ácido clorogênico e (2) Ácido cafeico



Fonte: Habtemariam (2019)

4.4.2 Aspectos biológicos

Estudos farmacológicos descritos para *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil, demonstraram atividades antivirais (Lückemeyer et al., 2011), antiobesidade (Arçari et al., 2013), antidiabética (Pereira et al., 2012), cicatrizante (Romana-Souza et al., 2015), antiinflamatória (Puangpraphant & De Mejia, 2009) e antioxidante (Morais et al., 2009; Anesini et al., 2012; Valerga et al., 2013; Oh et al., 2013; Souza et al., 2015).

Em estudo realizado por Lückemeyer e colaboradores (2012) foi analisado o efeito do extrato hidroetanólico de folhas de erva-mate e sub-frações deste extrato contra o herpes simplex virus (HSV) tipos 1 e 2, tendo sido constatada atividade antiviral para todas as amostras avaliadas. A análise por cromatografia em camada delgada constatou a presença de saponinas, rutina, ácidos cafeico e clorogênico, sendo que os autores sugerem que estes compostos podem ter um efeito sinérgico e serem os responsáveis pela atividade antiviral.

4.5 HERPES

O herpes é uma doença causada pelos vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2), amplamente conhecida devido à disseminação pela população mundial. Historicamente, lesões que poderiam ser características de herpes foram descritas desde os tempos de Hipócrates. No Brasil, mesmo não se tratando de uma doença de notificação compulsória, estima-se que mais da metade da população tenha o vírus inoculado no

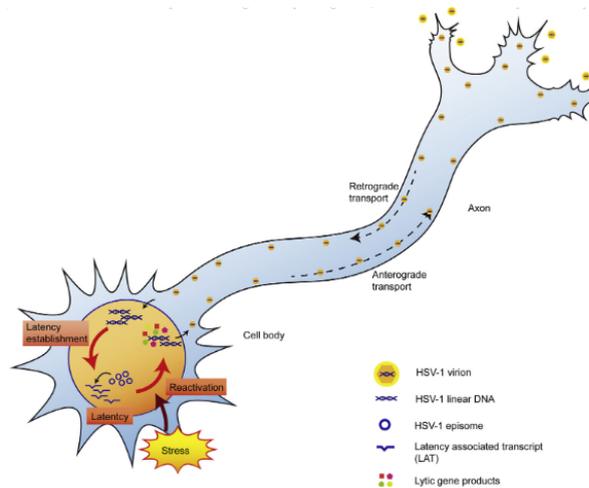
organismo, em estado latente. Acometendo somente o homem, os vírus HSV-1 e HSV-2, classificados como herpesvírus humanos (HHV), fazem parte da família Herpesviridae, sendo que a partir do momento de inoculação no hospedeiro, permanecem no organismo do indivíduo durante toda a sua vida (Santos, 2011; Lückemeyer et al., 2011; Cole, 2020). Sua disseminação pela população pode estar relacionada ao hospedeiro ser assintomático e/ou não ter o conhecimento de estar apresentando lesões características do herpes (Cole, 2020).

Morfologicamente, o HSV-1 e HSV-2 possuem estruturas semelhantes porém, são antigenicamente diferentes, sendo que suas dimensões estão entre 120 e 200 nm. Estes vírus são constituídos de envelope lipoprotéico com espículas glicoproteicas, capsídeo icosaédrico, envolto por um material proteico e amorfo chamado tegumento, o qual contém enzimas e fatores de transcrição essenciais para o início da infecção, e DNA de dupla fita (Boff, 2016; Fouéré et al., 2016; Harvey et al., 2013). Além disso, acometem diferentes locais no corpo do hospedeiro. O HSV-1 está relacionado a regiões extragenitais e o HSV-2 envolve a região genital, entretanto em estudos recentes relataram que o HSV-1 pode ser encontrado em regiões genitais (Trindade et al., 2007).

Estes vírus estão relacionados a diversas doenças, desde herpes labial até encefalite. As lesões apresentam caráter vesicular puntiforme, sendo nos lábios chamada de gengivoestomatite herpética acometida pelo HSV-1 (Lückemeyer et al., 2011; Cole, 2020; Whitley et al., 2001). As vesículas rompem facilmente, formando inúmeras lesões pequenas e avermelhadas, dando lugar a úlceras de fundo amarelado com zona edemaciada e eritematosa, extremamente dolorosas (Trindade et al., 2007; Slezák et al., 2009). São associadas a sintomas como formigamento local, queimação e desconforto, bem como náuseas e febre, dependendo do caso.

O mecanismo de transmissão ocorre pelo contato na lesão, por saliva ou perdigoto do hospedeiro infectado. Após o contato com o vírus ocorre a replicação dentro das células epiteliais e, em seguida, o vírus entra nos terminais axonais dos neurônios sensoriais, a partir dos quais é transportado pelos gânglios sensoriais correspondentes (geralmente gânglios trigêmeos), entrando em estado de latência (Figura 9). Assim que o indivíduo é exposto a fatores ambientais e internos desencadeadores como frio e calor, estresse, raios UV, o vírus latente pode se reativar e retomar sua replicação produtiva seguida pela formação do HSV infeccioso, que é transportado de volta aos tecidos periféricos ou para outras células neuronais permanecendo hospedeiro. Em casos brandos, o ciclo viral dura entre 5 a 7 dias, e em casos graves, até 2 semanas (Kumar et al., 2016; Bigley, 2014; Cole, 2020; Yan et al., 2019)

Figura 9 – Ciclo do vírus HSV-1 nos neurônios sensoriais



Fonte: Yan et al (2019)

