

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

**Centro de Ciências da Saúde**

**Programa de Pós-Graduação em Farmácia**

**IZABELLA THÁIS DA SILVA**

**TRIAGEM ANTI-HERPÉTICA DE ALGUNS TÁXONS DA  
BIODIVERSIDADE BRASILEIRA: Fracionamento biomonitorado de  
*Cecropia glaziovii* Sneth., Urticaceae (embaúba)**

**FLORIANÓPOLIS**

**2009**

**IZABELLA THAÍS DA SILVA**

**TRIAGEM ANTI-HERPÉTICA DE ALGUNS TÁXONS DA  
BIODIVERSIDADE BRASILEIRA: Fracionamento biomonitorado de  
*Cecropia glaziovii* Sneth., Urticaceae (embaúba)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmácia. Área de concentração: Fármaco e Medicamentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Maria Oliveira Simões

**FLORIANÓPOLIS**

**2009**

Silva, Izabella Thaís da

TRIAGEM ANTI-HERPÉTICA DE ALGUNS TÁXONS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA: Fracionamento biomonitorado de *Cecropia glaziovii* Sneth., Urticaceae (embaúba) / Izabella Thaís da Silva. Florianópolis, 2009. 133 p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2009.

1. atividade antiviral; 2. Herpes Simplex Vírus tipo 1 e 2; 3. mecanismo de ação; 4. *Cecropia glaziovii*; 5. C-glicosilflavonoides; 6. fracionamento biomonitorado

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Aplicada, coordenado pelas Professoras Dr<sup>a</sup>. Cláudia Maria Oliveira Simões (Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS) e Dr<sup>a</sup>. Célia Regina Monte Barardi (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, CCB), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.

Este trabalho recebeu apoio financeiro do CNPq (Edital Universal 2007-2009), e da CAPES através da concessão da bolsa de Mestrado por 24 meses.


**TRIAGEM ANTI-HERPÉTICA DE ALGUNS TÁXONS DA  
BIODIVERSIDADE BRASILEIRA: Fracionamento biomonitorado  
de *Cecropia glaziovii* Sneth., Urticaceae (embaúba)**

**POR**

**IZABELLA THAÍS DA SILVA**


Dissertação julgada e aprovada em sua forma final,  
pela Orientadora e membros da Comissão Examinadora.

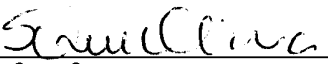
**Orientadora:**

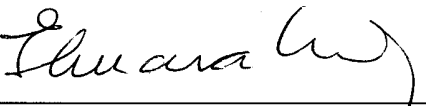
  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Cláudia Maria Oliveira Simões

**Comissão Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alexandre de Barros Falcão Ferraz  
(Universidade Luterana do Brasil/ RS)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ângela Machado de Campos  
(CIF/CCS/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Simone Quintana de Oliveira  
(CIF/CCS/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Elenara Lemos Senna  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Aos meus pais João Carlos e Silvana,  
ao meu irmão Arthur e ao Bruno pelo apoio e amor,  
e à professora Cláudia, pelo imenso aprendizado.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por minha vida, por estar sempre comigo e permitir que eu tenha forças para completar mais uma etapa importante em minha vida.

Aos meus pais João Carlos e Silvana e ao meu irmão Arthur, por todo o esforço que fizeram para eu concluir o curso de farmácia e o mestrado, pela presença constante em minha vida e pensamento, pelo amor incondicional, por me ensinarem a lutar e a buscar, por sempre me acolherem e estarem comigo. Amo muito vocês!

Ao Bruno, por seu amor, companheirismo, apoio, compreensão da minha ausência, enfim, por tudo que você é e simplesmente por estar ao meu lado. Te amo.

À professora Cláudia Maria Oliveira Simões, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela confiança em aceitar me orientar sem me conhecer e pelo aprendizado, que foi de grande importância não somente para a conclusão do mestrado, mas para toda a minha vida profissional. Muito Obrigada!

À professora Célia Regina Monte Barardi, pelo carinho, pelas sugestões, apoio e amizade em todos os momentos.

Ao professor Flávio Henrique Reginatto e ao mestrando Geison Modesti Costa pela amizade e companheirismo, pelo fornecimento dos extratos de *Cecropia glaziovii* e análises químicas realizadas com os mesmos, permitindo a realização deste trabalho.

Ao professor Eloir Paulo Schenkel e seus alunos por gentilmente cederem algumas das amostras testadas e auxiliarem na elaboração deste trabalho.

Ao professor Alexandre Ferraz por gentilmente ceder algumas das amostras testadas e auxiliar na elaboração deste trabalho.

Ao professor Edmundo Grisard pelo apoio e ensinamentos, e, por permitir a realização dos experimentos moleculares no laboratório de Protozoologia.

À professora Cecília Menks por disponibilizar o microscópio utilizado no ensaio de redução do tamanho das placas de lise.

Aos meus amigos e eternos professores Niero e Clóvis, pelos ensinamentos desde o tempo da graduação.

Às minhas queridas amigas Carol, Gabi, Nandinha e Grazi, que mesmo de longe me apoiaram.

À Débora e ao Thiago, meus amigos e parceiros de trabalho árduo, por sempre me acompanharem, pelos ensinamentos, pelas palavras de incentivo, por todos os finais de semana que passamos no laboratório, pizzas, enfim, por fazerem parte da minha vida e tornarem especiais os momentos de convívio. Adoro vocês! E ao Marcelo, pela disposição em nos acompanhar a qualquer momento do dia!

Aos amigos do Laboratório de Virologia Aplicada, Carol, Vanessinha, Jéssica, Marina, Francielly, Adriana, Jadel, Francielle, Aline, Ariadne, Cristian, pelo companheirismo, pelos momentos de alegria e amizade. E à Carla que, mesmo de longe, me auxiliou na realização de alguns experimentos.

À Pati e à Caca, por terem me ensinado e ajudado a realizar os ensaios moleculares.

À Cláudia Figueredo por ter me acolhido em sua casa e pelo apoio durante todo o período do mestrado.

À Lu e Aninha, duas pessoas especiais com as quais pude contar e dividir meus dias nesta cidade.

Aos membros da Banca por avaliarem e melhorarem a qualidade deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia e à CAPES pela bolsa.

Aos professores, colegas e amigos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização desta dissertação.



## RESUMO

Os vírus herpéticos tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2) são patógenos humanos pertencentes à família Herpesviridae, que estabelecem uma infecção latente nos neurônios que inervam a área da infecção primária e podem reativar causando infecções recorrentes localizadas. Contudo, sua resistência ao tratamento mais comumente disponível (aciclovir) faz das infecções herpéticas um grave problema de saúde mundial. Os produtos naturais são uma fonte inesgotável de compostos com promissoras atividades farmacológicas, incluindo atividade antiviral. A triagem anti-herpética de extratos de plantas tem fornecido resultados promissores, que justificam pesquisas nesta área. Neste trabalho, foi realizada uma triagem com onze extratos, e um fracionamento biomonitorado com aquele que apresentou resultados mais promissores. Desta forma, o extrato bruto aquoso obtido por infusão das folhas de *Cecropia glaziovii* Sneth e suas frações acetato de etila, n-butanol e o resíduo aquoso foram testados frente ao HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333) pelo ensaio de inibição da formação de placas de lise. A fração *n*-butanólica foi submetida a um processo de extração metanólica em resina Amberlite® XAD-16, fornecendo a fração rica em C-glicosilflavonoides (MeOH<sub>AMB</sub>) particionada em três subfrações (AMB<sub>1</sub>, AMB<sub>2</sub> e AMB<sub>3</sub>) também submetidas à avaliação da ação anti-herpética. As amostras não mostraram toxicidade nas concentrações máximas testadas em células VERO e GMK AH1 pelos ensaios do MTT e SRB. A subfração AMB<sub>2</sub> inibiu significativamente a replicação de ambos os vírus testados com valores de índice de seletividade (IS = CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>) >131,4 para o HSV-1 e >66,7 para o HSV-2. A fim de determinar o mecanismo da ação anti-herpética desta subfração, outras avaliações foram realizadas: ação virucida, influência na adsorção e penetração dos vírus nas células, propagação intercelular viral, e interferência sobre a síntese de proteínas virais, além da determinação dos teores de compostos fenólicos e flavonoides totais. O mecanismo da atividade anti-herpética da subfração AMB<sub>2</sub> parece ser mediado, ao menos em parte, pela redução da infecciosidade viral (apenas HSV-2), inibição da adsorção e penetração viral nas células, inibição da propagação viral intercelular, diminuição dos níveis da proteína  $\alpha$  ICP27 e das proteínas do envelope gD e gE do HSV-1. Tal atividade pode ser relacionada aos elevados teores de flavonoides do tipo C-glicosídeos (isoorientina e isovitexina).

**Palavras chaves:** atividade antiviral; Herpes Simplex Virus tipos 1 e 2; mecanismo de ação; *Cecropia glaziovii*; C-glicosilflavonoides; fracionamento biomonitorado.

## ABSTRACT

### **Anti-herpes screening of some taxons of Brazilian biodiversity: bioguided chromatographic fractionation of *Cecropia glaziovii* Sneth., Urticaceae (embaúba).**

Herpes Simplex Virus types 1 (HSV-1) and 2 (HSV-2) are human pathogens that establish a latent infection in the neurons, which innervate the areas of primary infection, and can reactivate causing recurrent located infections. However, their resistance to the most common available treatment (acyclovir) makes herpetic infections a serious worldwide health problem. Natural products are an inexhaustible source of compounds with promising pharmacological activities, including antiviral activity, which justifies researches in this area. In this work, an anti-herpes screening of eleven natural products extracts, and a bioguided chromatographic fractionation of one plant extract which presented the most promising results were carried out. For this way, the crude extract obtained by aqueous infusion from the leaves of *Cecropia glaziovii* Sneth, their ethyl acetate and *n*-butanol fractions and the aqueous residue were tested against the HSV-1 (KOS strain) and HSV-2 (333 strain) replication by a plaque reduction assay. The *n*-butanol fraction was stirred with Amberlite®XAD-16 furnishing the methanolic fraction enriched in C-glycosilflavonoids (MeOH<sub>AMB</sub>), which was chromatographically separated in three subfractions (AMB<sub>1</sub>, AMB<sub>2</sub> and AMB<sub>3</sub>), and an aqueous residue (AR<sub>AMB</sub>); all these samples were also submitted to the anti-herpes evaluation. All tested samples showed no cytotoxic effects at the maximum tested concentrations on VERO and GMK AH1 cells by MTT and SRB assays. The AMB<sub>2</sub> subfraction significantly inhibited the replication of both viruses showing SI values >131 for HSV-1 and >67 for HSV-2. In order to determine its possible mechanism of anti-herpes action several experiments were performed: the virucidal activity, the influence on the attachment and entry of viruses into cells, the inhibition of cell-to-cell spread, and the interference with viral proteins synthesis through a Western blotting assay. To correlate the antiviral activity of all tested samples to their content of phenolic compounds and flavonoids classical spectrophotometric assays were performed. The mechanism of anti-herpes activity of AMB<sub>2</sub> subfraction seems to be mediated, at least in part, by the reduction of viral infectivity (only against HSV-2), the inhibition of viruses attachment and entry into cells, the inhibition of cell-to-cell viruses diffusion, and to the impaired levels of  $\alpha$  protein ICP27 and envelope proteins gD and gE of HSV-1. The detected anti-herpes activity seems to be linked to the high content of C-glycosilflavonoids (specially isoorientin and isovitexin) of this subfraction.

**Keywords:** antiviral activity; Herpes Simplex Virus types 1 and 2; mechanism of action; *Cecropia glaziovii*; C-glycosilflavonoids; bioguided fractionation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mecanismo de latência dos HSV.	30
<b>Figura 2:</b> Estrutura do vírion dos HSV.	32
<b>Figura 3:</b> Receptores da superfície celular e ligantes virais que participam da entrada e fusão do HSV.	34
<b>Figura 4:</b> Ciclo de multiplicação dos vírus herpéticos (HSV).	37
<b>Figura 5:</b> Flavonoides C-heterosídeos presentes nas folhas de <i>Cecropia glaziovii</i> (glu = glicose).	45
<b>Figura 6:</b> Esquema do fracionamento do Extrato Bruto Aquoso (EBAI) de <i>Cecropia glaziovii</i> .	50
<b>Figura 7:</b> Esquema do fracionamento biomonitorado de <i>Cecropia glaziovii</i> e os valores de IS obtidos frente ao HSV-1 (cepa KOS) (em vermelho) e frente ao HSV-2 (cepa 333) (em azul).	78
<b>Figura 8:</b> Resultados da avaliação da atividade virucida [HSV-1 (A) e HSV-2 (B)] do extrato bruto aquoso e frações de <i>Cecropia glaziovii</i> através da técnica de redução das placas de lise, expressos em valores de CV <sub>50</sub> (µg/mL).	81
<b>Figura 9:</b> Resultados da avaliação da ação virucida a 4 e 37°C frente ao HSV-1 (cepa KOS).	82
<b>Figura 10:</b> Resultados da avaliação da ação virucida a 4 e 37°C frente ao HSV-2 (cepa 333).	83
<b>Figura 11:</b> Resultados da avaliação do efeito das frações de <i>Cecropia glaziovii</i> no ensaio de adsorção tradicional, em relação ao HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333), expressos em valores de CI <sub>50</sub> (µg/mL).	88
<b>Figura 12:</b> Resultados da avaliação do efeito da subfração AMB <sub>2</sub> (0,02 a 10 µg/mL) no ensaio de adsorção tradicional frente aos vírus HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333).	89

<b>Figura 13:</b> Resultados da avaliação do efeito da subfração AMB <sub>2</sub> (0,39 a 50 µg/mL) no ensaio de pós-adsorção frente aos vírus HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333).	90
<b>Figura 14:</b> Resultados da avaliação do efeito da subfração AMB <sub>2</sub> (0,19 a 100 µg/mL) no ensaio de penetração frente aos vírus HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333).	92
<b>Figura 15:</b> Resultados da inibição da propagação intercelular do vírus HSV-1 (cepa KOS).	94
<b>Figura 16:</b> Resultados da inibição da propagação intercelular do vírus HSV-2 (cepa 333).	95
<b>Figura 17:</b> Efeito do tempo de adição da subfração AMB <sub>2</sub> (40 e 60 µg/mL) e do aciclovir (1 µg/mL) no ciclo de replicação do HSV-1 (cepa KOS) em células VERO.	96
<b>Figura 18:</b> Efeito do tempo de adição da subfração AMB <sub>2</sub> (40 e 60 µg/mL) e do aciclovir (1 µg/mL) no ciclo de replicação do HSV-2 (cepa 333) em células GMK AH1.	97
<b>Figura 19:</b> Efeito da subfração AMB <sub>2</sub> sobre a expressão das proteínas ICP27, gD e gE do HSV-1 (cepa KOS) em células VERO e da proteína constitutiva β-actina, detectado por <i>Western Blotting</i> .	100
<b>Figura 20:</b> Curva de calibração do ácido gálico.	102
<b>Figura 21:</b> Teor de compostos fenólicos totais presentes no extrato bruto e frações purificadas de <i>Cecropia glaziovii</i> .	102
<b>Figura 22:</b> Curva de calibração da rutina.	103
<b>Figura 23:</b> Teor de flavonoides totais presentes no extrato bruto e frações purificadas de <i>Cecropia glaziovii</i> .	104
<b>Figura 24:</b> Proposta do mecanismo da ação anti-HSV-1 e anti-HSV-2 da subfração AMB <sub>2</sub> .	105

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Propriedades biológicas gerais das subfamílias $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ - <i>Herpesvirinae</i> .	26
<b>Quadro 2:</b> Classificação geral dos herpesvírus.	27
<b>Quadro 3:</b> Informações sobre os táxons da biodiversidade brasileira avaliados na triagem anti-herpética realizada.	41
<b>Quadro 4:</b> Atividades farmacológicas/biológicas de outras espécies do gênero <i>Cecropia</i> .	44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados.	69
<b>Tabela 2:</b> Resultados da triagem da potencial atividade anti-herpética dos extratos, através do método de inibição da formação das placas de lise.	71
<b>Tabela 3:</b> Resultados da citotoxicidade e da potencial atividade anti-herpética dos materiais-teste, através do método de inibição da formação das placas de lise.	72
<b>Tabela 4:</b> Resultados da citotoxicidade e da atividade antiviral do extrato e frações de <i>Cecropia glaziovii</i> .	77
<b>Tabela 5:</b> Resultados da inativação do HSV-2, na presença de soluções protéicas e da subfração AMB <sub>2</sub> .	84
<b>Tabela 6:</b> Resultados obtidos por diferentes estratégias metodológicas do ensaio de adsorção viral, expressos como valores de CI <sub>50</sub> das amostras testadas.	87
<b>Tabela 7:</b> Resultados obtidos no ensaio de penetração viral, expressos como valores de CI <sub>50</sub> das amostras testadas.	91

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%: porcentual  
>: maior  
 $\mu\text{L}$ : microlitro (s)  
 $\mu\text{g}$ : micrograma (s)  
 $^{\circ}\text{C}$ : graus Celsius  
 $\alpha$ : alfa  
 $\beta$ : beta  
 $\gamma$ : gama  
AcOEt: acetato de etila  
AMB<sub>1</sub>: subfração 1 de *Cecropia glaziovii* rica em C-glicosilflavonoides  
AMB<sub>2</sub>: subfração 2 de *C. glaziovii* rica em C-glicosilflavonoides  
AMB<sub>3</sub>: subfração 3 de *C. glaziovii* rica em C-glicosilflavonoides  
ATCC: *American Type Culture Collection*  
BCC: blocos completos casualizados  
BSA: *Bovine Serum Albumin*, albumina sérica bovina  
CC<sub>50</sub>: concentração que reduz em 50% a viabilidade celular  
CI<sub>50</sub>: concentração que inibi 50% da infecção viral  
Cm<sup>2</sup>: centímetros quadrados  
CMC: carboximetilcelulose  
CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono  
CV: controle viral  
CV<sub>50</sub>: concentração virucida para 50% dos vírions  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DNA: ácido desoxirribonucléico  
DO: densidade óptica  
EBAI: extrato bruto aquoso obtido por infusão  
g: glicoproteína viral  
g: grama (s)  
GAG: glicosaminoglicanas  
GMK AH1: linhagem celular proveniente de fibroblastos de rins de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*)  
h: horas  
HCl: ácido clorídrico  
HEP: heparina  
HIV: vírus da imunodeficiência humana  
HSV: Herpes Simplex Virus  
HSV-1: Herpes Simplex Virus tipo 1  
HSV-2: Herpes Simplex Virus tipo 2  
HVEM: Mediador de entrada dos herpesvírus, *Herpesvirus Entry Mediator*  
ICP: *Infected cell proteins*, proteínas de células infectadas  
IR: infecciosidade residual  
IS: índice de seletividade

KCl: cloreto de potássio  
kDa: kilodalton  
kpb: kilo pares de base  
Md: média  
MEM: *Minimal Essential Medium*, Meio Essencial Mínimo  
MeOH<sub>AMB</sub>: fração metanólica de *C. glaziovii* enriquecida em C-glicosilflavonoides  
mg: miligrama (s)  
min: minuto (s)  
mL: mililitro (s)  
mM: milimolar  
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazólio, sal de tetrazólio  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: carbonato de sódio  
n<sup>o</sup>: número  
*n*-BuOH: *n*-butanol  
NaCl: cloreto de sódio  
NaOH: hidróxido de sódio  
Nm: nanômetro  
p/v: peso/volume  
PBS: *Phosphate Buffered Saline*, solução de tampão fosfato  
pH: potencial hidrogeniônico  
P.I.: pós-infecção  
PMSF: fluoreto de fenilmetilsufonila  
PSA: 10.000 unidades de penicilina G, 10.000 µg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B  
RA: resíduo aquoso  
RA<sub>AMB</sub>: resíduo aquoso resultante do fracionamento em resina amberlite  
RNA: ácido ribonucléico  
RNAm: ácido ribonucléico mensageiro  
SDS: dodecil sulfato de sódio  
SFB: soro fetal bovino  
SNC: sistema nervoso central  
SNK: *Student-Newman-Keuls*  
SRB: sulforrodamina B  
T: título viral  
UFP: unidades formadoras de placas  
UFP/mL: unidades formadoras de placas por mililitro  
V: volts  
v/v: volume/volume  
VERO: linhagem celular proveniente de fibroblastos de rim de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*)  
vhs: *virion host shut*  
X: vezes



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	19
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	21
2.1 Fármacos antivirais de origem natural	21
2.2 Herpesvírus	25
2.2.1 Herpes Simplex Virus tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2)	27
2.3 Terapêutica anti-herpética	37
2.4 Materiais testados	40
2.4.1 Plantas testadas	40
2.4.2 Gênero <i>Cecropia</i>	42
<b>3 OBJETIVOS</b>	47
3.1 Objetivo geral	47
3.2 Objetivos específicos	47
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	49
4.1 Materiais de estudo	49
4.2 Culturas celulares	51
4.2.1 Células	51
4.2.2. Meio de Cultura e Reagentes	51
4.3 Vírus	51
4.3.1. Origem das cepas virais	51
4.3.2 Preparo das suspensões-estoques virais	52
4.3.3 Determinação dos títulos infecciosos virais	52
4.4 Avaliação da citotoxicidade	54
4.4.1 Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio (MTT)	54
4.4.2 Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sulforrodamina B (SRB)	55
4.5 Avaliação da potencial atividade antiviral	56
4.5.1 Ensaio de inibição da formação das placas de lise	56
4.6 Avaliação do provável mecanismo da ação anti-herpética dos extratos e frações obtidos a partir de <i>Cecropia glaziovii</i>	58
4.6.1 Avaliação da ação virucida direta	58
4.6.1.1 Atividade virucida da subfração AMB <sub>2</sub> na presença de soluções ricas em proteínas	59

4.6.2 Avaliação do efeito dos materiais-teste na adsorção viral	60
4.6.3 Avaliação do efeito da subfração AMB <sub>2</sub> na penetração viral	62
4.6.4 Avaliação do efeito da subfração AMB <sub>2</sub> na redução do tamanho das placas de lise	63
4.6.5 Avaliação do efeito do tempo de adição da subfração AMB <sub>2</sub> no ciclo de replicação viral	63
4.6.6 Avaliação da expressão das proteínas virais	64
4.7 Delineamento experimental e análise estatística	66
4.8 Determinação dos teores de compostos fenólicos totais e de flavonoides totais de <i>Cecropia glaziovii</i> por espectrofotometria UV/VIS	67
4.8.1 Compostos fenólicos totais	67
4.8.2 Flavonoides totais	68
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	69
5.1 Determinação dos títulos infecciosos virais	69
5.2 Triagem da potencial atividade antiviral	69
5.2.1 Avaliação da citotoxicidade	69
5.2.2 Avaliação da atividade antiviral pelo ensaio de inibição da formação das placas de lise	70
5.3 Fracionamento biomonitorado de <i>Cecropia glaziovii</i>	74
5.3.1 Avaliação da citotoxicidade de <i>Cecropia glaziovii</i>	75
5.3.2 Avaliação da atividade antiviral de <i>Cecropia glaziovii</i>	76
5.4 Avaliação do provável mecanismo da ação anti-herpética	80
5.4.1 Avaliação da ação virucida direta	80
5.4.2 Avaliação do efeito dos materiais-teste na adsorção viral	85
5.4.3 Avaliação do efeito da subfração AMB <sub>2</sub> na penetração viral	90
5.4.4 Avaliação do efeito da subfração AMB <sub>2</sub> na redução do tamanho das placas de lise	93
5.4.5 Avaliação do efeito do tempo de adição da subfração AMB <sub>2</sub> no ciclo de replicação viral	95
5.4.6 Avaliação da expressão das proteínas virais	98
5.5 Determinação dos teores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais de <i>Cecropia glaziovii</i> por espectrofotometria UV/Vis	101
5.5.1 Compostos fenólicos totais	101
5.5.2 Flavonoides totais	103
5.6 Proposta preliminar do mecanismo da ação anti-herpética da subfração AMB <sub>2</sub>	105
<b>6 CONCLUSÕES</b>	106
<b>7 PERSPECTIVAS</b>	108
REFERÊNCIAS	107
ANEXO	131

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse imenso patrimônio genético tem na atualidade um valor econômico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde se encontra sua maior potencialidade. Técnicas modernas de separação, elucidação estrutural e química combinatória, aliado à ampla diversidade de moléculas bioativas disponíveis, tem proporcionado a revitalização de produtos naturais como fonte de novos fármacos (SAKLANI; KUTTY, 2008). Estima-se que mais da metade dos medicamentos aprovados desde 1994, sejam derivados de fontes naturais (BUTLER, 2008), e somente no período de 2005 a 2007, 13 fármacos lançados no mercado farmacêutico mundial, são substâncias diretamente derivadas de produtos naturais (HARVEY, 2008).

Na última década, a pesquisa de novos fármacos passou por avanços significativos, principalmente depois da introdução de modelos biológicos realizados *in vitro* e em grande escala, os quais podem avaliar várias amostras, em um curto período de tempo, permitindo a realização de várias repetições dos experimentos e propiciando uma análise estatística consistente dos resultados. Os avanços tecnológicos que contribuíram para a busca de novos compostos referem-se à descoberta de novos alvos moleculares, impulsionados pelas novas ferramentas de biologia molecular, e a evolução das técnicas de síntese orgânica, resultando em substâncias ativas mais eficazes e/ou menos tóxicas, que podem ser utilizadas como protótipos de fármacos com atividades farmacológicas semelhantes às originais (TREVISAN; MACEDO, 2003; HARVEY, 2008; RISHTON, 2008).

Infecções agudas e recorrentes provocadas pelos Herpes Simplex Virus tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) permanecem um grave problema de saúde pública. A pesquisa por agentes antivirais seletivos tem sido intensa nos últimos anos, mas a necessidade de novas terapias antivirais ainda persiste já que muitos dos problemas relacionados ao tratamento das infecções herpéticas, tais como o aparecimento de cepas virais resistentes, alta toxicidade sistêmica e baixa eficácia em pacientes imunocomprometidos, ainda não foram solucionados (SERKEDJIEVA; IVANCHEVA, 1999; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

Em contraste com a enorme gama de fármacos antibacterianos e antifúngicos disponíveis, o atual arsenal terapêutico antiviral compreende cerca de 40 fármacos, sendo a maioria destes utilizados no tratamento de infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (DE CLERCQ, 2004; 2005).

Análogos de nucleosídeos, tais como o aciclovir, têm eficácia comprovada no tratamento de infecções provocadas pelos vírus herpéticos, inibindo seletivamente a replicação do DNA viral, com baixa toxicidade às células hospedeiras. Contudo, episódios recorrentes são menos responsivos à este medicamento e o isolamento de cepas virais resistentes à terapia comumente empregada nas infecções por HSV-1 e HSV-2, está aumentando consideravelmente, especialmente em pacientes imunocomprometidos (DE LOGU et al., 2000; SNOECK, 2000; FIELD, 2001), fatos que estimulam pesquisas para que novas terapias anti-herpéticas sejam encontradas.

O Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC vem, há vários anos, avaliando a citotoxicidade e a potencial atividade antiviral de produtos naturais. Recentemente, foi avaliada a atividade anti-herpética do extrato hidroetanólico das folhas de *Cecropia glaziovii* (embaúba), o qual apresentou resultados promissores (LÜCKEMEYER et al., 2005). Dentre os grupos de metabólitos secundários existentes nas folhas desta espécie vegetal, sabe-se que para alguns flavonoides, compostos terpênicos e procianidinas já foi relatada ação antiviral (AMOROS; SIMÕES; GIRRE, 1992; BUCKWOLD et al., 2004; COS et al., 2004; CHENG et al., 2005; LYU; RHIM; PARK, 2005; VELJKOVIC et al., 2007). Desta forma, este trabalho objetivou, principalmente, realizar o fracionamento biomonitorado do extrato das folhas de *Cecropia glaziovii*, além de propor o mecanismo pelo qual a subfração ativa exerce sua atividade anti-herpética *in vitro*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Fármacos antivirais de origem natural

Os produtos naturais originados a partir de microorganismos, animais e, principalmente plantas, constituem uma fonte inesgotável de compostos com promissoras atividades biológicas e farmacológicas (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2003; CHIN et al., 2006; BAKER et al., 2007; OJIMA, 2008; WANG, 2008), incluindo atividade antiviral (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997; HUDSON; TOWERS, 1999; JASSIM; NAJI, 2003; KHAN et al., 2005; CHATTOPADHYAY; NAIK, 2007; CHATTOPADHYAY; KHAN, 2008; MUKHTAR et al., 2008).

Um fármaco antiviral pode atuar diretamente, através da inativação das partículas virais exercendo uma ação virucida, ou interferir em alguns alvos virais, como na adsorção do vírus, sua penetração na célula hospedeira, bloqueio de um ou mais estágios da replicação viral, até sua liberação. Ainda, um fármaco antiviral pode estimular a produção de interferons pelas células, impedindo a propagação do vírion célula a célula (HUDSON; TOWERS, 1999).

Produtos naturais têm sido utilizados como fonte de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças, mas o número de substâncias com ação antiviral é escasso, apesar do vasto número de compostos químicos derivados de fontes naturais, semi-síntese ou síntese total (CHATTOPADHYAY; NAIK, 2007).

O surgimento da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), estimulou a pesquisa por novos fármacos antivirais, inclusive os de origem natural (HOUGHTON, 1996; ITOKAWA et al., 2008). Plantas são capazes de sintetizar moléculas bastante complexas com estereoquímica específica fornecendo uma grande diversidade estrutural, muito maior do que a fornecida pelos compostos obtidos por técnicas de química combinatória; logo, estas moléculas bioativas não podem ser ignoradas pelas indústrias farmacêuticas (OJIMA, 2008; RISHTON, 2008). Esses compostos naturais são relativamente pequenos (>1000 Da) e ocorrem, em geral, como membros de uma família de compostos relacionados, possibilitando o isolamento de inúmeros homólogos e a obtenção de informações sobre relações de estrutura-atividade, além da capacidade de serem absorvidos e metabolizados (HARVEY, 2000).

Plantas têm sido empregadas como remédios por milhares de anos (BALUNAS; KINGHORN, 2005; SAKLANI; KUTTY, 2008). Aproximadamente 80% das populações utilizam a medicina tradicional para o atendimento de suas necessidades primárias de saúde (HARVEY, 2000; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; NEWMAN, 2008; CHATTOPADHYAY; KHAN, 2008; WANG, 2008). Análises recentes da origem dos fármacos, desenvolvidos no período de 1981 a 2006, mostraram que produtos naturais ou seus derivados compreendem cerca de 50% de todos os novos medicamentos lançados no mercado farmacêutico neste período (NEWMAN; CRAGG, 2007; NEWMAN, 2008).

Ao examinar a origem dos medicamentos prescritos por profissionais da saúde, verifica-se que os produtos naturais ou fármacos a eles relacionados são usados para tratar aproximadamente 87% de todas as doenças humanas, incluindo os antivirais, antibacterianos, antitumorais, anticoagulantes, antiparasitários, imunossupressores, entre outros (CHIN et al., 2006; CHATTOPADHYAY; NAIK, 2007; SAKLANI; KUTTY, 2008).

Uma das estratégias na busca de novos fármacos antivirais derivados de produtos naturais é baseada no estudo de extratos de plantas medicinais. Ao se estudar uma planta com relação às suas características fitoquímicas, é importante considerar a existência de dois tipos de metabólitos: os metabólitos primários e os secundários. Os metabólitos primários são encontrados em todos os sistemas vivos, essenciais ao crescimento e à vida, como os aminoácidos, monossacarídeos, ácidos carboxílicos, lipídeos, etc, enquanto que metabólitos secundários são produtos do metabolismo específico, relacionados aos processos adaptativos e sintetizados principalmente para defesa contra predadores (CHATTOPADHYAY; KHAN, 2008). Estes últimos são biossintetizados a partir de metabólitos primários, com distribuição restrita a certas plantas e microorganismos, e caracterizados por uma enorme diversidade química (VERPOORTE, 2000; MOLYNEUX et al., 2007; ITOKAWA et al., 2008). Milhares de constituintes isolados de diferentes espécies vegetais têm sido extensivamente estudados em relação ao seu potencial efeito terapêutico contra infecções virais. Tais compostos são particularmente úteis devido à sua abundância na natureza e, em muitos casos, a sua baixa citotoxicidade (ALCHÉ et al., 2002).

Diversos estudos com extratos de plantas mostraram algum tipo de atividade antiviral *in vitro* e, atualmente, se conhece vários grupos de metabólitos secundários

que seriam os responsáveis pelas atividades detectadas (KHAN et al., 2005; CHATTOPADHYAY; KHAN, 2008; MUKHTAR et al., 2008). A título ilustrativo, dentre os metabólitos ativos, pode-se citar: flavonoides (AMOROS; SIMÕES; GIRRE, 1992; ALMEIDA et al., 1998; ROBIN et al., 1998; LI et al., 2002; SHAHAT et al., 2002; ROWLEY et al., 2002; KASHIWADA et al., 2005; LYU; RHIM; PARK, 2005; VELJKOVIC et al., 2007; CHATTOPADHYAY; KHAN, 2008), alcaloides (VANDEN BERGUE; VLIETINCK; VAN HOOFF, 1986; MANFREDI et al., 1991; LI et al., 2005; CHATTOPADHYAY et al., 2006; CHENG et al., 2007; HUA et al., 2007; WU et al., 2007), taninos (CHENG et al., 2002; KUO et al., 2002; CHENG et al., 2004; CHIANG et al., 2005), cumarinas (BUCKHEIT et al., 2000; MAZZEI et al., 2008), terpenos (HUDSON, 1990; ARMAKA et al., 1999; ITO et al., 2001; JIANG et al., 2002; MADUREIRA et al., 2003; KOCH et al., 2008; ITOKAWA et al., 2008), quinonas (ANDERSEN et al., 1991; HIGUCHI et al., 1991; KANG et al., 1999), saponinas (SIMÕES; AMOROS; GIRRE, 1999; APERS et al., 2001; BERMEJO et al., 2002; GOSSE et al., 2002; SAKURAI et al., 2004; WU et al., 2007; ZHAO et al., 2008), lignanas (EICH et al., 1996; KERNAN et al., 1997; KUO et al., 2001; OVENDEN et al., 2004), polissacarídeos (CARLUCCI et al., 1999; THOMPSON; DRAGAR, 2004; ZHU et al., 2004; 2006; CHATTOPADHYAY et al., 2007), compostos polifenólicos (SYDISKIS et al., 1991; GAUNTT et al., 2000; CHENG et al., 2003; BUCKWOLD et al., 2004; COS et al., 2004; CHENG et al., 2005).

O processo de descoberta de fármacos a partir de produtos naturais envolve várias áreas de pesquisa e diferentes métodos de análise (PIETERS; VLIETINCK, 2005). Resumidamente, o processo básico inicia-se com um botânico que realiza a coleta e identifica a(s) planta(s) de interesse, que pode envolver espécie(s) com atividade(s) farmacológica(s) conhecida(s) ou uma abordagem randômica com o intuito de realizar uma ampla triagem do perfil farmacológico. Os fitoquímicos preparam o(s) extrato(s) da(s) planta(s), que são submetidos aos ensaios farmacológicos, iniciando-se o processo de purificação, isolamento e caracterização da(s) substância(s) ativa(s) através de um fracionamento biomonitorado (BALUNAS; KINGHORN, 2005). Este método já levou à descoberta de importantes agentes antitumorais, como paclitaxel e camptotecina, isolados de *Taxus brevifolia* e *Camptotheca acuminata*, respectivamente (CHIN et al., 2006; ITOKAWA et al., 2008).

Neste sentido, o fracionamento biomonitorado consiste na obtenção de frações, as quais são monitoradas através de ensaios de atividade farmacológica com o objetivo de detectar em qual delas localizam-se os compostos bioativos. Para isso, são utilizadas diferentes técnicas, selecionadas de acordo com as características dos compostos a serem isolados, resultando na purificação, isolamento e identificação dos metabólitos bioativos presentes em uma espécie vegetal (HOUGHTON, 2000).

A avaliação da atividade antiviral *in vitro* inclui a verificação de dois fatores: eficácia antiviral e toxicidade celular, também denominada citotoxicidade. É muito importante que, antes de se iniciar a avaliação da potencial ação antiviral propriamente dita, se determine a citotoxicidade, pois a concentração de uma amostra que apresenta atividade antiviral não pode ser tóxica às células hospedeiras (ELOFF, 1998). Devido a isso, os resultados dos estudos *in vitro* geralmente são expressos como IS (= Índice de Seletividade), valor que expressa a razão entre a concentração da amostra que é tóxica para 50% do tapete celular (CC<sub>50</sub>) e a concentração que inibe 50% da infecção viral (CI<sub>50</sub>). Se o valor de IS for maior que 4, pode-se considerar que a amostra testada apresenta atividade antiviral. Portanto, a relação entre os efeitos farmacológicos e tóxicos de uma amostra em estudo é um importante requisito na previsão de sua aplicabilidade como potencial agente terapêutico (SIDWELL, 1986; LYU; RHIM; PARK, 2005).

Ensaio baseados em cultura de células geralmente são considerados ideais na descoberta de novos fármacos, pois mimetizam interações moleculares que ocorrem no sistema celular fisiológico humano (BAKER et al., 2007). Como diferentes vírus crescem em sistemas celulares distintos, é impossível designar um modelo único que poderia ser aplicado a todos os tipos virais. Portanto, diversos ensaios baseados em cultura de células são empregados para avaliar a atividade antiviral e virucida de substâncias puras ou mistura de compostos, como é o caso de extratos de plantas. Fármacos antivirais podem interferir em uma ou mais etapas da replicação viral, enquanto que compostos com ação virucida reduzem a infecciosidade viral extracelularmente, podendo ser considerados potenciais candidatos a microbicidas tópicos (COS et al., 2006). Os métodos mais usados para a detecção de potencial atividade antiviral *in vitro*, tanto de compostos puros quanto de extratos de plantas, são baseados nas diferentes habilidades dos vírus de se



replicarem em células cultivadas. Alguns vírus podem causar efeito citopático<sup>1</sup>, o qual pode ser avaliado por microscopia, ou formar as placas de lise<sup>2</sup>. Outros são capazes de alterar funções especializadas ou causar alguma transformação celular. A replicação viral pode também ser monitorada através da detecção de alterações na síntese de produtos virais (DNA, RNA ou polipeptídeos virais) (COS et al., 2006).

Desta forma, diversos produtos naturais, que apresentaram atividade antiviral *in vitro*, são potenciais candidatos a agentes terapêuticos ou profiláticos das infecções virais, desde que os estudos subseqüentes (*in vivo* e clínicos) confirmem os achados iniciais (VLINETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997).

## 2.2 Herpesvírus

Os vírus herpéticos fazem parte da família *Herpesviridae* e são divididos em três subfamílias:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  - *Herpesvirinae*, de acordo com suas propriedades biológicas (Quadro 1).

Atualmente, há cerca de 130 herpesvírus parcialmente caracterizados, o que demonstra sua alta disseminação na natureza, sendo que existem nove vírus herpéticos humanos (DA SILVA, 2000; ROIZMAN; PELLETT, 2001; CLEATOR; KLAPPER, 2004). A classificação geral dos vírus herpéticos está descrita no quadro 2.