Atualmente existem fármacos antivirais tanto para ação sistêmica, como aciclovir, valaciclovir, penciclovir, fanciclovir, ganciclovir, foscarnet e cidofovir, como para ação local (uso tópica) como aciclovir, penciclovir e docosanol (Tagliari et al., 2012). Os medicamentos aplicados via tópica apresentam limitada eficácia e necessidade de múltiplas aplicações por um período prolongado de tratamento. Fatores como barreiras físicas e químicas, representadas pela rede de fibrina, células epiteliais necrosadas e tecido conjuntivo ulcerado com exsudato e infiltrado inflamatório exuberante, limitam a ação local destes fármacos. Assim, é comum a opção pela utilização de tratamento via oral, devido à redução de sinais e sintomas mais rapidamente, evitando as limitações apresentadas por via tópica (Donalisio et al., 2013; Tagliari et al., 2012; Consolaro & Consolaro, 2009).

Analisando esses fatores, o desenvolvimento de terapias antivirais alternativas às convencionais, como a busca de novos ativos a partir de produtos de origem vegetal, surge como uma estratégia potencialmente interessante.

PARTE EXPERIMENTAL: Estudo das etapas iniciais do desenvolvimento de um medicamento fitoterápico

Esta parte do trabalho teve como objetivo experimentar as etapas tecnológicas que visam avaliar o potencial de uma planta medicinal como base para obtenção de um medicamento fitoterápico com atividade anti-herpética. Neste estudo foi utilizada uma amostra de erva-mate obtida comercialmente, previamente submetida ao sapeco e triturada, conservada em embalagem a vácuo. Inicialmente a matéria prima vegetal foi caracterizada e submetida à extração por turbolização com metodologia previamente padronizada (Santos et al., 2011). O extrato obtido foi avaliado quanto ao resíduo seco e teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu e, posteriormente, avaliados quanto à toxicidade e potencial anti-herpético.

Os resultados obtidos neste estudo estão descritos e discutidos a seguir.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

5.1.1 Matérias-primas

Ácido Gálico (Fluka, Suíça)

Ácido tricloroacético (LabSynth, Brasil)

Carbonato de Sódio Anidro (LabSynth, Brasil)

Folin-Ciocalteu's phenol (Fluka, Suíça)

Meio MEM (*Minimal Essential Medium* – Cultilab®)

Meio PBS (*Phosphate buffered saline* - Cultilab®)

5.1.2 Solventes

Ácido acético (Vetec Química Fina Ltda, Brasil)

Etanol (Vetec Química Fina Ltda, Brasil)

Metanol (Vetec Química Fina Ltda, Brasil)

5.1.3 Equipamentos

Agitador magnético com aquecimento Schott SLR (Schott Instruments, Alemanha)

Balança analítica AS2000 (Ohaus Corporation, EUA)

Balança de infravermelho (Ohaus Corporation, EUA)

Banho-maria (Velp Scientifica, Itália)

Centrífuga 4K15 Sigma (Sigma, EUA)

Estufa (Nova Ética, Brasil)

Leitor de placas (SpectraMax, USA)

Liofilizador (Terroni®, Brasil)

Rotaevaporador (Buchi, Suíça)

Tamisador (Bertel, Brasil)

Ultra-Turrax (IKA, Alemanha)

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Aquisição da matéria-prima vegetal (MPV)

Folhas e caules de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. foram industrialmente processadas (sapecadas e moídas) e embaladas a vácuo pela Erva-Mate Charrua®, no município de Ouro Preto-SC, Brasil.

O material vegetal foi fracionado de acordo com a faixa granulométrica. A fração de caules e pecíolos (maior ou igual a 1,70 mm) presente na amostra foi retirada; a fração de folhas foi caracterizada por meio de testes de perda por dessecação e teor de extrativos, sendo a seguir armazenada à 4°C para posterior extração e avaliação.

5.2.2 Caracterização da matéria-prima vegetal

5.2.2.1 Perda por dessecação

Cerca de 1 grama de material vegetal, exatamente pesados, foram transferidos à balança de infravermelho (100 °C) durante 10 minutos. A perda de massa percentual foi

avaliada e os resultados de três determinações foram expressos em termos da média das repetições (ANVISA, 2019).

5.2.2.2 Determinação do teor de extrativos

De acordo com Bundesvereinigung (1986), cerca de 1,0 g de MPV foram pesados e submetidos à extração a quente, por decocção, com 100,0 g de água, por 10 minutos. Após essa etapa, o peso foi reconstituído e a solução extrativa foi filtrada, descartando-se os primeiros 20 mL. Este processo foi realizado duas vezes. Previamente dessecados, os pesa-filtros contendo 20,0 g da solução extrativa foram evaporados em banho-maria até a secura para a obtenção dos resíduos sólidos. Em seguida, foram dessecados em estufa a 105 °C, durante 2 horas. Os pesa-filtros foram mantidos em dessecador até o resfriamento e, então, pesados. Esse procedimento foi realizado em triplicata. Os resultados do teor de extrativos foram expressos como a média de seis repetições, de acordo com a Equação 1:

$$TE = (RS \times fd \times 100) / m - (m \times PD/100) \quad (1)$$

onde:

TE = teor percentual de extrativos (%_{m/m}).

PD = perda por dessecação (%)

RS = massa do resíduo seco (g)

m = massa do material vegetal (g)

fd = Fator de diluição (5)

5.2.3 Obtenção e caracterização das soluções extrativas

5.2.3.1 Preparo das soluções extrativas

As soluções extrativas foram obtidas por turbo-extração conforme metodologia padronizada por Santos e colaboradores (2011). Brevemente, a MPV e o líquido extrator etanol 20 % (V/V), numa relação droga:solvente de 10% (m/V), foram submetidos a extração durante 5 minutos em Ultra-turrax, (T25 Basic, IKA, Alemanha) sob agitação de 13500 rpm. As soluções extrativas foram caracterizadas através dos teores de resíduo seco (RS) e teor de compostos fenólicos.

5.2.3.2 Determinação do resíduo seco (RS)

Cerca de 20,0 g de cada solução extrativa, exatamente pesados, foram colocados em pesa filtros previamente tarados. A seguir o conteúdo de cada pesa filtro foi levado à secura em banho-maria, sob agitação ocasional. Posteriormente os pesa filtros foram colocados em estufa a 105 °C por duas horas, resfriados em dessecador até chegar à temperatura ambiente e então pesados. O experimento foi realizado em triplicata e o resultado foi calculado em relação a 100,0 g de solução extrativa (% m/m) pela média de três determinações (Hartke & Mutschler, 1987).

5.2.3.3 Teor de composto fenólicos

O teor de polifenóis totais foi avaliado por metodologia de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Medina e colaboradores (2011). O extrato seco (2,5 mg) foi diluído em metanol/água (1:1 V/V). Em uma placa de 96 poços adicionou-se 12,5 µL da amostra, 50 µL de H₂O, 12,5 µL do reagente Folin-Ciocalteu e aguardou-se por 6 minutos. Em seguida, foi adicionado 125 µL de Na₂CO₃ 7 % (m/V). Após 90 minutos de incubação ao abrigo de luz, a absorbância foi medida em leitor de placas a 760 nm (Spectra Max M2, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g), calculados por meio de uma curva construída com concentrações que variaram de 100 a 250 µg/mL.

5.2.4 Obtenção dos extratos secos por liofilização

As soluções extrativas foram concentradas sob vácuo em rota- evaporador (Buchi, Suíça), para evaporação do etanol, a uma temperatura de 40°C. Posteriormente as soluções foram congeladas a -20 °C por 24 horas. Após este período foram submetidas ao processo de secagem por princípio de sublimação, em liofilizador (LD 1500, Terroni®, Brasil), durante 48 horas, com temperatura do condensador a -40 °C, sob pressão constante, após estabilização do sistema. Assim, o extrato seco foi obtido e armazenado em um dessecador.

5.2.5 Estudo de citotoxicidade

O extrato seco liofilizado (ESL) foi previamente solubilizado em meio MEM (ESL-MEM) ou em tampão fosfato-salino (ESL-PBS). Uma alíquota de 100 µL de suspensão de células Vero (ATCC:CCL 81 e Instituto Adolfo Lutz/SP) contendo aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células/mL foi distribuída em placas de 96 poços (100 µL/poço). A placa foi incubada por 24 h, a 37 °C, em estufa de CO₂ até confluência. O meio MEM foi substituído por 200 µL de diferentes concentrações das amostras e a placa foi incubada por 48 h, nas mesmas condições de temperatura e atmosfera. Sem remover o sobrenadante, as células foram fixadas com 100 µL/poço de solução aquosa de ácido tricloroacético a 10 % (m/V), e a placa foi incubada por 1 h à 4 °C. Após esse período, os poços foram lavados três vezes cuidadosamente com água destilada e mantidas em temperatura ambiente para secar. As células fixadas foram coradas com 100 µL de solução ácida de sulforrodamina B (0,057%, m/V) por 30 min. O excesso de corante foi removido com solução aquosa de ácido acético 1% (V/V) em três lavagens sucessivas e novamente a placa foi mantida em temperatura ambiente. Para extração do corante ligado às proteínas utilizou-se 100 µL/poço de solução tampão Tris-Base 10 mM, pH 10,5 e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 510 nm (Spectra Max M2, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Os valores de absorbância de cada concentração testada foram transformados em percentuais de viabilidade, em relação ao controle celular, o qual é considerado 100% viável, através da Equação 2:

$$Viabilidade (\%) = DO amostra \times 100 / DO controle celular \quad (2)$$

onde:

DO = densidade óptica

Em seguida, os percentuais calculados referentes às diferentes concentrações das amostras, foram inseridos num gráfico e por análise de regressão, foi possível calcular a CC₅₀, ou seja, concentração de cada amostra capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular. Os valores de CC₅₀ calculados representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão.

5.2.6 Avaliação da atividade antiviral pelo ensaio de inibição da formação das placas de lise

A atividade anti-herpética do extrato seco liofilizado foi avaliada pelo ensaio de placas de lise, realizado de acordo com Silva e colaboradores (2010) utilizando o fármaco aciclovir