---

<sup>1</sup> Por exemplo, o efeito citopático do HSV-1 é caracterizado pelo aparecimento de células de dimensões variáveis, arredondadas, bastante brilhantes, pouco refringentes, algumas vezes separadas e, mais freqüentemente, ligadas umas às outras por prolongamentos citoplasmáticos formando os chamados "focos" com aspecto característico de "cachos de uva", que se estendem rapidamente pela superfície do local de infecção (GIRARD; HIRTH, 1989).

<sup>2</sup> Placas de lise correspondem a áreas de efeito citopático viral em uma monocamada celular. Se uma célula na monocamada é infectada por uma partícula viral, novos vírus resultantes da infecção inicial podem infectar células adjacentes e, após um determinado período de tempo, a região onde ocorreu a infecção viral forma a chamada placa de lise, e o corante usado para revelação auxilia na visualização das placas (CONDIT, 2007).

**Quadro 1:** Propriedades biológicas gerais das subfamílias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  - *Herpesvirinae*.

SUBFAMÍLIA	PROPRIEDADES BIOLÓGICAS
<i>Alphaherpesvirinae</i>	Faixa variável de hospedeiros, ciclo reprodutivo relativamente curto, propagação rápida em cultura de células, destruição irreversível das células infectadas e capacidade de estabelecer infecção latente, primariamente, mas não exclusivamente, em gânglios sensoriais
<i>Betaherpesvirinae</i>	Faixa restrita de hospedeiros, ciclo reprodutivo longo, propagação lenta em culturas de células formando células aumentadas (citomegalia), podendo permanecer na forma latente em glândulas secretoras, células linforreticulares, rins e outros tecidos
<i>Gammaherpesvirinae</i>	Faixa de hospedeiros é limitada e, <i>in vitro</i> , todos se replicam em células linfoblastóides, sendo que alguns causam infecções com destruição irreversível em certos tipos de células fibroblásticas e epitelióides. São vírus específicos para linfócitos T e B onde podem estabelecer infecção latente ou lítica

Fonte: adaptado de DA SILVA (2000); CLEATOR; KLAPPER (2004).

**Quadro 2:** Classificação geral dos herpesvírus humanos.

<b>NOME COMUM E SIGLA</b>	<b>NOME OFICIAL</b>	<b>GÊNERO</b>	<b>SUBFAMÍLIA</b>
Vírus Herpes Simplex Tipo 1 (HSV-1)	Herpesvírus humano-1	<i>Simplexvirus</i>	<i>Alphaherpesvirinae</i>
Vírus Herpes Simplex Tipo 2 (HSV-2)	Herpesvírus humano-2		
Vírus da Varicella-Zoster (VZV)	Herpesvírus humano-3	<i>Varicellovirus</i>	
Citomegalovírus (CMV)	Herpesvírus humano-5	<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Betaherpesvirinae</i>
Vírus Herpes Humano Tipo 6A (HHV-6A)	Herpesvírus humano-6A	<i>Roseolovirus</i>	
Vírus Herpes Humano Tipo 6B (HHV-6B)	Herpesvírus humano-6B		
Vírus Herpes Humano Tipo 7 (HHV-7)	Herpesvírus humano-7		
Vírus Epstein-Barr (EBV)	Herpesvírus humano-4	<i>Lymphocryptovirus</i>	<i>Gammapherpesvirinae</i>
Vírus herpes Humano Tipo 8 (HHV-8)	Herpesvírus humano-8	<i>Rhadinovirus</i>	

Fonte: adaptado de DA SILVA (2000); CLEATOR; KLAPPER (2004).

### 2.2.1 Herpes Simplex Virus tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2)

Os Herpes Simplex Virus foram os primeiros vírus herpéticos humanos descobertos e são os vírus da família *Herpesviridae* mais intensivamente investigados (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). Eles produzem uma primoinfecção aguda, seguida de latência viral nos gânglios sensoriais por toda a vida dos hospedeiros, com episódios de reativação viral causando lesões que podem se localizar no sítio da infecção primária inicial ou próxima a ele, sempre

acompanhada de lise irreversível da célula hospedeira infectada (LUPI; PEREIRA JR, 2000b).

O herpes simples é uma dermatose infecto-contagiosa crônica e recorrente, tendo como agente etiológico o HSV-1 e/ou HSV-2 (LUPI; PEREIRA JR, 2000b), que mostram similaridades em suas manifestações clínicas, sendo que ambos provocam infecção primária em membranas mucosas e latência nos gânglios nervosos sensoriais (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007).

Embora HSV-1 e HSV-2 causem infecções genitais ou extragenitais clinicamente indistinguíveis, há diferenças na distribuição anatômica destas infecções, como foi descrito em 1967 por Dowdle e colaboradores. Em geral, o HSV-1 afeta principalmente boca, lábios, olhos e locais acima da cintura, enquanto que o HSV-2 infecta regiões abaixo da cintura. Porém, nas últimas décadas ocorreram alterações na distribuição e prevalência das infecções herpéticas. Em alguns países, a proporção de infecções genitais causadas pelo HSV-1 é bastante elevada, podendo atingir 60% dos casos. Esta mudança de etiologia é causada principalmente pelas alterações no comportamento sexual, especialmente pelo contato oro-genital desprotegido (ELLERMANN-ERIKSEN, 2005).

O HSV propaga-se de pessoa a pessoa através do contato direto com secreções contaminadas (BRADY; BERNSTEIN, 2004) e o tipo de infecção resultante dependerá do sistema imunológico do hospedeiro. Indivíduos susceptíveis, isto é, indivíduos soronegativos para HSV, desenvolvem “infecção primária” após sua primeira exposição ao HSV-1 ou ao HSV-2, sendo geralmente mais severas que uma infecção recorrente. Uma “infecção inicial” ocorre quando um indivíduo já possui anticorpos contra HSV-1 ou HSV-2 e é infectado com o outro tipo de vírus pela primeira vez. Durante a infecção primária e infecção inicial, o vírus estabelece uma infecção latente nos neurônios sensoriais. A subsequente reativação do vírus latente resulta numa “infecção recorrente” (WHITLEY; ROIZMAN, 2001; CLEATOR; KLAPPER, 2004; CERNIK; GALLINA; BRODELL, 2008).

A infecção primária por HSV é, em sua grande maioria, assintomática, especialmente em indivíduos saudáveis jovens (ELLERMANN-ERIKSEN, 2005). Contudo, as manifestações clínicas características variam desde gengivomastites, lesões orolabiais, querato-conjuntivites e infecções genitais, até doenças potencialmente fatais, incluindo infecção neonatal, encefalites e infecções

disseminadas em pacientes com o sistema imunológico comprometido (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

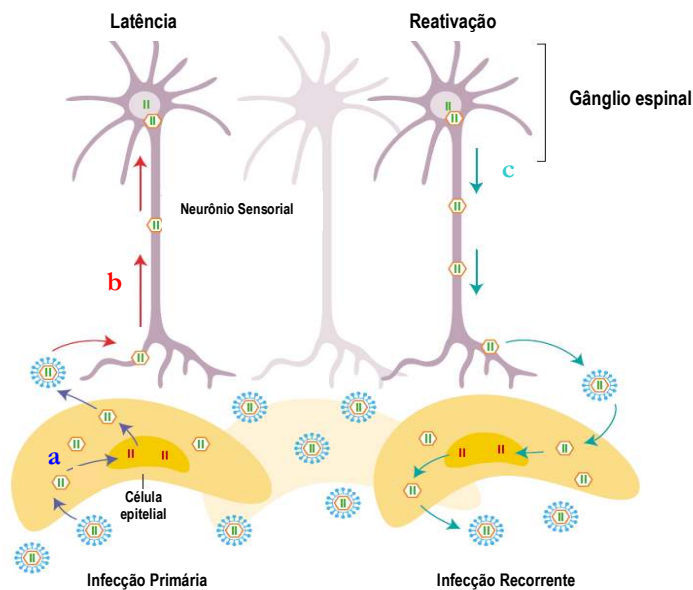
As propriedades biológicas dos HSV que controlam o curso da infecção humana são neurovirulência e latência. Há possibilidade destes vírus invadirem e se replicarem no SNC, resultando em danos neurológicos severos, tal como ocorre nas encefalites herpéticas. Alternativamente, eles podem simplesmente estabelecer latência, funcionando como um reservatório para a transmissão viral a pessoas susceptíveis, se reativados (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

Somente nos Estados Unidos, aproximadamente 500.000 novos casos de doença herpética são relatados a cada ano (PIRET et al., 2002; ARDUINO; PORTER, 2008). A soroprevalência do HSV-1 em adultos atinge 70% nos países desenvolvidos e até 100% nos países em desenvolvimento. Mulheres são mais susceptíveis à infecção por HSV-2 do que homens e a prevalência sorológica do HSV-2 varia de 7-40% em mulheres grávidas até 60-95% em pessoas infectadas pelo HIV. Uma outra preocupação é decorrente do fato que apenas 10-25% das pessoas com anticorpos anti-HSV-2 estão conscientes da sua infecção e da capacidade de transmitir o vírus para pacientes susceptíveis (GUPTA; WARREN; WALD, 2007).

Além disso, o herpes genital encontra-se intimamente relacionado à aquisição do HIV, aumentando em até três vezes o risco de contraí-lo sexualmente (GUPTA; WARREN; WALD, 2007). Isto ocorre através do recrutamento de células do sistema imune para os locais da ulceração genital, acarretando numa maior disponibilidade das células-alvo ativadas do vírus HIV (linfócitos CD<sub>4</sub>) (LUPI; SEMENOVITCH; PEREIRA JR, 2000c; CELUM et al., 2008; KOELLE; COREY, 2008).

Como dito anteriormente, os HSV apresentam capacidade de estabelecer infecção latente ou persistente por toda a vida do hospedeiro, variando o sítio de latência de acordo com a subfamília. A principal característica dos membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* é estabelecer latência nos nervos sensoriais. A infecção primária causada pelos HSV-1 e HSV-2 é caracterizada pela replicação no local da inoculação viral, seguida de um transporte axonal retrógrado dos vírus ao correspondente gânglio sensorial, onde a infecção resulta em morte celular ou no estabelecimento de latência. Dessa forma, em alguns neurônios, os vírus expressam genes, replicam e causam morte celular, enquanto que em outros neurônios, os vírus estabelecem uma infecção latente caracterizada pela transcrição gênica viral

limitada (nenhum dos genes virais expressos durante a fase lítica é detectado), exceto para os genes “transcritos associados à latência (LATs)” (LAZARINI et al., 2006; MARGOLIS et al., 2007). Os vírus podem então ser reativados dos gânglios trigêmio, vagal e sacral (WHITLEY; ROIZMAN, 2001) espontaneamente ou desencadeado por vários estímulos, como estresse, febre, trauma, mudanças hormonais, radiação ultravioleta, e então passar anterogradamente pelo nervo, causando as infecções recorrentes com lesões características em sítios específicos da pele e mucosas (BRADY; BERNSTEIN, 2004; ARDUINO; PORTER, 2008) (figura 1).



**Figura 1:** Mecanismo de latência dos HSV. (a) Ciclo lítico dos Herpes Simplex Virus em células epiteliais ou genitais causando infecção primária; (b) Alguns vírions entram no neurônio sensorial e passam retrogradamente ao seu núcleo onde estabelecem latência; (c) Reativação resulta num transporte anterógrado dos vírions, saída do neurônio, e reinfecção das células, que podem gerar lesões recorrentes ou assintomáticas. Fonte: LACHMANN (2003).

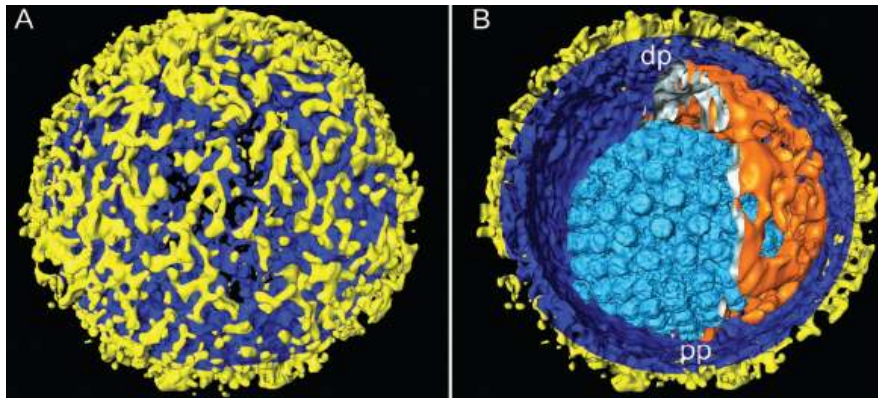
Os HSV-1 e HSV-2 são estritamente relacionados entre si, mostrando uma homologia em nível de DNA de 83% em regiões codificadoras de proteínas. As lesões causadas pelo HSV-1 podem não ser distinguidas daquelas causadas pelo HSV-2, mas há diferenças genéticas e biológicas, que permitem sua diferenciação sorológica. O mapa genético de ambos é colinear e o genoma apresenta aproximadamente o mesmo tamanho (152 kpb e 155 kpb para HSV-1 e HSV-2, respectivamente), que codificam genes correspondentes; porém, há diferenças nos locais de restrição das endonucleases do genoma e no tamanho aparente das

proteínas codificadas (SPEAR, 2004; ELLERMANN-ERIKSEN, 2005; GUPTA; WARREN; WALD, 2007; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

Os HSV-1 e HSV-2 são vírus envelopados de replicação nuclear com um peso molecular de  $96 \times 10^6$  kDa, conformação esférica e regular com um diâmetro que varia de 120 a 150 nm (ARDUINO; PORTER, 2008). Os vírions compreendem quatro componentes distintos: envelope, tegumento, capsídeo e genoma.

No interior do vírion está o core contendo DNA linear de fita dupla, o qual consiste em dois componentes ligados covalentemente, denominados longo (L) e curto (S), ambos contendo seqüências únicas ( $U_L$  e  $U_S$ , respectivamente), que são flanqueadas por regiões de seqüências repetitivas invertidas. O rearranjo destes dois componentes dá origem a quatro populações de moléculas de DNA, diferindo entre si apenas na orientação das seqüências do DNA. Seu genoma é um dos maiores entre os vírus herpéticos humanos, codificando cerca de 70 a 200 proteínas requeridas para o crescimento do vírus em cultura celular *in vitro*, para funções relacionadas à entrada do vírus na célula hospedeira, à regulação da expressão gênica, à replicação e ao empacotamento do DNA viral, entre outras (WHITE; FENNER, 1994; WHITLEY; ROIZMAN, 2001; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; ARDUINO; PORTER, 2008).

Os demais componentes do vírion envolvem o core. O capsídeo é composto de 162 capsômeros (150 hexâmeros e 12 pentâmeros) arranjados em simetria icosaédrica com aproximadamente 125 nm de diâmetro e 15 nm de espessura. Envolvendo o capsídeo encontra-se o tegumento, uma camada amorfa, que contém no mínimo 20 proteínas virais envolvidas nas fases iniciais da infecção e replicação do vírion. O envelope é constituído por uma bicamada lipídica, derivado das membranas das células previamente infectadas, onde estão acomodadas no mínimo 12 tipos de glicoproteínas virais (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM e gN), que desempenham funções importantes nas diversas etapas da infecção viral. Estas glicoproteínas têm sido extensivamente estudadas e a principal diferença antigênica entre HSV-1 e HSV-2 parece estar relacionada aos epítomos específicos encontrados em algumas delas. Além das glicoproteínas virais, há diversas proteínas não glicosiladas, lipídios e poliaminas no envelope viral (WHITE; FENNER, 1994; LUPI; PEREIRA JR, 2000b; CLEATOR; KLAPPER, 2004; ELLERMANN-ERIKSEN, 2005; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; ARDUINO; PORTER, 2008). A morfologia característica dos HSV pode ser visualizada na figura 2.



**Figura 2:** Estrutura do vírion dos HSV. **(A)** Imagem da superfície externa do HSV obtida de uma tomografia crio-eletrônica, mostrando as glicoproteínas virais em amarelo e o envelope em azul escuro. **(B)** Corte transversal do interior do vírion, mostrando o capsídeo (azul claro), o tegumento (alaranjado) e o envelope com as glicoproteínas (azul escuro e amarelo). Fonte: GRÜNEWALD et al.(2003).

O ciclo de multiplicação dos vírus herpéticos consiste em uma seqüência complexa de eventos. *In vitro*, o processo completo de replicação viral envolve, aproximadamente, 18 a 20 horas, e é citolítico. Resumidamente, para iniciar sua infecção, os HSV precisam ser adsorvidos aos receptores de superfície celular, seguido da fusão do envelope viral com a lamela externa da membrana plasmática. O capsídeo desenvolvido é, então, transportado até os poros nucleares, onde o genoma viral será liberado para dentro do núcleo celular. Os eventos chave que ocorrem no núcleo incluem transcrição, síntese do DNA, montagem do capsídeo, empacotamento do DNA e envelopamento, resultando na liberação de um novo vírion potencialmente infeccioso. É importante destacar que o vírion é estruturado de modo que o genoma viral fique protegido de condições adversas do ambiente extracelular (DA SILVA, 2000; SPEAR, 2004; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

A primeira etapa do ciclo de multiplicação dos vírus herpéticos consiste na **entrada ou penetração**, que é um processo complexo envolvendo cinco das doze glicoproteínas virais. Os HSV podem entrar nas células através de duas formas distintas. A principal via de entrada envolve a adsorção e fusão do envelope viral com a membrana plasmática sendo dependente de interações com receptores específicos presentes na superfície celular e independente de pH (este processo será descrito detalhadamente a seguir). Uma segunda forma de entrada do vírus na célula hospedeira, dita secundária, envolve endocitose do capsídeo envelopado,



através da sua fusão à membrana da vesícula endocítica dependente de pH (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

A infecção pelos HSV é iniciada através da **adsorção**, que consiste na ligação reversível da partícula viral via gB e/ou gC a um receptor celular (cadeias de glicosaminoglicanos de proteoglicanos da superfície celular). O sulfato de heparana, um dos diversos tipos de GAG, é preferencial e considerado o principal receptor de ligação dos HSV (METTENLEITER, 2002; SPEAR, 2004; ELLERMANN-ERIKSEN, 2005; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). Assim, a adsorção inicial do HSV-1 às células é mediada, predominantemente, pela interação da gC (e, em menor extensão, pela gB) aos receptores GAG da superfície celular. Embora a gC desempenhe um papel importante, aumentando significativamente a eficiência da infecção pelo HSV-1, estudos realizados com vírus mutantes desprovidos de gC (HSV-1 gC<sup>-</sup>) demonstraram que os mesmos mantiveram-se infecciosos, porém com uma redução da capacidade de infectar células em cultura (cerca de 10 vezes) quando comparados às cepas selvagens. No entanto, HSV-2 desprovidos de gC (HSV-2gC<sup>-</sup>) não apresentaram perda da sua capacidade infecciosa, sugerindo que a adsorção do HSV-2 se dá via gB, e este fato poderia explicar as diferenças exibidas entre os dois sorotipos, tais como tropismo celular e perfil epidemiológico (GERBER; BELVAL; HEROLD, 1995; TRYBALA et al., 2000; METTENLEITER, 2002; MARCHETTI; AMMENDOLIA; SUPERTI, 2009).

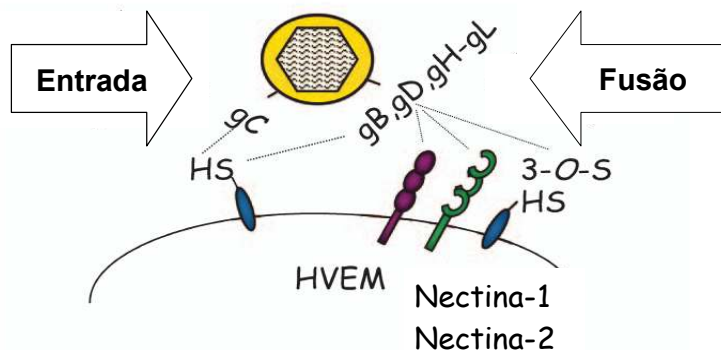
Portanto, a gC é considerada uma glicoproteína não essencial de entrada, ao contrário da gB que é essencial. Além disso, um estudo recente, realizado por Satoh e colaboradores (2008), demonstrou que outros receptores celulares para as duas glicoproteínas virais (gB e gD) são requeridos para a infecção pelos HSV-1, e que uma classe de receptores do tipo imunoglobulina [*Paired Immunoglobulin-Like type 2* (PILR $\alpha$ )] desempenham um importante papel durante a entrada do vírus, como um co-receptor da gB.

Embora ambos os sorotipos de HSV tenham como principal receptor celular as moléculas de sulfato de heparana, estes vírus exibem diferenças específicas em suas interações com as células hospedeiras. Por exemplo, substâncias polianiónicas inibiram mais eficientemente a infecção causada por HSV-2 do que aquela causada por HSV-1, enquanto que compostos policatiônicos mostraram-se mais eficientes na inibição da infecção causada pelo HSV-1. Além disso, células desprovidas de cadeias de sulfato de heparana e de condroitina foram permissivas à infecção pelo

HSV-1, mas não pelo HSV-2, quando em presença de sulfato de dextrana (receptor artificial), infecção esta mediada principalmente pela gB-1 (gB do HSV-1) (TRYBALA et al., 2000).

No entanto, as interações das glicoproteínas B e C com as moléculas de sulfato de heparana não são suficientes para a entrada dos HSV nas células. Para que ocorra a **penetração** por fusão, após a adsorção da partícula viral à superfície celular, é necessário que a gD interaja com um dos seus diversos receptores, sofrendo alterações conformacionais. Além disso, é preciso que também ocorra interação com a gB ou com o dímero gH-gL, resultando na fusão do envelope viral com a membrana da célula, e subsequente entrada do nucleocapsídeo e do tegumento no citoplasma celular (METTENLEITER, 2002; SPEAR, 2004; ELLERMANN-ERIKSEN, 2005).

Os receptores de entrada, nos quais a gD se liga, estão divididos em três classes: (1) um membro da família dos receptores do fator de necrose tumoral, o HVEM (mediador de entrada dos herpesvírus), mais tarde designado de HVEA (proteína A de entrada dos herpesvírus); (2) as nectinas 1 e 2, membros da superfamília das imunoglobulinas; e (3) sítios específicos do sulfato de heparana, gerados por 3-O-sulfotransferases. Os HSV diferem entre si apenas com relação à preferência pelos receptores. Enquanto o HVEM e a nectina-1 são excelentes receptores de entrada para ambos os sorotipos, a nectina-2 é inativa para a entrada do HSV-1 e fracamente ativa para mediar a entrada do HSV-2 (SPEAR, 2004). Um resumo da seqüência de eventos da adsorção e da fusão dos vírions nas células hospedeiras está representado na figura 3.



**Figura 3:** Receptores da superfície celular e ligantes virais que participam da entrada e da fusão dos HSV; Cinco glicoproteínas virais participam deste processo (gB, gC, gD, gH e gL) e a ligação dos vírus às células é mediada pela ligação da gB ou gC às cadeias do sulfato de heparana presentes nas células, o que facilita a ligação da gD a um dos seus receptores de superfície e desencadeia a fusão do envelope viral com a membrana celular, através da ação da gB e do heterodímero gH-gL. Fonte: SPEAR (2004).

Após a fusão, as proteínas do tegumento e o nucleocapsídeo viral são introduzidos no citoplasma celular. O nucleocapsídeo é transportado por microtúbulos do citoesqueleto até um poro da membrana nuclear, através do qual o DNA viral é liberado no interior no núcleo celular. No núcleo irá ocorrer a transcrição, replicação e montagem de novos capsídeos. As proteínas do tegumento asseguram uma expressão robusta de genes virais e paralisam o metabolismo macromolecular para uso próprio da célula hospedeira, garantindo eficientemente a síntese protéica e do DNA viral. Uma proteína do tegumento, *vhs* (*virion host shut-off*), produto do gene  $U_L41$ , parece permanecer no citoplasma, onde desempenha a função de desagregar polirribossomas e degradar RNAs celular e viral, sendo que o último possui vantagem, uma vez que sua produção está altamente induzida. Uma outra proteína do tegumento, VP16 ou  $\alpha$ -TIF, aumenta a expressão de genes  $\alpha$ , promovendo a transcrição viral imediata (WHITE; FENNER, 1994; WHITLEY; ROIZMAN, 2001; ELLERMANN-ERIKSEN, 2005).

Durante a infecção produtiva, mais de 84 diferentes proteínas são expressas de uma forma coordenada e é regulada em três fases seqüenciais: imediata ( $\alpha$ ), precoce ( $\beta$ ), e tardia ( $\gamma$ ), sendo essa última ainda subdividida em tardia imediata ( $\gamma_1$ ) e tardia verdadeira ( $\gamma_2$ ), de acordo com seu grau de dependência na replicação do DNA para sua expressão (COLBERE, 1975; JOHNSON; SONG; KNIPE, 2008; SU et al., 2008).

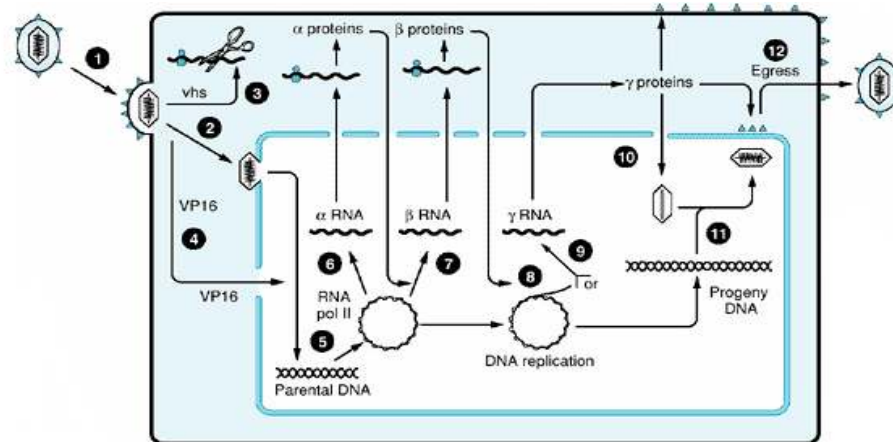
Na fase imediata, a expressão dos genes  $\alpha$  resulta na produção de proteínas que regulam a replicação viral (indutores transcricionais) e são sintetizadas em torno de 3 a 4 h P.I. Além disso, as proteínas da fase  $\alpha$  são responsáveis por bloquear a apresentação de peptídeos antigênicos na superfície das células infectadas. As chamadas *infected cell proteins* (ICPs) [0, 4, 22, 27, 47 e  $U_S1.5$ ] são proteínas multifuncionais da fase imediata, que alteram o ambiente das células infectadas para permitir uma expressão mais eficiente dos genes virais e funcionam como transativadores da expressão dos genes  $\beta$ . As proteínas regulatórias ICP0, ICP4 e ICP22 são fosforiladas por quinases celulares (exemplo: ciclina cinase, *cdc2*) e proteínas quinases virais ( $U_S3$  e  $U_L13$ ) (BOEHMER; LEHMAN, 1997; WHITLEY; ROIZMAN, 2001; 2002; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

A ativação da maquinaria transcricional das células pelos produtos dos genes  $\alpha$  resulta na síntese de proteínas da fase precoce ou  $\beta$ , que promovem a

replicação do DNA viral e a expressão das proteínas  $\gamma$ . As proteínas de fase  $\beta$  incluem as sete enzimas que são requeridas para a síntese do genoma viral [uma subunidade catalítica da DNA polimerase viral ( $U_L30$ ) e sua proteína acessória ( $U_L42$ ), uma proteína de ligação  $U_L9$ , uma proteína de ligação do DNA fita simples ou ICP8 ( $U_L29$ ) e um complexo helicase-primase formado por três proteínas ( $U_L5$ ,  $U_L8$  e  $U_L52$ )], e as enzimas necessárias para o metabolismo do DNA viral (ribonucleotídeo redutase, timidina quinase, dUTPase, uracil DNA glicosilase, entre outras). O pico de síntese dos produtos de fase precoce é atingido entre 5-7 h P.I., e quando níveis suficientes destas proteínas acumulam-se no interior da célula infectada, inicia-se a replicação do DNA viral. Outras proteínas de fase precoce estão envolvidas no aumento dos estoques de desoxirribonucleotídeos das células infectadas, enquanto outras exercem função de enzimas de reparo para os genomas virais recém-sintetizados. A expressão dos genes  $\alpha$  é significativamente reduzida após o início da replicação do DNA viral, enquanto que os genes da fase tardia ou  $\gamma$  começam a ser expressos em altos níveis (WHITE; FENNER, 1994; BOEHMER; LEHMAN, 1997; WHITLEY; ROIZMAN, 2001; CLEATOR; KLAPPER, 2004; ELLERMANN-ERIKSEN, 2005).

A síntese do nucleocapsídeo e de todas as outras proteínas estruturais que formarão os vírions, tais como as glicoproteínas do envelope viral, ocorrem quando a expressão dos genes  $\gamma$  é induzida pelos produtos da fase precoce ( $\beta$ ), em torno de 12 h P.I. Os vírions são montados no núcleo das células infectadas, onde as proteínas dos capsídeos reúnem-se para formar capsídeos vazios. O DNA viral recém-sintetizado é clivado e empacotado para produzir os nucleocapsídeos, que irão se associar a porções modificadas da membrana nuclear, contendo as proteínas do tegumento e as glicoproteínas do envelope. Isto desencadeia o envelopamento por brotamento através da membrana nuclear. Vírions envelopados acumulam-se no retículo endoplasmático, e os vírions maduros migram para a superfície celular, onde se fundem à membrana citoplasmática, e são liberados no espaço extracelular por exocitose. Portanto, a infecção produtiva de uma célula resulta na sua destruição devido às mudanças bioquímicas e estruturais induzidas pela replicação viral (WHITE; FENNER, 1994; CLEATOR; KLAPPER, 2004; ELLERMANN-ERIKSEN, 2005).

O progresso de uma infecção herpética nos tecidos é influenciado pela capacidade dos HSV de infectarem células adjacentes diretamente através das junções celulares. Os vírus estarão, deste modo, evitando a exposição a substâncias extracelulares, tais como anticorpos e complemento (ELLERMANN-ERIKSEN, 2005). As mesmas glicoproteínas virais (gB, gD, gH/gL) e os mesmos receptores celulares, que promovem a entrada dos HSV, via superfície apical da célula, possibilitam a propagação viral célula a célula, isto é, o movimento do vírus no espaço entre as células infectadas e células vizinhas não infectadas (NYBERG et al., 2004). Adicionalmente, o heterodímero viral gE/gI participa da propagação viral entre as células, através da ligação a receptores presentes nas junções celulares, facilitando a entrada dos vírions em células adjacentes (JOHNSON et al., 2001; POLCICOVA et al., 2005). Um diagrama referente ao ciclo de multiplicação dos HSV pode ser visualizado na figura 4.



**Figura 4:** Ciclo de multiplicação dos HSV. (1) O vírus adsorve, liga-se e funde-se à membrana celular, liberando o capsídeo e as proteínas do tegumento no citoplasma; (2) O capsídeo é transportado ao poro nuclear onde o DNA viral é liberado; (3) A proteína VHS degrada o RNAm; (4) VP16 entra no núcleo; (5) o DNA viral circulariza; (6) o DNA viral é transcrito pela RNA polimerase celular formando os  $\alpha$ RNA; (7) As proteínas  $\alpha$  estimulam a transcrição dos genes  $\beta$ ; (8) As proteínas  $\beta$  estão envolvidas na replicação do DNA viral e, sua síntese (9), estimula a expressão dos genes  $\gamma$ , (10) que estão envolvidos na montagem do capsídeo no núcleo e modificações da membrana para a formação do vírion; (11) DNA é "empacotado" no interior dos capsídeos vazios formando os nucleocapsídeos, que brotam (12) através da membrana nuclear para formar o vírion envelopado que é liberado no espaço extracelular onde vai infectar células adjacentes. Fonte: ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY (2007).

### 2.3 Terapêutica anti-herpética

O ciclo de replicação dos componentes da subfamília *Alphaherpesvirinae* (HSV-1, HSV-2 e VZV) oferece múltiplos sítios potenciais para o desenvolvimento de

medicamentos antivirais (LUPI, 2000a). Embora grande parte do arsenal terapêutico anti-herpético atual seja representado pelos análogos de nucleosídeos, que atuam em uma única enzima viral (DNA polimerase), outras proteínas que desempenham funções específicas na replicação dos herpesvírus podem servir como alvo molecular para o desenvolvimento de fármacos antivirais, como por exemplo, os inibidores da adsorção e entrada dos herpesvírus, compostos que inibam a expressão gênica e a replicação do DNA viral, bem como a montagem e liberação dos vírions (COEN; SCHAFFER, 2003).

No século XXI, o arsenal terapêutico está bem estabelecido para a prevenção e tratamento de algumas doenças virais, o qual compreende cerca de 40 fármacos aprovados oficialmente para uso clínico. A maioria deles foi aprovada nos últimos cinco anos, sendo que metade é utilizada para o tratamento da infecção ocasionada pelo HIV. Os demais antivirais são utilizados contra os vírus das hepatites B e C, vírus influenza, vírus respiratório sincicial e vírus herpéticos, incluindo neste último grupo o vírus da varicela zoster, o citomegalovírus e os HSV tipos 1 e 2 (DE CLERCQ, 2004; 2005). Portanto, poucos são os medicamentos usados para o tratamento das infecções herpéticas, que incluem inibidores da replicação viral (aciclovir, valaciclovir, idoxuridina, ganciclovir, fanciclovir, brivudina, penciclovir, cidofovir, foscarnet e trifluorotimidina) e o docosanol, que é um inibidor da entrada dos vírions nas células (MAMIDYALA; FIRESTINE, 2006; ROTTINGHAUS; WHITLEY, 2007).

O primeiro medicamento anti-herpético sintetizado foi a idoxuridina em 1959 por Prusoff; porém, devido à sua elevada citotoxicidade e baixa seletividade, este fármaco foi aprovado somente para o tratamento tópico de infecções por HSV (DE CLERCQ; FIELD, 2006). Em seguida, foi sintetizada a vidarabina, em 1968. No entanto, foi com a descoberta do aciclovir, um análogo acíclico do nucleosídeo 2'-deoxiguanosina altamente seletivo para os herpesvírus, em 1977 (ELION et al., 1977), que se iniciou uma nova era na pesquisa de fármacos antivirais. A partir da década de 80, houve um acentuado avanço no campo da virologia, particularmente pela necessidade de combate ao HIV, resultando na descoberta e validação de novos alvos para intervenção terapêutica. Porém, ainda há poucos agentes antivirais, quando comparados à grande disponibilidade de compostos antimicrobianos e até mesmo antifúngicos (DE CLERCQ, 2002).

Teoricamente, qualquer processo que seja essencial para a replicação do vírus e não para a sobrevivência celular, é um alvo para a ação de fármacos antivirais (WHITE; FENNER, 1994). No entanto, uma das razões que dificultam o desenvolvimento de fármacos antivirais é, principalmente, a natureza intrínseca dos vírus, os quais possuem uma estrutura relativamente simples e um sistema enzimático restrito, sendo totalmente dependentes da maquinaria metabólica da célula hospedeira para sua replicação. Desta forma, compostos que inibem ou provocam a morte viral são, também, tóxicos às células hospedeiras, em diferentes intensidades. O compromisso com a especificidade pelas células infectadas, a eficácia e um baixo nível de toxicidade são, portanto, indispensáveis para a seleção de novos agentes antivirais (ROTTINGHAUS; WHITLEY, 2007).

O aciclovir, 9-(2-hidroxi-etoximetil-guanina), fármaco de escolha no tratamento de infecções herpéticas, age como um inibidor seletivo da replicação dos herpesvírus e é administrado na forma de um pró-fármaco inativo, com posterior conversão a um derivado fosforilado pela ação de uma enzima codificada pelo próprio vírus, a timidina quinase viral. O monofosfato de aciclovir sofre ainda duas fosforilações por quinases celulares, transformando-se na forma ativada: trifosfato de aciclovir. Desta maneira, o fármaco se concentra nas células infectadas, reduzindo os efeitos colaterais, o que explica a alta seletividade deste fármaco. O aciclovir trifosforilado inibe, especificamente, a replicação do DNA dos HSV ao competir com o trifosfato de desoxiguanosina pela DNA polimerase viral, e ao atuar como substrato para esta enzima. É importante ressaltar que as enzimas celulares, mais especificamente a DNA polimerase celular, é consideravelmente menos sensível a esta inibição do que a DNA polimerase viral. A molécula de aciclovir é ligada ao genoma dos HSV, através da DNA polimerase, durante o processo de alongamento da estrutura helicoidal do DNA viral. A ausência do grupo hidroxila na posição 3' impede a incorporação de outro nucleotídeo, inibindo a sua síntese de forma irreversível e efetuando a terminação obrigatória da cadeia de DNA à qual se incorpora (LUPI, 2000a; ROTTINGHAUS; WHITLEY, 2007).

Se os HSV não expressarem uma quinase funcional capaz de fosforilar o fármaco, ou ainda se a estrutura da DNA polimerase viral estiver alterada e incapaz de se ligar ou incorporar a forma trifosfatada do aciclovir ou de outros análogos de nucleosídeos (como é o caso de certas cepas virais mutantes), os HSV se tornarão resistentes à esta terapia. Sob tais circunstâncias, os índices terapêuticos destes

fármacos serão significativamente reduzidos, uma vez que doses maiores serão requeridas para produzir efeitos clínicos e os pacientes poderão apresentar efeitos colaterais e, possivelmente, sintomas de intoxicação (COEN; SCHAFFER, 2003).

A biodisponibilidade oral do aciclovir é de somente 10-20% e derivados nucleosídicos acíclicos, tipicamente ésteres, foram desenvolvidos para superar este problema. O valaciclovir (éster L-valina do aciclovir), um dos primeiros pró-fármacos do aciclovir, é rapidamente metabolizado após administração oral, com uma biodisponibilidade em torno de 50% (BRADY; BERNSTEIN, 2004; DE CLERCQ; FIELD, 2006).

A vidarabina e o foscarnet são freqüentemente utilizados no tratamento de infecções provocadas por cepas de HSV-1 e HSV-2 resistentes ao aciclovir, uma vez que a atividade da timidina quinase não é requerida para a sua ação antiviral. No entanto, estes dois fármacos podem induzir mutações no gene da DNA polimerase viral, quando utilizados por longos períodos (DE LOGU et al., 2000). Além disso, com o uso crescente dos agentes antivirais, vários casos de toxicidade têm sido relatados. Aciclovir e ganciclovir podem provocar neurotoxicidade, particularmente em pacientes com disfunção renal (ERNST; FRANEY, 1998), enquanto que a terapia com foscarnet está associada à falência renal aguda (HOCH et al., 1995).

O desenvolvimento de vacinas anti-HSV é um outro processo desafiante, já que a latência e a reativação virais ocorrem na presença de imunidade celular e humoral previamente adquirida. Dessa forma, a imunidade induzida por uma vacina contra os HSV deve superar a capacidade dos vírions de evadirem-se do sistema imunológico do hospedeiro, além de prevenir infecções recorrentes em indivíduos que já estejam infectados por HSV (WHITLEY; ROIZMAN, 2002; BRADY; BERNSTEIN, 2004).