(ACV/Sigma Aldrich) como controle positivo para vírus HSV-1 (cepas KOS e 29R). As amostras foram diluídas em placa nas concentrações de 250 a 7,81 µg/mL. Cada ensaio continha controle viral (células infectadas e não tratadas com as amostras) e controle celular (células não infectadas e nem tratadas). As células Vero foram cultivadas em placas de 24 poços (2,5 x 10⁵/poço/0,75 mL) e incubadas à 37 °C, 5 % de CO₂ até a confluência (24 h). Após esse tempo o meio foi aspirado, a monocamada celular foi lavada três vezes com PBS e 400 µL das suspensões virais foram adicionadas, na concentração de 100 UFP/poço, por 1 h a 37 °C e 5 % CO₂. Após a adsorção viral, as células foram lavadas novamente com PBS e foram adicionados 500 µL de diferentes concentrações de amostra (250 a 7,81 µg/mL) em uma solução de carboximetilcelulose (CMC) 1,5 % dissolvida em meio MEM 2x (1:1, V/V) por 48h, a 37 °C e 5 % CO₂. Por fim, o meio foi aspirado, as células foram coradas com 100 µL de preto de naftaleno. Após 20 minutos, à temperatura ambiente e em agitador horizontal, o corante foi aspirado e as placas formadas foram contadas através da visualização em microscópio estereoscópio. A porcentagem de inibição da replicação viral de cada amostra, com relação aos controles virais, foi calculada através da Equação 3:

$$\% \text{ de inibição} = 1 - [n^{\circ} \text{ placas amostra} / n^{\circ} \text{ placas controle viral}] \times 100 \quad (3)$$

Os percentuais calculados foram inseridos em gráficos e através da análise de regressão linear foi possível calcular os valores de concentração média inibitória de atividade antiviral (CI₅₀). Os valores de CI₅₀ representam a média de, no mínimo, três experimentos independentes ± desvio padrão. Assim, obtido os valores de concentração média citotóxica (CC₅₀) e CI₅₀ foi possível calcular o índice de seletividade (IS = CC₅₀/CI₅₀) de cada amostra.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL (MPV)

A produção da erva-mate para a comercialização envolve o sapeco das folhas de *Ilex paraguariensis*. No sapeco, operação realizada tradicionalmente na preparação da erva-mate para utilização do chimarrão, as folhas e galhos são submetidos a uma passagem rápida por uma fogueira ocorrendo a inativação de enzimas, a evaporação de compostos voláteis como água e a perda de parte da cafeína por sublimação (Santos et al., 2011). As folhas de erva-mate utilizadas neste trabalho foram adquiridas comercialmente já previamente

submetidas a estes processos. O material vegetal foi então fracionado por tamização em tamis de 1,70 mm. A fração retida (igual ou superior ao diâmetro do tamis), composta de caules e pecíolos foi desprezada e a fração passagem, constituída de folhas foi utilizada para dar continuidade ao trabalho.

A transformação de uma planta medicinal em uma matéria-prima com grau farmacêutico que possibilite seu uso como matéria-prima para o desenvolvimento de um fitoterápico tem vários objetivos: preservar a integridade química dos constituintes, preservar suas propriedades farmacológicas, garantir uma ação biológica constante e conferir segurança em sua utilização (Simões et al, 2010). Para isto, a qualidade da matéria prima vegetal deve ser avaliada e servirá de parâmetro de qualidade para as etapas subsequentes do processo produtivo.

Neste trabalho a MPV foi caracterizada por meio da avaliação da perda por dessecação e teor de extrativos, como descrito nos subítens 5.2.2.1 e 5.2.2.2.

6.1.1 Perda por dessecação

Este ensaio determina a concentração dos compostos voláteis, como água, presentes na MPV, através da medição por balança de infravermelho. É de extrema importância a avaliação deste parâmetro pois a presença de umidade no material vegetal pode induzir processos de degradação enzimática e química, que podem contribuir com a proliferação de microorganismos durante o armazenamento da planta durante um período prolongado (Farias, 2010).

O teor de umidade é medido através do aquecimento da MPV pela emissão dos raios infravermelhos irradiados pela balança. O resultado encontrado foi de 9,65% ($\pm 0,20$) com desvio padrão relativo de 2,17% ($n = 3$), verificando-se que este se encontra dentro do preconizado, considerando que o valor máximo de teor de umidade pela Farmacopeia Brasileira (1988) é de 14%.

6.1.2 Teor de extrativos

A técnica de teor de extrativos permite o estabelecimento de um parâmetro inicial de qualidade da MPV, por meio da quantificação de substâncias extraídas por uma metodologia

padronizada Bundesvereinigung (1986), explicada no item 5.2.2.2. O teor de extrativos funciona como um referencial comparativo entre diferentes lotes das MPVs através do percentual de material extraído de forma simples e padronizada.

O teor de extrativos em água obtido para a matéria-prima vegetal foi de 38,28% (\pm 0,004) com desvio padrão relativo igual a 6,23 %. Este resultado está em consonância com o obtido por Santos (2011), que foi de aproximadamente 40 % (m/m).

6.2 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES EXTRATIVAS

Após a caracterização, a MPV foi submetida à extração, que visa retirar seletiva e quantitativamente as substâncias de interesse, neste caso os compostos fenólicos. A padronização da etapa extrativa visa assegurar a qualidade e reprodutibilidade do extrato obtido devido à grande diversidade de compostos químicos presentes nos vegetais.

A qualidade de um extrato padronizado depende de parâmetros que devem ser controlados, como: (i) método extrativo, que está correlacionado a parte da MPV utilizada e que deve considerar possíveis degradações dos compostos presentes; (ii) líquido extrator, que deve ser eficiente, seletivo, facilmente eliminado e de baixa toxicidade; (iii) tempo e velocidade de extração, relacionado como o período necessário para atingir o equilíbrio ou à capacidade de esgotamento da MPV, além de outros parâmetros que podem interferir nesta etapa, como aumento da temperatura.

Estudos anteriores mostram que os compostos fenólicos ácido clorogênico e ácido cafeico, são os componentes majoritários da planta *Ilex paraguariensis*, responsáveis pelo efeito antiherpético. Com base nesta informação e visando facilitar a quantificação, foram escolhidos os compostos fenólicos como marcadores químicos, sendo utilizada a técnica espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu para a sua quantificação.