Portanto, os fatos aqui expostos mostram a importância e a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos anti-herpéticos, menos tóxicos e mais eficazes.

## **2.4 Materiais testados**

### **2.4.1 Extratos testados**

O quadro 3 e o item 2.4.2 trazem algumas informações a respeito dos extratos testados neste trabalho.



**Quadro 3:** Informações sobre os táxons da biodiversidade brasileira avaliados na triagem anti-herpética realizada.

Família	Sinonímia científica	Nomes populares	Usos
Rhodomelaceae	<i>Laurencia flagellifera</i> J. Agardh <i>Chondrophyucus flagelliferus</i> C. Agardh	-	Produção industrial de ágar (OLIVEIRA, 1981)
Rhodomelaceae	<i>Laurencia microcladia</i> Kützing	-	Produção industrial de ágar (OLIVEIRA, 1981)
Passifloraceae	<i>Passiflora edulis</i> Deg.	Maracujá-azedo	Sedativo (PIO CORRÊA, 1978)
Sapindaceae	<i>Dodonea viscosa</i> Jacq.	Vassoura-vermelha	Adstringente, aromática, sudorífera (PIO CORRÊA, 1978)
Musaceae	<i>Musa</i> sp.	Bananeira	Alimento (PIO CORRÊA, 1978)
Asteraceae	<i>Eupatorium bupleurifolium</i> D.C.	-	-
Asteraceae	<i>Eupatorium rufescens</i> Lund.	-	-
Asteraceae	<i>Eupatorium serratum</i> Spreng.	-	-
Asteraceae	<i>Eupatorium tanacetifolium</i> Gill.	-	-
Asteraceae	<i>Calea phyllolepis</i> Baker	-	-
Urticaceae	<i>Cecropia glaziovii</i> Sneth.	Embaúba	Diurética, anti-hipertensiva e antiasmática (LORENZI; MATOS, 2002)

Após a triagem anti-herpética, o vegetal escolhido para ser o objeto de estudo desta dissertação foi *Cecropia glaziovii* Sneth., devido aos resultados obtidos (item 5.2 – Resultados e Discussão) e à proximidade com o laboratório que realiza o seu estudo fitoquímico, o que facilitou o acesso aos extratos e frações a serem testados. Seguem abaixo algumas informações sobre o gênero *Cecropia* e a referida espécie.

## 2.4.2 Gênero *Cecropia*

### 2.4.2.1 Aspectos Gerais

Anteriormente descrito na família Moraceae, o gênero *Cecropia* foi classificado novamente por Berg (1978), definindo-o como integrante da família Cecropiaceae (ordem Urticales), a qual foi morfológicamente considerada como intermediária entre as famílias Moraceae e Urticaceae. Com esse novo arranjo taxonômico, a família Cecropiaceae incluiria mais de 180 espécies, distribuídas em seis gêneros: *Coussapoa*, *Musanga*, *Myrianthus*, *Poiküospermum*, *Pourouma* e *Cecropia*, sendo este último o único gênero importante como fonte de espécies medicinais e com grande ocorrência em todo o território brasileiro (DI STASI; SEITO; HURUMA-LIMA, 2002). Embora essa classificação taxonômica (Cecropiaceae) seja considerada correta por muitos pesquisadores, recentemente estudos baseados em análises filogenéticas (SYTSMA et al., 2002) apontaram uma nova classificação para o gênero *Cecropia*, inserindo-o na família Urticaceae.

O gênero *Cecropia* compreende cerca de 100 espécies ocorrendo na América Tropical, desde o México até o sul do Brasil (BERG, 1996). No território brasileiro, mais de 50 espécies deste gênero podem ser encontradas no Norte (especialmente na Floresta Amazônica), parte do Centro-Oeste, e também nas regiões Sudeste e Sul, porém são raramente encontradas nas zonas secas do Nordeste (PIO CORRÊA, 1978; CARAUTA, 1996; OLIVEIRA et al., 2000). O nome do gênero *Cecropia* vem do grego *cecrops*, que significa “chamar, ecoar”, referindo-se ao caule e aos ramos ocos das plantas desse gênero, usados na fabricação de instrumentos de sopro (DI STASI; SEITO; HURUMA-LIMA, 2002).

Membros deste gênero são tipicamente árvores de 8 a 25 metros de altura, com troncos segmentados e ocos onde formigas do gênero *Azteca* vivem em mutualismo fornecendo proteção em resposta a algum dano ao vegetal e influenciando no desenvolvimento da espécie (GIANOLI et al., 2008). Além dessa relação simbiótica, o bicho-preguiça (*Bradypus tridactylus*) alimenta-se dos brotos e dos frutos destas plantas (BACKES; IRGANG, 2002).

Várias espécies de *Cecropia* servem de fonte industrial para a extração de celulose e as folhas são usadas tradicionalmente em todo o Brasil como chá diurético (LORENZI; MATOS, 2002). Além do emprego como diurético, estas plantas

são popularmente utilizadas para o tratamento de bronquites, diabetes, asma, hipertensão arterial, infecções pulmonares e ansiedade (DI STASI et al., 1994; 2002; ROCHA; LAPA; DE LIMA, 2002; ALMEIDA et al., 2006; DELARCINA et al., 2007; LIMA-LANDMAN et al., 2007; TOLEDO et al., 2008).

Apesar de seu amplo uso popular, poucas espécies do gênero *Cecropia* são estudadas. Destacam-se *C. glaziovii*, *C. obtusifolia* e *C. peltata* por apresentarem uma série de estudos em relação ao seu perfil fitoquímico e atividades farmacológicas. Ênfase especial será dada a *C. glaziovii* Sneth, objeto de estudo desta dissertação.

#### **2.4.2.2 *Cecropia glaziovii* Sneth**

*Cecropia glaziovii* Sneth é uma árvore característica da costa sudeste do Brasil, pertencente à família Urticaceae, conhecida por suas propriedades medicinais, assim como outras espécies do gênero. Denominada popularmente de “embaúba vermelha”, é também chamada de “árvore da preguiça”, pois seus frutos servem de alimentos para o bicho-preguiça. É comum encontrar plantas deste gênero ao redor de áreas devastadas como árvores de replantio em áreas de desmatamento, devido ao seu rápido crescimento, o que tem ajudado a difundir o gênero por diversas regiões do país (TANAE et al., 2007).

Na América Latina tropical e subtropical, há relatos etnofarmacológicos do uso de *C. glaziovii* como cardiotônico, diurético, hipotensivo, anti-inflamatório e antiasmático (LORENZI; MATOS, 2002; SOUCCAR et al., 2008). Estas indicações populares têm sido cientificamente investigadas nos últimos 10 anos, principalmente com relação às ações cardiovasculares da planta (ROCHA; LAPA; DE LIMA, 2002).

A atividade antihipertensiva do extrato aquoso das folhas de *C. glaziovii* Sneth e de sua fração butanólica foi confirmada e presumidamente relacionada ao bloqueio de canais de cálcio na musculatura lisa vascular (CYNEIROS, 1997; LIMA-LANDMAN et al., 2007; NINAHUAMAN et al., 2007). O tratamento crônico com o extrato aquoso desta planta provocou efeito ansiolítico e antidepressivo em ratos (ROCHA; LAPA; DE LIMA, 2002), possivelmente relacionado ao bloqueio da recaptção de monoaminas no SNC, principalmente de noradrenalina, sendo a catequina e as procianidinas B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub> os compostos mais ativos (ROCHA et al., 2007). Os mesmos extratos (aquoso e fração butanólica) causaram redução do

broncoespasmo induzido por histamina em porcos, efeito relacionado provavelmente a uma atividade  $\beta$ -adrenérgica (DELARCINA et al., 2007), confirmando a ação broncodilatadora de *C. glaziovii*.

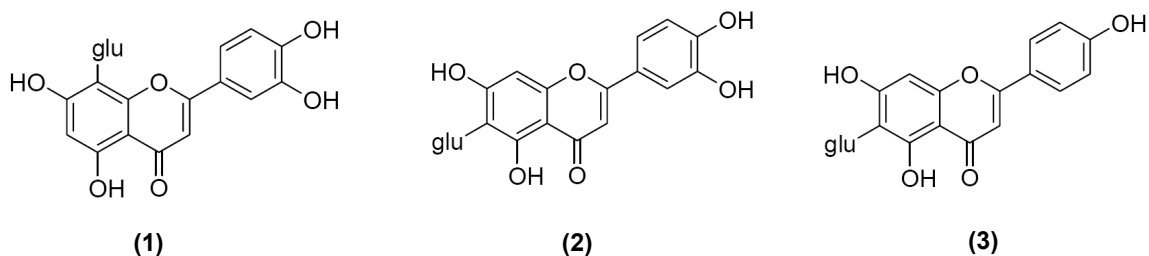
Um estudo recente avaliou o efeito de *C. glaziovii* no desenvolvimento neurocomportamental e físico de ratos (GERENUTTI et al., 2008), mostrando a baixa toxicidade desta planta frente a porcos-da-índia grávidas. Além disso, Souccar e colaboradores (2008) comprovaram a inibição da secreção de ácido gástrico pelo extrato aquoso padronizado das folhas de *C. glaziovii*, bem como de seus constituintes químicos isolados (flavonoides, procianidinas e catequinas). Esta atividade já havia sido relatada em trabalhos anteriores (CYSNEIROS et al., 1996).

O quadro 4 sumariza as principais atividades farmacológicas/biológicas descritas para as outras espécies do gênero *Cecropia*.

**Quadro 4:** Atividades farmacológicas/biológicas de outras espécies do gênero *Cecropia*.

ESPÉCIE	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
<i>C. palmata</i> Willd.	Antioxidante	SILVA et al., 2007
<i>C. catharinensis</i> Cuatrec.	Colinomimética bloqueável por atropina	SIMÕES et al., 1998
<i>C. peltata</i> L.	Hipoglicemiante	NICASIO et al., 2005
		ANDRADE-CETTO et al., 2006
		ANDRADE-CETTO; CÁRDENAS; RAMÍREZ-REYS, 2007
<i>C. obtusifolia</i> Bertol.	Hipoglicemiante	ANDRADE-CETTO; WIEDENFELD, 2001
		HERRERA-ARELLANO et al., 2004
		ANDRADE-CETTO; HEINRICH, 2005
		NICASIO et al., 2005
	REVILLA-MONSALVE et al., 2007	
	Inibição da $\alpha$ -glicosidase	ANDRADE-CETTO; BECERRA-JIMÉNEZ; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, 2008
	Analgesia	PÉREZ-GUERRERO et al., 2001
Antiinflamatório tópico e sistêmico		
Depressor do SNC		
<i>C. pachystachya</i> Trécul.	Hipotensora	CONSOLINI; MIGLIORI, 2005
	Cardiotônica	CONSOLINI et al., 2006
	Sedativa	
	Antimalárica	UCHÔA, 2004
	Antioxidante	VELÁZQUEZ et al., 2003
	Antiinflamatória	HIKAWCZUK et al., 1998
<i>C. lyratiloba</i> Miquel.	Citotóxica	ROCHA et al., 2007
	Vasodilatadora	ALMEIDA et al., 2006

Em relação ao perfil fitoquímico de *C. glaziovii*, a classe majoritária de metabólitos secundários presentes, principalmente nas suas folhas, são os flavonoides, proantocianidinas e ácidos fenólicos. Alguns dos compostos mais comumente encontrados nesta espécie são flavonoides da classe dos C-heterosídeos, nos quais os açúcares estão ligados ao núcleo aromático por uma ligação carbono-carbono, resistente à hidrólise ácida (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007). Nesta espécie, a C-glicosilflavona orientina **(1)** está presente em menor proporção, e majoritariamente encontram-se isoorientina **(2)** e isovitexina **(3)** (figura 5). Foram identificados, também, outros compostos fenólicos, tais como ácido clorogênico, procianidinas B<sub>2</sub> e C<sub>1</sub>, isoquercitrina, catequina e epicatequina (LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001), e mais recentemente, Tanae e colaboradores (2007) isolaram e identificaram as procianidinas B<sub>3</sub> (isômero) e B<sub>5</sub> no extrato aquoso e fração butanólica das folhas desta espécie vegetal.



**Figura 5:** Flavonoides C-heterosídeos presentes nas folhas de *Cecropia glaziovii* (glu = glicose).

Atualmente, inúmeros C-glicosilflavonoides já foram isolados de plantas, e os mais estudados são os mono-C-glicosilflavonoides incluindo vitexina (8-C-glicosil-apigenina) e isovitexina (6-C-glicosil-apigenina) (HAN et al., 2008), sendo este último um dos componentes majoritários das folhas de *C. glaziovii* (TANAE et al., 2007).

Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* já foram publicados em relação à potencial atividade antiviral de flavonoides. Várias revisões (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997; COWAN, 1999; HUDSON; TOWERS, 1999; JASSIM; NAJI, 2003; MARTIN; ERNST, 2003; KHAN et al., 2005; CHATTOPADHYAY; NAIK, 2007; CHATTOPADHYAY; KHAN, 2008) demonstraram a grande variedade de vírus testados e a diversidade dos métodos utilizados, os quais demonstraram efeitos de inativação viral direta ou inibição do ciclo de replicação viral. Há relatos de que flavonoides, em especial quercetina, morina, rutina, e a catequina, inibiram o ciclo

replicativo de vários tipos de vírus, incluindo vírus herpéticos, vírus sincicial respiratório e poliovírus (KAUL; MIDDLETON; OGRA, 1986; CUSHNIE; LAMB, 2005), além de apresentarem efeito sinérgico, por exemplo, entre flavonas e flavonóis (AMOROS; SIMÕES; GIRRE, 1992). Um estudo, que avaliou a atividade anti-herpética *in vitro* e *in vivo* de uma planta rica em C-glicosilflavonas (*Clinacanthus nutans*), relatou efeito virucida direto e também resultados positivos em pacientes que trataram topicamente lesões de herpes genital e herpes zoster com um creme contendo 5% de um extrato da referida planta (JAYAVASU; BALACHANDRA; SANGKITJAPORN, 1992; YOOSOOK et al., 1999).

Em relação à atividade antiviral dos flavonoides C-heterosídeos majoritários presentes nas folhas da *C. glaziovii* (isorientina, isovitexina e orientina), há pouquíssimos estudos publicados. Um deles, realizado por Li e colaboradores (2002), avaliou a atividade antiviral da orientina e vitexina isoladas das flores de *Trollius chinensis*, que se mostraram ativas contra a replicação do vírus parainfluenza 3. Gonçalves e colaboradores (2001) avaliaram o efeito anti-herpético *in vitro* de extratos ricos em C-glicosilflavonoides obtidos de *Vitex polygama* (Verbenaceae), que nas condições experimentais testadas, mostraram-se pouco ativos para uma cepa de HSV-1 resistente ao aciclovir. É importante ressaltar que esta cepa viral, bem como as metodologias empregadas por estes pesquisadores, não foram as mesmas utilizadas nesta dissertação.

Portanto, até o momento, no nosso conhecimento, não há relato publicado da detecção da atividade anti-herpética (anti-HSV-1 e anti-HSV-2) de *Cecropia glaziovii*, que constitui o objetivo maior do presente estudo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Realizar a triagem anti-herpética de nove plantas e duas algas, oriundas da biodiversidade brasileira, e selecionar a que apresentar os melhores resultados para aprofundar a avaliação da atividade antiviral detectada, correlacionando-a com sua composição química, assim como propor o mecanismo da sua ação anti-herpética.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos extratos e frações obtidos a partir de *Laurencia flagellifera*, *L. microcladia*, *Passiflora edulis*, *Dodonea viscosa*, *Musa sp.*, *Eupatorium bupleurifolium*, *E. rufescens*, *E. serratum*, *E. tanacetifolium*, *Calea phyllolepis* e *Cecropia glaziovii*, frente às células VERO e GMK AH1, através do ensaio colorimétrico do MTT;
- Avaliar a atividade anti-herpética destes extratos e frações frente ao HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333), através do ensaio de inibição da formação das placas de lise;
- Realizar o fracionamento biomonitorado de *C. glaziovii*, selecionando a subfração com maior atividade antiviral;
- Avaliar a possível atividade virucida do extrato bruto e frações purificadas de *C. glaziovii*;
- Avaliar a atividade virucida da subfração mais ativa na presença de soluções protéicas;
- Avaliar a ação do extrato bruto e frações purificadas de *C. glaziovii* na adsorção dos vírus nas células, através de estratégias metodológicas específicas;
- Avaliar a interferência da subfração mais ativa na penetração dos vírus nas células, através de uma estratégia metodológica específica;
- Avaliar a ação da subfração mais ativa na propagação intercelular viral, através do ensaio de redução do tamanho das placas de lise;

- Avaliar a influência da subfração mais ativa na replicação viral em função do tempo, através da sua adição em diferentes períodos pós-infecção;
- Avaliar a possível interferência da subfração mais ativa na expressão de proteínas virais, através do ensaio de *Western Blotting*, utilizando anticorpos específicos para proteínas expressas em algumas das fases da replicação viral;
- Correlacionar a atividade antiviral detectada com os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais presentes no extrato bruto e frações purificadas, incluindo a subfração mais ativa;
- Propor o mecanismo da ação anti-herpética da subfração mais ativa.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais de estudo

Os seguintes extratos empregados na triagem anti-herpética (*Laurencia flagellifera*; *L.microcladia*; *Passiflora edulis*; *Dodonea viscosa*; *Musa* sp.) foram gentilmente fornecidos pelos Professores Doutores Eloir Paulo Schenkel e Flávio Henrique Reginatto do Departamento de Ciências Farmacêuticas/CIF/CCS/UFSC. Os extratos e frações de *Eupatorium bupleurifolium*, *E. rufescens*, *E. serratum*, *E. tanacetifolium* e *Calea phyllolepis* foram fornecidos pelo Prof. Dr. Alexandre Ferraz da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA-RS).

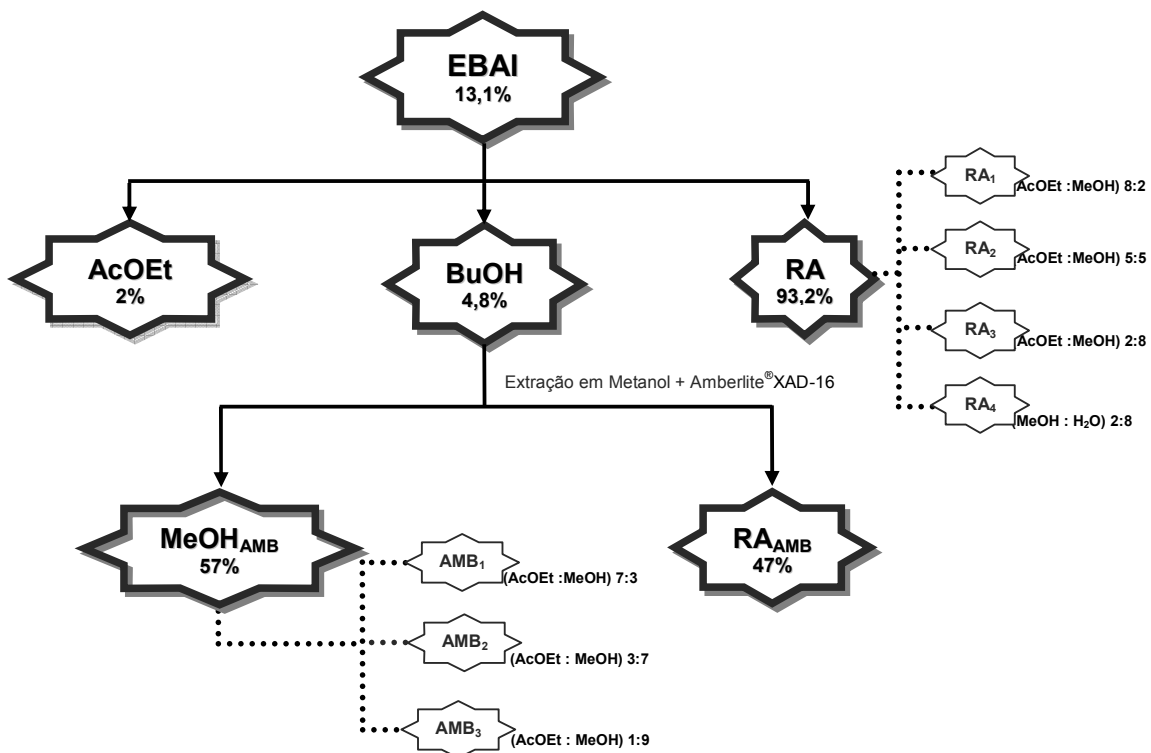
Durante o fracionamento biomonitorado, foram utilizados o extrato bruto aquoso e frações purificadas das folhas de *Cecropia glaziovii* Sneth, gentilmente fornecidos pelo Mestrando Geison Modesti Costa do Laboratório de Farmacognosia/CIF/CCS/UFSC, sob a orientação do Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto, a quem agradecemos esta frutífera colaboração. A seguir, há uma descrição sucinta do processo de obtenção do extrato e frações de *C. glaziovii* Sneth.

As folhas de *C. glaziovii* foram coletadas na localidade do Rio Vermelho no município de Florianópolis, Santa Catarina, no mês de março de 2007. O material vegetal foi identificado pelo botânico Prof. Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg e a exsicata está depositada no Herbário do Departamento de Botânica/CCB/UFSC, catalogada sob o número FLOR37143.

O material vegetal foi seco à temperatura ambiente e, então, moído para posterior preparação dos extratos. O extrato bruto aquoso foi obtido por infusão (EBAI), na proporção 1g (droga vegetal - folhas): 10 mL (líquido extrator), sendo que as folhas moídas foram deixadas em contato com água quente por um período de 30 min. Logo após, 600 mL deste extrato (EBAI) foi particionado com solventes de polaridade crescente [acetato de etila (3 x 200 mL) e n-butanol (3 x 200 mL)], fornecendo as frações AcOEt e n-BuOH, respectivamente. Considerando que, na fração n-BuOH concentram-se os metabólitos secundários de interesse (os C-glicosilflavonoides – TANAE et al. 2007), esta foi submetida a um processo de extração com metanol e em resina Amberlite® XAD-16, fornecendo uma fração metanólica rica em C-glicosilflavonoides (MeOH<sub>AMB</sub>) e um resíduo aquoso (RA<sub>AMB</sub>).

Aquelas frações que obtiveram um maior rendimento [Resíduo aquoso (RA) - 93,2%; e MeOH<sub>AMB</sub> - 57%] foram submetidas a uma purificação com misturas de solventes de diferentes polaridades. O fracionamento do extrato bruto aquoso (EBAI) e das frações purificadas, com seus respectivos rendimentos (%), está esquematizado na figura 6.

Os extratos e frações foram então liofilizados para posterior preparo das soluções-estoques a 5 mg/mL. Para isso, os materiais liofilizados foram exatamente pesados em balança analítica e dissolvidos em 1% de DMSO (Merck®) e, posteriormente, diluídos em meio MEM (*Minimal Essential Medium* – Cultilab®), acrescido de 1% de PSA (10.000 unidades de penicilina G, 10.000 µg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B – Cultilab®), filtrados assepticamente em filtro Millipore® 0,22 µm, aliqotados em tubos de 1 mL, e armazenados a -20°C até a realização dos ensaios.



**Figura 6:** Esquema do fracionamento do extrato bruto aquoso (EBAI) de *Cecropia glaziovii*.

## 4.2 Culturas celulares

### 4.2.1 Células

Foram utilizadas células VERO (ATCC:CCL 81 e Instituto Adolfo Lutz/SP) e GMK AH1 (Departamento de Virologia Clínica, Universidade de Göteborg, Suécia), ambas culturas contínuas de fibroblastos de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*), cultivadas a 37°C, em atmosfera umedecida de 5% de CO<sub>2</sub>. Estas células foram escolhidas por serem permissivas à replicação *in vitro* do HSV-1 e do HSV-2 respectivamente, possibilitando sua multiplicação e demonstrando efeito citopático visível ao microscópio invertido (HU; HSIUNG, 1989).

### 4.2.2. Meio de Cultura e Reagentes

O meio utilizado para o crescimento e manutenção das células foi o Meio MEM (*Minimal Essential Medium* – Cultilab<sup>®</sup>), acrescido de 0,22% de bicarbonato de sódio para que o pH permaneça entre 7,25 a 7,4. O MEM foi suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB – Cultilab<sup>®</sup>) na proporção de 10% para promoção do crescimento e 5% para manutenção das linhagens celulares. Para prevenir a contaminação das culturas de células por bactérias, fungos e leveduras foram adicionados ao meio 1% de PSA. Para obtenção de subculturas celulares, para manutenção das células e para realização dos experimentos, utilizou-se como agente dissociante, a tripsina (tripsina de pâncreas de porco preparada em uma solução de EDTA 1:250, Sigma<sup>®</sup>), que é uma enzima proteolítica que catalisa reações de quebra de cadeia polipeptídica em determinadas seqüências de aminoácidos.

## 4.3 Vírus

### 4.3.1. Origem das cepas virais

Os vírus utilizados foram Herpes Simplex Virus tipo 1 (HSV-1), cepa KOS (Faculdade de Farmácia, Universidade de Rennes, França), e Herpes Simplex Virus

tipo 2 (HSV-2), cepa 333 (Departamento de Virologia Clínica, Universidade de Göteborg, Suécia), ambos vírus DNA envelopados.

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

As suspensões-estoques virais foram preparadas conforme metodologia descrita por Simões e colaboradores (1999).

Suspensões virais já existentes foram inoculadas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo uma monocamada de células VERO para HSV-1 ou GMK AH1 para HSV-2, tripsinizadas 24 h antes da infecção. O meio de cultura foi aspirado e a monocamada celular foi lavada 3x com solução de tampão fosfato (PBS); após, o tapete celular foi inoculado com 1 mL da suspensão viral e o frasco incubado por 1 h a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub> para permitir a adsorção e penetração viral e, então, o excesso de vírus foi retirado por sucção a vácuo e 10 mL de meio MEM sem SFB foram adicionados. As condições de incubação foram as mesmas descritas acima.

O efeito citopático viral (ECP) foi monitorado por microscópio invertido a cada ciclo de replicação (18 h). Quando o tapete celular se mostrou totalmente infectado pelo vírus, o frasco foi congelado a -80°C e descongelado a 37°C 3x para o rompimento total das células e liberação das partículas virais. A suspensão foi centrifugada por 10 min a 350 Xg em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado em tubos estéreis, titulado e armazenado a -80°C até sua utilização.

O procedimento de preparação das suspensões virais foi realizado rotineiramente a fim de se obter estoques virais com alto título infeccioso.

#### **4.3.3 Determinação dos títulos infecciosos virais**

Antes de se iniciar os ensaios para avaliação da potencial atividade antiviral dos extratos, foi essencial obter inóculos virais com infecciosidade conhecida. A infecciosidade do vírus pode usualmente ser determinada como unidades formadoras de placas (UFP). O título infeccioso dos estoques virais do HSV-1 e HSV-2 foi determinado através do método de contagem das placas de lise, descrito por Burleson; Chambers e Wiedbrauk (1992).

Em todos os ensaios que utilizaram placas de 24 cavidades, estas foram previamente preparadas da seguinte maneira: suspensões de células VERO para

HSV-1 ou GMK AH1 para HSV-2, na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/cavidade, foram cultivadas em meio MEM, suplementado com 5% de SFB e 1% de PSA, e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em estufa de  $\text{CO}_2$  até a confluência (24h).

Após, o meio de cultura de cada cavidade foi aspirado cuidadosamente e a monocamada celular foi lavada com PBS. Essas células foram infectadas com 400 $\mu\text{L}$  da suspensão-estoque viral diluída (razão 1:10), em meio MEM com 1% de PSA sem SFB (três réplicas para cada diluição). As placas foram incubadas durante 1 h, tendo sido agitadas cuidadosamente a cada 15 min para uma melhor distribuição da suspensão viral. Após esse tempo, a suspensão viral foi aspirada e as células mais uma vez lavadas com PBS. A cada cavidade, foram adicionados 500 $\mu\text{L}$  de uma solução de CMC<sup>3</sup> (carboximetilcelulose). As placas foram novamente incubadas por 72 e 48 h para o HSV-1 e HSV-2, respectivamente. Após este período, o meio foi retirado e as células fixadas e coradas pela adição de 200  $\mu\text{L}$  do corante preto de naftaleno<sup>4</sup> por 40 min, à temperatura ambiente, em agitador horizontal. Após este tempo, o corante foi aspirado e as placas colocadas para secar a temperatura ambiente, sendo quantificadas através da visualização em microscópio estereoscópio. Para calcular o título, foram contados os focos de infecção na última diluição, que se caracterizam por áreas claras de lise celular, chamadas de placas.

O título viral foi calculado através da seguinte fórmula e expresso como sendo o número de unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL):

$$\frac{\text{Número de placas formadas na última diluição} \times \text{Recíproca da diluição}}{\text{Recíproca do volume}}$$

<sup>3</sup> **Preparo da solução de carboximetilcelulose:** Meio MEM 2X + solução aquosa a 1,5 % de carboximetilcelulose (Sigma<sup>®</sup>), na proporção 1:1, ambos previamente esterilizados e acrescidos de 1% de PSA.

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

## 4.4 Avaliação da citotoxicidade

Para avaliação da potencial atividade antiviral de uma amostra qualquer, é indispensável a avaliação prévia de sua possível toxicidade em relação as células permissivas ao vírus em estudo. Neste trabalho, foram utilizados dois ensaios colorimétricos quantitativos para a avaliação da viabilidade celular: um deles com o sal de tetrazólio (MTT), conforme proposto por Mosmann (1983), Sieuwerts et al. (1995), e padronizado no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC por Freitas (2001); e um ensaio que empregou o corante sulforrodamina B (SRB), conforme proposto por Skehan et al. (1990) e Vichai; Kirtikara (2006), e padronizado no referido laboratório pela autora desta dissertação.

### 4.4.1 Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio (MTT)

O sal de tetrazólio MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazólio] é um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, que o reduzem em suas mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto formazana de coloração azul-escuro, não solúvel em água, que fica armazenado no citoplasma celular. O ensaio colorimétrico com MTT é um método sensível e quantitativo, pois mede a quantidade de formazana formada através de espectrofotometria, onde o valor da absorbância obtido é proporcional ao número de células viáveis.

Uma suspensão de células VERO ou GMK AH1, contendo aproximadamente  $2,5 \times 10^5$  células/mL, obtida por tripsinização de um frasco de cultura celular, foi distribuída em uma placa de 96 cavidades (100µL/cavidade). A placa foi incubada por 24 h, a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub>. Após 24 h, com o tapete celular confluyente, o meio MEM foi substituído pelos diversos materiais-teste, em diferentes concentrações, através de diluições sucessivas na razão 1:2, e a placa foi incubada por 72 h. Depois desse período, o meio de cada cavidade foi substituído por 50 µL de uma solução de MTT<sup>5</sup> (1mg/mL), e a placa foi novamente incubada por 4 h. A

---

<sup>5</sup> **Preparo da solução-estoque de MTT:** foram utilizados 5 mg de MTT (Sigma®) para cada mL de PBS (p/v). Para uso, foi feita a diluição em meio MEM (1mg/mL).

solução de MTT foi então removida e substituída por 100 µL de DMSO/cavidade (Nuclear®) para dissolver os cristais de formazana. A placa foi agitada por 10 min à temperatura ambiente para que toda a formazana fosse dissolvida e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Bio-Tek, Elx 800) a 540 nm.

Os valores de absorbância medidos para cada concentração de cada material-teste, foram transformados em porcentagens de viabilidade (X%), em relação ao controle celular, o qual é considerado 100% viável, através da seguinte fórmula, onde DO= Densidade Óptica:

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

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

#### **4.4.2 Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sulforrodamina B (SRB)**

O ensaio com sulforrodamina B (SRB), proposto por Skehan et al. (1990) e padronizado pela autora desta dissertação, é um método *in vitro* utilizado para avaliação da citotoxicidade de amostras de origens diversas, que fundamenta-se na capacidade que este corante possui de ligar-se a componentes protéicos de células, previamente fixadas com ácido tricloroacético (TCA), possibilitando a quantificação da biomassa celular total.

Da mesma forma que no ensaio colorimétrico com o MTT, descrito no item 4.4.1, uma suspensão de células VERO ou GMK AH1, contendo aproximadamente  $2,5 \times 10^5$  células/mL, obtida por tripsinização de um frasco de cultura celular, foi distribuída em uma placa de 96 cavidades (100 µL/cavidade). A placa foi incubada por 24 h, a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub> e, após, o meio MEM foi substituído pelos

diversos materiais-teste, em diferentes concentrações, através de diluições sucessivas na razão 1:2, e a placa foi incubada por 72 h, nas mesmas condições de temperatura e CO<sub>2</sub>.

Após este período, sem remover o sobrenadante, as células foram fixadas através da adição de 100 µL de uma solução aquosa de TCA a 10% (p/v) em cada cavidade, e a placa foi incubada por 60 min a 4°C. Após, as cavidades foram lavadas, cuidadosamente, 4x com água destilada e deixadas 24 h à temperatura ambiente para secagem. Em seguida, as células fixadas foram coradas com 100 µL da solução ácida de sulforrodamina B<sup>6</sup> (0,057% p/v) por 30 min. O corante não ligado às proteínas foi removido através de quatro lavagens sucessivas com a solução aquosa de ácido acético a 1% (v/v), e a placa foi seca novamente por 24 h. A partir de então, procedeu-se a extração do corante ligado às proteínas, com a adição de 100 µL, em cada cavidade, de solução tampão de Tris Base 10 mM (pH 10,5)<sup>7</sup>. A placa foi agitada por 10 min à temperatura ambiente para que todo o corante fosse dissolvido e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Bio-Tek, Elx 800) a 510 nm.

Os valores de absorbância e o cálculo dos resultados seguiram as mesmas orientações dispostas no item 4.4.1.

## 4.5 Avaliação da potencial atividade antiviral

### 4.5.1 Ensaio de inibição da formação das placas de lise

Através deste ensaio, foram testados os diferentes extratos durante a triagem anti-herpética (*Laurencia flagellifera*; *L. microcladia*; *Passiflora edulis*; *Dodonea viscosa*; *Musa* sp.; *Eupatorium bupleurifolium*, *E. rufescens*, *E. serratum*, *E. tanacetifolium*; *Calea phyllolepis* e *Cecropia glaziovii*), bem como as frações purificadas de *C. glaziovii* durante o processo de fracionamento biomonitorado. Foi utilizado como controle positivo, para HSV-1 e HSV-2, o fármaco aciclovir (Fundação Oswaldo Cruz / Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS). As

---

<sup>6</sup> **Preparo da solução ácida de Sulforrodamina B:** 57 mg de Sulforrodamina B (Sigma<sup>®</sup>) foram dissolvidos em 100 mL de uma solução aquosa a 1% de ácido acético (v/v)(Merck<sup>®</sup>).

<sup>7</sup> **Preparo da solução Tris-Base 10 mM:** 242,2 mg de Tris-Base (Sigma<sup>®</sup>) foram dissolvidos em 200 mL de água ultra-pura, e o pH foi ajustado até 10,5.



amostras e o controle positivo (10 µg/mL) foram dissolvidos em solução de CMC (preparada conforme descrito no item 4.3.3), em concentrações específicas para o processo de triagem (tabela 2), e para a determinação da  $CI_{50}$ , nas concentrações de 4,00 a 500,00 µg/mL, em diluições seriadas na razão 1:2. Além disso, para cada ensaio foram realizados controles virais, onde as células foram apenas infectadas, porém não tratadas, e controles celulares, onde as células não foram infectadas nem tratadas. Este ensaio foi realizado conforme metodologia proposta por De Logu et al. (2000), com pequenas modificações.

Células VERO ou GMK AH1 foram cultivadas em placas de 24 cavidades ( $2,5 \times 10^5$  células/cavidade) e incubadas a 37°C, 5% de  $CO_2$  até a confluência (24 h). O meio foi aspirado cuidadosamente com auxílio de vácuo, preservando-se a integridade da monocamada celular e foram feitas três lavagens com PBS. Após a lavagem, as placas foram infectadas com as suspensões de HSV-1 (cepa KOS) ou de HSV-2 (cepa 333) (100 UFP/cavidade), exceto nos controles celulares. Após 1 h de adsorção a 37°C e 5%  $CO_2$ , as células foram novamente lavadas com PBS e, então, adicionou-se 500 µL da solução de CMC contendo os diferentes materiais-teste. Os controles virais e celulares receberam apenas 500 µL da solução de diluição das amostras (solução de CMC a qual foi descrita no item 4.3.3) e foram incubados por 72 h (para o HSV-1) ou 48 h (para HSV-2), a 37°C e 5% de  $CO_2$ . Passado este período, o meio contendo o material-teste foi aspirado e as células coradas com 200 µL de solução de preto de naftaleno (preparada conforme descrito no item 4.3.3). Após 40 min, à temperatura ambiente e em agitador horizontal, o corante foi aspirado e as placas contadas através da visualização em microscópio estereoscópio. A porcentagem de inibição da replicação viral de cada material-teste, com relação aos controles virais, foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \left( 1 - \frac{\text{N}^\circ \text{ de Placas}_{\text{material-teste}}}{\text{N}^\circ \text{ de Placas}_{\text{controle viral}}} \right) \times 100$$

Em seguida, os percentuais calculados foram inseridos em um gráfico, e através da análise de regressão linear, foi possível calcular os valores de  $CI_{50}$ , ou seja, a concentração de cada amostra que inibiu 50% a infecção viral. Os valores de  $CI_{50}$  representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

Com posse dos valores de  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$  foi possível calcular o índice de seletividade (IS) de cada amostra em relação a cada cepa viral utilizada, através da seguinte fórmula:

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

#### **4.6 Avaliação do provável mecanismo da ação anti-herpética dos extratos e frações obtidos a partir de *Cecropia glaziovii***

##### **4.6.1 Avaliação da ação virucida direta**

Este ensaio foi conduzido para determinar se as amostras que foram ativas quando avaliadas pelo método de inibição da formação das placas de lise, são capazes de inativar os vírus na ausência de células, ou seja, avaliar a ação direta da amostra sobre as partículas virais, e sua conseqüente diminuição da capacidade infectante dos vírus estudados.

O ensaio foi realizado conforme proposto por Ekblad et al. (2006), com pequenas modificações. As misturas de 50  $\mu$ L da suspensão viral contendo  $4 \times 10^4$  UFP de HSV-1 ou HSV-2, e 50  $\mu$ L das diferentes concentrações dos materiais-teste (diluídos em MEM sem SFB, razão 1:2) ou 50  $\mu$ L de MEM (controle viral) foram homogeneizadas e incubadas por 15 min a 37°C em banho-maria, ou a 4°C em geladeira. Decorrido este período, foi realizada a diluição das misturas (1:100 ou 1:200) a fim de se obter a concentração não inibitória das amostras, utilizando-se MEM gelado com 1% de PSA. Placas de 24 cavidades, contendo uma monocamada celular confluyente (24 h) de células VERO (para HSV-1) ou GMK AH1 (para HSV-2) foram lavadas 3x com PBS; o tampão foi aspirado e 400  $\mu$ L de cada diluição (1:100 ou 1:200) foram distribuídos nas placas, que foram, então, incubadas por 60 min a 37°C e 5% de  $CO_2$ . Após esse tempo, as diluições foram retiradas, as monocamadas celulares lavadas com PBS e recobertas com 500  $\mu$ L da solução de CMC. As placas foram incubadas a 37°C durante 72 h para o HSV-1 e 48 h para o HSV-2. Após esse período, a solução de CMC foi retirada e as células fixadas e coradas com a solução de preto de naftaleno (cujo preparo foi descrito no item 4.3.3) e as placas de lise foram contadas com auxílio de microscópio estereoscópio. De

posse dos números das placas de lise, nos diferentes tratamentos e nos controles virais, foi possível determinar a infecciosidade residual (IR) em % das diluições das amostras, através da seguinte fórmula, onde Md = média:

$$IR = \frac{N^{\circ} \text{ de Placas}_{\text{material-teste}}}{Md N^{\circ} \text{ de Placas}_{\text{controle viral}}} \times 100$$

Em seguida, os percentuais calculados foram inseridos em um gráfico, e através da análise de regressão, foi possível calcular os valores de  $CV_{50}$ , ou seja, a concentração de cada amostra que foi virucida para 50% dos vírions.

#### **4.6.1.1 Atividade virucida da subfração $AMB_2$ na presença de soluções ricas em proteínas**

O efeito de soluções ricas em proteínas na inativação do HSV-2 pela subfração  $AMB_2$ , foi avaliado conforme descrito previamente por Ekblad et al. (2006), com pequenas modificações.

Volumes equivalentes (25  $\mu$ L) da subfração  $AMB_2$ , na concentração de 90,60  $\mu$ g/mL<sup>8</sup>, e de diferentes diluições seriadas (razão 1:10) de uma solução de BSA (Albumina Sérica Bovina – 0,00005 a 0,5%) ou de uma solução de SFB (0,0005 a 5%), foram misturados em tubos e incubados por 5 min, à temperatura ambiente. Após, foram adicionados  $4 \times 10^4$  UFP de HSV-2 (cepa 333) em 50  $\mu$ L de meio MEM sem SFB e incubados por mais 15 min a 37°C. Controles virais foram feitos usando-se 50  $\mu$ L de meio MEM + 50  $\mu$ L da suspensão viral contendo  $4 \times 10^4$  UFP do HSV-2, e também controles usando-se 50  $\mu$ L das diferentes concentrações das soluções protéicas + 50  $\mu$ L da mesma suspensão viral. Decorrido este período, foi realizada a diluição das misturas (1:100) a fim de se obter a concentração não inibitória da subfração, utilizando-se MEM gelado com 1% de PSA. Placas de 24 cavidades, contendo uma monocamada celular confluenta (24 h) de células GMK AH1, foram lavadas 3x com PBS, o tampão foi aspirado e 400  $\mu$ L de cada diluição (1:100) foram distribuídos nas placas, que foram, então, incubadas por 60 min a

<sup>8</sup> A concentração residual da subfração  $AMB_2$  é de 22,65  $\mu$ g/mL, considerando-se que a mesma é reduzida 4x com a adição de volumes equivalentes de solução protéica e suspensão viral, no decorrer do experimento.

37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, as diluições foram retiradas, as monocamadas celulares lavadas com PBS e recobertas com 500 µL da solução de CMC. Após 48 h de incubação a 37°C, a solução de CMC foi retirada, as células coradas com a solução de preto de naftaleno e as placas de lise foram contadas com auxílio de microscópio estereoscópio. De posse dos números das placas de lise nos diferentes tratamentos e nos controles virais, foi possível determinar o percentual (%) de inibição da infecciosidade residual exercida pela subfração AMB<sub>2</sub>, na presença de diferentes soluções protéicas, através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 1 - \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de Placas}_{\text{material-teste}}}{\text{N}^{\circ} \text{ de Placas}_{\text{controle viral}}} \times 100$$

#### 4.6.2 Avaliação do efeito dos materiais-teste na adsorção viral

Este ensaio foi realizado para avaliar se as amostras foram capazes de inibir a adsorção viral. Foram conduzidos, em parte, a 4°C, temperatura na qual os vírus adsorvem nas células, mas não as penetram.

##### 4.6.2.1 Ensaio de adsorção tradicional

Este ensaio seguiu os procedimentos descritos por Cheng et al. (2004), com algumas modificações. Monocamadas celulares confluentes (células VERO ou GMK AH1) foram previamente resfriadas a 4°C por 30 min em geladeira. Nesse período, foram feitas as diluições das amostras nas concentrações de 0,40 a 100,00 µg/mL<sup>9</sup>, que foram misturadas a volumes equivalentes de suspensão viral contendo 100 UFP. Após, o meio das placas resfriadas foi aspirado e as células lavadas 1x com PBS gelado, antes da adição de 500 µL das misturas diluição do material-teste/suspensão viral, e as placas foram novamente incubadas a 4°C por mais 2 h. No mesmo experimento, foram feitos controles celulares (apenas meio de cultura) e controles virais (suspensão viral contendo 100 UFP). Após o período de adsorção a

<sup>9</sup> As concentrações das amostras reduzem-se pela metade ao se adicionar volumes equivalentes de suspensão viral. Portanto, as concentrações testadas correspondem de 0,20 a 50,00 µg/mL.

4°C, os materiais-teste e a suspensão viral foram aspirados e as células lavadas 2x com PBS gelado para retirar os vírus não adsorvidos e o restante dos materiais-teste. Para controlar a metodologia empregada, foi realizado a lavagem de um dos controles virais com solução de tampão citrato<sup>10</sup> (pH 3,0). Neste valor de pH, ocorre uma desestabilização das partículas virais adsorvidas nas membranas celulares, fazendo com que sejam liberadas e eliminadas após aspiração e lavagem. Teoricamente, não deve haver penetração até este ponto do ensaio, uma vez que a temperatura de 4°C foi empregada, o que se reflete na ausência de placas de lise neste controle viral lavado com a solução de tampão citrato.

Na seqüência do ensaio, 500 µL da solução de CMC (preparado conforme descrito no item 4.3.3) foram adicionados cuidadosamente às monocamadas celulares e as placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 72 e 48 h para o HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333), respectivamente. O restante do método seguiu as orientações dispostas no item 4.5.1.

#### 4.6.2.2 Ensaio de pós-adsorção

Este ensaio foi realizado para verificar a possível interferência das amostras sobre as partículas virais que já estejam estavelmente adsorvidas nas células. Esta metodologia seguiu as orientações de Piret et al. (2002), com pequenas modificações.

Diferentemente do ensaio anterior, onde misturas dos materiais-teste e da suspensão viral foram adsorvidos por 2 h a 4°C, neste experimento, células resfriadas por 30 min a 4°C, foram primeiramente infectadas com uma suspensão viral contendo 100 UFP de HSV-1 ou HSV-2 (células VERO ou GMK AH1, respectivamente) e mantidas em geladeira a 4°C por 2 h para permitir a adsorção. Decorrido este período, as células foram lavadas 2x com PBS para retirar os vírus não adsorvidos e foram adicionados 400 µL de diferentes concentrações dos materiais-teste diluídos seriadamente (razão 1:2) em meio MEM sem SFB, e incubadas por mais 2 h a 4°C. Após este período, as células foram novamente lavadas 2x com PBS. Da mesma forma que no ensaio anterior, foram feitos controles

---

<sup>10</sup> **Preparo da solução tampão citrato:** 4,2 g de ácido cítrico (Carlo Erba®), 0,375 g de KCl (Sigma®) e 4,0 g de NaCl (Sigma®) foram dissolvidos em 500 mL de água ultra-pura e filtrados com auxílio de papel filtro. O pH foi ajustado para 3,0, a solução esterilizada por autoclavagem a 121°C e armazenada em geladeira a 4°C até o uso.

celulares, controles virais e um controle da metodologia, através da lavagem com solução de tampão citrato. O restante do procedimento seguiu orientações dispostas no item anterior (4.6.2.1).

#### **4.6.3 Avaliação do efeito da subfração AMB<sub>2</sub> na penetração viral**

Considerando que os vírus adsorvem nas células a 4°C, mas apenas as penetram quando a temperatura é aumentada (McCLAIN; FULLER, 1994), o efeito da subfração AMB<sub>2</sub> na penetração do HSV-1 em células VERO, e do HSV-2 em células GMK AH1, foi examinado como descrito previamente por Piret et al. (2002) e Su et al. (2008), com algumas modificações.

Neste sentido, placas com monocamada celular confluyente (células VERO ou GMK AH1) foram previamente resfriadas a 4°C, por 30 min em geladeira, infectadas com 100 UFP de HSV-1 ou HSV-2 e incubadas por 2 h a 4°C para ocorrer a adsorção. Decorrido este período, as células foram lavadas com PBS gelado para remover partículas virais não adsorvidas, e a temperatura do experimento foi rapidamente elevada por incubação das placas em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 5 min para maximizar a penetração viral. Após, foram adicionados 400 µL de diferentes concentrações da subfração AMB<sub>2</sub>, da heparina e do aciclovir diluídos em meio MEM sem SFB (razão 1:2). Para cada ensaio, foram efetuados os controles virais, onde as células foram infectadas e não tratadas, e os controles celulares, onde as células não foram infectadas nem tratadas.

Em seguida, as placas foram recolocadas na estufa (tempo zero) e as amostras permaneceram em contato com as células durante todo o tempo de penetração (até 60 min). Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e com solução de tampão citrato (pH 3,0) a 37°C por 1 min, para inativar vírions que supostamente não penetraram nas células até este período. O pH foi normalizado através de uma lavagem subsequente com PBS pH 7,0. As células receberam, então, 500 µL da solução de CMC, e os procedimentos seguintes foram os mesmos descritos no item 4.5.1.

#### 4.6.4 Avaliação do efeito da subfração AMB<sub>2</sub> na redução do tamanho das placas de lise

Considerando que a redução do tamanho da placa de lise é um bom indicativo para a inibição da dispersão radial dos vírus herpéticos célula à célula (JENSSEN et al., 2008), foi realizado um ensaio para verificar se os materiais-teste exerciam efeito na propagação viral intercelular, diminuindo a área das placas de lise formadas. Neste ensaio, foi testada a subfração AMB<sub>2</sub> e o aciclovir (controle negativo). Com relação aos vírus, foram utilizados o HSV-1 (cepa KOS) e o HSV-2 (cepa 333). Foram empregadas as mesmas placas de 24 cavidades obtidas nos experimentos descritos no item 4.5.1, e o procedimento de leitura seguiu as orientações propostas por Nyberg et al. (2004) e Kratz et al. (2008).

Imagens de 20 placas de lise de cada concentração dos materiais-teste foram capturadas usando-se uma câmera digital colorida refrigerada de 3,3 megapixels, acoplada ao microscópio de luz Olympus BX41<sup>®</sup>. O programa utilizado para a captura das imagens foi o Q-capture PRO 5.1 da Q-imaging<sup>®</sup>. As áreas médias de cada concentração foram determinadas através do programa Image J<sup>®</sup> versão 1.41, expressas como média  $\pm$  desvio padrão e comparadas com a área dos controles virais.

#### 4.6.5 Avaliação do efeito do tempo de adição da subfração AMB<sub>2</sub> no ciclo de replicação viral

A atividade antiviral da subfração AMB<sub>2</sub> (40 e 60  $\mu\text{g/mL}$ ) foi avaliada em vários períodos de tempo, de acordo com a técnica descrita por Carlucci et al. (1999). Como controle, foi empregado o aciclovir na concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$ . Células VERO ou GMK AH1 foram cultivadas em placas de 24 cavidades com meio MEM, suplementado com 5% de SFB e 1% de PSA até atingirem confluência (24 h). Diferentes tratamentos foram então realizados:

- **Pré-tratamento – 3 h antes da infecção:** a subfração AMB<sub>2</sub> foi diluída nas concentrações adequadas em meio MEM + 1% de PSA e adicionada às células. Após 3 h de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, a amostra foi aspirada, a monocamada celular foi lavada com PBS e uma suspensão viral contendo 100 UFP de HSV-1 ou HSV-2 foi adicionada às células; a placa foi incubada por mais 1 h, e

após, o inóculo viral foi aspirado e as células novamente lavadas com PBS. Posteriormente, 500 µL da solução de CMC foram adicionados cuidadosamente e a placa foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 72 ou 48 h para o HSV-1 ou HSV-2 respectivamente, e, após esse período, a placa foi tratada conforme procedimento descrito no item 4.5.1.

- **Tratamento simultâneo – tempo zero (T<sub>0</sub>):** a subfração AMB<sub>2</sub>, diluída nas concentrações adequadas em meio MEM + 1% de PSA, foi adicionada às monocamadas celulares concomitantemente com uma suspensão viral contendo 100 UFP de HSV-1 ou HSV-2. A placa foi incubada por 1 h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, e após esse período, a mistura foi aspirada, as células foram lavadas com PBS e 500 µL da solução de CMC foram adicionados cuidadosamente. A placa foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 72 ou 48 h para o HSV-1 ou HSV-2 respectivamente, e, após esse período, a mesma foi tratada conforme procedimento descrito no item 4.5.1.

- **Tratamento pós-infecção:** a monocamada celular foi infectada com 400 µL de uma suspensão viral contendo 100 UFP de HSV-1 ou HSV-2. Uma hora após a infecção, a suspensão viral foi aspirada, as células foram lavadas com PBS e adicionou-se 500 µL de uma solução de CMC + subfração nas concentrações especificadas acima para o tempo 1 h (t<sub>1</sub>); após, a placa foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C, até completar o período de 72 ou 48 h (HSV-1 ou HSV-2 respectivamente).

- **Demais tempos:** as células receberam apenas 500 µL da solução de CMC e a placa foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Nos tempos subseqüentes 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18 e 24 h após a infecção, essa solução foi aspirada e as células foram tratadas com a subfração AMB<sub>2</sub> diluída em solução de CMC. A placa foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C, até completar o período de 72 ou 48 h (HSV-1 ou HSV-2, respectivamente).

#### 4.6.6 Avaliação da expressão das proteínas virais

A avaliação das proteínas virais expressas pelo HSV-1 (cepa KOS) foi conduzida através de um ensaio de *Western blotting*, segundo procedimento descrito por Kuo et al. (2001), com algumas modificações.



Células VERO, em uma densidade aproximada de  $6 \times 10^5$  células/cavidade, foram cultivadas em placas de 6 cavidades com meio MEM, suplementado com 5% de SFB e 1% de PSA até atingirem confluência. Após 24 h, as células foram incubadas ou não (controle celular) com 2 mL de uma suspensão viral do HSV-1 (cepa KOS) com MOI<sup>11</sup> de 0,1 por 1 h a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas 3x com 1 mL de PBS e, então, foram adicionados 2 mL da subfração AMB<sub>2</sub> em duas concentrações distintas (40 e 60 µg/mL) e 2 mL de meio MEM nos controles viral e celular. Além disso, duas cavidades foram reservadas para adição dos 2 mL da subfração AMB<sub>2</sub> (40 e 60 µg/mL) apenas 3 h P.I. As placas foram incubadas a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub>, durante 18 h (1 ciclo de replicação viral). Após este período, o meio foi retirado, as células foram lavadas 2x com 2 mL de PBS e foram adicionados 150 µL de tampão de lise [2% dodecil sulfato de sódio (SDS); 5% β-mercaptoetanol; 0,125 M Tris-HCl; 30% de glicerol; 0,8% de azul de bromofenol e 100 µg/mL de fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF)]. As amostras foram transferidas para tubos do tipo eppendorf®, fervidas durante 5 min a 100°C e centrifugadas a 10000 Xg por 10 min (a 4°C). Após a centrifugação, as amostras foram transferidas para novos tubos e armazenadas a -20°C. A determinação da concentração protéica foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

As proteínas (aproximadamente 50 µg) foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e SDS 0,1% (SDS-PAGE). Em seguida as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (GE Healthcare®) em tampão de transferência<sup>12</sup>, *over night*, a 100 V e a 4°C. Na seqüência, as membranas foram bloqueadas por 1 h com 5% de leite desnatado em solução de *Blotting Buffer*<sup>13</sup>, lavadas 5x, 6 min, com esta mesma solução, e incubadas por 90 min, à temperatura ambiente, separadamente, com os seguintes anticorpos primários diluídos 1:1000 em solução de *Blotting buffer* contendo 2% de leite desnatado: anticorpo policlonal de cabra contra ICP27, proteína de fase α do HSV-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); anticorpo monoclonal de cabra

---

<sup>11</sup> **MOI**: significa multiplicidade de infecção (*multiplicity of infection*). É a razão entre o número de partículas virais infecciosas usadas para infectar um determinado número de células.

<sup>12</sup> **Preparo do Tampão de Transferência**: 25 mM de Tris Base (Sigma®) e 192 mM de Glicina (Amresco®) foram dissolvidos em 100 mL de uma solução aquosa a 20% de metanol (v/v).

<sup>13</sup> **Preparo da solução de Blotting Buffer**: 25 mM de Tris Base, pH 7,4 (Sigma®), 0,15 M de NaCl (Amresco®) e 0,1 % de Tween 20 (Usb®) foram dissolvidos em 1000 mL de água ultra-pura e o tampão foi armazenado a 4°C até o uso.

contra  $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); anticorpo monoclonal de camundongo contra gD, proteína de fase  $\gamma$  do HSV-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); anticorpo monoclonal de camundongo contra gE, proteína de fase  $\gamma$  do HSV-1 (SJOGREN-JANSON; JEANSSON, 1985; 1990).

Após este período, as membranas foram lavadas 5x, 6 min, com a solução de *blotting buffer* e incubadas, durante 1 h, à temperatura ambiente, com os anticorpos secundários, de acordo com a origem do anticorpo primário: IgG anticabra (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluído 1:5000 em *blotting buffer* contendo 2% de leite desnatado e IgG anticamundongo (Immunology Consultants Laboratory, ICL, USA) também diluído 1:5000 em *blotting buffer* com 2% de leite desnatado. Os anticorpos secundários estavam conjugados à peroxidase. Após o período de incubação, as membranas foram lavadas 5x, 6 min, com a solução de *blotting buffer* e detectados por um sistema de quimioluminescência – ECL (*Enhanced chemiluminescence*).

#### **4.7 Delineamento experimental e análise estatística**

Um delineamento de blocos completos casualizados (BCC) e um arranjo fatorial dos tratamentos foram empregados, tanto na avaliação da citotoxicidade como na avaliação da potencial atividade antiviral (SOKAL; ROHLF, 1995), onde cada cavidade da placa constituiu uma unidade experimental e os tratamentos foram as diferentes concentrações das diferentes amostras testadas, frente aos vírus HSV-1 e HSV-2. Os tratamentos e os controles foram distribuídos aleatoriamente entre as cavidades da placa, e as repetições (três) ficaram em placas diferentes, pois foram realizadas em dias subseqüentes, garantindo a casualização. Cada placa correspondeu a um bloco, permitindo uma melhor avaliação das possíveis variações entre as repetições.

O estudo de qualquer atividade farmacológica em cultura celular tem como vantagem, entre muitas outras, a homogeneidade das amostras. Um erro grave que normalmente é cometido quando se trata de experimentos realizados em placas de microtitulação, é acreditar que, colocando-se as mesmas concentrações de uma amostra, em duas ou três colunas na placa, se estaria fazendo uma duplicata ou triplicata. Estatisticamente, este procedimento é considerado apenas uma réplica de

um mesmo tratamento e não uma repetição, pois a variância devido a fatores externos (erro experimental) não estaria sendo levada em consideração (SOKAL; ROHLF, 1995). Por isso, foram realizados dois ou três experimentos independentes, em dias subseqüentes, o que caracteriza uma triplicata.

Para calcular os valores de  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$ , realizou-se uma análise de regressão linear, a partir de curvas de concentração *versus* efeito, e, os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata, sendo os resultados expressos como a média  $\pm$  desvio-padrão ou média  $\pm$  coeficiente de variação. As diferenças estatisticamente significativas ou não dos tratamentos, com relação aos controles virais, foram analisadas através do teste de Dunett e para separação de médias foi empregado o teste de Tukey ou SNK, utilizando o programa GraphPad InStat<sup>®</sup>.

#### **4.8 Determinação dos teores de compostos fenólicos totais e de flavonoides totais de *Cecropia glaziovii* por espectrofotometria UV/VIS**

##### **4.8.1 Compostos fenólicos totais**

A avaliação do teor de compostos fenólicos totais presentes no extrato bruto e frações resultantes do processo de fracionamento biomonitorado de *C. glaziovii* foi conduzida segundo procedimento descrito por Naithani et al. (2006) e Liu et al. (2008), com algumas modificações. Os materiais-teste analisados foram o extrato bruto aquoso obtido por infusão (EBAI) e suas respectivas frações purificadas AcOEt, n-BuOH, RA e MeOH<sub>AMB</sub>, cujo processo de obtenção foi descrito no item 4.1.

O ensaio baseia-se na redução do íon fosfomolibdato do reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma<sup>®</sup>) pelo íon fenolato da amostra, formando compostos cromógenos, que podem ser detectados espectrofotometricamente. O teor de compostos fenólicos totais foi expresso como equivalentes de ácido gálico (GAE) em mg/g de amostra, transformados em percentual (%).

Primeiramente, foi realizada uma curva de calibração utilizando-se soluções de concentrações conhecidas do ácido gálico (100, 300, 500, 750 e 1000  $\mu$ g/mL) e submetidas ao mesmo procedimento descrito abaixo. Em balões volumétricos de 10,00 mL, foram adicionados 6,00 mL de água destilada, 100  $\mu$ L de uma solução aquosa do material-teste a 2 mg/mL, e 500  $\mu$ L do reagente de Folin-Ciocalteu<sup>®</sup>. Um

balão referente ao branco foi preparado apenas com água destilada e 500 µL do reagente. Após 3 min, foram adicionados 1,50 mL da solução aquosa de carbonato de sódio<sup>14</sup> (20% p/v) e, então, o volume dos balões volumétricos foram completados para 10,00 mL com água destilada. Após 2 h de incubação à temperatura ambiente, foram medidas as absorvâncias das amostras em espectrofotômetro UV/VIS (PerkinElmer®, Lambda 25 UV/VIS) a 760 nm contra o branco e, posteriormente, comparadas com a curva de calibração do ácido gálico. Os dados representam a média de duas análises independentes ± coeficiente de variação.

#### 4.8.2 Flavonoides totais

Da mesma forma que no experimento para determinação do teor de compostos fenólicos totais, os materiais-teste analisados foram o extrato bruto aquoso obtido por infusão (EBAI) e suas respectivas frações purificadas AcOEt, n-BuOH, RA e MeOH<sub>AMB</sub> de *C.glaziovii*, acrescido das subfrações AMB<sub>1</sub>, AMB<sub>2</sub> e AMB<sub>3</sub>, cujo processo de obtenção foi descrito no item 4.1. Esta análise foi baseada no método descrito por Miliauskas et al. (2004) e por Tunalier et al. (2007).

Em um balão volumétrico com capacidade para 25,00 mL, foram misturados 1,00 mL da diluição do material-teste a 10 mg/mL + 1,00 mL da solução etanólica de AlCl<sub>3</sub><sup>15</sup> na concentração de 20 mg/mL (p/v) e, a seguir, foram diluídos com etanol (Nuclear®) até 25,00 mL. A absorvância foi medida a 415 nm em espectrofotômetro UV/VIS (PerkinElmer®, Lambda 25 UV/VIS) após 40 min de incubação à temperatura ambiente. Para o preparo dos brancos, foram misturados 1,00 mL da diluição dos materiais-teste (10 mg/mL) + 1 gota de ácido acético glacial (Nuclear®), que foram posteriormente diluídos em etanol (balão volumétrico de 25,00 mL). A curva de calibração foi previamente realizada com soluções de várias concentrações de rutina (50, 100, 150, 250, 350, 500, 1000 e 1500 µg/mL) submetidas ao mesmo procedimento. O teor de flavonoides totais foi expresso como equivalentes de rutina em mg/g de amostra, transformados em percentual (%). Os dados representam a média de duas análises independentes ± coeficiente de variação.

---

<sup>14</sup> **Preparo da solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>):** 20 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Vetec®) foram pesados, dissolvidos em 100 mL de água destilada e a solução foi estocada a 4°C até o uso.

<sup>15</sup> **Preparo da solução de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>):** 20 g de AlCl<sub>3</sub> (Vetec®) foram pesados, dissolvidos em 100 mL de álcool etílico (Nuclear®) e a solução foi estocada a 4°C até o uso.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação dos títulos infecciosos virais

Os títulos infecciosos das suspensões-estoques virais foram determinados conforme a metodologia descrita no item 4.3.3. No decorrer do trabalho, foram utilizadas duas suspensões-estoques de cada vírus, preparadas de acordo com as orientações descritas no item 4.3.2. Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 1.

**Tabela 1:** Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados.

Vírus	Suspensão estoque viral	Título (UFP/mL)
HSV-1 (cepa KOS)	1	$4,25 \times 10^7$
	2	$1,53 \times 10^6$
HSV-2 (cepa 333)	1	$8,00 \times 10^4$
	2	$7,75 \times 10^6$

### 5.2 Triagem da potencial atividade antiviral

#### 5.2.1 Avaliação da citotoxicidade

O fármaco antiviral ideal é aquele que inibe somente a(s) etapa(s) do ciclo de replicação viral, sem interferir na célula hospedeira, possibilitando que esta se recupere da infecção e mantenha sua atividade metabólica normal. Na pesquisa de novos fármacos antivirais, de origem natural ou sintética, deve-se considerar seus efeitos tóxicos sobre as células hospedeiras, pois se os mesmos forem excessivamente tóxicos, a sua utilização passa a ser inviável, mesmo apresentando uma ação antiviral significativa (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGUE, 1997; HUDSON; TOWERS, 1999).

O estudo da citotoxicidade dos extratos e frações frente à células VERO e GMK AH1 anteriormente ao processo de triagem anti-herpética, foi realizado utilizando-se o ensaio colorimétrico do MTT descrito no item 4.4.1, e para cada material testado, foram calculados os valores de  $CC_{50}$ , após 72 h de incubação, como pode ser observado nas tabelas 2 e 3 (páginas 71 e 72).

### **5.2.2 Avaliação da atividade antiviral pelo ensaio de inibição da formação das placas de lise**

O ensaio de redução das placas de lise é considerado o “padrão ouro” para a medida quantitativa de infecções virais (HUDSON; TOWERS, 1999; JEFFERY; PILLAY, 2004). Este método foi desenvolvido originalmente para o estudo de bacteriófagos por d’Herelle no início do século passado, tendo sido adaptado para vírus animais por Dubelcco e Vogt, em 1953. Este avanço revolucionou a virologia animal, introduzindo uma metodologia relativamente simples e precisamente quantitativa, a qual baseia-se na habilidade das partículas infecciosas virais de causar uma área macroscópica de efeito citopático em uma monocamada celular normal. Especificamente, se uma célula na monocamada é infectada por uma partícula viral, novos vírus resultantes da infecção inicial podem infectar células ao redor desta primeira e assim por diante. Após um determinado período de tempo, que depende 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 usado para revelação auxilia na visualização e contagem das placas (CONDIT, 2007).

As partículas virais, ao serem liberadas de células infectadas, vão originalmente infectar as células adjacentes. Quando células infectadas são recobertas por um meio de cultura semi-sólido, ou seja, meio de cultura acrescido de um agente espessante (CMC, por exemplo), previne-se a formação de placas de lise secundárias, que surgem através da difusão do vírus do local original da infecção para novos locais, assegurando desta forma que cada placa de lise foi formada por uma única partícula infecciosa do inóculo inicial, permitindo a determinação dos títulos de suspensões virais, e a avaliação da atividade antiviral de diferentes amostras, através da contagem do número de placas e do cálculo da inibição da formação das placas de lise, respectivamente (CONDIT, 2007).

Neste trabalho, extratos de onze diferentes táxons da biodiversidade brasileira e suas frações foram investigados em relação à sua potencial atividade antiviral contra o HSV-1 (cepa KOS) e o HSV-2 (cepa 333). Na primeira etapa da triagem anti-herpética, foi empregada uma concentração conhecidamente não citotóxica dos extratos e frações, e os resultados foram expressos como % de inibição da infecção viral, conforme demonstrado na tabela 2.

**Tabela 2:** Resultados da triagem da potencial atividade anti-herpética dos extratos, através do método de inibição da formação das placas de lise.

Extrato	Líquido Extrator	Parte utilizada	Concentração Testada (µg/mL)	% de Inibição	
				HSV-1 (cepa KOS)	HSV-2 (cepa 333)
<i>Laurencia flagellifera</i>	Água	Folhas	500	<b>97,5 ± 0,9</b>	<b>56,6 ± 3,6</b>
	Acetato de etila	Folhas	250	SI	SI
<i>Laurencia microcladia</i>	Água	Folhas	140	32,6 ± 7,7	22,7 ± 6,3
	Acetato de etila	Folhas	37	SI	SI
<i>Passiflora edulis</i>	Diclorometano	Raízes	250	<b>91,7 ± 8,3</b>	<b>55,5 ± 2,05</b>
	Acetato de etila	Raízes	500	SI	SI
	n-Butanol	Raízes	500	SI	5,2 ± 5
<i>Dodonea viscosa</i>	Etanol	Sementes	31,25	2,5 ± 2,5	SI
	Etanol	Folhas	1000	<b>100 ± 0</b>	<b>93,7 ± 5,125</b>
<i>Musa sp.</i>	Água	Folhas	1000	SI	SI
<i>Eupatorium bupleurifolium</i>	Resíduo Aquoso	Folhas e flores	250	<b>92,8 ± 0,8</b>	<b>68,2 ± 1,3</b>
	Extrato bruto*	Folhas e flores	250	<b>99,3 ± 0,7</b>	<b>70,2 ± 1,6</b>
<i>Eupatorium rufescens</i>	Resíduo Aquoso	Folhas	500	<b>95,6 ± 1,6</b>	<b>66,2 ± 2,7</b>
	Extrato bruto*	Folhas	250	<b>82,5 ± 12</b>	<b>59,6 ± 2,2</b>
<i>Eupatorium serratum</i>	Resíduo Aquoso	Folhas e flores	250	<b>100 ± 0</b>	<b>92,1 ± 2,4</b>
	Extrato bruto*	Folhas e flores	125	<b>100 ± 0</b>	<b>89,5 ± 1,8</b>
<i>Eupatorium tanacetifolium</i>	Resíduo Aquoso	Folhas e flores	250	<b>100 ± 0</b>	<b>81,3 ± 2,4</b>
	Extrato bruto*	Folhas e flores	250	<b>100 ± 0</b>	<b>93,9 ± 3,1</b>
<i>Cecropia glaziovii</i>	Água	Folhas	500	<b>100 ± 0</b>	<b>100 ± 0</b>
<i>Calea phyllolepis</i>	Resíduo Aquoso	Folhas	100	<b>100 ± 0</b>	<b>100 ± 0</b>
	Extrato bruto*	Folhas	100	<b>100 ± 0</b>	<b>100 ± 0</b>
Aciclovir			10	<b>100 ± 0</b>	<b>100 ± 0</b>

Aciclovir foi empregado como controle positivo; SI = sem inibição; \* Extrato bruto aquoso; Os valores representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão

Posteriormente, os extratos e frações que apresentaram percentuais de inibição > 50% com relação a, no mínimo, uma das cepas virais empregadas, foram submetidos a uma nova avaliação da potencial atividade anti-herpética, utilizando-se

diluições seriadas (razão 1:2) a fim de se determinar os valores de  $CI_{50}$  (concentração que inibe 50% da infecção viral). De posse desses valores e também das respectivas  $CC_{50}$ , foi possível calcular os índices de seletividade ( $IS = CC_{50}/CI_{50}$ ), que indicam quão promissora é a atividade antiviral de cada material testado. Os resultados desta avaliação estão compilados na tabela 3.

**Tabela 3:** Resultados da citotoxicidade e da potencial atividade anti-herpética dos materiais-teste, através do método de inibição da formação das placas de lise.

Extrato	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )		$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )		IS ( $CC_{50}/CI_{50}$ )		
	VERO	GMK AH1	HSV-1 (KOS)	HSV-2 (333)	HSV-1 (KOS)	HSV-2 (333)	
<i>Laurencia flagellifera</i> (Fração Aquosa)	605 $\pm$ 10	698 $\pm$ 12	219,5 $\pm$ 12,5	482 $\pm$ 18	2,8	1,4	
<i>Dodonea viscosa</i>	>1000	>1000	162,5 $\pm$ 6,4	501 $\pm$ 15	>6,1	>1,9	
<i>Eupatorium bupleurifolium</i>	RA	>1000	>1000	70,6 $\pm$ 1,3	100,8 $\pm$ 9,5	>14,2	>9,9
	EB	>2000	>2000	58,6 $\pm$ 3,9	89,5 $\pm$ 7,5	>34,1	>22,3
<i>E. rufescens</i>	RA	>2000	>2000	174,1 $\pm$ 8,3	238 $\pm$ 12	>11,5	>8,4
	EB	965 $\pm$ 5	1000 $\pm$ 3	101,0 $\pm$ 1,1	198 $\pm$ 9	9,5	5,1
<i>E. serratum</i>	RA	1240 $\pm$ 24	1500 $\pm$ 15	19,1 $\pm$ 0,1	45 $\pm$ 5,8	64,8	33,3
	EB	500 $\pm$ 5	750 $\pm$ 10	28,1 $\pm$ 0,7	57 $\pm$ 8,2	17,8	13,1
<i>E. tanacetifolium</i>	RA	1810 $\pm$ 190	1980 $\pm$ 125	47 $\pm$ 0,8	67 $\pm$ 2,4	38,5	29,5
	EB	1255 $\pm$ 115	1545 $\pm$ 110	40 $\pm$ 2,9	59,5 $\pm$ 4,3	31,4	25,9
<i>Cecropia glaziovii</i>	>5000	>5000	89,6	147,1 $\pm$ 7,1	>56,1	>34	
<i>Calea phyllolepis</i>	RA	1238 $\pm$ 169	1322 $\pm$ 148	10,7 $\pm$ 1,5	12,8 $\pm$ 1	115	103,7
	EB	746,3 $\pm$ 41,7	1025 $\pm$ 175	10,6 $\pm$ 1,9	11,1 $\pm$ 0,3	70,4	93,0
Aciclovir	>1000	>1000	0,51 $\pm$ 0,02	1,18 $\pm$ 0,04	>1960	847,45	

Aciclovir foi empregado como controle positivo; RA: Resíduo aquoso; EB: Extrato bruto aquoso; Os valores representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

A fração diclorometano das raízes de *Passiflora edulis*, apesar de ter inibido 55,5% a replicação do HSV-2 e 91,7% a replicação do HSV-1 (tabela 2), não foi avaliada em função do término do material vegetal necessário para a realização dos ensaios, sendo necessário uma nova coleta de planta para dar continuidade aos estudos.



A fração acetato de etila de *Laurencia microcladia* não inibiu a replicação do HSV-1 e do HSV-2, e o extrato aquoso apresentou baixos percentuais de inibição em relação à replicação dos dois vírus testados (tabela 2 – 32,6 e 22,7%, respectivamente para HSV-1 e HSV-2). Entretanto, o extrato de *Laurencia flagellifera*, ao ser testado na concentração de 500 µg/mL, inibiu 97,5 e 56,6% da infecção produzida pelos HSV-1 e HSV-2, respectivamente (tabela 2). A presença de glicolípídeos nessa alga poderia explicar a atividade detectada, visto que existe relato na literatura da presença desses metabólitos nesta espécie (LHULLIER et al., 2007) e das atividades antiviral e imunoestimulante dos mesmos (DEIG, 1974; WANG et al., 2007; GARG et al., 2008; WU; FUJIO; WONG, 2008). Porém, após determinação das suas  $CI_{50}$ , verificou-se que os índices de seletividade referentes as duas cepas testadas (tabela 3 - IS= 2,8 e 1,4, respectivamente para HSV-1 e HSV-2) não foram promissores.

A atividade anti-HSV-1 detectada para o extrato etanólico das folhas de *Dodonea viscosa* (tabela 3 – IS > 6,1), poderia estar relacionada com a presença de alguns de seus metabólitos secundários já relatados na literatura, tais como polissacarídeos, esteróides do tipo  $\beta$ -sitosterol, flavonoides glicosilados e não-glicosilados (NAIR; SUBRAMANIAN, 1975; DOMINGUEZ et al., 1980; SINGH; SINGH; JINDAL, 1995; GETIE et al., 2002; NAGARAJU; KARIMULLA, 2002), considerando-se que vários estudos também já relataram atividade anti-herpética para estas classes de produtos naturais (AMOROS; SIMÕES; GIRRE, 1992; BUCKWOLD et al., 2004; COS et al., 2004; MICHELINI et al., 2004; ZHU et al., 2004; 2006; CHENG et al., 2005; LYU; RHIM; PARK, 2005; CHATTOPADHYAY et al., 2007; VELJKOVIC et al., 2007).

Apesar da promissora atividade anti-herpética detectada para as espécies de *Eupatorium* e para *Calea phyllolepis* (tabela 3), optou-se continuar oportunamente os estudos destes vegetais. Na revisão bibliográfica realizada com estas espécies, não foram encontrados relatos fitoquímicos nem de estudos farmacológicos. Outras espécies do gênero *Eupatorium* (ex. *E. arnottianum*) foram estudadas, sendo quimicamente caracterizadas pela presença de compostos sesquiterpênicos, flavonoides e ácidos fenólicos (CLAVIN et al., 2007). Adicionalmente, estudos realizados com espécies do gênero *Eupatorium* (ex. *E. cannabinum*) têm demonstrado substancial atividade antiproliferativa *in vitro* contra algumas linhagens celulares tumorais, sendo freqüentemente relacionada à presença de lactonas

sesquiterpênicas nestes vegetais (RUCKER; HEIDEN; SCHENKEL, 2001; MONKS et al., 2002). Estas mesmas lactonas sesquiterpênicas, que demonstraram atividade antitumoral *in vitro*, poderiam ser os metabólitos responsáveis pela atividade anti-herpética detectada para as quatro espécies de *Eupatorium* que foram testadas frente ao HSV-1 e HSV-2, já que há relatos na literatura relacionando atividade antiviral a este grupo de metabólitos secundários (HWANG et al., 2006; EFFERTH et al., 2008).

Observando os resultados obtidos, pôde-se verificar que os extratos discutidos acima, além de *Cecropia glaziovii*, que será discutido posteriormente, protegem as células da infecção viral, porém o mecanismo de ação bem como as substâncias responsáveis por esta atividade ainda não foram elucidados, sendo necessários mais estudos para atingir tais objetivos.

Embora o extrato bruto aquoso de *Cecropia glaziovii* não tenha sido o mais promissor entre os testados (tabelas 2 e 3 – IS >56,1 e >34 respectivamente para o HSV-1 e HSV-2), optou-se por dar continuidade ao fracionamento biomonitorado com este material, devido ao fato dele estar disponível em maior quantidade, já que para a realização subsequente dos ensaios antivirais, uma grande quantidade de amostra se faria necessária. Outro motivo para esta escolha foi a proximidade com o laboratório que estava realizando o estudo fitoquímico de *C.glaziovii*, o que facilitou o acesso aos extratos e frações desta espécie vegetal e permitiu a realização do fracionamento biomonitorado.