A técnica escolhida para a extração das folhas de *I. paraguariensis* foi a turbo-extração, baseada na redução do tamanho de partícula concomitantemente com a sua extração. Seu mecanismo é baseado na aplicação de elevadas forças de cisalhamento que geram o rompimento das células da matéria-prima vegetal favorecendo assim a rápida dissolução dos

componentes químicos. Esta técnica foi escolhida por proporcionar o quase esgotamento da MPV, além da diminuição do tempo de extração (Sonaglio et al., 2010).

As condições de extração utilizadas foram anteriormente padronizadas de Santos e colaboradores (2011) por meio de delineamento experimental. A concentração de MPV, líquido extrator, velocidade e tempo de extração estão descritos no item 5.2.2.3.

Para avaliar esta etapa, os parâmetros de resíduo seco e teor de compostos fenólicos foram realizados. Os resultados encontrados nestes estudos estão expressos na tabela 2.

Tabela 2 - Resultados da caracterização das soluções extrativas obtidas por turbo-extração de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.

Concentração de MPV (% m/m)	Concentração hidroalcoólica (V/V)	Resíduo seco (% m/m)	Concentração de compostos fenólicos ($\mu\text{g/mL}$)
10	20	3,32	192,59

O resíduo seco traduz quantitativamente o total de substâncias extraídas em condições específicas de método, tempo e solvente. Os teores de compostos fenólicos encontrados foram inferiores aos estudos anteriores, o que pode ser decorrente de diferenças na matéria prima utilizada.

A seguir, optou-se por dar continuidade ao estudo com extratos secos obtidos por liofilização. Extratos secos apresentam inúmeras vantagens, entre elas: (i) maior estabilidade e facilidade no processo de padronização dos princípios ativos presentes na matéria-prima em questão; (ii) maior concentração destes ativos; (iii) menor espaço para armazenamento, quando comparada à extratos fluidos (Kashaninejad et al., 2020).

A liofilização é uma técnica de secagem baseada na sublimação da água presente na amostra até valores residuais. Neste método a amostra previamente congelada é submetida a um aumento gradativo da temperatura associada a vácuo no interior de um liofilizador, fazendo que a água passe lentamente do estado sólido para gasoso em condições mais brandas de secagem se comparado a operações que utilizam calor, causando menos alterações no produto.

6.3 ESTUDO DE CITOTOXICIDADE

A utilização de plantas medicinais como fontes de medicamentos requer a realização prévia de ensaios farmacológicos que avaliem o potencial terapêutico das mesmas para a atividade pretendida. Neste trabalho a atividade antiherpética da *Ilex paraguariensis* foi avaliada, pelos ensaios de eficácia antiviral e toxicidade celular (citotoxicidade), descritos nos itens 5.2.4 e 5.2.5.

Para determinar a atividade antiviral de um composto, é necessário assegurar que o mesmo não esteja em concentração tóxica para a célula hospedeira. Assim, alíquotas do extrato seco liofilizado (ESL) foram diluídas nos tampões MEM e PBS, gerando as amostras ESL-MEM e ESL-PBS, que foram avaliadas em concentrações decrescentes de 2500 a 2,44 µg/mL e apresentaram valores de CC_{50} 518,1 e 402,4, respectivamente. Neste estudo, pode-se confirmar que as amostras, nas condições avaliadas, não apresentaram efeitos citotóxicos na linhagem testada, independente em que foram diluídas.

Foi constatado que a alíquota ESL-MEM obteve maior estabilidade celular quando comparada a alíquota ESL-PBS, devido a maior integridade do tapete celular e os valores de CC_{50} obtidos. Isso ocorre devido à diferente composição dos meios utilizados.

6.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL PELO ENSAIO DE INIBIÇÃO DAS PLACAS DE LISE

O ensaio de inibição das placas de lise baseia-se na capacidade de partículas virais causarem um efeito citopático em uma monocamada celular normal resultando numa área macroscópica visível. Este efeito citopático é resultado da infecção celular inicial, ou seja, as partículas virais ao serem liberadas de células infectadas vão infectar as células adjacentes. Após um determinado tempo, dependente do vírus e do número de unidades formadoras de placas (UFP) inoculadas, a região onde ocorreu a infecção viral forma a chamada placa de lise, e o corante na técnica permite a visualização e contagem destas placas (Condit, 2007). Este ensaio é considerado padrão ouro para medida quantitativa de infecções virais (Hudson; Towers, 1999 apud Silva, 2009).

O extrato seco apresentou um elevado índice de seletividade (IS), calculado com base na relação CC_{50}/CI_{50} , tanto para cepas HSV-1 sensíveis à aciclovir (KOS) quanto resistentes

(29R), principalmente quando a amostra foi diluída no meio MEM, indicando uma atividade anti-herpética promissora, como mostrado na tabela 3. Estes resultados corroboram aqueles obtidos por Lückemeyer e colaboradores, 2012), que relataram uma atividade anti HSV-1 para extratos de folhas de *Ilex paraguariensis*.

Tabela 3 - Resultados da atividade anti-herpética do extrato seco liofilizado de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil através do método de inibição da formação de placa de lise.

Cepa	Meio de diluição	CI ₅₀	IS
KOS	MEM	135,10	4,86
	PBS	284,20	1,83
29R	MEM	92,90	5,58
	PBS	160,20	2,51

CI₅₀: concentração média inibitória de atividade antiviral; IS: índice de seletividade.