### **5.3 Fracionamento biomonitorado de *Cecropia glaziovii***

Os processos de fracionamento de extratos vegetais com vista ao isolamento de substâncias ativas podem ser monitorados por ensaios direcionados para a avaliação da atividade biológica. Pode-se iniciar o fracionamento de um extrato vegetal através da partição por solventes orgânicos de polaridade crescente, visto que a concentração de cada um dos componentes em cada fase estará relacionada com o coeficiente de partição ou distribuição apresentado por cada substância (DEY; HARBORNE, 1991).

Já foi abordado na revisão bibliográfica que a principal classe de metabólitos secundários presentes, principalmente nas folhas de *C. glaziovii*, são os compostos polifenólicos, em especial flavonoides, proantocianidinas e ácidos fenólicos. Porém,

os compostos mais comumente encontrados nesta espécie são flavonoides da classe dos C-heterosídeos, sendo as C-glicosilflavonas majoritárias, isoorientina e isovitexina e, em menor proporção, a orientina. Além destes, também foram identificados outros compostos fenólicos, como ácido clorogênico, procianidinas B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub> e C<sub>1</sub>, isoquercitrina, catequina e epicatequina (LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001; TANAE et al., 2007).

Sabe-se que compostos fenólicos, como ácidos fenólicos, taninos e flavonoides, ligam-se às proteínas para formar complexos instáveis. Portanto, vírus envelopados e entre eles os HSV, podem ser mais vulneráveis à ação de tais compostos, já que eles podem facilmente interagir com as glicoproteínas de superfície do envelope viral (HUDSON, 1990; SERKEDJIEVA; IVANCHEVA, 1999; JASSIM; NAJI, 2003). Acredita-se, também, que os compostos polifenólicos atuem através da associação com proteínas das partículas virais e/ou da superfície das células hospedeiras, resultando na redução e, até mesmo, na inibição da adsorção e penetração viral (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGUE, 1997; SCHNITZLER et al., 2008).

Conforme citado na revisão bibliográfica, em relação à atividade antiviral, especificamente dos C-glicosilflavonoides majoritários presentes nas folhas da *C. glaziovii* (isoorientina e isovitexina), há pouquíssimos estudos publicados, justificando a realização deste estudo.

### **5.3.1 Avaliação da citotoxicidade de *Cecropia glaziovii***

Para avaliação da citotoxicidade do extrato e frações obtidos durante o fracionamento biomonitorado, foi empregado, além do ensaio colorimétrico do MTT, outro ensaio, que quantifica a biomassa protéica total, através da utilização do corante sulforrodamina B (SKEHAN et al., 1990; VICHAI; KIRTIKARA, 2006), conforme descrito no item 4.4.2. Foram realizados dois ensaios, pois eles avaliam parâmetros diferentes de citotoxicidade, e também para confirmar os valores obtidos com ambos. Os valores de CC<sub>50</sub> obtidos com estes dois métodos foram idênticos para todos os materiais-teste (dados não mostrados), e os resultados obtidos estão sumarizados na tabela 4, expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

Os dados obtidos mostraram que o extrato bruto aquoso obtido por infusão (EBAI) e os resíduos aquosos, tanto RA e suas subfrações (RA<sub>1</sub> e RA<sub>2</sub>), quanto o RA obtido após extração da fração n-BuOH em amberlite (RA<sub>AMB</sub>), foram menos citotóxicos que as demais frações, com valores de CC<sub>50</sub> >5000 µg/mL para as duas linhagens celulares testadas, com exceção do resíduo aquoso (RA) que apresentou um valor de CC<sub>50</sub> em relação as células VERO de 4220 ± 9 µg/mL. Porém, todas as demais frações testadas foram igualmente pouco citotóxicas, tanto para as células VERO quanto para as células GMK AH1.

### 5.3.2 Avaliação da atividade antiviral de *Cecropia glaziovii*

Durante a realização da triagem anti-herpética, o extrato bruto aquoso, obtido por infusão (EBAI) das folhas de *C. glaziovii*, inibiu 100% a replicação de ambos os vírus herpéticos testados, HSV-1 e HSV-2, na concentração de 500 µg/mL (tabela 2). Para avaliar a atividade antiviral *in vitro* deste extrato e de suas frações, obtidas conforme o esquema demonstrado na figura 6 (pág 50), foi empregado o ensaio de inibição da formação das placas de lise e os resultados foram expressos em valores de CI<sub>50</sub>. De posse dos valores estimados de CC<sub>50</sub> e CI<sub>50</sub>, pôde-se calcular os valores de IS das amostras testadas (tabela 4).

Os valores obtidos permitiram verificar que, tanto o extrato bruto como todas as frações de *C. glaziovii*, apresentaram atividade antiviral promissora para ambas as cepas virais testadas. Ao se comparar os resultados obtidos com os dois tipos de vírus, verificou-se que o HSV-1 (cepa KOS) foi quase sempre mais sensível ao extrato e frações de *C. glaziovii* do que o HSV-2 (cepa 333). O mesmo comportamento foi verificado para o aciclovir.

A partir do fracionamento do extrato bruto (EBAI), obteve-se três frações: acetato de etila (AcOEt), n-butanol (n-BuOH) e o resíduo aquoso (RA), que foram avaliadas quanto à citotoxicidade e atividade antiviral. Os valores de IS obtidos para cada uma dessas frações podem ser visualizados na tabela 4 e também na figura 7 para os vírus HSV-1 e HSV-2. Com relação à atividade anti-HSV-1, apesar da fração AcOEt possuir um IS mais promissor (>82) em relação as outras duas frações (n-BuOH – IS>64; RA – IS=61), optou-se por dar continuidade ao fracionamento a partir da fração n-BuOH, pois sabe-se que é nesta fração que se concentram os metabólitos secundários de interesse (sabidamente os C-glicosilflavonoides

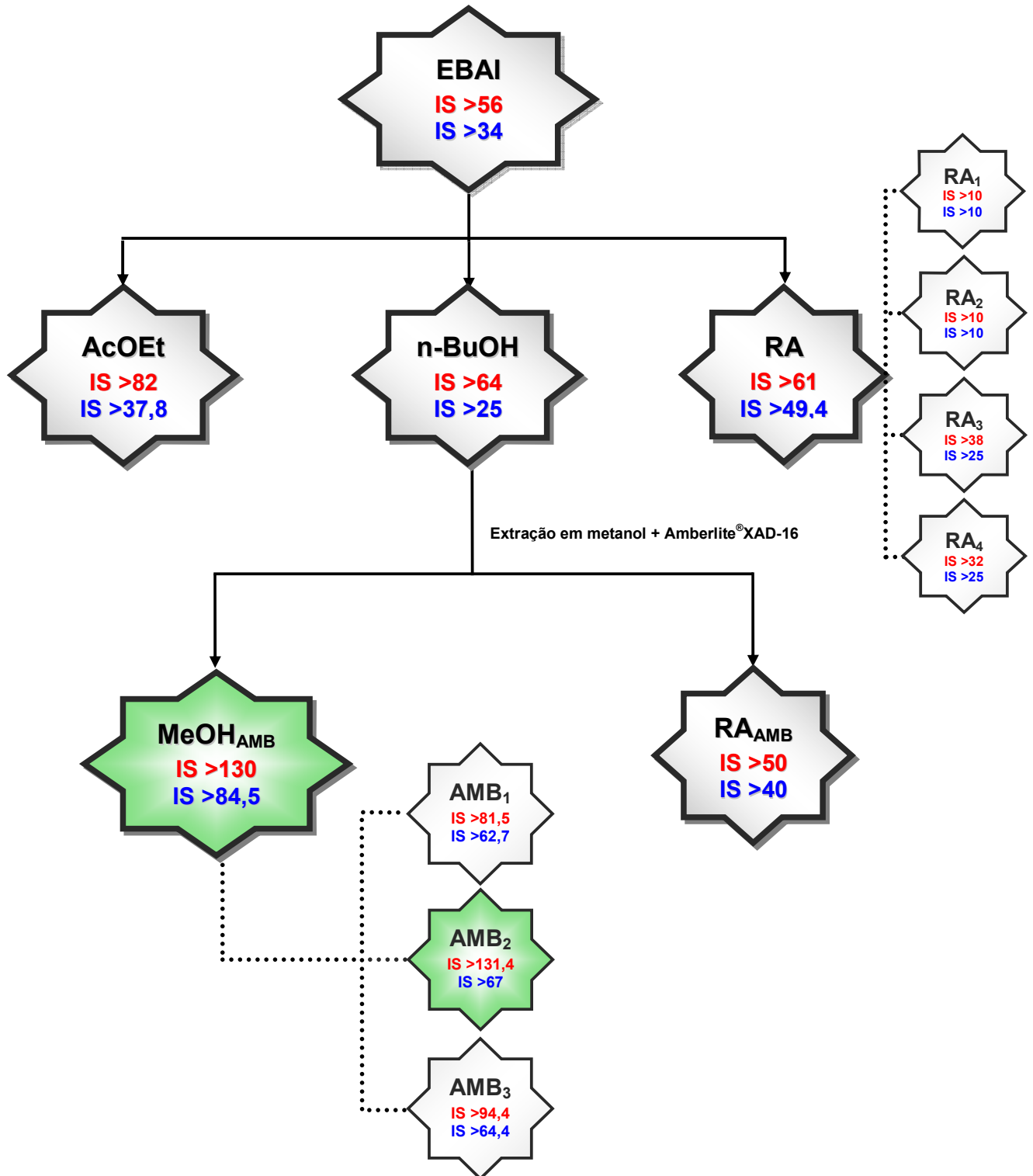
majoritários de interesse: isoorientina, isovitexina e, em menor proporção, a orientina). Para o HSV-2, foi observado o mesmo comportamento e seguiu-se o mesmo raciocínio.

Portanto, a fração n-BuOH, foi submetida a um processo de extração em resina Amberlite®XAD-16, fornecendo uma fração metanólica enriquecida em C-glicosilflavonoides (MeOH<sub>AMB</sub>) e um resíduo aquoso (RA<sub>AMB</sub>). Aquelas frações que obtiveram um maior rendimento durante o processo de fracionamento (RA: 93,2%; MeOH<sub>AMB</sub>: 57%) foram submetidas a uma purificação com misturas de solventes de diferentes polaridades, e as subfrações resultantes também foram avaliadas quanto à sua potencial atividade antiviral.

**Tabela 4:** Resultados da citotoxicidade e da atividade antiviral do extrato e frações de *Cecropia glaziovii*.

AMOSTRA	CC <sub>50</sub> (µg/mL)		CI <sub>50</sub> (µg/mL)		IS (CC <sub>50</sub> / CI <sub>50</sub> )	
	VERO	GMK AH1	HSV-1 (KOS)	HSV-2 (333)	HSV-1 (KOS)	HSV-2 (333)
EBAI	>5000	>5000	89,6 ± 5,7	147,1 ± 7,1	>56,1	>34
AcOEt	>2000	>2000	24,3 ± 2,8	52,8 ± 6,1	>82	>37,8
n-BuOH	>4000	>4000	62,5 ± 0,4	160 ± 8	>64	>25
RA	4220 ± 9	>5000	65,9 ± 4,8	101,22 ± 0,9	61	>49,4
RA <sub>1</sub>	>5000	>5000	>500	>500	>10	>10
RA <sub>2</sub>	>5000	>5000	>500	>500	>10	>10
RA <sub>3</sub>	>3000	>3000	79,4 ± 6,8	120,4 ± 6,5	>38	>25
RA <sub>4</sub>	>2000	>2000	62,5	80,3 ± 19,2	>32	>25
<b>MeOH<sub>AMB</sub></b>	>3000	>3000	23 ± 2	34,5 ± 4,5	<b>&gt;130</b>	<b>&gt;84,5</b>
AMB <sub>1</sub>	>3000	>3000	36,8	47,8 ± 6,5	>81,5	>62,7
<b>AMB<sub>2</sub></b>	>2500	>2500	19,1 ± 1,8	37,5 ± 4,9	<b>&gt;131,4</b>	<b>&gt;67</b>
AMB <sub>3</sub>	>2000	>2000	21,2 ± 3,23	26,9 ± 4,3	>94,4	>64,4
RA <sub>AMB</sub>	>5000	>5000	99,4 ± 15,6	125,4 ± 0,9	>50	>40
Aciclovir (C+)*	>1000	>1000	0,51 ± 0,02	1,18 ± 0,04	>1960	847,45

\* C+: controle positivo



**Figura 7:** Esquema do fracionamento biomonitorado de *Cecropia glaziovii* e os valores de IS obtidos frente ao HSV-1 (cepa KOS) (em **vermelho**) e frente ao HSV-2 (cepa 333) (em **azul**).

O resíduo aquoso (RA), ao ser particionado apresentou perda de atividade anti-HSV-1 e anti-HSV-2, verificada por uma queda nos IS das sub-frações RA<sub>1</sub>, RA<sub>2</sub>, RA<sub>3</sub> e RA<sub>4</sub>, mostrando-se inferiores ao valor do índice de seletividade da fração RA. Todos os valores estão compilados na tabela 4 e na figura 7, para os vírus HSV-1 e HSV-2. Estes resultados sugerem que o resíduo aquoso apresenta substâncias que agem sinergicamente, potencializando a ação desta fração antes dela ser particionada. O mesmo não ocorreu com a fração rica em C-glicosilflavonoides, MeOH<sub>AMB</sub>, que continuou a apresentar importante atividade anti-herpética, mesmo após ser particionada.

Portanto, entre todas as frações testadas, a MeOH<sub>AMB</sub> e a subfração AMB<sub>2</sub>, apresentaram uma atividade anti-herpética mais promissora em relação aos dois tipos virais, sugerindo que a inibição da replicação viral obtida esteja diretamente relacionada aos elevados teores de C-glicosilflavonoides presentes nestas amostras. Posteriormente, a determinação do teor de flavonoides totais, por espectrofotometria UV/VIS, revelou um maior teor desta classe de metabólitos nesta subfração enriquecida em C-glicosilflavonoides, dados que serão expostos e discutidos a seguir. Além disso, a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), realizada pelo Mestrando Geison Modesti Costa, mostrou que ambas as frações são basicamente constituídas pelos dois C-glicosilflavonoides majoritários: isoorientina e isovitexina. O cromatograma da subfração AMB<sub>2</sub> sugere um maior teor destes constituintes, quando comparado aos teores da fração MeOH<sub>AMB</sub>, e das subfrações AMB<sub>1</sub> e AMB<sub>3</sub>. Os cromatogramas da fração MeOH<sub>AMB</sub> e das subfrações AMB<sub>1</sub>, AMB<sub>2</sub> e AMB<sub>3</sub> estão no anexo ao final desta dissertação, além de uma cromatografia em camada delgada (CCD) da subfração AMB<sub>2</sub>, também realizada pelo mesmo mestrando.

Com base nestes resultados iniciais, foi realizada a determinação dos teores de compostos fenólicos totais e de flavonoides totais de algumas frações de *C. glaziovii*, com o intuito de correlacioná-los com a atividade anti-herpética detectada.

Além disso, foi idealizado um delineamento experimental, com o objetivo de propor o mecanismo da ação anti-HSV da subfração AMB<sub>2</sub>, enriquecida em C-glicosilflavonoides. Desta forma, foram avaliados seus efeitos virucida na presença e ausência de soluções protéicas, na adsorção e na penetração viral, na propagação viral célula à célula, e na expressão de proteínas virais durante o ciclo replicativo, cujos resultados são apresentados e discutidos a seguir.

## 5.4 Avaliação do provável mecanismo da ação anti-herpética

### 5.4.1 Avaliação da ação virucida direta

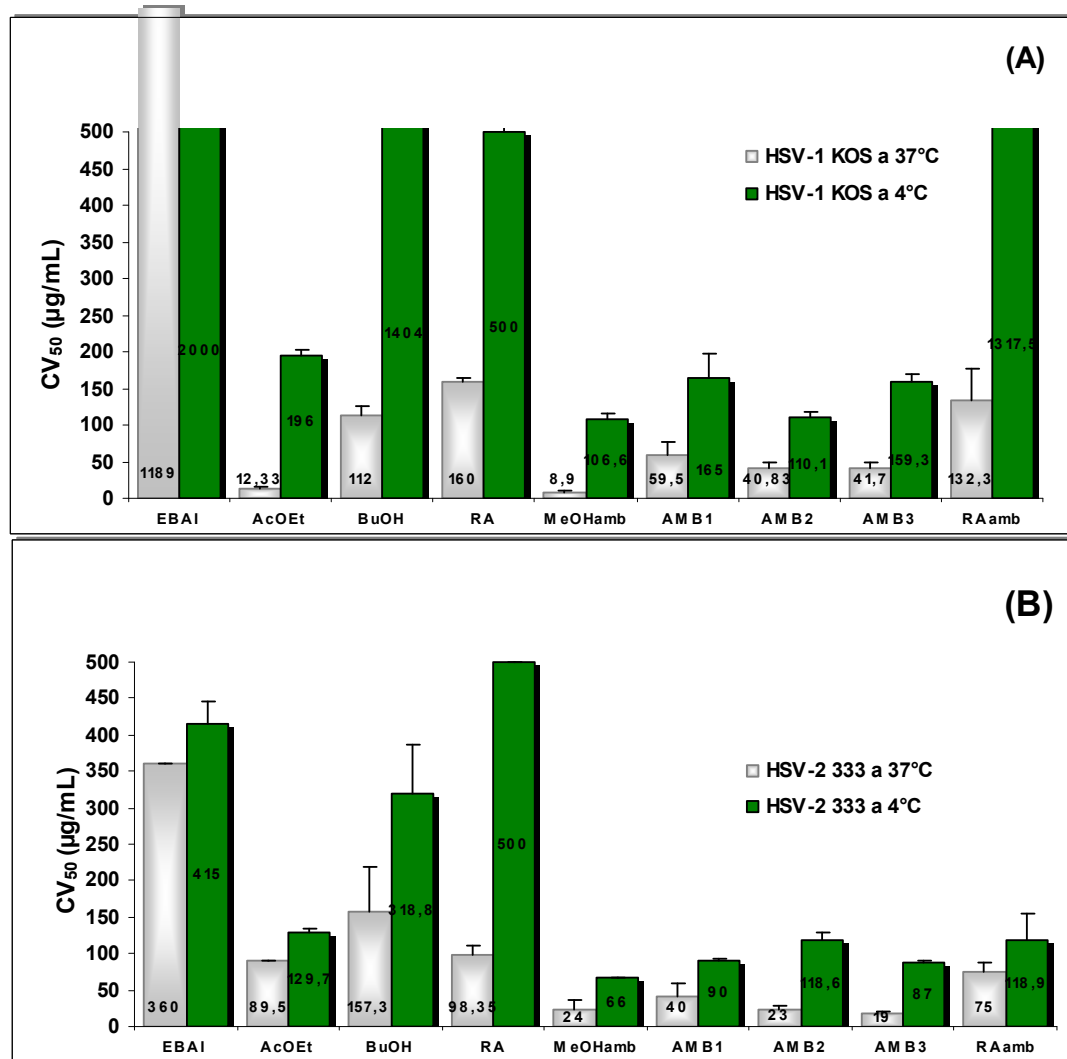
Como qualquer tipo de fármaco, um produto de origem natural pode atuar diretamente, através da inativação das partículas virais exercendo uma ação virucida, ou interferir em alguns alvos virais, como na adsorção do vírus, sua penetração na célula hospedeira, bloqueio de um ou mais estágios da replicação viral, até sua liberação e propagação intercelular (HUDSON; TOWERS, 1999). A inativação direta dos vírions pode ser causada pela sua desintegração completa, solubilização do envelope viral, ou através de modificações químicas ou degradação de algumas glicoproteínas essenciais de envelope. A ligação da amostra às glicoproteínas do envelope, poderia desencadear prematuramente alterações conformacionais que comprometeriam a montagem do complexo requerido para a fusão do envelope viral à membrana da célula (gB e o heterodímero gH-gL) ou ainda, através do bloqueio de interações proteína-proteína essenciais para o estabelecimento do estado fusiogênico (BULTMANN; TEUTON; BRANDT, 2007).

Por este motivo, o primeiro passo da elucidação do mecanismo anti-herpético, foi a avaliação da interferência da subfração AMB<sub>2</sub> sobre a infecciosidade dos HSV-1 e HSV-2. Nesta etapa, além da subfração AMB<sub>2</sub>, foram avaliados o extrato bruto aquoso das folhas de *C. glaziovii* (EBAI) e as demais frações obtidas durante seu fracionamento biomonitorado. Para isso, cada amostra em diferentes concentrações foi misturada ao fluido viral ( $4 \times 10^4$  UFP de HSV-1 ou HSV-2) e incubada por 15 min a 4°C ou 37°C. Após o período de incubação, as misturas foram diluídas (1:100), a fim de se obter as concentrações não inibitórias das amostras e foram tituladas. A figura 8 mostra os valores de CV<sub>50</sub>, ou seja, as concentrações das amostras que inibiram em 50% a infecciosidade viral, nas duas temperaturas empregadas (37 e 4°C).

Os resultados obtidos com esta estratégia metodológica permitiram verificar que, de uma forma geral, os materiais-teste foram mais virucidas em relação ao HSV-2 do que ao HSV-1. A temperatura de 37°C foi avaliada por ser empregada nos experimentos de inibição da formação das placas de lise, e a temperatura de 4°C por ser empregada nos demais experimentos de adsorção e penetração. Analisando-se os dados referentes ao HSV-1, as concentrações de todas as amostras, que



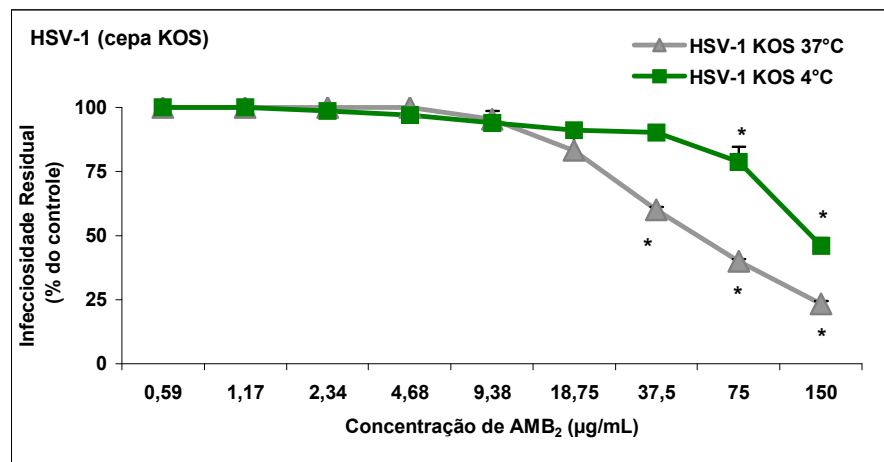
reduziram a infecciosidade viral em 50% ( $CV_{50}$ ), foram estatisticamente diferentes ao se empregar diferentes temperaturas de incubação ( $4^{\circ}C$  ou  $37^{\circ}C$ ), através do teste de Tukey ( $p < 0,001$ ). Com relação ao HSV-2, a temperatura de  $4^{\circ}C$  acarretou uma menor redução da infecciosidade viral, representada por valores de  $CV_{50}$  mais elevados, apenas para as frações n-BuOH, RA e subfração  $AMB_2$  ( $p < 0,01$  pelo teste de Tukey). O fato da redução da infecciosidade viral ser dependente da temperatura, já foi demonstrado em um estudo com o vírus parainfluenza, onde o efeito na conformação de glicoproteínas ou na interação proteína-proteína mostrou-se dependente de alterações de temperatura (JUNAKAR; CHERRY, 1986; BULTMANN; TEUTON; BRANDT, 2007).



**Figura 8:** Resultados da avaliação da atividade virucida [HSV-1 - (A) e HSV-2 - (B)] do extrato bruto aquoso e frações de *Cecropia glaziovii*, através da técnica de inibição da formação das placas de lise, expressos em valores de  $CV_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ). Os resultados representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

Com base nos resultados promissores apresentados pela subfração  $AMB_2$ , através do ensaio de inibição da formação das placas de lise, como foi discutido anteriormente, foi realizada uma avaliação mais detalhada referente à sua ação virucida.

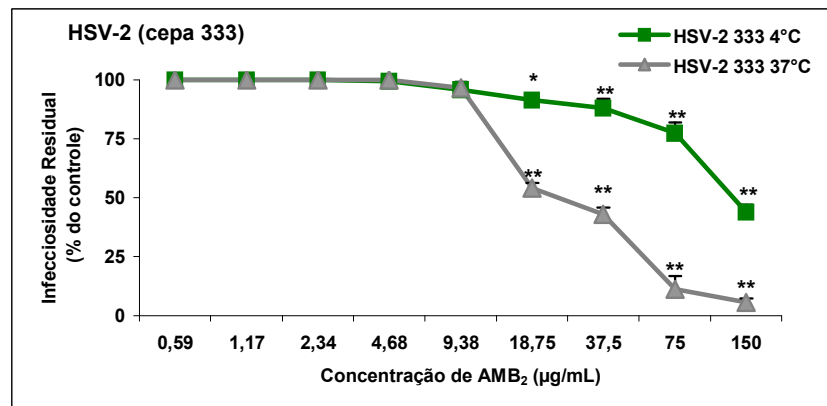
A figura 9 mostra que houve uma diminuição significativa de 34,92% da infecciosidade do HSV-1, a partir de 37,5  $\mu\text{g/mL}$ , a 37°C. De fato, a concentração que inativou diretamente 50% das partículas virais nesta temperatura foi 40,83  $\mu\text{g/mL}$ , conforme figura 8(A). Porém, a 4°C, somente houve uma redução estatisticamente significativa da infecciosidade residual (21,14%), a partir de 75  $\mu\text{g/mL}$ , sendo que a  $CV_{50}$  nesta temperatura foi de 110,1  $\mu\text{g/mL}$ . A comparação destes dados com a  $CI_{50}$  desta subfração (19,1  $\mu\text{g/mL}$ ), obtida pelo ensaio de inibição da formação das placas de lise, mostra que a concentração requerida para inativar extracelularmente 50% do HSV-1 é cerca de 2 e 5 vezes maior (a 37 e 4°C, respectivamente). Portanto, uma inativação parcial do HSV-1 pela subfração  $AMB_2$  poderia estar relacionada à ligação dos componentes majoritários desta subfração às glicoproteínas virais, inibindo desta forma, os estágios iniciais da replicação viral (adsorção e penetração). Porém, como será discutido nos itens 5.4.2 e 5.4.3, a subfração  $AMB_2$  inibiu a adsorção e a penetração do HSV-1 em concentrações não virucidas.



**Figura 9:** Resultados da avaliação da ação virucida a 4 e 37°C frente ao HSV-1 (cepa KOS) de diferentes concentrações (0,59 a 150  $\mu\text{g/mL}$ ) da subfração  $AMB_2$ . Tais concentrações foram co-incubadas com  $4,0 \times 10^4$  UFP do HSV-1 por 15 min a 4 e 37°C, seguido da diluição das misturas a concentrações não inibitórias (1:100). Aciclovir (10  $\mu\text{g/mL}$ ) foi usado como controle negativo e manteve a infecciosidade residual mínima de 80% (dados não mostrados). Os resultados estão representados como porcentagens de infecciosidade residual em relação ao controle viral, sem tratamento. Os valores obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes. (\*) diferença significativa ( $p < 0,01$ ), teste de Dunnett.

Diferentemente do HSV-1, pode-se verificar na figura 10, que a subfração  $AMB_2$  na sua  $CI_{50}$  (37,5  $\mu\text{g/mL}$ ) inativou diretamente mais de 50% das partículas do HSV-2, a 37°C. Quando se utilizou a temperatura de 4°C, a capacidade virucida reduziu, de forma significativa, e somente a 118,6  $\mu\text{g/mL}$  houve inativação de 50% dos HSV-2. Porém, como será discutido nos itens 5.4.2 e 5.4.3, a subfração  $AMB_2$  inibiu os estágios iniciais da replicação do HSV-2 em concentrações não virucidas.

No ensaio para avaliação da atividade virucida, as amostras e os vírus, pré-incubados por 15 min, são diluídos a concentrações não inibitórias dessas amostras (1:100), antes da sua adição às células para a realização do ensaio de redução de placas de lise. Portanto, a concentração inicial que era de 150 passa a 1,5  $\mu\text{g/mL}$ , 75  $\mu\text{g/mL}$  passa a 0,75  $\mu\text{g/mL}$ , e assim sucessivamente. Foram realizados também, experimentos onde a concentração inicial foi diluída 200x, os quais mostraram perfis de redução de infecciosidade residual extremamente semelhantes àqueles em que a diluição 1:100 foi empregada (dados não mostrados).



**Figura 10:** Resultados da avaliação da ação virucida a 4 e 37°C frente ao HSV-2 (cepa 333) de diferentes concentrações (0,59 a 150  $\mu\text{g/mL}$ ) da subfração  $AMB_2$ . Tais concentrações foram co-incubadas com  $4,0 \times 10^4$  UFP do HSV-2 por 15 min a 4 e 37°C, seguido da diluição das misturas a concentrações não inibitórias (1:100). Aciclovir (10  $\mu\text{g/mL}$ ) foi usado como controle negativo e manteve a infecciosidade residual mínima de 80% (dados não mostrados). Os resultados estão representados como porcentagens de infecciosidade residual em relação ao controle viral, sem tratamento. Os valores obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ , indicam diferenças estatísticas significativas, avaliadas pelo teste de Dunnett.

De forma geral, nas maiores concentrações testadas, a subfração  $AMB_2$  exibiu efeito virucida extracelular. Em baixas concentrações, ela não inativou totalmente as partículas virais, mas uma inativação parcial pode ter ocorrido, devido à ligação da amostra residual (após diluição 1:100 ou 1:200) às glicoproteínas de envelope. Desta forma, a interação direta com as proteínas de envelope seria, no

mínimo, um dos modos de inibição da infecção viral demonstrada por esta subfração.

Considerando-se que o HSV-2 é o principal agente etiológico das infecções herpéticas genitais, e o fato demonstrado de que a capacidade virucida de diferentes compostos é relativamente menor em presença de soluções ricas em proteínas (PIRET et al., 2002; ISAACS; JIA; XU, 2004), a atividade virucida da subfração AMB<sub>2</sub> foi investigada frente ao HSV-2, em presença de soluções protéicas contendo SFB e BSA. Para isso, a subfração AMB<sub>2</sub> foi co-incubada por 5 min a 37°C com tais soluções protéicas, antes da adição de aproximadamente 4x10<sup>4</sup> UFP do vírus. Logo após, as misturas foram novamente incubadas por 15 min a 37°C e, então, diluídas a concentrações não inibitórias (1:100). A tabela 5 mostra os percentuais de inibição da infecciosidade do HSV-2, na presença de diferentes concentrações de SFB e BSA e 23 µg/mL da subfração AMB<sub>2</sub>, concentração esta que inativou 50% das partículas virais (CV<sub>50</sub>) no experimento virucida a 37°C.

**Tabela 5:** Resultados da inativação do HSV-2, na presença de soluções protéicas e da subfração AMB<sub>2</sub>.

Solução Protéica	Inibição da Infecciosidade Residual (%)
<b>BSA (%)</b>	
0,5	31,0 ± 4,5 *
0,05	54,4 ± 3,2 *
0,005	58,5 ± 4,6 *
0,0005	47,4 ± 5,3 *
0,00005	61,2 ± 3,8 *
<b>SFB (%)</b>	
5	37,7 ± 5,2 *
0,5	40,5 ± 6,5 *
0,05	55,7 ± 3,8 *
0,005	55,0 ± 7,3 *
0,0005	50,2 ± 5,8 *

Os resultados foram analisados em relação aos controles virais, com e sem proteína (0% de inibição) e expressos como média ± desvio padrão de dois experimentos independentes. (\*)  $p < 0,01$  pelo teste de Dunnett.

Analisando os resultados apresentados na tabela 5, concluiu-se que a subfração AMB<sub>2</sub>, em presença de soluções protéicas, inibiu de forma significativa ( $p < 0,01$ ) a infecciosidade residual, com relação aos controles virais (sem efeito inibitório), mostrando que esta amostra manteve a sua atividade virucida em presença de SFB e BSA. Este fato, aliado à significativa capacidade em reduzir a infecciosidade do HSV-2 em concentrações mais baixas que o valor de CI<sub>50</sub> a 37°C, demonstrou que a subfração AMB<sub>2</sub> possui potencial para ser explorado futuramente como um importante microbicida tópico.

Considerando a potencial aplicação tópica da subfração AMB<sub>2</sub>, estudos relacionados à modulação da sua atividade virucida, na presença de secreções cervicais e sêmen humanos, são necessários. É de fundamental importância o desenvolvimento de fármacos virucidas contra HSV, particularmente em combinação com fármacos virucidas anti-HIV para prevenção da transmissão genital destes dois vírus (BOURNE et al., 1999; SHOGAN et al., 2006), uma vez que o herpes genital encontra-se intimamente relacionado à dinâmica de aquisição, infecção e transmissão do HIV, aumentando em até 3x o risco de contrair este vírus sexualmente (CELUM et al., 2004; 2008). Além disso, os lactobacilos são os componentes predominantes da flora vaginal, desempenhando um importante papel na manutenção da saúde deste local e, portanto, a avaliação da segurança destes microbicidas frente aos lactobacilos desta flora também se faz necessária.

Os flavonoides, de forma geral, apresentam um amplo espectro de atividade contra vírus RNA e DNA, incluindo os HSV, atuando através da inibição da infecciosidade e/ou da replicação viral (KAUL; MIDDLETON; OGRA, 1985; KASHIWADA et al., 2005; LYU; RHIM; PARK, 2005; VELJKOVIC et al., 2007; CHATTOPADHYAY; KHAN, 2008). Há, ainda, relatos do efeito virucida direto de alguns flavonoides, tais como luteolina, quercetina e apigenina (COWAN, 1999; JASSIM; NAJI, 2003). Entretanto, não foram encontrados relatos referentes à inativação viral direta dos C-glicosilflavonoides presentes na subfração AMB<sub>2</sub>, justificando estudos futuros nesta área.

#### **5.4.2 Avaliação do efeito dos materiais-teste na adsorção viral**

A infecção pelos HSV é iniciada através da adsorção, que consiste na ligação reversível da partícula viral, via glicoproteínas do envelope (gB e/ou gC), a um

receptor celular. O sulfato de heparana, um dos diversos tipos de glicosaminoglicanos, é considerado o principal receptor de ligação dos HSV (METTENLEITER, 2002; SPEAR, 2004; ELLERMANN-ERIKSEN, 2005; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). A adsorção inicial do HSV-1 às células é mediada, predominantemente, pela interação da gC (e, em menor extensão, pela gB) aos receptores da superfície celular, enquanto a gB é essencial para a adsorção do HSV-2. Assim, este fato poderia justificar as diferenças exibidas entre os dois sorotipos, tais como tropismo celular e perfil epidemiológico (GERBER; BELVAL; HEROLD, 1995; TRYBALA et al., 2000; METTENLEITER, 2002; MARCHETTI; AMMENDOLIA; SUPERTI, 2009).

Experimentalmente, a adsorção viral ocorre a baixas temperaturas e é muito mais eficaz para partículas virais envelopadas do que para as não envelopadas. A penetração dos vírus, que depende da temperatura de incubação das células, é realizada em 3 min por fagocitose ou fusão da membrana celular com o envelope viral (COLBERE, 1975). Devido a isso, a avaliação do efeito de uma amostra qualquer na adsorção viral deve ser realizada a baixa temperatura (4°C), para que o vírus apenas adsorva (ou não) às células, mas não as penetre, visto que para isso uma elevação da temperatura é requerida.

Nesta fase do estudo do mecanismo da ação da subfração AMB<sub>2</sub>, foram também avaliados o extrato bruto aquoso e várias frações de *Cecropia glaziovii*, através de dois tipos de ensaios de adsorção, envolvendo duas diferentes estratégias metodológicas. Os resultados estão sumarizados na tabela 6, expressos como valores de CI<sub>50</sub>.

Como já citado anteriormente, o sulfato de heparana é um dos principais sítios da interação inicial de muitos vírus com as células susceptíveis, entre eles os HSV (SCHMIDTKE et al., 2003). Esta interação é intermediada por interações eletrostáticas entre os resíduos dos aminoácidos básicos das glicoproteínas gC e gB do envelope viral e grupamentos sulfatados ou carboxilados carregados negativamente das moléculas do sulfato de heparana (NYBERG et al., 2004). Já a heparina, um polissacarídeo sulfatado, com comprovada ação anti-herpética, age por inibição da adsorção viral, através da interação com as glicoproteínas gC e gB dos HSV. Sabe-se, ainda, que o HSV-2 apresenta maior susceptibilidade que o HSV-1 às substâncias polianiónicas, tal como a heparina (AGUILAR; HELD; WAGNER, 2007).

**Tabela 6:** Resultados obtidos por diferentes estratégias metodológicas do ensaio de adsorção viral, expressos como valores de  $CI_{50}$  das amostras testadas.

Amostra	ENSAIO			
	Adsorção tradicional $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )		Pós-adsorção $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	HSV-1 KOS	HSV-2 333	HSV-1 KOS	HSV-2 333
EBAI	36,90 $\pm$ 9,98	13,23 $\pm$ 1,50	170,00 $\pm$ 11,72	31,00 $\pm$ 8,48
AcOEt	2,70 $\pm$ 0,92	2,40 $\pm$ 0,42	19,03 $\pm$ 5,25	14,08 $\pm$ 1,16
BuOH	16,10 $\pm$ 2,91	2,67 $\pm$ 1,18	72,86 $\pm$ 8,13	15,72 $\pm$ 2,52
RA	SA	SA	SA	SA
MeOH <sub>AMB</sub>	1,20 $\pm$ 0,24	0,28 $\pm$ 0,08	7,79 $\pm$ 0,45	3,43 $\pm$ 1,09
AMB <sub>1</sub>	2,90 $\pm$ 0,78	0,48 $\pm$ 0,03	NR	NR
AMB <sub>2</sub>	2,40 $\pm$ 0,33	0,20 $\pm$ 0,01	6,84 $\pm$ 0,26	2,59 $\pm$ 0,29
AMB <sub>3</sub>	2,80 $\pm$ 0,71	0,36 $\pm$ 0,14	NR	NR
RA <sub>AMB</sub>	12,50 $\pm$ 1,81	1,75 $\pm$ 0,71	NR	NR
Aciclovir	SA	SA	SA	SA
Heparina	0,33 $\pm$ 0,05	0,07 $\pm$ 0,01	>10,00	>10,00

SA: sem atividade; NR: não realizado; Os valores obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

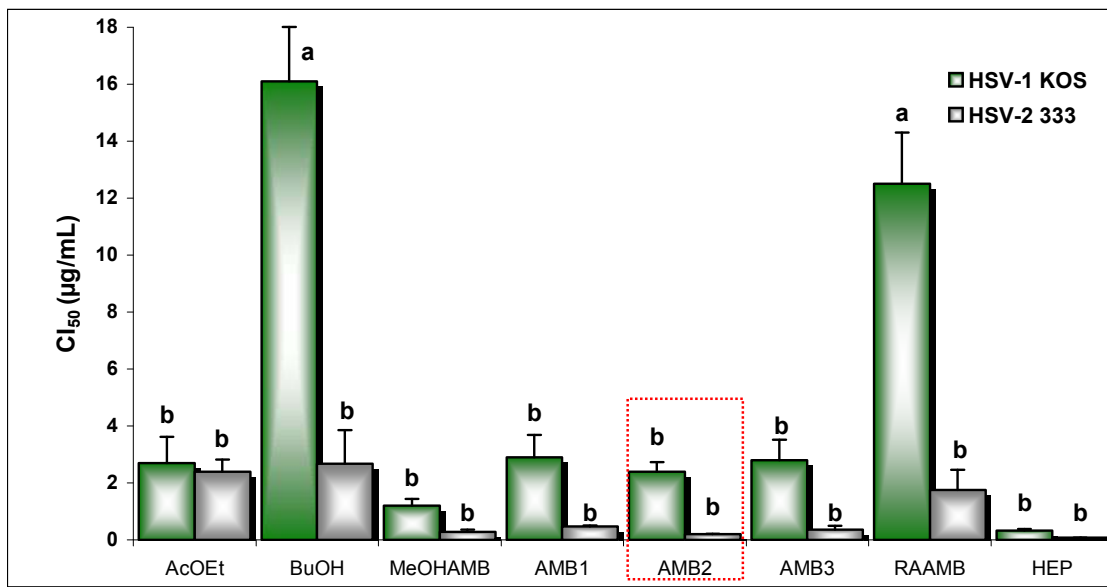
O aciclovir, fármaco de escolha para o tratamento das infecções herpéticas, foi utilizado como controle negativo nos ensaios de adsorção e penetração viral, pois seu mecanismo de ação é outro: ele inibe, especificamente, apenas a replicação do DNA dos HSV ao competir com o trifosfato de desoxiguanosina pela DNA polimerase viral e ao atuar como substrato para esta enzima (ROTTINGHAUS; WHITLEY, 2007).

Ambos os vírus [HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333)] foram inibidos pelas amostras testadas e pela heparina no ensaio de adsorção tradicional, conforme os resultados expressos na tabela 6.

Avaliando-se os dados referentes à inibição da adsorção do HSV-2 (figura 11), embora os resultados de cada amostra testada não apresentem diferenças significativas entre si, com exceção do extrato bruto aquoso (EBAI - dados não mostrados na figura 11), eles também não diferem de maneira significativa em relação à ação da heparina (HEP), indicando que o efeito destas amostras (com

exceção do EBAI) na adsorção viral se compara ao da heparina, a qual reconhecidamente inibe a adsorção viral.

Em relação ao efeito inibitório da adsorção do HSV-1, o extrato bruto aquoso e as frações n-BuOH e RA<sub>AMB</sub>, apesar de inibirem a adsorção viral em relação ao controle viral, não apresentaram diferenças entre si, porém diferiram significativamente das demais frações e também da heparina, o que indica, provavelmente, que as demais frações inibiram a adsorção viral de forma mais significativa, semelhantemente à heparina. A figura 11 mostra o efeito das frações de *Cecropia glaziovii* na adsorção do HSV-1 (cepa KOS) e do HSV-2 (cepa 333), obtido através da técnica de inibição das placas de lise, expressos em valores de CI<sub>50</sub> (µg/mL).

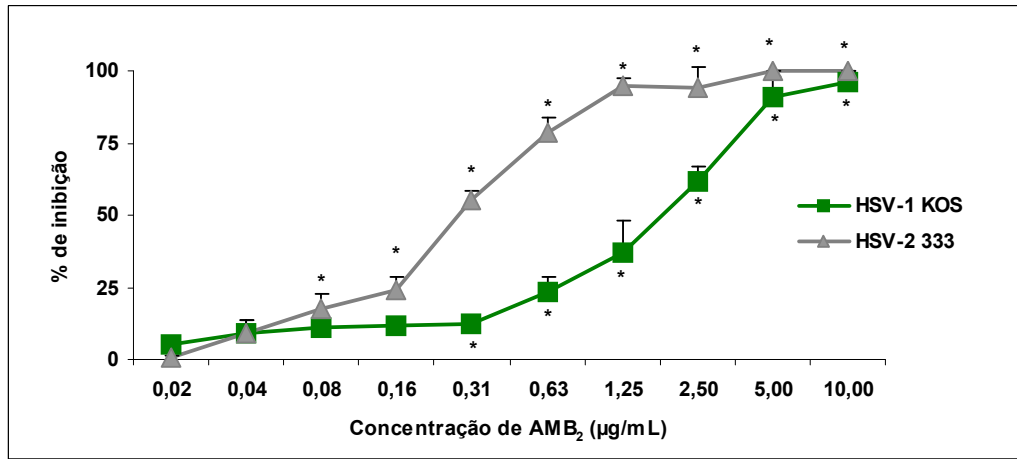


**Figura 11:** Resultados da avaliação do efeito das frações de *Cecropia glaziovii* no ensaio de adsorção tradicional, em relação ao HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333), expressos em valores de CI<sub>50</sub> (µg/mL). Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre cada amostra e cepas testadas, avaliadas através do teste de Tukey ( $p < 0,01$ ).

Considerando os resultados promissores apresentados pela subfração AMB<sub>2</sub>, através do ensaio de inibição da adsorção tradicional, foi realizada uma avaliação mais detalhada referente a este efeito. Portanto, a figura 12 exhibe os percentuais de inibição para cada concentração testada da subfração AMB<sub>2</sub>, frente aos diferentes vírus empregados (HSV-1 e HSV-2), no ensaio de adsorção tradicional.



Analisando-se os resultados obtidos, verificou-se que a adsorção do HSV-1 foi inibida, significativamente ( $p < 0,01$ ), a partir de  $0,31 \mu\text{g/mL}$  da subfração  $\text{AMB}_2$ , enquanto que  $0,08 \mu\text{g/mL}$  desta subfração foram suficientes para inibir, também de forma significativa, a adsorção do HSV-2 (cepa 333), em relação aos controles virais.

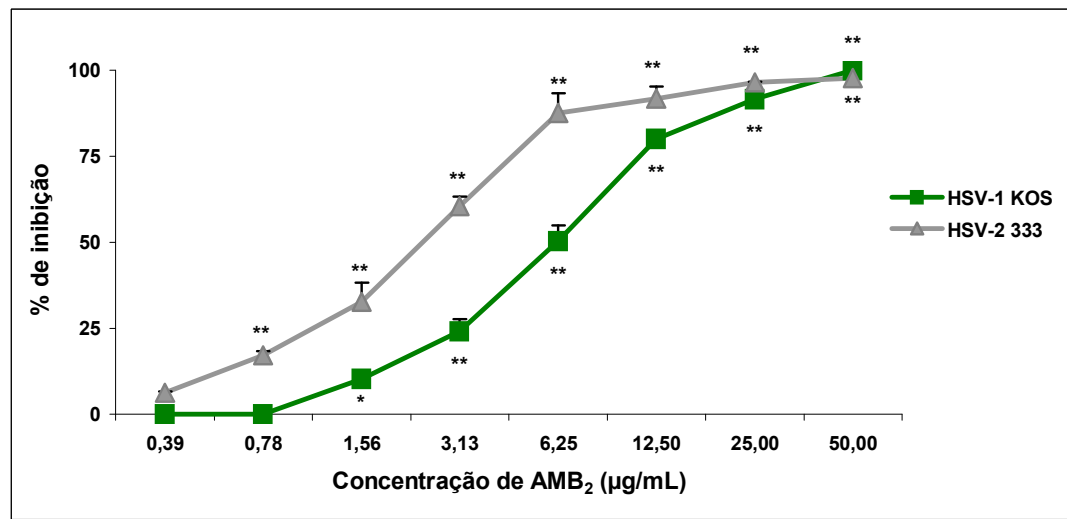


**Figura 12:** Resultados da avaliação do efeito da subfração  $\text{AMB}_2$  ( $0,02$  a  $10 \mu\text{g/mL}$ ) no ensaio de adsorção tradicional frente aos vírus HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333). Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. (\*) indica diferenças significativas ( $p < 0,01$ ), teste de Dunnett, em relação ao controle viral, sem tratamento.

Os diferentes estágios da entrada dos HSV nas células hospedeiras são potenciais alvos para atuação de fármacos antivirais e, a adsorção dos HSV às células-alvo envolve dois estágios de interação vírus-célula. Após a adsorção inicial dos vírus às moléculas do sulfato de heparana, que envolve as glicoproteínas gC e gB, ocorrem interações mais estáveis dos vírions aos receptores celulares, através das glicoproteínas gD e, possivelmente, também da gH (McCLAIN; FULLER, 1994; PIRET et al., 2002). O ensaio de pós-adsorção teve por objetivo determinar se a amostra foi capaz de atuar sobre esses vírions estavelmente adsorvidos, diminuindo sua afinidade pelas células. Para isso, as células foram previamente infectadas com uma suspensão viral de HSV-1 ou HSV-2, e mantidas a  $4^\circ\text{C}$  por 2 h para permitir a adsorção, e só então, as amostras diluídas foram adicionadas e incubadas por mais 2 h a  $4^\circ\text{C}$ , atuando ou não sobre os vírions já ligados às células. Os dados da tabela 6 indicam que, entre as amostras testadas, a subfração  $\text{AMB}_2$  foi a mais efetiva em inibir a infecciosidade do HSV-1 e HSV-2 estavelmente adsorvidos às células, mesmo quando adicionada após 2 h de contato das partículas virais com as culturas celulares. Além disso, esta subfração foi até mesmo mais efetiva do que a heparina

( $CI_{50} > 10 \mu\text{g/mL}$ ) em inibir a formação das placas de lise no ensaio de pós-adsorção, com valores de  $CI_{50}$  de 6,84 e 2,59  $\mu\text{g/mL}$  para o HSV-1 e HSV-2, respectivamente.

A figura 13 exibe os percentuais de inibição para cada concentração testada da subfração  $AMB_2$ , frente aos diferentes vírus empregados (HSV-1 e HSV-2), no ensaio de pós-adsorção. Apesar de ambos os vírus terem se mostrado sensíveis à subfração  $AMB_2$ , a inibição da formação das placas de lise neste ensaio requereu concentrações maiores da amostra, quando comparadas àquelas requeridas no ensaio de adsorção tradicional.



**Figura 13:** Resultados da avaliação do efeito da subfração  $AMB_2$  (0,39 a 50  $\mu\text{g/mL}$ ) no ensaio de pós-adsorção frente aos vírus HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333). Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. (\*) e (\*\*) indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) e ( $p < 0,01$ ), teste de Dunnett, em relação ao controle viral sem tratamento.

Uma explicação pertinente aos resultados obtidos através deste ensaio seria de que os componentes majoritários da subfração  $AMB_2$  poderiam apresentar maior afinidade pelos vírions previamente adsorvidos, desligando-os das células hospedeiras. Ou ainda, que uma interação dos C-glicosilflavonoides presentes nesta subfração com as glicoproteínas virais não ligadas às células, poderia provocar uma alteração conformacional do envelope, com conseqüente desestabilização da ligação vírus-célula.

#### 5.4.3 Avaliação do efeito da subfração $AMB_2$ na penetração viral

As interações das glicoproteínas gB e gC com as moléculas do sulfato de heparana não são suficientes para a entrada dos HSV nas células. Para que ocorra

a penetração por fusão, após a adsorção da partícula viral à superfície celular, é necessário que a gD interaja com um dos seus diversos receptores, sofrendo alterações conformacionais. Além disso, é preciso que também ocorra interação com a gB ou com o dímero gH-gL, resultando na fusão do envelope viral com a membrana da célula, e subsequente entrada do nucleocapsídeo e do tegumento no citoplasma celular (METTENLEITER, 2002; SPEAR, 2004; ELLERMANN-ERIKSEN, 2005).

Considerando os resultados promissores obtidos com a fração MeOH<sub>AMB</sub> e suas subfrações AMB<sub>1</sub>, AMB<sub>2</sub> e AMB<sub>3</sub>, no que diz respeito à inibição da adsorção viral (tabela 6 e figura 11), decidiu-se dar continuidade ao estudo do mecanismo de ação apenas com a subfração AMB<sub>2</sub>, visto que o seu perfil cromatográfico (Anexo p.132) e a determinação do seu teor de flavonoides totais (item 5.5.2) indicaram a presença majoritária destes compostos na subfração AMB<sub>2</sub>.

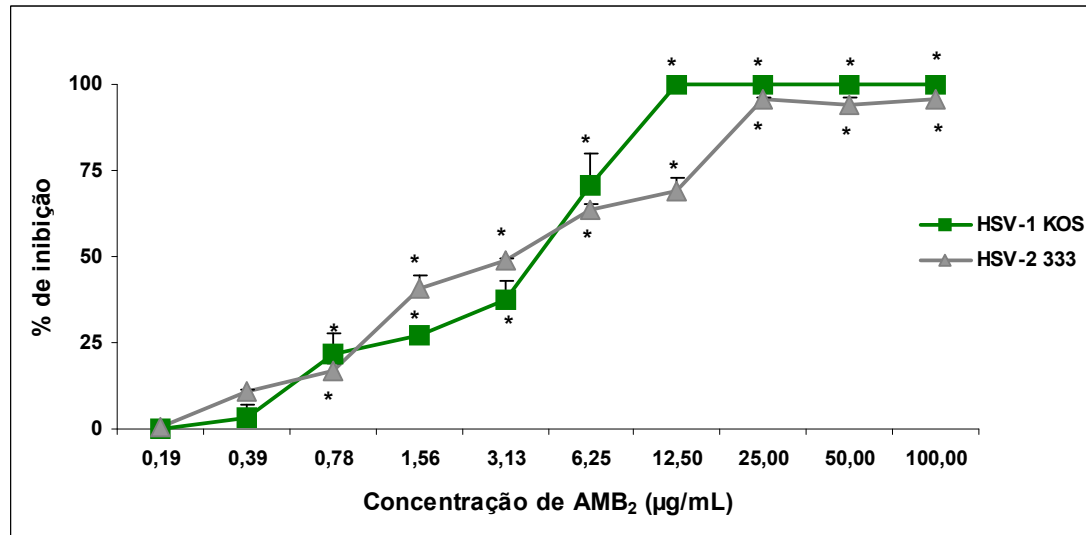
A inibição da penetração viral foi avaliada conforme descrito no item 4.6.3, em relação aos dois tipos de vírus herpéticos, e estão expressos na tabela 7 como valores de CI<sub>50</sub>.

**Tabela 7:** Resultados do ensaio de penetração viral, expressos como valores de CI<sub>50</sub> das amostras testadas.

Vírus	Amostra CI <sub>50</sub> (µg/mL)		
	AMB <sub>2</sub>	Heparina	Aciclovir
HSV-1 (cepa KOS)	3,68 ± 0,52 <sup>a</sup>	>10,00 <sup>b</sup>	SA
HSV-2 (cepa 333)	3,89 ± 0,32 <sup>a</sup>	6,47 ± 0,21 <sup>b</sup>	SA

SA: sem atividade; Os valores obtidos representam a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, avaliadas pelo teste SNK. <sup>a,b</sup>( $p < 0,01$ ).

Analisando-se os resultados obtidos, verificou-se que as duas cepas virais testadas foram significativamente mais sensíveis à subfração AMB<sub>2</sub> do que à heparina ( $p < 0,01$ ), porém sem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os dois tipos de HSV. A figura 14 mostra os percentuais de inibição para cada concentração testada da subfração AMB<sub>2</sub>, frente ao HSV-1 e HSV-2 no ensaio de penetração viral.



**Figura 14:** Resultados da avaliação do efeito da subfração AMB<sub>2</sub> (0,19 a 100 µg/mL) no ensaio de penetração frente aos vírus HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333). Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes. (\*) indica diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,01$ ), teste de Dunett, em relação ao controle viral sem tratamento.

Os dados apresentados nos itens 5.4.2 e 5.4.3, referentes à adsorção e penetração viral, respectivamente, sugerem, em conjunto, que a subfração AMB<sub>2</sub> afeta o processo de infecção dos vírus, não através da sua ligação aos receptores da superfície celular, mas sim através do desligamento dos vírus que já haviam adsorvido às células, possivelmente interferindo com as glicoproteínas virais (CHENG et al., 2004). Desta maneira, a subfração AMB<sub>2</sub>, enriquecida em C-glicosilflavonoides, além de inibir substancialmente a adsorção viral, apresentou atividade importante na penetração dos vírus testados.

Esses resultados corroboram aqueles obtidos em outros estudos envolvendo flavonoides de uma maneira geral. Barnard e colaboradores (1993) verificaram a ação anti-HSV-1 de um flavonóide (SP-303), e o mecanismo da ação anti-herpética proposto foi a inibição da penetração viral nas células. Outros estudos demonstraram que extratos de própolis, cujos constituintes majoritários eram flavonoides, exerceram atividade anti-HSV-1, devido provavelmente à inibição da entrada dos vírions nas células e, também, das etapas iniciais da replicação viral (AMOROS et al., 1992; HULEIHEL; ISANU, 2002).

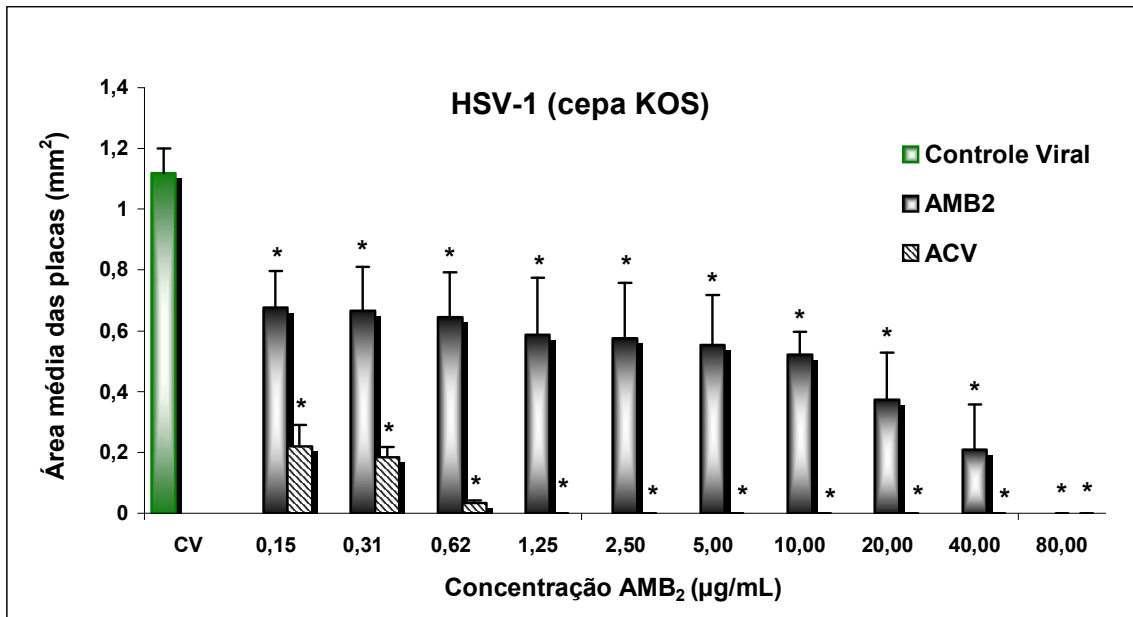
#### 5.4.4 Avaliação do efeito da subfração AMB<sub>2</sub> na redução do tamanho das placas de lise

Tendo em vista que a rápida dispersão célula a célula dos HSV, nas mucosas genital e oral, é de grande importância para evitar o desenvolvimento de resposta imunológica e assim estabelecer infecção produtiva ou recorrente nos humanos (AMMENDOLIA; MARCHETTI; SUPERTI, 2007), a inibição da propagação intercelular dos vírus herpéticos pela subfração AMB<sub>2</sub> poderia oferecer uma vantagem ao impedir as infecções recorrentes ocasionadas pelos vírus latentes no hospedeiro.

O efeito da subfração AMB<sub>2</sub> sobre a dispersão do HSV-1 (cepa KOS) e do HSV-2 (cepa 333) célula a célula (*cell to cell spread*) foi investigado pela sua adição às células, após a infecção com os mesmos, deixando-a em contato com a monocamada celular durante todo o período de incubação (72 e 48 h para HSV-1 e HSV-2, respectivamente). Para assegurar que a dispersão dos vírus ocorresse somente pela transmissão célula a célula, o meio foi suplementado com um agente espessante (carboximetilcelulose). Os resultados foram expressos como área das placas virais formadas em comparação àquelas dos controles virais não tratados.

Além de ter inibido a formação das placas de lise, a subfração AMB<sub>2</sub> reduziu substancialmente a dispersão radial dos vírus herpéticos testados, o que foi verificado através da redução da área das placas de lise formadas pelo HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333).

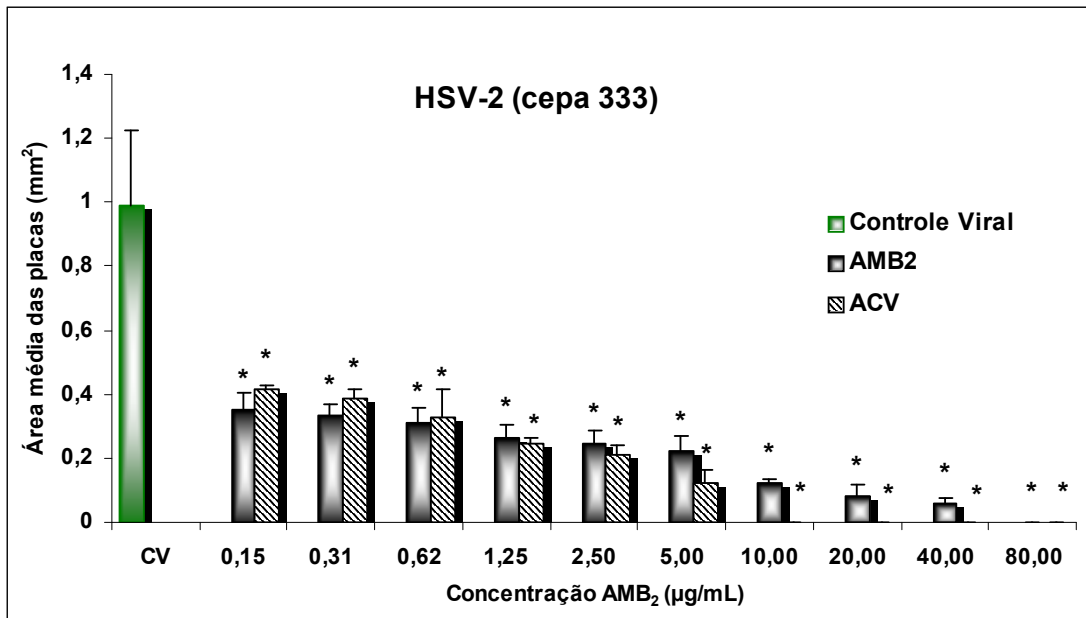
A subfração AMB<sub>2</sub> reduziu significativamente ( $p < 0,01$ ) a área das placas de lise formadas pelo HSV-1 (cepa KOS), em todas as concentrações testadas (0,15 a 80,00 µg/mL). O aciclovir inibiu totalmente a formação das placas de lise nas concentrações de 1,25 a 80,00 µg/mL; nas menores concentrações (0,15 a 0,62 µg/mL), este fármaco inibiu significativamente a dispersão radial do HSV-1 ( $p < 0,01$ ) (figura 15).



**Figura 15:** Resultados da inibição da propagação intercelular do vírus HSV-1 (cepa KOS). Foram medidas as áreas de 20 placas formadas pela subfração enriquecida em C-glicosilflavonóides (AMB<sub>2</sub>) e aciclovir (ACV) nas concentrações de 0,15 a 80,00 µg/mL. Os resultados foram analisados com relação ao controle viral (1,12 ± 0,08 mm<sup>2</sup>) pelo teste de Dunett e expressos como média ± desvio padrão de dois experimentos independentes. (\*)  $p < 0,01$ .

Com relação ao HSV-2 (cepa 333), também houve uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) da área das placas de lise pela subfração AMB<sub>2</sub>, em todas as concentrações testadas (0,15 a 80,00 µg/mL). Da mesma maneira, o aciclovir foi efetivo em reduzir a dispersão do HSV-2 célula à célula (figura 16), mas em menor intensidade do que em relação ao HSV-1.

O HSV infecta as células do epitélio estratificado escamoso, que forma a epiderme e a mucosa em diferentes sítios anatômicos, incluindo a região oral e genital. Uma rápida dispersão dos vírus célula a célula pode promover a evasão imune viral (SATTENTAU, 2008), além de ser de vital importância para estabelecer infecções primárias ou recorrentes produtivas no homem (NYBERG et al., 2004), sendo, portanto, um alvo atrativo para a intervenção antiviral. Assim, o potencial para reduzir a dispersão dos vírus célula a célula pode encontrar aplicação no desenvolvimento de fármacos para o tratamento das lesões do HSV (BERGEFALL et al., 2005).



**Figura 16:** Resultados da inibição da propagação intercelular do vírus HSV-2 (cepa 333). Foram medidas as áreas de 20 placas formadas pela subfração enriquecida em C-glicosilflavonóides (AMB<sub>2</sub>) e aciclovir (ACV) nas concentrações de 0,15 a 80,00 µg/mL. Os resultados foram analisados com relação ao controle viral ( $0,98 \pm 0,23 \text{ mm}^2$ ) pelo teste de Dunnett e expressos como média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes. (\*)  $p < 0,01$ .

Embora a inibição da infecção herpética por flavonoides seja um fenômeno amplamente conhecido (JASSIM; NAJI, 2003; MARTIN; ERNST, 2003; KHAN et al., 2005; CHATTOPADHYAY; NAIK, 2007; CHATTOPADHYAY; KHAN, 2008), pouco foi estudado em relação ao efeito destes compostos na transmissão intercelular do HSV. Os resultados aqui obtidos revelaram que a inibição da dispersão do HSV-1 (cepa KOS) e do HSV-2 (cepa 333) pode ser um dos alvos da subfração AMB<sub>2</sub>, contribuindo para a sua atividade antiviral. Portanto, a subfração AMB<sub>2</sub> pode ser considerada um excelente candidato para o tratamento das infecções herpéticas, não somente pela inibição da entrada dos vírions nas células (adsorção e penetração), mas também por prevenir a disseminação da infecção às células adjacentes não infectadas.

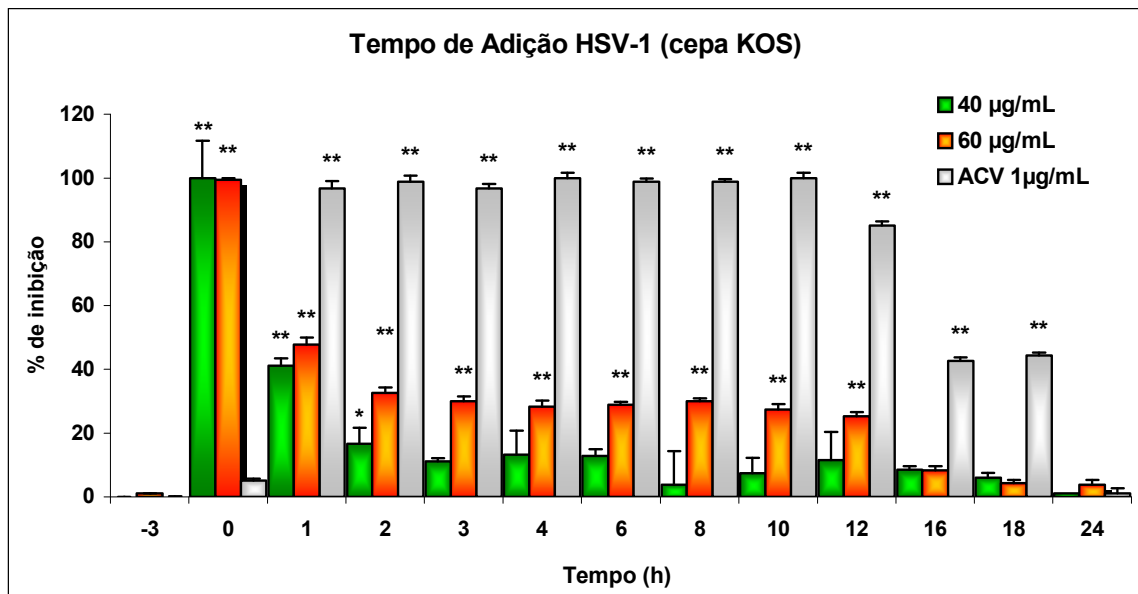
#### 5.4.5 Avaliação do efeito do tempo de adição da subfração AMB<sub>2</sub> no ciclo de replicação viral

Para a efetivação completa de um ciclo de replicação dos HSV (18 h), várias etapas são essenciais, incluindo a entrada dos vírus nas células (adsorção e

penetração), com subsequente expressão dos genes  $\alpha$  (imediatos), tais como ICP27 e ICP4, dos genes  $\beta$  (precoces), que codificam enzimas virais essenciais, a exemplo da DNA polimerase e da timidina quinase, e dos genes  $\gamma$  (tardios) estruturais, que codificam as gB, gC, ICP5, entre outras (KUO et al., 2002).

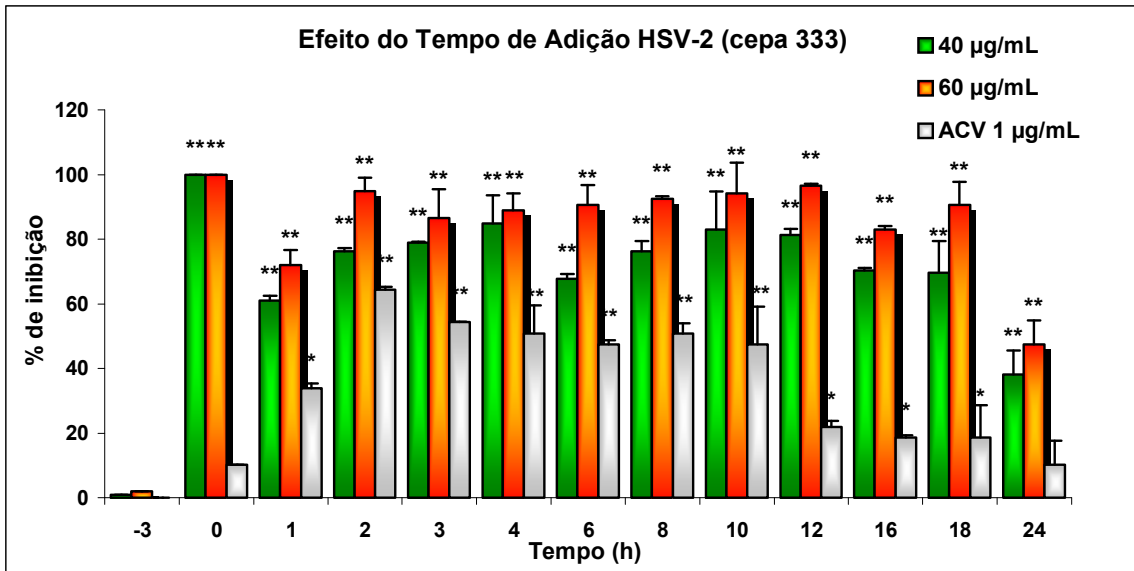
O estudo do efeito antiviral em função do tempo de adição de uma amostra qualquer permite verificar em qual(is) fase(s) do ciclo de replicação viral ela estaria agindo. Portanto, foi avaliado o efeito do tempo de adição da subfração  $AMB_2$  no ciclo de replicação do HSV-1 (cepa KOS) e do HSV-2 (cepa 333) para detectar em qual fase, além da adsorção e penetração, esta subfração estaria também atuando.

Duas concentrações da subfração  $AMB_2$  foram testadas para cada tipo de HSV: uma que não inibiria 100% a replicação do HSV-1 e HSV-2 (40  $\mu\text{g/mL}$ ), e outra que, teoricamente, deveria apresentar um percentual de inibição da replicação viral maior, em relação as duas cepas (60  $\mu\text{g/mL}$ ), além do aciclovir a 1  $\mu\text{g/mL}$ . Todas estas concentrações foram adicionadas às células previamente à infecção (-3h), simultaneamente com o vírus ( $T_0$ ) ou em intervalos de 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18 e 24 h P.I. Os resultados estão apresentados nas figuras 17 e 18, referentes ao HSV-1(cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333), respectivamente.



**Figura 17:** Efeito do tempo de adição da subfração  $AMB_2$  (40 e 60  $\mu\text{g/mL}$ ) e do aciclovir (1  $\mu\text{g/mL}$ ) no ciclo de replicação do HSV-1 (cepa KOS) em células VERO. Os resultados estão representados como % de inibição da replicação viral em relação ao controle viral, sem tratamento. Os valores obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$  indicam diferenças estatisticamente significativas, teste de Dunnett.





**Figura 18:** Efeito do tempo de adição da subfração AMB<sub>2</sub> (40 e 60 µg/mL) e do aciclovir (1 µg/mL) no ciclo de replicação do HSV-2 (cepa 333) em células GMK AH1. Os resultados estão representados como % de inibição da replicação viral em relação ao controle viral, sem tratamento. Os valores obtidos representam a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes. (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$  indicam diferenças estatisticamente significativas, teste de Dunnett.

Os resultados mostraram que o pré-tratamento das células VERO ou GMK AH1 com a subfração AMB<sub>2</sub>, por 3h antes da infecção, não afetou a multiplicação dos HSV-1 e HSV-2. Portanto, esta subfração enriquecida em C-glicosilflavonoides não possui efeito profilático *in vitro* contra a infecção por tais vírus.

Entretanto, a subfração AMB<sub>2</sub>, na menor concentração testada (40 µg/mL), inibiu significativamente a infecção pelo HSV-1 ( $p < 0,01$ ), ao ser adicionada concomitantemente com o vírus, mas não após 2 h ou nos demais períodos P.I. Estas observações indicaram, mais uma vez, que esta subfração atua nos estágios iniciais da infecção pelo HSV-1, incluindo a adsorção dos vírus aos receptores e sua penetração no citoplasma celular, fatos já comprovados através de experimentos em condições específicas (figuras 12, 13 e 14).

Todos os resultados, em conjunto, sugerem que a subfração AMB<sub>2</sub> afeta o processo de infecção viral, não através da ligação dos vírus às moléculas da membrana celular, mas sim através do desligamento dos vírus que já haviam adsorvido às células, impedindo sua posterior penetração, possivelmente interferindo com as glicoproteínas virais.

Ao se empregar uma maior concentração de amostra (60 µg/mL), obteve-se resultados semelhantes nos tempos iniciais de infecção (até 2 h P.I.), porém pôde-se constatar que a amostra afetou também, de forma significativa ( $p < 0,01$ ), estágios mais tardios do ciclo de replicação do vírus (até 12 h P.I.). A interferência da subfração AMB<sub>2</sub> sobre as outras fases do ciclo de replicação do HSV-1 poderia estar, ao menos em parte, relacionada com a redução da síntese de polipeptídeos virais (como será discutido a seguir).

Em relação ao HSV-2, todas as etapas do ciclo de replicação foram inibidas ( $p < 0,01$ ) pela adição da subfração AMB<sub>2</sub> (40 e 60 µg/mL), até 24 h P.I., sugerindo que, além de atuar efetivamente nos estágios iniciais do processo replicativo do HSV-2 (adsorção e penetração), a capacidade intrínseca desta subfração de inativar extracelularmente os vírions (efeito virucida), poderia ser responsável, também, pela inibição verificada durante todo o ciclo de replicação, atuando provavelmente sobre as novas progênies virais liberadas pelas células infectadas.

#### 5.4.6 Avaliação da expressão das proteínas virais

Na seqüência, foi analisado se a inibição da replicação do HSV-1 (cepa KOS) pela subfração AMB<sub>2</sub> estava relacionada ao bloqueio da síntese de proteínas virais nas células VERO. A inibição da síntese de proteínas nas células GMK AH1 relacionadas ao HSV-2 não foi verificada neste trabalho, pois o LVA não possuía os anticorpos específicos para este sorotipo.

Sabe-se que durante a infecção produtiva ocasionada pelos vírus herpéticos, mais de 84 diferentes proteínas são expressas de uma forma coordenada e regulada em três fases seqüenciais (COLBERE, 1975; JOHNSON; SONG; KNIPE, 2008; SU et al., 2008):

- ✓ Fase imediata ( $\alpha$ ): os produtos dos genes  $\alpha$  são indutores transcricionais, ou seja, são cruciais na indução e regulação do ciclo de replicação viral, sendo sintetizadas em torno de 2 - 3 h P.I. Exemplos das proteínas  $\alpha$ : *Infected cell proteins* (ICPs) 0, 4, 22, 27, 47 e U<sub>S</sub>1.5;
- ✓ Fase precoce ( $\beta$ ): são expressas as proteínas que promovem a replicação do DNA viral e a expressão das proteínas  $\gamma$ . As proteínas de fase  $\beta$  incluem as enzimas que são requeridas para a síntese do genoma viral: DNA polimerase

viral, a proteína de ligação de DNA fita simples (ICP8), DNA helicase-primase, proteína U<sub>L</sub>9 e as enzimas necessárias para o metabolismo do ácido nucléico viral (ribonucleotídeo redutase, timidina quinase, dUTPase, uracil DNA glicosilase, etc). O pico de síntese dos produtos de fase precoce é atingido entre 5 - 7 h P.I., e quando níveis suficientes destas proteínas acumulam-se no interior da célula infectada, inicia-se a replicação do DNA viral;

- ✓ Fase tardia ( $\gamma$ ): nesta fase ocorre a síntese do nucleocapsídeo e de todas as outras proteínas estruturais que formarão o vírion, como as glicoproteínas presentes no envelope viral, em torno de 12 h P.I. Exemplo das proteínas  $\gamma$ : gB, gC, gD e gE.

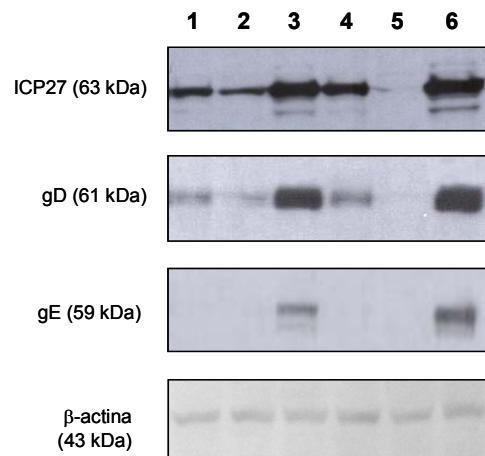
Considerando-se o comportamento da subfração AMB<sub>2</sub> no ciclo replicativo do HSV-1 (cepa KOS) durante o ensaio de tempo de adição (item 5.4.5), foi investigada a ação dessa subfração quando os vírus já haviam penetrado e iniciado a replicação intracelular, podendo-se desta maneira, tentar correlacionar a inibição observada com a redução e/ou bloqueio da síntese de proteínas virais. Para isso, a expressão das proteínas virais ICP27, gD e gE em células VERO, e da proteína constitutiva celular  $\beta$ -actina, foi analisada por *Western Blotting*. Quatro tratamentos foram empregados: 40 e 60  $\mu\text{g/mL}$  adicionados 1h e 3h P.I. Aproximadamente 50  $\mu\text{g}$  de proteínas foram extraídas 18 h após incubação com os diferentes tratamentos e analisadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para posterior realização do *immunoblotting* com os respectivos anticorpos.