Importante salientar que o extrato seco nebulizado apresentou um índice de seletividade de 4,86 e 5,58 para as cepas KOS e 29R, respectivamente, quando diluído em MEM. Este índice pode ser considerado promissor, principalmente pelo melhor resultado observado para a cepa resistente, de mais difícil tratamento. Assim, abre-se uma perspectiva de continuidade deste trabalho no sentido de explorar o extrato seco de erva mate, *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., como base para o desenvolvimento de medicamento para o tratamento tópico de HSV-1.

7 CONCLUSÃO

Na parte experimental deste trabalho, a erva mate foi utilizada como planta modelo para a realização dos estudos que constituem as fases iniciais do desenvolvimento tecnológico de um medicamento fitoterápico a partir de uma planta medicinal. Neste sentido, uma amostra comercial de erva-mate, previamente sapecada e triturada, foi caracterizada quanto ao teor de umidade e teor de extrativos, parâmetros fundamentais para um desenvolvimento tecnológico deste tipo. A matéria prima vegetal analisada apresentou concentração de umidade de 9,65 %, abaixo do máximo preconizado pela Farmacopeia Brasileira (1988), que é de 14 %. O teor de extrativos foi de 38,28%, sendo convergente com o obtido por Santos (2016), que foi de aproximadamente 40 % (m/m).

As soluções extrativas preparadas por turboextração apresentaram um resíduo seco de 3,32 % (m/m) e uma concentração de compostos fenólicos igual a 192,59 ($\mu\text{g/mL}$), expressos em ácido gálico. Estes valores indicam uma baixa concentração de resíduo seco e compostos fenólicos, quando comparados a estudos anteriores. No entanto, a secagem do extrato por liofilização permitiu uma adequação destes parâmetros, ajustando a diluição do extrato seco para os ensaios subsequentes.

O ensaio de citotoxicidade demonstrou que o extrato seco solubilizado nos meios MEM e PBS, não fossem citotóxicos à linhagem Vero utilizada, apresentando valores de CC50 de 518,1 e 402,4, respectivamente.

No estudo de atividade antiviral, o extrato seco nebulizado apresentou um índice de seletividade de 4,86 e 5,58 para as cepas KOS e 29R, respectivamente, quando diluído em MEM. Este índice pode ser considerado promissor, principalmente considerando o maior valor de IS para a cepa resistente, abrindo uma perspectiva de continuidade deste trabalho no sentido de explorar o extrato seco de erva mate, *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., como base para o desenvolvimento de um medicamento para o tratamento tópico de HSV-1.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SHURA, A. Traditional Chinese medicine. **Medical Empathy, Pharmacological Systems, and Treatment Strategies in Integrative Cardiovascular Chinese Medicine**, Elsevier, vol. 2, p. (47–68), outubro, 2020.

ANDRADE, Fabiana M. Diagnóstico da Cadeia Produtiva da Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). 92 p. Consultoria, São Mateus do Sul, PR.

ANESINI, Claudia *et al.* Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **Lwt - Food Science And Technology**, [S.L.], v. 45, n. 2, p. 299-304, mar. 2012. Elsevier BV.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*, volume 1. 6ª Ed. Brasília, 2019.

APOTHEKERVERBÄNDE, B. Deutscher Arzneimittel-Codex. 1986.

ARÇARI, Demétrius Paiva *et al.* The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 141, n. 2, p. 809-815, nov. 2013. Elsevier BV.

BASTOS, Deborah Helena Markowicz; TORRES, Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva. Bebidas à base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. **Nutrire: Soc. Bras. Alim. São Paulo**, v. 26, p. 77-89, dez. 2003.

BERKAI, Dorival. **500 Anos de História da Erva-Mate**. Porto Alegre: Editora Cone Sul, 2000.

BIGLEY, Nancy J.. Complexity of Interferon- γ Interactions with HSV-1. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 5, n. 15, p. 1-9, fev. 2014. Frontiers Media SA.

BOFF, Laurita. **Triagem anti-herpética de plantas medicinais & avaliação do mecanismo da ação de Strychnos pseudoquina A. St. Hil., Loganiaceae**. 2016. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

BORELLA, Júlio César; CARVALHO, Dianne Maciely Arantes de. Avaliação comparativa da qualidade de extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) comercializados em farmácias de manipulação em Ribeirão Preto – SP. **Revista Brasileira de Farmácia**, Ribeirão Preto, v. 1, n. 92, p. 11-16, mar. 2011.

BRACESCO, N. *et al.* Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 136, n. 3, p. 378-384, jul. 2011. Elsevier BV

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. 2006. Disponível em:

https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf. Acesso em: 22 set. 2020.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **NORMAS E MANUAIS TÉCNICOS**, nº 31. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. Série A. Brasília: Cadernos de Atenção Básica, 2012. 156 p.

BRAZACA, Solange. **Determinação de lipídeos**: aula prática nº 5. São Paulo: ESALQ, 2016. 5 p.

BRUGUÉS, Joan Mora. Las espirales del conocimiento. La medicina científica occidental, la medicina homeopática y la medicina tradicional china. **Revista Médica de Homeopatía**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 71-78, set. 2017. Elsevier BV.

CARDOSO, Caroly Mendonça Zanella. **Manual de controle de qualidade de matérias-primas vegetais para farmácia magistral**. São Paulo: Pharmabooks, 2009. 148 p.

CHAVES, Douglas Siqueira de Almeida. **Extração de matérias primas vegetais**. Farmacognosia Aula II. UNIFESO. Teresópolis, RJ. 2010.

CLARK, Noel A.. Surface memory effects in liquid crystals: influence of surface composition. **Physical Review Letters**, [S.L.], v. 55, n. 3, p. 292-295, 15 jul. 1985. American Physical Society (APS).

COLE, Shannon. Herpes Simplex Virus. **Nursing Clinics Of North America**, [S.L.], v. 55, n. 3, p. 337-345, set. 2020. Elsevier BV.

CONDIT, Richard C. **Principles of virology**. In: KNIFE, D.M.; Howley, P. M.; Griffin, D.; Lamb, R.; Martin, M.; Roizman, B.; Straus, S. E. (Eds.). *Fields Virology*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wikins. p. 25-57.

CONSOLARO, Alberto; CONSOLARO, Maria Fernanda M-O.. Diagnóstico e tratamento do herpes simples recorrente peribucal e intrabucal na prática ortodôntica. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 16-24, jun. 2009. FapUNIFESP (SciELO).

DONALISIO, Manuela et al. In vitro anti-Herpes simplex virus activity of crude extract of the roots of *Nauclea latifolia* Smith (Rubiaceae). **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-8, 16 out. 2013. Springer Science and Business Media LLC.

EFING, Luiza Cortéz et al. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 153-159, 31 dez. 2009. Universidade Federal do Paraná.

FARIAS, Maren Rocha. **Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais**. In: UFSC, E. U. E. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 6º ed. Porto Alegre/ Florianópolis. cap. 12. 2010

FOUÉRÉ, Sébastien et al. First HSV-1 non primary genital herpes in two patients. **Journal of Clinical Virology**, [S.L.], v. 78, p. 108-110, maio 2016. Elsevier BV.

GASTALDI, Emanuely et al. **Extração de lipídios em alimentos**. 2010. Universidade de Vila Velha.

GIANNENAS, Ilias; CHRISTAKI, Efterpi; GIANNENAS, Ilias (ed.). The history of herbs, medicinal and aromatic plants, and their extracts. In: FLOROU-PANERI, Panagiota; CHRISTAKI, Efterpi; GIANNENAS, Ilias (ed.). **Feed Additives**. Cambridge: Academic Press, 2020. p. 1-18.

HABTEMARIAM, Solomon. The chemical and pharmacological basis of yerba maté (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) as potential therapy for type 2 diabetes and metabolic syndrome. **Medicinal Foods As Potential Therapies For Type-2 Diabetes And Associated Diseases**, [S.L.], p. 943-983, 2019.

DA, Hao; GU, Xiao Jie; XIAO, Pei Gen. Medicinal Plants: chemistry, biology and omics. In: DA, Hao et al. **Phytochemistry and biology of *Ilex* pharmaceutical resources**. Sawston: Woodhead Publishing, 2015. p. 531-585.

HARVEY, Richard A. et al. Enveloped DNA Viruses. In: CORNELISSEN, Cynthia Nau et al. **Lippincott's Illustrated Reviews: microbiology**. 3. ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. Cap. 25. p. 255-272.

HEINRICHS, Reges; MALAVOLTA, Eurípedes. Composição mineral do produto comercial da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Ciência Rural**, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 781-785, out. 2001. FapUNIFESP (SciELO).

HUDSON, J.; TOWERS, G. H. N. **Phytomedicines as antivirals**. Drugs of the Future, v. 24, p. 295 - 320, 1999. In: SILVA, Izabella Thaís da. Triagem anti-herpética de alguns táxons da biodiversidade brasileira: Fracionamento biomonitorado de *Cecropia glaziovii* Sneth., *Urticaceae* (embaúba). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009.

KASHANINEJAD, Mansoore et al. Freeze dried extract from olive leaves: valorisation, extraction kinetics and extract characterization. **Food And Bioproducts Processing**, [S.L.], v. 124, n. 11, p. 196-207, nov. 2020. Elsevier BV.

KUMAR, Sreeja P. et al. Pathogenesis and life cycle of herpes simplex virus infection-stages of primary, latency and recurrence. **Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery, Medicine, And Pathology**, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 350-353, jul. 2016. Elsevier BV.

LÜCKEMEYER, Débora D. et al. Effects of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Yerba Mate) on Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 Replication. **Phytotherapy Research**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 535-540, 14 set. 2011.

MATSUBARA, Simara; RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S.L.], v. 26, n. 2, p. 401-407, jun. 2006. FapUNIFESP (SciELO).

MEDINA, Marjorie B. Simple and Rapid Method for the Analysis of Phenolic Compounds in Beverages and Grains. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 59, n. 5, p. 1565-1571, 9 mar. 2011. American Chemical Society (ACS).

MELECCHI, Maria Ines Soares. **Caracterização química de extratos de Hibiscus tiliaceus: estudo comparativo de métodos de extração**. 2005. 218 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MIGLIATO, Ketylin Fernanda. **Syzygium cumini (L) Skeels-jambolão: estudo farmacognóstico, otimização do processo extrativo, determinação da atividade antimicrobiana do extrato e avaliação da atividade anti-séptica de um sabonete líquido contendo o referido extrato**. 2005. 179 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2005.

MIGUEL, Antonio H.; ANDRADE, Jailson B. de. Rapid Quantitation of Ten Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Atmospheric Aerosols by Direct Hplc Separation After Ultrasonic Acetonitrile Extraction. **International Journal Of Environmental Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 35-41, jan. 1989. Informa UK Limited.

MORAIS, Elayne C. de et al. Consumption of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Improves Serum Lipid Parameters in Healthy Dyslipidemic Subjects and Provides an Additional LDL-Cholesterol Reduction in Individuals on Statin Therapy. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 57, n. 18, p. 8316-8324, 23 set. 2009. American Chemical Society (ACS).