De acordo com a figura 19, as células não infectadas não expressaram as proteínas virais (linha 5), e todas elas foram detectadas nas células infectadas com HSV-1 e não tratadas com a subfração AMB<sub>2</sub> (linha 6). A  $\beta$ -actina foi expressa em todos os tratamentos aplicados, indicando que a amostra não interferiu na síntese de proteínas constitutivas, essenciais ao funcionamento celular.

Os tratamentos com 40 e 60  $\mu\text{g/mL}$  da subfração AMB<sub>2</sub> 1 h P.I. (linhas 1 e 2) suprimiram quase totalmente a expressão das proteínas tardias ( $\gamma$ ) gD e gE, mas apresentaram fraca supressão da expressão da proteína imediata ( $\alpha$ ) ICP27, quando comparado às células infectadas não tratadas (linha 6). Porém, quando 40  $\mu\text{g/mL}$  foram adicionados 3 h P.I. (linha 3) não houve qualquer supressão da expressão das proteínas ICP27 e gD, havendo apenas uma atenuação na expressão da gE. Em células VERO infectadas, as proteínas da fase  $\alpha$  são detectadas cerca de

1 a 2 h P.I. e o pico da síntese ocorre após 3 h (SU et al., 2008), justificando a não supressão da expressão de ICP27 nos tratamentos de 3 h P.I.

Ao ser adicionada 3 h P.I., a subfração AMB<sub>2</sub>, na concentração de 60 µg/mL, não suprimiu a expressão de ICP 27, proteína imediata, mas suprimiu totalmente a expressão de gE (linha 4) e apresentou pequena supressão da proteína tardia gD, cuja síntese inicia somente 12 h P.I.



**Figura 19:** Efeito da subfração AMB<sub>2</sub> sobre a expressão das proteínas ICP27, gD e gE do HSV-1 (cepa KOS) em células VERO e da proteína constitutiva  $\beta$ -actina, detectado por *Western Blotting*. **Linha 1:** células tratadas com 40 µg/mL adicionados 1 h P.I.; **linha 2:** células tratadas com 60 µg/mL adicionados 1 h P.I.; **linha 3:** células tratadas com 40 µg/mL adicionados 3 h P.I.; **linha 4:** células tratadas com 60 µg/mL adicionados 3 h P.I.; **linha 5:** células não infectadas; **linha 6:** células infectadas com HSV-1.

A ICP27 é uma proteína regulatória multifuncional essencial para a replicação do HSV-1. Esta fosfoproteína de 63 kDa é expressa durante a fase imediata, sendo requerida para a expressão apropriada dos genes virais da fase precoce e tardia (DAI-JU et al., 2006) e bloqueia o processamento do mRNA acarretando numa diminuição da produção de proteínas celulares (SMITH; MALIK; CLEMENTS, 2005). A ICP27 desempenha importantes papéis no processamento pós-transcricional do RNA e atua como um transportador de RNAs tardios do núcleo para o citoplasma, desta forma regulando a expressão de proteínas virais tardias (WHITLEY; ROIZMAN, 2001; SMITH; MALIK; CLEMENTS, 2005; LARRALDE et al., 2006).

Assim, a ICP27 parece atuar em todos os estágios da expressão dos genes virais, desde a transcrição até a tradução (DAI-JU et al. 2006).

Apesar de AMB<sub>2</sub>, não suprimir efetivamente a síntese da proteína viral imediata ICP27 em células Vero, uma fraca supressão de sua expressão foi observada ao tratar as células com 40 e 60 µg/mL da subfração 1 h P.I., e isto poderia influenciar na expressão das proteínas tardias.

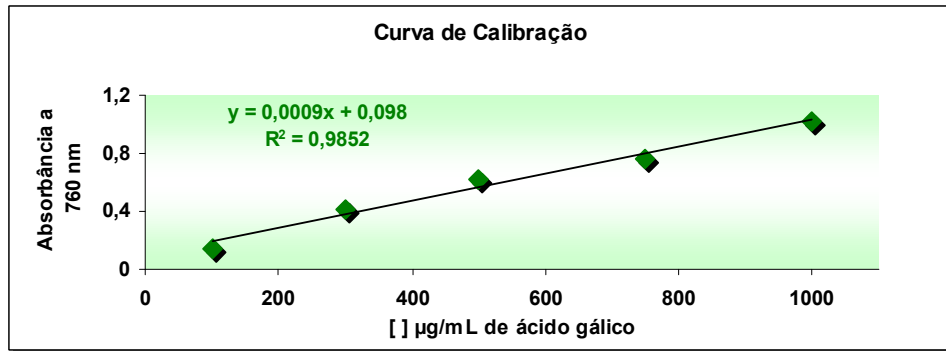
Estes resultados sugeriram que a atividade antiviral de AMB<sub>2</sub> pode estar, ainda que em parte, relacionada aos baixos níveis das proteínas virais de fase tardia, que são essenciais para síntese do nucleocapsídeo e de todas as outras proteínas estruturais, impedindo a montagem de novos vírions e a infecção de células adjacentes.

## **5.5 Determinação dos teores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais de *Cecropia glaziovii* por espectrofotometria UV/Vis**

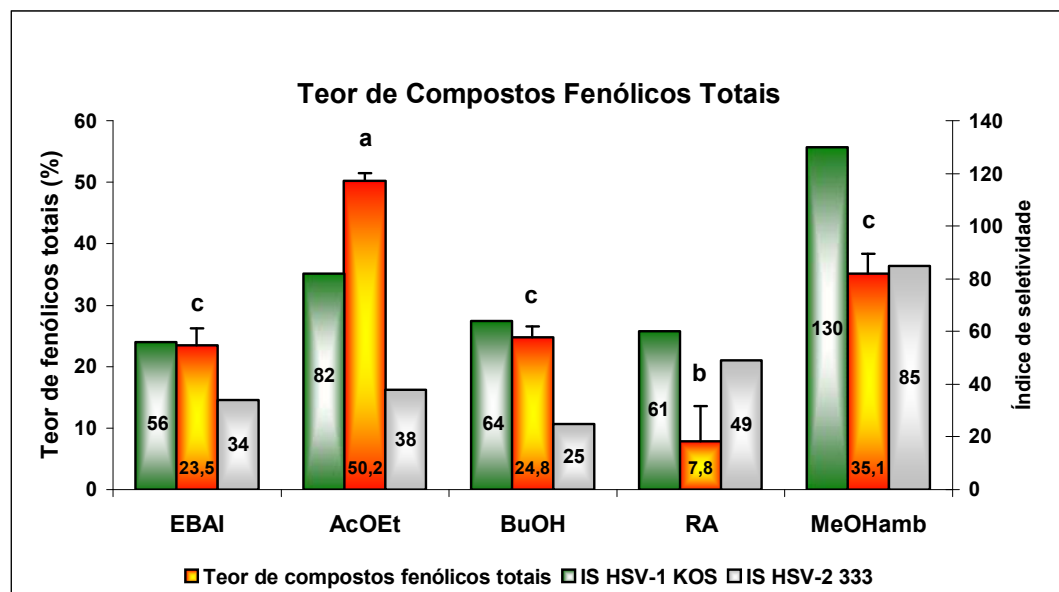
### **5.5.1 Compostos fenólicos totais**

A avaliação do teor de compostos fenólicos totais presentes no extrato e frações resultantes do processo de fracionamento biomonitorado de *C. glaziovii* foi conduzida, segundo procedimentos descritos por Naithani et al. (2006) e Liu et al. (2008), com algumas modificações. Os materiais-teste analisados foram o extrato bruto aquoso obtido por infusão (EBAI) e suas respectivas frações purificadas AcOEt, n-BuOH, RA e MeOH<sub>AMB</sub>.

Para esta quantificação foi necessário, primeiramente, realizar a curva de calibração com concentrações conhecidas do ácido gálico e expressa pela equação de reta ( $y=0,0009x+0,098$ ,  $R^2=0,9852$ ), representada na figura 20. O teor de compostos fenólicos totais foi expresso como equivalentes de ácido gálico em mg/g de amostra, transformados em percentuais (%), e foi relacionado aos respectivos valores de IS (índice de seletividade) para cada cepa viral testada (figura 21).



**Figura 20:** Curva de calibração do ácido gálico. A leitura foi realizada a 760 nm e cada ponto representa a média de duas leituras de cada concentração.



**Figura 21:** Teor de compostos fenólicos totais presentes no extrato bruto e frações purificadas de *Cecropia glaziovii*. O teor de fenólicos (%) de cada amostra está relacionado aos valores de IS referentes ao HSV-1 e HSV-2, e representam a média  $\pm$  coeficiente de variação de duas análises independentes em espectrofotômetro UV/VIS. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas: <sup>a,b</sup> ( $p < 0,001$ ) / <sup>b,c</sup> ( $p < 0,01$ ) / <sup>a,c</sup> ( $p < 0,01$ ), teste SNK.

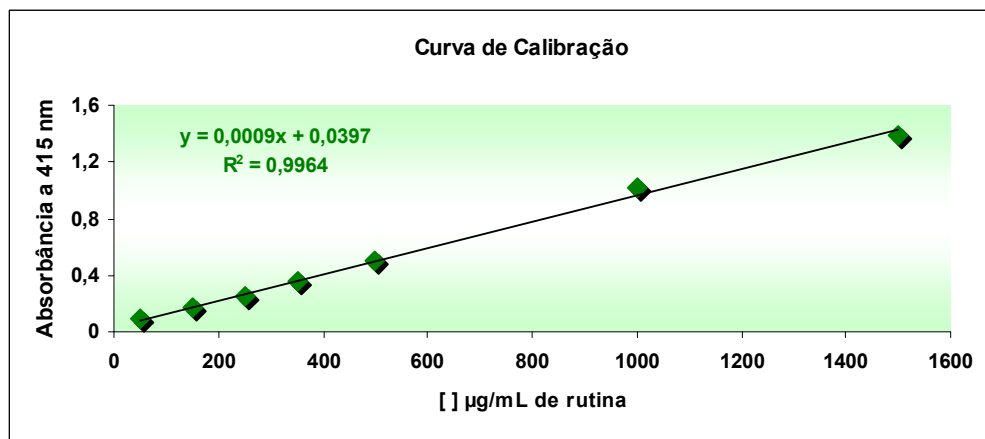
Os teores de compostos fenólicos totais variaram entre 7,8 e 50,2 %, sendo o maior teor encontrado na fração acetato de etila (AcOEt), com diferenças estatísticas significativas em relação aos demais. Este solvente de polaridade mais baixa concentra, principalmente, ácidos fenólicos e agliconas flavonoídicas. Tanae e colaboradores (2007) já relataram a presença do ácido clorogênico nas folhas de *C. glaziovii*, bem como de outros compostos polifenólicos. Apesar da fração AcOEt possuir um teor de compostos fenólicos totais maior que a fração MeOH<sub>AMB</sub>, a atividade anti-herpética foi menos significativa, demonstrada pelos menores valores

de IS. Este fato reforça a hipótese de que os compostos majoritários (C-glicosilflavonoides), presentes na fração obtida a partir da extração metanólica em resina Amberlite ( $\text{MeOH}_{\text{AMB}}$ ) e nas suas subfrações  $\text{AMB}_1$ ,  $\text{AMB}_2$  e  $\text{AMB}_3$ , são os responsáveis pela promissora atividade antiviral apresentada. Por este motivo, foi realizada posteriormente a quantificação de flavonoides totais para reforçar esta hipótese.

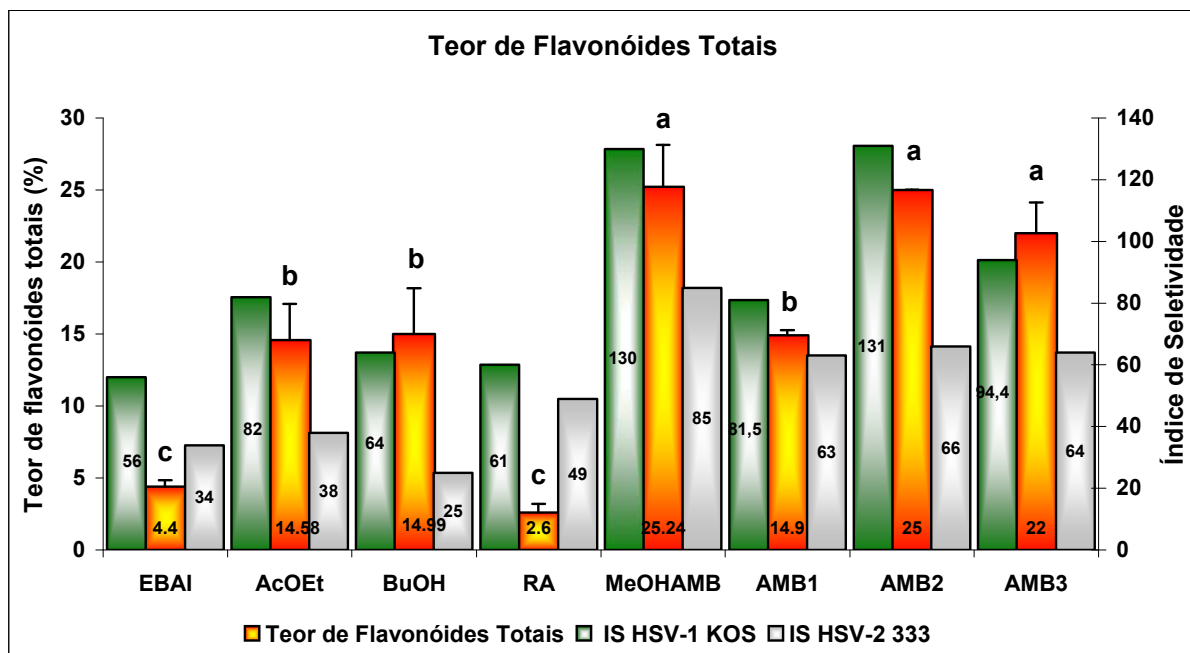
### 5.5.2 Flavonoides totais

Os materiais-teste analisados em relação ao conteúdo de flavonoides totais, foram o extrato bruto aquoso obtido por infusão (EBAI) e suas respectivas frações purificadas AcOEt, n-BuOH, RA e  $\text{MeOH}_{\text{AMB}}$  de *C.glaziovii*, além das subfrações  $\text{AMB}_1$ ,  $\text{AMB}_2$  e  $\text{AMB}_3$ . Esta determinação foi baseada nos métodos descritos por Miliuskas et al. (2004) e por Tunalier et al. (2007).

A curva de calibração foi previamente realizada utilizando-se concentrações conhecidas da rutina e expressa pela equação da reta ( $y=0,0009x+0,0397$ ,  $R^2=0,9964$ ), representada na figura 22. O teor de flavonoides totais foi expresso como equivalentes de rutina em mg/g de amostra, transformados em percentuais (%), e foi relacionado aos respectivos valores de IS (índice de seletividade) para cada cepa viral testada (figura 23).



**Figura 22:** Curva de calibração da rutina. A leitura foi realizada a 415 nm e cada ponto representa a média de duas leituras de cada concentração.



**Figura 23:** Teor de flavonoides totais presentes no extrato bruto e frações purificadas de *Cecropia glaziovii*. O teor de flavonoides (%) de cada amostra está relacionado aos valores de IS referentes ao HSV-1 e HSV-2, e representam a média  $\pm$  coeficiente de variação de duas análises independentes em espectrofotômetro UV/VIS. Letras diferentes indicam diferenças significativas: <sup>a,c</sup> ( $p < 0,001$ ) / <sup>b,c</sup> ( $p < 0,01$ ) / <sup>a,b</sup> ( $p < 0,01$ ), teste SNK.

Os teores de flavonoides totais variaram de 2,6 a 25,24%, e a fração MeOH<sub>AMB</sub> e suas respectivas subfrações AMB<sub>2</sub> e AMB<sub>3</sub> diferiram significativamente das demais ( $p < 0,001$ ), apresentando os maiores teores de flavonoides totais.

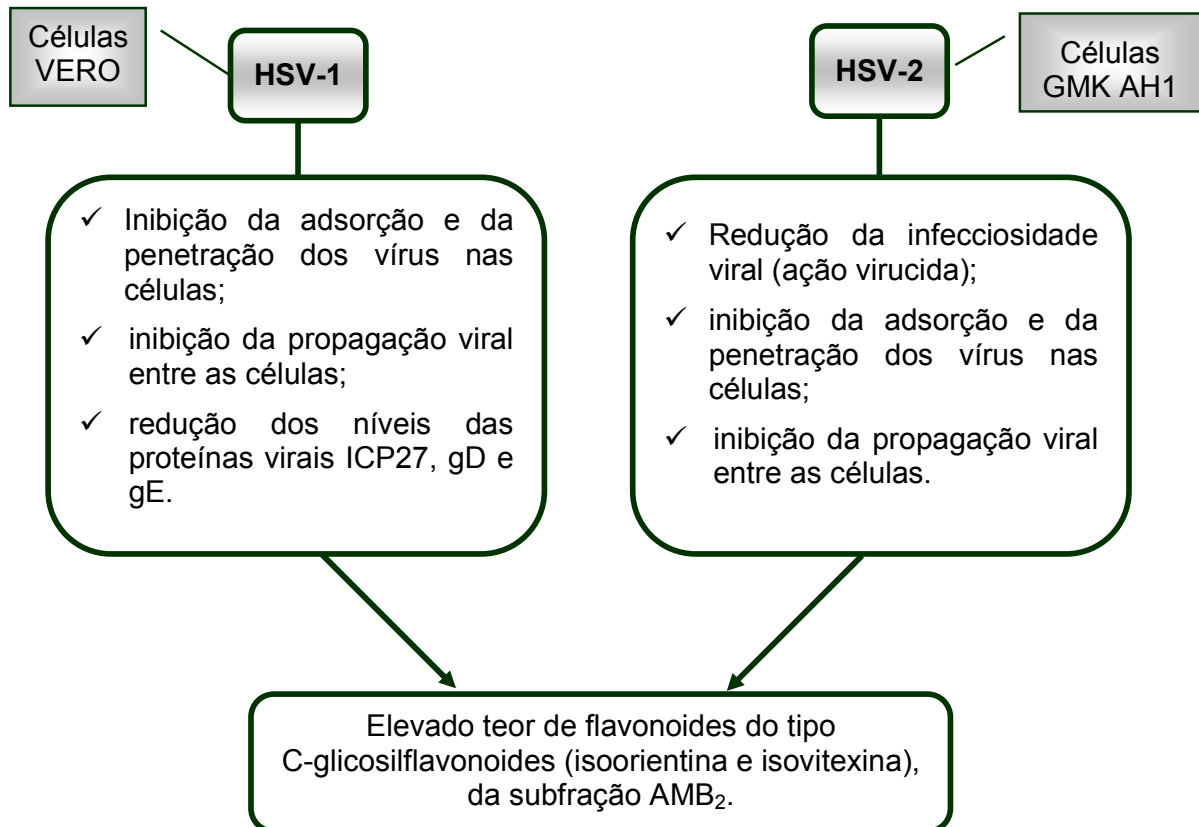
Analisando-se os resultados das subfrações, a AMB<sub>1</sub> apresentou os menores valores de IS, e corresponde àquela com o menor teor de flavonoides totais, seguida pelas subfrações AMB<sub>3</sub> e AMB<sub>2</sub>. Com estes dados é possível inferir que há uma correlação entre os elevados teores de flavonoides da subfração AMB<sub>2</sub> e a maior atividade anti-herpética detectada.

Além disso, a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), realizada pelo Mestrando Geison Modesti Costa (Anexo p. 131 e 132), mostrou que a fração MeOH<sub>AMB</sub> e a subfração AMB<sub>2</sub> são basicamente constituídas pelos dois C-glicosilflavonoides majoritários: isoorientina e isovitexina, e ainda, o cromatograma da subfração AMB<sub>2</sub> sugere um maior teor destes constituintes, quando comparado aos cromatogramas das frações MeOH<sub>AMB</sub>, AMB<sub>1</sub> e AMB<sub>3</sub>



## 5.6 Proposta preliminar do mecanismo da ação anti-herpética da subfração AMB<sub>2</sub>

A partir dos resultados obtidos, formulou-se a hipótese do mecanismo da ação anti-herpética da subfração AMB<sub>2</sub> frente ao HSV-1 (cepa KOS) e ao HSV-2 (cepa 333), como pode ser visualizado na figura 24.



**Figura 24:** Proposta do mecanismo da ação anti-HSV-1 e anti-HSV-2 da subfração AMB<sub>2</sub>.

## 6 CONCLUSÕES

- ✓ Das onze amostras testadas na triagem anti-herpética, apenas o extrato bruto aquoso de *Eupatorium serratum* e a fração aquosa de *Laurencia flagellifera* apresentaram considerável toxicidade frente as células VERO e GMK AH1.
- ✓ Com relação à ação anti-herpética, resultados promissores foram obtidos para *Laurencia flagellifera*, *Dodonea viscosa*, *Eupatorium bupleurifolium*, *E. rufescens*, *E. serratum*, *E. tanacetifolium*, *Calea phyllolepis* e *Cecropia glaziovii*.
- ✓ O extrato bruto aquoso e frações de *Cecropia glaziovii* apresentaram baixa citotoxicidade frente às células VERO e GMK AH1, através das duas metodologias empregadas (MTT e Sulforrodamina B).
- ✓ A fração MeOH<sub>AMB</sub> e a sua subfração AMB<sub>2</sub> mostraram-se mais ativas em inibir a replicação do HSV-1 e do HSV-2.
- ✓ O extrato bruto aquoso e as frações testadas de *C. glaziovii* não mostraram ação virucida significativa, que justificasse o seu modo de atuação, com exceção da subfração AMB<sub>2</sub> que na sua CI<sub>50</sub> (37,5 µg/mL) inativou diretamente mais de 50% das partículas do HSV-2 a 37°C; porém, este material não apresentou ação virucida significativa frente ao HSV-2 a 4°C.
- ✓ Na presença de soluções protéicas, a subfração AMB<sub>2</sub> manteve a sua atividade virucida frente ao HSV-2. Este fato, aliado a significativa capacidade de reduzir a infecciosidade deste vírus, em concentrações abaixo da sua CI<sub>50</sub> a 37°C, demonstrou que a subfração AMB<sub>2</sub> possui potencial para ser explorado futuramente como um importante microbicida tópico.
- ✓ A subfração AMB<sub>2</sub> inibiu significativamente a adsorção e a penetração do HSV-1 (cepa KOS) e do HSV-2 (cepa 333) nas células VERO e GMK AH1, respectivamente.

- ✓ A difusão intercelular dos vírus HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333) também foi significativamente inibida pela subfração AMB<sub>2</sub>.
- ✓ Na avaliação da atividade antiviral em função do tempo, a subfração AMB<sub>2</sub> inibiu significativamente a infecção pelo HSV-1 (cepa KOS), ao ser adicionada concomitantemente com o vírus e até 2 h P.I., perdendo sua atividade gradualmente nos intervalos de tempo posteriores. Porém, ao se empregar uma maior concentração de amostra, esta subfração inibiu a replicação viral quando adicionada até 12 h P.I. Em relação ao HSV-2, todas as etapas do ciclo de replicação viral foram inibidas pela adição da subfração AMB<sub>2</sub> até 24 h P.I. Adicionalmente, esta subfração não demonstrou efeito profilático *in vitro* contra a infecção por HSV-1 ou HSV-2.
- ✓ Na avaliação da interferência sobre a síntese de proteínas virais (HSV-1, cepa KOS), a subfração AMB<sub>2</sub> apresentou fraca atividade sobre a síntese da proteína de fase imediata ICP27, mas inibiu a expressão das proteínas tardias gD e gE, sem interferir na síntese da proteína constitutiva  $\beta$ -actina.
- ✓ A quantificação dos compostos fenólicos totais e dos flavonoides totais mostrou que a atividade anti-herpética, detectada para a subfração AMB<sub>2</sub>, está direta e especificamente relacionada com os flavonoides presentes, especialmente os C-glicosilflavonoides majoritários: isorientina e isovitexina.
- ✓ Estes dados sugerem que o mecanismo da ação anti-herpética da subfração AMB<sub>2</sub> está relacionado ao elevado teor de flavonoides do tipo C-glicosídeos, com a inibição da adsorção, penetração e difusão radial dos vírus às células hospedeiras, com a redução da infecciosidade viral (apenas em relação ao HSV-2) e com a diminuição dos níveis da proteína  $\alpha$  ICP27 e das proteínas do envelope gD e gE expressas pelo HSV-1 (cepa KOS).

## 7 PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos, têm-se como perspectivas:

- ✓ Realizar o fracionamento biomonitorado dos outros extratos que mostraram resultados promissores na triagem antiviral (*Eupatorium blupleurifolium*, *E. rufescens*, *E. serratum*, *E. tanacetifolium* e *Calea phyllolepis*);
- ✓ Avaliar a integridade dos vírions após contato com a subfração AMB<sub>2</sub> por microscopia eletrônica de varredura;
- ✓ Avaliar a toxicidade da subfração AMB<sub>2</sub> frente aos lactobacilos da flora vaginal humana normal;
- ✓ Avaliar a atividade anti-HIV da subfração AMB<sub>2</sub>;
- ✓ Avaliar a atividade virucida (anti-HSV-2) da subfração AMB<sub>2</sub> em presença de secreções cervicovaginais;
- ✓ Verificar o possível sinergismo da subfração AMB<sub>2</sub> com o aciclovir;
- ✓ Avaliar a atividade anti-herpética dos C-glicosilflavonoides purificados (isorientina e isovitexina), após seu isolamento da subfração AMB<sub>2</sub>;
- ✓ Testar a atividade anti-herpética do extrato e frações obtidos de *Cecropia glaziovii*, frente a cepas virais resistentes ao aciclovir;
- ✓ Empregar as cepas mutantes HSV-1 (gC<sup>-39</sup>) e HSV-2 (gC<sup>neg1</sup>), já disponíveis no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, para investigar a interação da subfração AMB<sub>2</sub> à glicoproteína viral C (gC);
- ✓ Verificar se há inibição da síntese de proteínas virais nas células GMK AH1 expressas pelo HSV-2, através de técnicas moleculares.

## REFERÊNCIAS

AGUILAR, J.S.; HELD, K.S.; WAGNER, E.K. Herpes simplex virus type 1 shows multiple interactions with sulfonated compounds at binding, penetration, and cell-to-cell passage. **Virus Genes**, p. 241 - 248, 2007.

ALCHÉ, L.E.; BARQUERO, A.A.; SANJUAN, N.A.; COTO, C.E. An antiviral principle present in a purified fraction from *Melia azedarach* L. leaf aqueous extract restrains herpes simplex vírus type 1 propagation. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 348 - 352, 2002.

ALMEIDA, A.P.; MIRANDA, M.M.F.S.; SIMONI, I.C.; WIGG, M.D.; LAGROTA, M.H.C.; COSTA, S.S. Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 562 - 567, 1998.

ALMEIDA, R.R.; RAIMUNDO, J.M.; OLIVEIRA, R.R.; KAPLAN, M.A.C.; GATTAS, C.R.; SUDO, R.T.; ZAPATA-SUDO, G. Activity of *Cecropia lyratiloba* extracts on contractility of cardiac and smooth muscles in wistar rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, p. 109 - 113, 2006.

AMMENDOLIA, M.G.; MARCHETTI, M.; SUPERTI, F. Bovine lactoferrin prevents the entry and intercellular spread of herpes simplex type 1 in Green Monkey Kidney cells. **Antiviral Research**, v. 76, p. 252 - 262, 2007.

AMOROS, M.; SIMÕES, C.M.O.; GIRRE, L.; SAUVAGER, F.; CORMIER, M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral acitivity of propolis. **Journal Natural Products**, v. 55, p. 1732 - 1740, 1992.

ANDERSEN, D.O.; WEBER, N.D.; WOOD, S.G.; HUGHES, B.G.; MURRAY, B.K.; NORTH, J.A. In vitro virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives. **Antiviral Research**, v. 16, p. 185 - 196, 1991.

ANDRADE-CETTO, A.; WIEDENFELD, H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 145 - 149, 2001.

ANDRADE-CETTO, A.; HEINRICH, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 325 - 348, 2005.

ANDRADE-CETTO, A.; BECERRA-JIMÉNEZ, J.; MARTÍNEZ-ZURITA, E.; ORTEGA-LARROCEA, P.; HEINRICH, M. D isease-consensus index as a tool of selecting potential hypoglycemic plants in Chikindzonot, Yucatán, México. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 199 - 204, 2006.

ANDRADE-CETTO, A.; CÁRDENAS, R.; RAMÍREZ-REYES, B. Hypoglycemic effect of *Cecropia peltata* L. on N5-STZ type 2 diabetic rats. **Pharmacology online**, v. 3, p. 203 - 210, 2007.

ANDRADE-CETTO, A.; BECERRA-JIMÉNEZ, J.; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 27 - 32, 2008.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; ANTONIO, R.V.; CRECZYNSKIPASA, T.B.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 843 - 848, 2003.

APERS, S.; BARONIKOVA, S.; SINDAMBIWE, J.B.; WITVROUW, M.; DE CLERCQ, E.; VANDEN BERGHE, D.; VAN MARCK, E.; VLIETINCK, A.J.; PIETERS, L. Antiviral, haemolytic and molluscicidal activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*: Establishment of structure-activity relationships. **Planta Medica**, v.67, p. 528 - 532, 2001.

ARDUINO, P.G.; PORTER, S.R. Herpes simplex virus type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 37, p. 107 - 121, 2008.

ARMAKA, M.; PAPANIKOLAOU, E.; SIVROPOULOU, A.; ARSENAKIS, M. Antiviral properties of isborneol, a potent inhibitor of herpes simplex virus type1. **Antiviral Research**, v. 43, p. 79 - 92, 1999.

BACKES, P; IRGANG, B. **Árvores do Sul**: guia de identificação & interesse ecológico (as principais espécies nativas sul-brasileiras). Rio Grande do Sul: Instituto Souza Cruz, 2002. p. 98.

BAKER, D.D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 1225 - 1244, 2007.

BALUNAS, M.J; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431 - 441, 2005.

BARNARD, D.L.; SMEE, D.F.; HUFFMAN, J.H.; MEYERSON, L.R.; SIDWELL, R.W. Antiherpesvirus activity and mode of action of SP-303, a novel plant flavonoid. **Chemotherapy**, v. 39, p. 203 - 211, 1993.

BERG, C.C. Cecropiaceae a New Family of the Urticales. **Taxon**, v. 27, p. 39 - 44, 1978.

BERG, C.C. *Cecropia* (Cecropiaceae) no Brasil, ao sul da Bacia Amazônica. **Albertoa**, v. 4, p. 213 - 224, 1996.

BERGEFALL, K.; TRYBALA, E.; JOHANSSON, M.; UYAMA, T.; NAITO, S.; YAMADA, S.; KITAGAWA, H.; SUGAHARA, K.; BERGSTRÖM, T. Chondroitin sulfate characterized by the E-disaccharide unit is a potent inhibitor of herpes simplex virus infectivity and provides the virus binding sites on gro2C cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 32193 - 32199, 2005.

BERMEJO, P.; ABAD, M.J.; DÍAZ, A.M.; FERNÁNDEZ, L.; DE SANTOS, J.; SANCHEZ, S.; VILLAESCUSA, L.; CARRASCO, L.; IRURZUN, A. Antiviral activity of seven iridoids, three saikosaponins and one phenylpropanoid glycoside extracted from *Bupleurum rigidum* and *Scrophularia scorodonia*. **Planta Medica**, v. 68, p. 106 - 110, 2002.

BOEHMER, P.E.; LEHMAN, I.R. Herpes simplex virus DNA replication. **Annual Reviews in Biochemistry**, v. 66, p. 347- 384, 1997.

BOULWARE, S.L.; BRONSTEIN, J.C.; NORDBY, E.C.; WEBER, P.C. Identification and characterization of a benzothiophene inhibitor of herpes simplex virus type 1 replication which acts at the immediate early stage of infection. **Antiviral Research**, v. 51, p. 111 - 125, 2001.

BOURNE, K.Z.; BOURNE, N.; REISING, S.F.; STANBERRY, L.R. Plant products as topical microbicide candidates: assessment of in vitro and in vivo activity against herpes simplex virus type 2. **Antiviral Research**, v. 42, p. 219 - 226, 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248 - 254, 1976.

BRADY, R.C.; BERNSTEIN, D.J. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**, v. 61, p. 73 - 81, 2004.

BUCKWOLD, V.E.; WILSON, R.J.H.; NALCA, A.; BEER, B.B.; VOSS, T.G.; TURPIN, J.A.; BUCKHEIT, R.W.; WEI, J.; WENZEL-MATHERS, M.; WALTON, E.M.; SMITH, R.J.; PALLANSCH, M.; WARD, P.; WELLS, J.; CHUVALA, L.; SLOANE, S.; PAULMAN, R.; RUSSELL, J.; HARTMAN, T.; PTAK, R. Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA and RNA viruses. **Antiviral Research**, v. 61, p. 57 - 62, 2004.

BUCKHEIT, R.W.; RUSSELL, J.D.; XU, Z.Q.; FLAVIN, M. Anti-HIV-1 activity of calanolides used in combination with other mechanistically diverse inhibitors of HIV-1 replication. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v. 11, p. 321 - 327, 2000.

BULTMANN, H.; TEUTON, J.; BRANDT, C.R. Addition of a C-terminal cysteine improves the anti-herpes simplex virus activity of a peptide containing the human immunodeficiency virus type 1 TAT protein transduction domain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 1596 - 1607, 2007.

BURLESON, F.G.; CHAMBERS, T.M.; WIEDBRAUK, D.L. **Virology**: a laboratory manual. San Diego: Academic, 1992. p. 250.

BUTLER, M.S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 475 - 516, 2008.

CARAUTA, J.P.P. Moráceas do Estado do Rio de Janeiro. **Albertoa**, v. 4, p. 145 - 195, 1996.

CARLUCCI, M.J.; CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.C.; CERESO, A.S.; DAMONTE, E.B. Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. **Antiviral Research**, v. 43, p. 93 - 102, 1999.

CELUM, C.; LEVINE, R.; WEAVER, M.; WALD, A. Genital herpes and human immunodeficiency virus: double trouble. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 82, p. 447 - 453, 2004.

CELUM, C.; WALD, A.; HUGHES, J.; SANCHEZ, J.; REID, S.; DELANY-MORETLWE, S.; COWAN, F.; CASAPIA, M.; ORTIZ, A.; FUCHS, J.; BUCHBINDER, S.; KOBLIN, B.; ZWERSKI, S.; ROSE, S.; WANG, J.; COREY, L. Effect of aciclovir on HIV-1 acquisition in herpes simplex virus 2 seropositive women and men who have sex with men: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 371, p. 2109 - 2119, 2008.

CERNIK, C.; GALLINA, K.; BRODELL, R.T. The treatment of herpes simplex infections: an evidence-based review. **Archives of Internal Medicine**, v. 168, p. 1137 - 1144, 2008.

CHATTOPADHYAY, D.; ARUNACHALAM, G.; MANDAL, A.B.; BHATTACHARYA, S.K. Dose-dependent therapeutic antiinfectives from ethnomedicines of bay islands. **Chemotherapy**, v. 52, p. 151 - 157, 2006.

CHATTOPADHYAY, D.; NAIK, T.N. Antivirals of ethnomedicinal origin: structure-activity relationship and scope. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 275 - 301, 2007.

CHATTOPADHYAY, D.; KHAN, M.T.H. Ethnomedicines and ethnomedicinal phytophores against herpesviruses. **Biotechnology Annual Review**, v. 14, p. 297 - 348, 2008.

CHATTOPADHYAY, K.; MATEU, C. G.; MANDAL, P.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; RAY, B. Galactan sulfate of *Grateloupia indica*: Isolation, structural features and antiviral activity. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1428 - 1435, 2007.

CHENG, H.Y.; LIN, C.C.; LIN, T.C. Antiherpes simplex virus type 2 activity of casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* Linn. **Antiviral Research**, v. 55, p. 447 - 455, 2002.



CHENG, H.Y.; LIN, T.A.; ISHIMARU, K.; YANG, C.M.; WANG, K. C.; LIN, C.C. In vitro antiviral activity of prodelphinidin B-2 3,3'-di-O-gallate from *Myrica rubra*. **Planta Medica**, v. 69, p. 953 - 956, 2003.

CHENG, H.Y.; LIN, T.C.; YANG, C.M.; WANG, K.C.; LIN, L.T.; LIN, C.C.; Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits both virus entry and late stage of herpes simplex virus type 2 infection *in vitro*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 577 - 583, 2004.

CHENG, H.Y.; LIN, T.A.; YANG, C.M.; SHIEH, D.E.; LIN, C.C. In vitro anti-HSV-2 activity and mechanism of action of proanthocyanidin A-1 from *Vaccinium vitis-idaea*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 10 - 15, 2005.

CHENG, P.; MA, Y.B.; YAO, S.Y.; ZHANG, Q.; WANG, E.J. Two new alkaloids and active anti-hepatitis B virus constituents from *Hypserpa nitida*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 5316 - 5320, 2007.

CHIANG, L.C.; NG, L.T.; CHENG, P.W.; CHIANG, W.; LIN, C.C. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 32, p. 811 - 816, 2005.

CHIN, Y.W.; BALUNAS, M.J.; CHAI, H.B.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from natural sources. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 2, p. 239 - 253, 2006.

CLAVIN, M.; GORZALCZANY, S.; MACHO, A.; MUÑOZ, E.; FERRARO, G.; ACEVEDO, C.; MARTINO, V. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 585 - 589, 2007.

CLEATOR, G.M.; KLAPPER, P.E. The Herpesviridae. In: ZUCKERMAN, A.J.; BANATVALA, J.E.; PATTISON, J.R.; GRIFFITHS, P.D.; SCHOUB, B.D. **Principles and Practice of Clinical Virology**. 5.ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. p. 47 - 51.

COEN, D.M.; SCHAFFER, P.A. Antiherpesvirus drugs: a promising spectrum of new drugs and drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 278 - 288, 2003.

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

CONDIT, R.C. Principles of virology. In: 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 & Wilkins, 2007. p. 25 - 57.

CONSOLINI, A.E.; MIGLIORI, G.N. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 417 - 422, 2005.

CONSOLINI, A.E.; RAGONE, M.I.; MIGLIORI, G.N.; CONFORTI, P.; VOLONTÉ, M.G. Cardiotonic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 90 - 96, 2006.

COS, P.; MAES, L.; VANDEN BERGHE, D.; HERMANS, N.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Plant substances as anti-HIV agents selected according to their putative mechanism of action. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 284 - 293, 2004.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro "proof-of-concept". **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 290 - 302, 2006.

COWAN, M.M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564 - 582, 1999.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343 - 356, 2005.