OH, Jungmin et al. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. **Food Control**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 403-409, jun. 2013. Elsevier BV.

PAGLIOSA, Cristiane Manfê. **Caracterização química do resíduo de ervais e folhas “in natura” de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**. 2009. 146 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Ciência e Tecnologia em Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

PEREIRA, D.F. et al. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 19, n. 10, p. 868-877, jul. 2012. Elsevier BV.

PIRES, Janaína S. et al. **Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas**. In: INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS. Artigo. São Paulo. 2017. p. 1-5.

PREDIGER, Rui D.s. et al. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 120, n. 3, p. 465-473, dez. 2008. Elsevier BV.

PUANGPRAPHANT, Sirima; BERHOW, Mark A.; MEJIA, Elvira Gonzalez de. Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) saponins induce caspase-3-dependent apoptosis in human colon cancer cells in vitro. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 125, n. 4, p. 1171-1178, abr. 2011. Elsevier BV.

PUANGPRAPHANT, Sirima; MEJIA, Elvira Gonzalez de. Saponins in Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and Quercetin Synergistically Inhibit iNOS and COX-2 in Lipopolysaccharide-Induced Macrophages through NFκB Pathways. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 57, n. 19, p. 8873-8883, 14 out. 2009. American Chemical Society (ACS).

RAVEN, P. H.; CURTIS, H. **Biologia vegetal**. Barcelona: Omega, 1975. 716 p.

ROMANA-SOUZA, Bruna; PIRES, Taiza Castro; MONTE-ALTO-COSTA, Andréa. Mate tea-mediated reduction in catecholamine synthesis improves cutaneous wound healing of chronically stressed mice. **Food Research International**, [S.L.], v. 71, p. 32-40, maio 2015. Elsevier BV.

SALDAÑA, Marleny D. A. et al. Extraction of Methylxanthines from Guaraná Seeds, Maté Leaves, and Cocoa Beans Using Supercritical Carbon Dioxide and Ethanol. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 50, n. 17, p. 4820-4826, ago. 2002. American Chemical Society (ACS).

SÁNCHEZ, Edna Carolina Mayorga; RIBEIRO, Nilsa Brito. **Encontros de práticas de saúde e epistemologias, entre a medicina ocidental e o pensamento ameríndio**. In: ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 3., 2018. Artigo. Pará: Propit-Unifesspa, 2018. p. 1-6.

SANTOS, Manuely Pereira de Moraes et al. Herpesvírus humano: tipos, manifestações orais e tratamento. **Odontologia Clínico-Científica**, Recife, v. 11, n. 3, p. 191-196, jun. 2011.

SANTOS, R. I. dos. **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários**. p. 403-434. 2004. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2º ed. Editora Universidade/UFRGS/Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis.

SANZ, M. D. T.; ISASA, M. E. T. Elementos minerales en la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. H.). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.61, n. 3, p. 441-454. 1991.

SCHUBERT, Alexandre et al. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil. (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, [S.L.], v. 29, n. 6, p. 1233-1236, dez. 2006. FapUNIFESP (SciELO).

SILVA, Raquel D'Agostini et al. The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male Wistar rats. **Fitoterapia**, [S.L.], v. 82, n. 6, p. 818-826, set. 2011. Elsevier BV.

SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. **Porto Alegre**: UFRGS, 2010.

SLEZÁK, Radovan et al. Infections of the oral mucosa caused by herpes simplex virus. **Klin Mikrobiol Infekc Lek**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 131-137, ago. 2009.

SNOECK, R. Antiviral therapy of herpes simplex. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 157-159, out. 2000. Elsevier BV.

SONAGLIO, Diva et al. **Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/ UFRGS; 2010.

SOUZA, Aloisio H.P. et al. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: an in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. **Food Research International**, [S.L.], v. 78, p. 286-294, dez. 2015. Elsevier BV.

SUERTEGARAY, Carlos Eduardo de Oliveira. **Dinâmica da cultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) em sistemas agroflorestais e monocultivos**. 2002. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

TAGLIARI, N. A. B.; KELMANN, R. G.; DIFENTHALER, H. Aspectos terapêuticos das infecções causadas pelo vírus herpes simples tipo 1. **Perspectiva**, Erechim, v. 36, n. 133, p. 191-201, mar. 2012.

TRINDADE, Ana Karine Farias da et al. Herpes Simples Labial: um desafio terapêutico. **Comunicação e Ciências da Saúde**, Paraíba, v. 18, n. 4, p. 307-314, dez. 2007.

VALDUGA, Eunice et al. Caracterização química da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate) e de outras espécies utilizadas na adulteração do mate. **B.Ceppa**, Curitiba, v. 15, n. 1, p. 1-12, jun. 1997.

VALERGA, Julia; SHORTHOSE, Robin; LANARI, Maria C.. Antioxidant activity of yerba mate extracts: interactions between the individual polyphenols. **European Journal Of Lipid Science And Technology**, [S.L.], v. 115, n. 5, p. 513-525, 1 fev. 2013. Wiley.

WHITLEY, Richard J; ROIZMAN, Bernard. Herpes simplex virus infections. **The Lancet**, [S.L.], v. 357, n. 9267, p. 1513-1518, maio 2001. Elsevier BV.

WHO. **Legal status of traditional medicine and complementary/alternative medicine: a worldwide review**. 2. ed. [S.L.]: TRM, 2001. 189 p.

YAN, Chang et al. Disturbed Yin–Yang balance: stress increases the susceptibility to primary and recurrent infections of herpes simplex virus type 1. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 383-398, mar. 2020. Elsevier BV.