CYSNEIROS, R.M.; MESIA, S.V.; TERSARIOL, I.L.S.; LAPA, A.J. Evidências para ação anti-secretora ácida gástrica da *Cecropia glazioui* Sneth. In: XIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 1996, Florianópolis. **Anais**, Florianópolis, 1996. p. 103.

CYSNEIROS, R.M. **Mecanismo da ação hipotensora do extrato aquoso e frações purificadas da *Cecropia glazioui* Sneth.** 1997. 72 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1997.

DA SILVA, A.G. Propriedade gerais dos herpesvírus. In: LUPI, O.; DA SILVA, A.G.; PEREIRA JR, A.C. **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento.** Rio de Janeiro: Medsi, 2000. p. 1 - 14.

DAI-JU, J.Q.; LI, L.; JOHNSON, L.A.; SANDRI-GOLDIN, R.M. ICP27 interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II and facilitates its recruitment to herpes simplex virus 1 transcription sites, where it undergoes proteasomal degradation during infection. **Journal of Virology**, v. 80, p. 3567 - 3581, 2006.

D'HERELLE, F. **The bacteriophage and its behavior.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1926.

DE CLERCQ, E. Strategies in the design of antiviral drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, p. 13 - 25, 2002.

- DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current use. **Journal of Clinical Virology**, v. 30, p. 115 - 133, 2004.
- DE CLERCQ, E. Recent highlights in the development of new antiviral drugs. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 552 - 560, 2005.
- DE CLERCQ, E.; FIELD, H.J. Antiviral prodrugs – the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 1 - 11, 2006.
- DE LOGU, A.; LOY, G.; PELLERANO, M.L.; BONSIGNORE, L.; SCHIVO, M.L. Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. **Antiviral Research**, v. 48, p. 177 - 185, 2000.
- DEIG, E.E. Inhibition of herpes virus replication by marine algae extracts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 6, p. 524 - 525, 1974.
- DELARCINA, S.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; SOUCCAR, C.; CYSNEIROS, R.M.; TANAE, M.M.; LAPA, A.J. Inhibition of histamine-induced bronchospasm in guinea pigs treated with *Cecropia glaziovii* Sneth and correlation with the in vitro activity in tracheal muscles. **Phytomedicine**, v. 14, p. 328 - 332, 2007.
- DEY, P.M.; HARBONE, J.B. **Methods in plant biochemistry**. San Diego: Academic. v. 6, 1991.
- DI STASI, L.C.; SEITO, L.N.; HURUMA-LIMA, C.A. Urticales medicinais In: DI STASI, L.C.; HURUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: Unesp, 2002. p. 230 – 235.
- DI STASI, L.C.; HIRUMA, C.A.; GUIMARÃES, M.; SANTOS, C.M. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, v. 65, p. 530 - 540, 1994.
- DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v. 73, p. 69 - 91, 2002.
- DOMINGUEZ, X. A.; FRANCO, R.; CANO, C.G.; CHAVEZ, C.N. Medicinal plants of Mexico. Part XLIV. Isolation of 3,6,4'-trimethoxy-5,7-dioxyflavone from the aerial part of *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* Jacq (Sapindaceae). **Revista Latinoamericana de Química**, v. 11, p. 3 - 4, 1980.
- DOWDLE, W.R.; NAHMIA, A.J.; HARWELL, R.W.; PAULS, F.P. Association of antigenic type of Herpesvirus hominis with site of viral recovery. **Journal of Immunology**, v. 99, p. 974 - 980, 1967.

DUBELCCO, R.; VOGT, M. Some problems of animal virology as studied by the plaque technique. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 18, p. 273 - 279, 1953.

EFFERTH, T.; ROMERO, M.R.; WOLF, D.G.; STAMMINGER, T.; MARIN, J.J.G.; MARSCHALL, M. The antiviral activities of artemisinin and artesunate. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 804 - 811, 2008.

EICH, E.; PERTZ, H.; KALOGA, M.; SCHULZ, J.; FESEN, M.R.; MAZUMDER, A.; POMMIER, Y. (-)-Arctigenin as a lead structure for inhibitors of human immunodeficiency virus type-1 integrase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, p. 86 - 95, 1996.

EKBLAD, M.; BERGSTRÖM, T.; BANWELL, M.G.; BONNET, M.; RENNER, J.; FERRO, V.; TRYBALA, E. Anti-herpes simplex virus activities of two novel disulphated cyclitols. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v. 17, p. 97 - 106, 2006.

ELLERMANN-ERIKSEN, S. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. **Virology Journal**, v. 2, p. 1 - 30, 2005.

ELION, G.B.; FURMAN, P.A.; FYFE, J.A.; DE MIRANDA, P.; BEAUCHAMP, L.; SCHAEFFER, H.J. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, p. 5716 - 5720, 1977.

ELOFF, J.N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 1 - 8, 1998.

ERNST, M.E.; FRANEY, R.J. Acyclovir-and ganciclovir-induced neurotoxicity. **The annals of Pharmacotherapy**, v. 32, p.111 - 113, 1998.

FATAHZADEH, M.; SCHAWARTZ, R.A. Human herpes simplex virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 57, p. 737 - 763, 2007.

FIELD, H.J. Herpes simplex virus antiviral drug resistance – current trends and future prospects. **Journal of Clinical Virology**, v. 21, p. 261 - 269, 2001.

FREITAS, A.M. **Avaliação da atividade antiviral de extratos de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, Araucariaceae**. 2001. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

GARG, H.; FRANCELLA, N.; TONY, K.A.; AUGUSTINE, L.A.; BARCHI JR, J.J.; FANTINI, J.; PURI, A.; MOOTOO, D.R.; BLUMENTHAL, R. Glycoside analogs of  $\beta$ -

galactosylceramide, a novel class of small molecule antiviral agents that inhibit HIV-1 entry. **Antiviral Research**, v. 80, p. 54 - 61, 2008.

GAUNTT, C.J.; WOOD, H.J.; MCDANIEL, H.R.; MCANALLEY, B.H. Aloe polymannose enhances anti-coxsackievirus antibody titres in mice. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 261 - 266, 2000.

GERBER, S.I.; BELVAL, B.J.; HEROLD, B.C. Differences in the role of glycoprotein C of HSV-1 and HSV-2 in viral binding may contribute to serotype differences in cell tropism. **Virology**, v. 214, p. 29 - 39, 1995.

GERENUTTI, M.; PRESTES, A.F.R.O.; SILVA, M.G.; FIOL, F.D.S.D.; FRANCO, Y.O.; VENANCIO, P.C.; GROppo, F.C. The effect of *Cecropia glaziovii* Snethlage on the physical and neurobehavioral development of rats. **Pharmazie**, v. 63, p. 398 - 404, 2008.

GETIE, M.; GEBRE-MARIAM, T.; RIETZ, R.; NEUBERT, R. H. H. Evaluation of the release profiles of flavonoids from topical formulations of the crude extract of the leaves of *Dodonaea viscosa* (Sapindaceae). **Pharmazie**, v. 57, p. 320 - 322, 2002.

GIANOLI, E.; SENDOYA, S.; VARGAS, F.; MEJÍA, P.; JAFFÉ, R.; RODRÍGUEZ, M.; GUTIÉRREZ, A. Patterns of *Azteca* ants' defence of *Cecropia* trees in a tropical rainforest: support for optimal defence theory. **Ecological Research**, v. 23, p. 905 - 908, 2008.

GIRARD, M.; HIRTH, L. **Virologie Moléculaire**. 2.ed. Paris: Doin, 1989. 617 p.

GONÇALVES, J.L.S.; LEITÃO, S.G.; DELLE MONACHE, F.; MIRANDA, M.M.F.S.; SANTOS, M.G.M.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. In vitro antiviral effect of flavonoid-rich extracts of *Vitex polygama* (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. **Phytomedicine**, v. 6, p. 477 - 480, 2001.

GOSSE, B.; GNABRE, J.; BATES, R.B.; DICUS, C.W.; NAKKIEW, P.; HUANG, R.C.C. Antiviral saponins from *Tieghemella heckelii*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1942 - 1944, 2002.

GRÜNEWALD, K.; DESAI, P.; WINKLER, D.C.; HEYMANN, J.B.; BELNAP, D.M.; BAUMEISTER, W.; STEVEN, A.C. Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. **Science**, v. 302, p. 1396 - 1398, 2003.

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

HAN, J.; YE, M.; QIAO, X.; XU, M.; WANG, B.; GUO, D. Characterization of phenolic compounds in the chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 516 - 525, 2008.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 294 - 300, 2000.

HARVEY, A.L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 894 - 901, 2008.

HERRERA-ARELLANO, A.; AGUILAR-SANTAMARÍA, L.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, B.; NICASIO-TORRES, P.; TORTORIELLO, J. Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. **Phytomedicine**, v. 11, p. 561 - 566, 2004.

HIGUCHI, H.; MORI, K.; KATO, A.; OHKUMA, T.; ENDO, T.; KAJI, H.; KAJI, A. Antiretroviral activities of anthraquinones and their inhibitory effects on reverse transcriptase. **Antiviral Research**, v. 15, p. 205 - 216, 1991.

HIKAWCZUK, V.J.; SAAD, J.R.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A.O.; GIORDANO, O.S.; Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Cecropia pachystachya*. **Anales de la Asociación Química Argentina**, v. 86, p. 167 - 170, 1998.

HOCH, B.S.; SHAHMEHDI, S.J.; LOUIS, B.M.; LIPNER, H.I. Foscarnet alters antidiuretic hormone-mediated transport. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2008 - 2012, 1995.

HOUGHTON, P.J. Medicinal plants and the control of parasites: compounds with anti-HIV activity from plants. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 601 - 604, 1996.

HOUGHTON, P.J. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 419 - 423, 2000.

HU, J.M.; HSIUNG, G.D. Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. **Antiviral Research**, v. 11, p. 217 - 232, 1989.

HUA, H.M.; PENG, J.; DUNBAR, D.C.; SCHINAZI, R.F.; ANDREWS, A.G.C.; CUEVAS, C.; GARCIA-FERNANDEZ, L.F.; KELLY, M.; HAMANN, M.T. Batzelladine alkaloids from the caribbean sponge *Monanchora unguifera* and the significant activities against HIV-1 and AIDS opportunistic infectious pathogens. **Tetrahedron**, v. 63, p. 11179 - 11188, 2007.

HUDSON, J.B. **Antiviral compounds from plants**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1990. p. 133 - 148.

HUDSON, J.; TOWERS, G.H.N. Phytomedicines as antivirals. **Drugs of the Future**, v. 24, p. 295 - 320, 1999.

HULEIHEL, M.; ISANU, V. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. **Israel Medical Association Journal**, v. 4, p. 923 - 927, 2002.

HWANG, D.R.; WU, Y.S.; CHANG, C.W.; LIEN, T.W.; CHEN, W.C.; TAN, U.K.; HSU, J.T.A.; HSIEH, H.P. Synthesis and antiviral activity of a series of sesquiterpene lactones and analogues in the subgenomic HCV replicon system. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 83 - 91, 2006.

ISAACS, C.E.; JIA, J.H.; XU, W. A lipid-peptide microbicide inactivates herpes simplex virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 3182 - 3184, 2004.

ITO, J.; CHANG, F.R.; WANG, H.K.; PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; KILGORE, N.; LEE, K.H. Anti-AIDS agents. 48. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1278 - 1281, 2001.

ITOKAWA, H.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; AKIYAMA, T.; LEE, K.H. Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. **Journal of Natural Medicines**, v. 62, p. 263 - 280, 2008.

JASSIM, S.A.A.; NAJI, M.A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 412 - 427, 2003.

JAYAVASU, C.; BALACHANDRA, K.; SANGKITJAPORN, S. Clinical trial in the treatment of genital herpes patients with *Clinacanthus nutans* extract. **Communicable Disease Journal**, v. 18, p. 152 - 161, 1992.

JEFFERY, K.; PILLAY, D. Diagnostic Approaches. In: ZUCKERMAN, A.J.; BANATVALA, J.E.; PATTISON, J.R.; GRIFFITHS, P.D.; SCHOUB, B.D. **Principles and Practice of Clinical Virology**. 5.ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. p. 1 - 22.

JENSSEN, H.; SANDVIK, K.; ANDERSEN, J.H.; HANCOCK, R.E.W.; GUTTEBERG, T.J. Inhibition of HSV cell-to-cell spread by lactoferrin and lactoferricin. **Antiviral Research**, v. 79, p. 192 - 198, 2008.

JIANG, R.W.; MA, S.C.; HE, Z.D.; HUANG, X.S.; BUT, P.P.H.; WANG, H.; CHAN, S.P.; OOI, E.C.; XU, H.X.; MAK, T.C.W. Molecular structures and antiviral activities of naturally occurring and modified cassane furanoditerpenoids and friedelane triterpenoids from *Caesalpinia minax*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2161 - 2170, 2002.

JOHNSON, D.C.; WEBB, M.; WISNER, T.W.; BRUNETTI, C. Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread. **Journal of Virology**, v. 75, p. 821 - 823, 2001.

JOHNSON, K.E.; SONG, B.; KNIPE, D.M. Role for herpes simplex virus 1 ICP27 in the inhibition of type I interferon signaling. **Virology**, v. 374, p. 487 - 494, 2008.

JUNAKAR, P.R.; CHERRY, R.J. Temperature and pH dependence of the haemolytic activity of influenza virus and of the rotational mobility of the spike glycoproteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 854, p. 198 - 206, 1986.

KANG, K.H.; HUH, H.; KIM, B.K.; LEE, C.K. An antiviral furoquinone from *Paulownia tomentosa* Steud. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 624 - 626, 1999.

KASHIWADA, Y.; AOSHIMA, A.; IKESHIRO, Y.; CHEN, J.P.; FURUKAWA, H.; ITOIGAWA, M.; FUJIOK, T.; MIHASHI, K.; COSENTINO, L.M.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; LEE, K.H. Anti-HIV benzyloisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure-activity correlations with related alkaloids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 443 - 448, 2005.

KAUL, T.N.; MIDDLETON, E.J.; OGRA, P.L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. **Journal of Medical Virology**, v. 15, p. 71 - 79, 1985.

KHAN, M.T.H.; ATHER, A.; THOMPSON, K.D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral Research**, v. 67, p. 107-119, 2005.

KERNAN, M.R.; SENDL, A.; CHEN, J.L.; JOLAD, S.D.; BLANC, P.; MURPHY, J.T.; STODDART, C.A.; NANAKORN, W.; BALICK, M.J.; ROZHON, E.J. Two new lignans with activity against influenza virus from the medicinal plant *Rhinacanthus nasutus*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 635 - 637, 1997.

KOCH, C.; REICHLING, J.; SCHNEELE, J.; SCHNITZLER, P. Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. **Phytomedicine**, v. 15, p. 71 - 78, 2008.

KOELLE, D.M.; COREY, L. Herpes Simplex: Insights on pathogenesis and possible vaccines. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 381 - 395, 2008.

KRATZ, J.M.; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; LEAL, P.C.; NUNES, R.J.; YUNES, R.A.; TRYBALA, E.; BERGSTRÖM, T.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 903 - 907, 2008.

KUO, Y.C.; CHEN, C.C.; TSAI, W.J.; HO, Y.H. Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by *Psychotria serpens*: relationship to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. **Antiviral Research**, v. 51, p. 95 - 109, 2001.

KUO, Y.C.; LIN, L.C.; TSAI, W.J.; CHOU, C.J.; KUNG, S.H.; HO, Y.H. Samarangenin B from *Limonium sinense* suppresses herpes simplex virus type 1 replication in vero cells by regulation of viral macromolecular synthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 2854 - 2864, 2002.



LACAILLE-DUBOIS, M.A.; FRANCK, U.; WAGNER, H. Search for potential Angiotensine Converting Enzyme (ACE)- inhibitors from plants. **Phytomedicine**, v. 8, p. 47 - 52, 2001.

LACHMANN, R. Herpes simplex virus latency. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 5, p. 1 - 10, 2003.

LARRALDE, O.; SMITH, R.W.; WILKIE, G.S.; MALIK, P.; GRAY, N.K.; CLEMENTS, J.B. Direct stimulation of translation by the multifunctional herpesvirus ICP27 protein. **Journal of Virology**, v. 80, p.1588 - 1591, 2006.

LAZARINI, P.B.; VIANNA, M.F.; ALCANTARA, M.P.A.; SCALIA, R.A.; CAIAFFA FILHO, H.H. Pesquisa do vírus herpes simples na saliva de pacientes com paralisia facial periférica de Bell. **Revista Brasileira De Otorrinolaringologia**, v. 72, p. 7 - 11, 2006.

LHULLIER, C.; SILVA, I.T.; SIMÕES, C.M.O.; FALKENBERG, M.B.; SCHENKEL, E.P. Antiherpes activity of the red seaweed *Chondrophycus flagelliferus* (Rhodomelaceae, Ceramiales). In: 1st Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution Systematics and Ecology, 2007, São Pedro. **Anais**. São Pedro: 2007. p. 51.

LI, Y.L.; MA, S.C.; YANG, Y.T.; YE, S.M.; BUT, P.P.H. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 365 - 368, 2002.

LI, S.Y.; CHEN, C.; ZHANG, H.; GUO, H.; WANG, H.; WANG, L.; ZHANG, X.; HUA, S.; YU, J.; XIAO, P.; LI, R.; TAN, X. Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. **Antiviral Research**, v. 67, p. 18 - 23, 2005.

LIMA-LANDMAN, M.T.R.; BORGES, A.C.R.; CYSNEIROS, R.M.; DE LIMA, T.C.M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: an in vivo approach to the hypotensive mechanism. **Phytomedicine**, v. 14, p. 314 - 320, 2007.

LIU, H.; QIU, N.; DING, H.; YAO, R. Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 chinese herbals suitable for medical or food uses. **Food Research International**, v. 41, p. 363 - 370, 2008.

LYU, S.Y.; RHIM, J.Y.; PARK, W.B. Antiherpetic activities of flavonoids against Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) and Type 2 (HSV-2) *in vitro*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, p. 1293 - 1301, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Cecropia pachystachya* Trécul. In: LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. p. 118 - 119.

LÜCKEMEYER, D.D.; MULLER, V.D.M.; COSTA, G.M.; PETRONILHO, F.; PIZZOL, F.D.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O.; REGINATTO, F.H. Avaliação da potencial atividade antiviral de *Cecropia* sp. In: XV Seminário de Iniciação Científica da UFSC, 2005, Florianópolis. **Resumos**. Florianópolis: Lagoa Editora, 2005.

LUPI, O. Terapêutica anti-herpética. In: LUPI, O.; DA SILVA, A.G.; PEREIRA JR, A.C. **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000a. p. 233 - 254.

LUPI, O.; PEREIRA JR, A.C. Herpes simples. In: LUPI, O.; DA SILVA, A.G.; PEREIRA JR, A.C. **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000b. p. 43 - 70.

LUPI, O.; SEMENOVITCH, I.; PEREIRA JR, A.C. Epidemiologia dos Herpesvírus. In: LUPI, O.; DA SILVA, A.G.; PEREIRA JR, A.C. **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000c. p. 15 - 31.

MADUREIRA, A.M.; ASCENSO, J.R.; VALDEIRA, L.; DUARTE, A.; FRADE, J.P.; FREITAS, G.; FERREIRA, M.J.U. Evaluation of the antiviral and antimicrobial activities of triterpenes isolated from *Euphorbia segetalis*. **Natural Product Research**, v. 17, p. 375 - 380, 2003.

MAMIDYALA, S.K.; FIRESTINE, S.M. Advances in herpes simplex virus antiviral therapies. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 16, p. 1463 - 1480, 2006.

MANFREDI, K.P.; BLUNT, J.W.; CARDELLINA, J.H.I.; MCMAHON, J.B.; PANNELL, L.K.; CRAGG, G.M.; BOYD, M.R. Novel alkaloids from the tropical plant *Ancistrocladus abbreviatus* inhibit cell killing by HIV-1 and HIV-2. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 34, p. 3402 - 3405, 1991.

MARCHETTI, M.; AMMENDOLIA, M.G.; SUPERTI, F. Glycosaminoglycans are not indispensable for the anti-herpes simplex virus type 2 activity of lactoferrin. **Biochimie**, v. 91, p. 155 - 159, 2009.

MARGOLIS, T.P.; IMAI, Y.; YANG, L.; VALLAS, V.; KRAUSE, P.R. Herpes simplex virus type 2 (HSV-2) establishes latent infection in a different population of ganglionic neurons than HSV-1: Role of latency-associated transcripts. **Journal of Virology**, v. 81, p. 1872 - 1878, 2007.

MARTIN, K.W.; ERNST, E. Antiviral agents from plants and herbs: a systematic review. **Antiviral Therapy**, v. 8, p. 77 - 90, 2003.

MAZZEI, M.; NIEDDU, E.; MIELE, M.; BALBI, A.; FERRONE, M.; FERMEGLIA, M.; MAZZEI, M.T.; PRICL, S.; LA COLLA, P.; MARONGIU, F.; IBBA, C.; LODDO, R. Activity of mannich bases of 7 - hydroxycoumarin against Flaviviridae. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 2591 - 2605, 2008.

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

METTENLEITER, T.C. Brief overview on cellular virus receptors. **Virus Research**, v. 82, p. 3 - 8, 2002.

MICHELINI, F.M.; RAMIREZ, J.A.; BERRA, A.; GALAGOVSKY, L.R.; ALCHE, L.E. In vitro and in vivo antiherpetic activity of three new synthetic brassinosteroid analogues. **Steroids**, v. 69, p. 713 - 720, 2004.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; BEEK, T.A.V. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231 - 237, 2004.

MOLYNEUX, R.J.; LEE, S.T.; GARDNER, D.R.; PANTER, K.E.; JAMES, L.F. Phytochemicals: The good, the bad and the ugly? **Phytochemistry**, v. 68, p. 2973 - 2985, 2007.

MONKS, N.R.; FERRAZ, A.; BORDIGNON, S.; MACHADO, K.R.; LIMA, M.F.S.; ROCHA, A.B.; SCHWARTSMANN, G. *In vitro* cytotoxicity of extracts from Brazilian Asteraceae. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, p. 494 - 500, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55 - 63, 1983.

MUKHTAR, M.; ARSHAD, M.; AHMAD, M.; POMERANTZ, R.J.; WIGDAHL, B.; PARVEEN, Z. Antiviral potentials of medicinal plants. **Virus Research**, v. 131, p. 111 - 120, 2008.

NAGARAJU, A.; KARIMULLA, S. Accumulation of elements in plants and soils in and around Nellore mica belt, Andhra Pradesh, India - a biogeochemical study. **Environmental Geology**, v. 41, p. 852 - 860, 2002.

NAIR, A.G.R.; SUBRAMANIAN, S.S. Isorhamnetin and quercetin glycosides from *Dodonea viscosa* and *Sapindus emarginatus*. **Indian Journal of Chemistry**, v. 13, p. 639 - 640, 1975.

NAITHANI, V.; NAIR, S.; KAKKAR, P. Decline in antioxidant capacity of Indian herbal teas during storage and its relation to phenolic content. **Food Research International**, v. 39, p. 176 - 181, 2006.

NEWMAN, D.J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 2589 - 2599, 2008.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Reports**, v. 17, p. 215 - 234, 2000.

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

NICASIO, P.; AGUILAR-SANTAMARÍA, L.; ARANDA, E.; ORTIZ, S.; GONZÁLEZ, M. Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two *Cecropia* species. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 661 - 664, 2005.

NINAHUAMAN, M.F.M.L.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J.; LIMA-LANDMAN, M.T.R. ACE activity during the hypotension produced by standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth: a comparative study to captopril effects in rats. **Phytomedicine**, v. 14, p. 321 - 327, 2007.

NYBERG, K.; EKBLAD, M.; BERSTRÖM, E.; FREEMAN, C.; PARISH, C.R.; FERRO, V.; TRYBALA, E. The low molecular weight heparan sulfate-mimetic, PI-88, inhibits cell-to-cell spread of herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 63, p. 15 - 24, 2004.

OJIMA, I. Modern natural products chemistry and drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 2587 - 2588, 2008.

OLIVEIRA, E. C. Perspectivas da exploração de algas marinhas no Brasil. **Jornal Brasileiro de Ciências**, São Paulo, v. 1, p. 15 - 16, 1981.

OLIVEIRA, R.R.; LOPES, D.; CARAUTA, J.P.P.; SANTOS, E.C.T.; BERGMANN, B.R.; KAPLAN, M.A.C. Pharmacological evaluation of *Cecropia purpurascens* Berg. In: Sessão Regular da Academia Brasileira de Ciências, 2000, Rio de Janeiro. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro: 2000. p. 293.

OVENDEN, S.P.B.; YU, J.; SAN WAN, S.; SBERNA, G.; MURRAY TAIT, R.; RHODES, D.; COX, S.; COATES, J.; WALSH, N.G.; MEURER-GRIMES, B.M. Globoidnan A: A lignan from *Eucalyptus globoidea* inhibits HIV integrase. **Phytochemistry**, v. 65, p. 3255 - 3259, 2004.

PÉREZ-GUERRERO, C.; HERRERA, M.D.; ORTIZ, R.; SOTOMAYOR, M.A.; FERNÁNDEZ, M.A. A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 279 - 284, 2001.

PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 57 - 60, 2005.

PIO CORRÊA, M.; **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1978. v. 4. p. 199 - 208.

PIRET, J.; ROY, S.; GAGNON, M.; LANDRY, S.; DÉSORMEAUX, A.; OMAR, R.F.; BERGERON, M.G. Comparative study of mechanisms of herpes simplex virus inactivation by sodium lauryl sulfate and n-lauroylsarcosine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 2933 - 2942, 2002.

POLCICOVA, K.; GOLDSMITH, K.; RAINISH, B.L.; WISNER, T.W.; JOHNSON, D.C. The extracellular domain of herpes simplex virus gE is indispensable for efficient cell-to-cell spread: Evidence for gE/gI receptors. **Journal of Virology**, v. 79, p. 11990 - 12001, 2005.

REVILLA-MONSALVE, M.C.; ANDRADE-CETTO, A.; PALOMINO-GARIBAY, M.A.; WIEDENFELD, H.; ISLAS-ANDRADE, S. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 636 - 640, 2007.

RISHTON, G.M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, p. 43 - 49, 2008.

ROBIN, V.; BOUSTIE, M.; AMOROS, M.; GIRRE, L. *In vitro* antiviral activity of seven *Psiadia* species, Asteraceae: isolation of two antipoliiovirus flavonoids from *Psiadia dentata*. **Pharmaceutical Pharmacological Communications**, v. 4, p. 61 - 64, 1998.

ROCHA, F.F.; LAPA, A.J.; DE LIMA, T.C.M. Evaluation of the anxiolytic-like effects of *Cecropia glaziovii* Sneth in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 71, p. 183 - 190, 2002.

ROCHA, F.F.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; SOUCCAR, C.; TANAE, M.M.; DE LIMA, T.C.M.; LAPA, A.J. Antidepressant-like effect of *Cecropia glaziovii* Sneth and its constituents – *In vivo* and *in vitro* characterization of the underlying mechanism. **Phytomedicine**, v. 14, p. 396 - 402, 2007.

ROCHA, G.G.; SIMÕES, M.; LÚCIO, K.A.; OLIVEIRA, R.R.; KAPLAN, M.A.C.; GATTAS, C.R. Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 7355 - 7360, 2007.

ROIZMAN, B.; PELLETT, P.E. The family Herpesviridae: A brief introduction. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.; LAMB, R.; MARTIN, M.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. (Eds.). **Fields Virology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1929 - 1939.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D.M.; WHITLEY, R.J. Herpes Simplex Viruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.; LAMB, R.; MARTIN, M.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (Eds.). **Fields Virology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 2502 – 2601.

- ROTTINGHAUS, S.T.; WHITLEY, R.J. Current non-AIDS antiviral chemotherapy. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 5, p. 217 - 230, 2007.
- ROWLEY, D.C.; HANSEN, M.S.T.; RHODES, D.; SOTRIFFER, C.A.; NI, H.; MCCAMMON, D.B.; BUSHMAN, F.D.; FENICAL, W. Thalassiolins A–C: New Marine-Derived Inhibitors of HIV cDNA Integrase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 3619 - 3625, 2002.
- RUCKER, G.; HEIDEN, K.; SCHENKEL, E. Antitumor-active lactones from *Kaunia rufescens* and *Eupatorium cannabinum*. **Journal of the Indian Institute of Science**, v. 81, p. 333 - 334, 2001.
- SAKLANI, A.; KUTTY, S.K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 161 - 171, 2008.
- SAKURAI, N.; WU, J.H.; SASHIDA, Y.; MIMAKI, Y.; NIKAIDO, T.; KOIKE, K.; ITOKAWA, H.; LEE, K.H. Anti-AIDS Agents. Part 57: Actein, an anti-HIV principle from the rhizome of *Cimicifuga racemosa* (black cohosh), and the anti-HIV activity of related saponins. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 1329 - 1332, 2004.
- SATOH, T.; ARII, J.; SUENAGA, T.; WANG, J.; KOGURE, A.; UEHORI, J.; ARASE, N.; SHIRATORI, I.; TANAKA, S.; KAWAGUCHI, Y.; SPEAR, P.G.; LANIER, L.L.; ARASE, H. PILR $\alpha$  is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. **Cell**, v. 132, p. 935 - 944, 2008.
- SATTENTAU, Q. Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 815 - 826, 2008.
- SCHMIDTKE, M.; KARGER, A.; MEERBACH, A.; EGERER, R.; STELZNER, A.; MAKAROV, V. Binding of a *N,N'*-bistheteryl derivative of dispirotriperazine to heparan sulfate residues on the cell surface specifically prevents infection of viruses from different families. **Virology**, v. 311, p. 134 - 143, 2003.
- SCHNITZLER, P.; NOLKEMPER, S.; STINTZING, F.C.; REICHLING, J. Comparative *in vitro* study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations. **Phytomedicine**, v. 15, p. 62 - 70, 2008.
- SERKEDJIEVA, J.; IVANCHEVA, S. Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 59 - 68, 1999.
- SHAHAT, A.A.; COS, P.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; HAMMOUDA, F.M.; ISMAIL, S.I.; AZZAM, S.; CLAEYS, M.; GOOVAERTS, E.; PEITERS, L.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A.J. Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. **Planta Medica**, v. 68, p. 539 - 541, 2002.

SHOGAN, B.; KRUSE, L.; MULAMBA, G.B.; HU, A.; COEN, D.M. Virucidal activity of a gt-rich oligonucleotide against herpes simplex virus mediated by glycoprotein B. **Journal of Virology**, v. 80, p. 4740 - 4747, 2006.

SIDWELL, R.W. Determination of antiviral activity. **Drugs Pharmaceutical Science**, v. 27, p. 433 - 480, 1986.

SIEUWERTS, A.; KLIJN, J.G.M.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC<sub>50</sub> - values and cells survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 813 - 823, 1995.

SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1012 - 1018, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 5.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1998. p.96 - 97.

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

SINGH, R.B.; SINGH, S.P.; JINDAL, V.K. Reduction of periodate oxidized seed polysaccharide from *Dodonea viscosa* Linn. seeds. **Acta Ciencia Indica, Chemistry**, v. 21, p. 95 - 97, 1995.

SJOGREN-JANSSON, E.; JEANSSON, S. Large-scale production of monoclonal antibodies in dialysis tubing. **Journal of Immunological Methods**, v. 84, p. 359 - 364, 1985.

SJOGREN-JANSSON, E.; JEANSSON, S. Growing hybridomas in Dialysis Tubing: Optimization of the technique. In: ZOLA, H. **Laboratory Methods in Immunology**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 41 - 50.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107 - 1112, 1990.

SMITH, R.W.P.; MALIK, P.; CLEMENTS, J.B. The herpes simplex virus ICP27 protein: a multifunctional post-transcriptional regulator of gene expression. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, p. 499 - 501, 2005.

SNOECK, R. Antiviral therapy of herpes simplex. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 157 - 159, 2000.

- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. 3.ed. New York: Freeman, 1995. p. 346 - 352.
- SOUCCAR, C.; CYSNEIROS, R.M.; TANAE, M.M.; TORRES, L.M.B.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; LAPA, A.J. Inhibition of gastric acid secretion by a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth and underlying mechanism. **Phytomedicine**, v. 15, p. 462 - 469, 2008.
- SPEAR, P.G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cellular Microbiology**, v. 6, p. 401 - 410, 2004.
- SU, C.T.; HSU, J.T.A.; HSIEH, H.P.; LIN, P.H.; CHEN, T.C.; KAO, C.L.; LEE, C.N.; CHANG, S.Y. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. **Antiviral Research**, v. 79, p. 62 - 70, 2008.
- SYDISKIS, R.J.; OWEN, D.G.; LOHR, J.L.; ROSLER, K.A.; BLOMSTER, R.N. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 2463 - 2466, 1991.
- TANAE, M.M.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; DE LIMA, T.C.M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. **Phytomedicine**, v. 14, p. 309 - 313, 2007.
- THOMPSON, K.D.; DRAGAR, C. Antiviral activity of *Undaria pinnatifida* against Herpes Simplex Virus. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 551 - 555, 2004.
- TOLEDO, V.M.; TELLEZ, M.G.O.; SORTIBRÁN, A.N.C.; ANDRADE-CETTO, A.; RODRÍGUEZ-ARNAIZ, R. Genotoxicity testing of *Cecropia obtusifolia* extracts in two in vivo assays: The wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila* and the human cytokinesis-block micronucleus test. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 58 - 63, 2008.
- TREVISAN, M.T.S.; MACEDO, F.V.V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para o tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, p. 301 - 304, 2003.
- TRYBALA, E.; LILJEQVIST, J.A.; SVENNERHOLM, B.; BERGSTROM, T. Herpes simplex virus types 1 and 2 differ in their interaction with heparan sulfate. **Journal of Virology**, v. 74, p. 9106 - 9114, 2000.
- TUNALIER, Z.; KOSAR, M.; KÜPELI, E.; ÇALIS, I.; BASER, K.H.C. Antioxidant, anti-inflammatory, anti-nociceptive activities and composition of *Lythrum salicaria* L. extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 539 - 547, 2007.
- UCHÔA, V.T. **Avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações das espécies *Cecropia pachystachya* Trec. (Cecropiaceae) e *Ximena americana* L. (Olacaceae) e o estudo fitoquímico da *C. pachystachya* guiado pelo bioensaio**



**antimalárico in vivo**. 2004. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2004.

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

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H.A.; BUSCHIAZZO, P.M.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v. 74, p. 91 - 97, 2003.

VELJKOVIC, V.; MOUSCADET, J.F.; VELJKOVIC, N.; GLISIC, S.; DEBYSER, Z. Simple criterion for selection of flavonoid compounds with anti-HIV activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 1226 -1232, 2007.

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the new millennium: lead-finding and biotechnology. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, p. 253 - 262, 2000.

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

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

YOOSOOK, C.; PANPISUTCHAI, Y.; CHAICHANA, S.; SANTISUK, T.; REUTRAKUL, V. Evaluation of anti-HSV-2 activities of *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 179 - 187, 1999.

WANG, H.; LI, Y.L.; SHEN, W.Z.; RUI, W.; MA, X.J.; CEN, Y.Z. Antiviral activity of a sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) compound isolated from the green alga *Caulerpa racemosa*. **Botânica Marina**, v. 50, p. 185 - 190, 2007.

WANG, Y. Needs for new plant-derived pharmaceuticals in the post-genome era: an industrial view in drug research and development. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 395 - 406, 2008.

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

WHITLEY, R.J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **Lancet**, v. 357, p. 1513 - 1518, 2001.

WHITLEY, R.J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus: is a vaccine tenable? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, p. 145 - 151, 2002.

WU, D.; FUJIO, M.; WONG, C.H. Glycolipids as immunostimulating agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 1073 - 1083, 2008.

WU, Y.R.; MA, Y.B.; ZHAO, Y.X.; YAO, S.Y.; ZHOU, J.; ZHOU, Y.; CHEN, J. Two new quaternary alkaloids and anti-hepatitis B virus active constituents from *Corydalis saxicola*. **Planta Medica**, v. 73, p. 787 - 791, 2007.

WU, Z.J.; OUYANG, M.A.; WANG, C.Z.; ZHANG, Z.K. Six new triterpenoid saponins from the leaves of *Ilex oblonga* and their inhibitory activities against TMV replication **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, p. 422 - 427, 2007.

ZHAO, Y.L.; CAI, G.M.; HONG, X.; SHAN, L.M.; XIAO, X.H. Anti-hepatitis B virus activities of triterpenoid saponin compound from *Potentilla anserine* L. **Phytomedicine**, v. 15, p. 253 - 258, 2008.

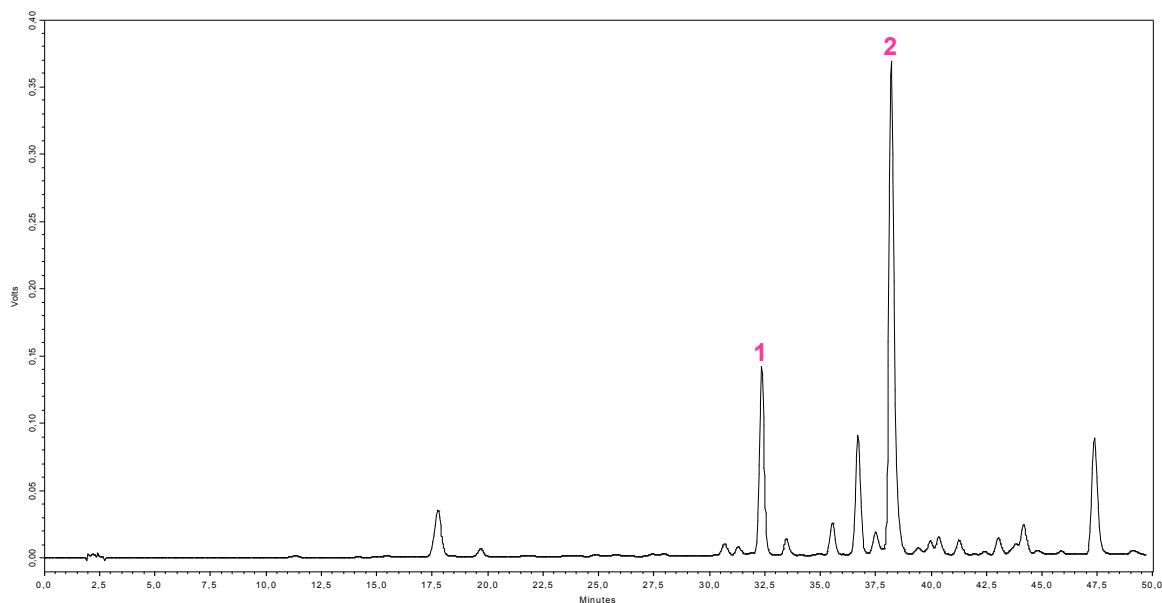
ZHU, W.; CHIU, L.C.M.; OOI, V.E.C.; CHAN, P.K.S.; ANG, P.O. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 81 - 85, 2004.

ZHU, W.; CHIU, L.C.M.; OOI, V.E.C.; CHAN, P.K.S.; ANG, P.O. Antiviral property and mechanisms of a sulphated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 1. **Phytomedicine**, v. 13, p. 695 - 701, 2006.

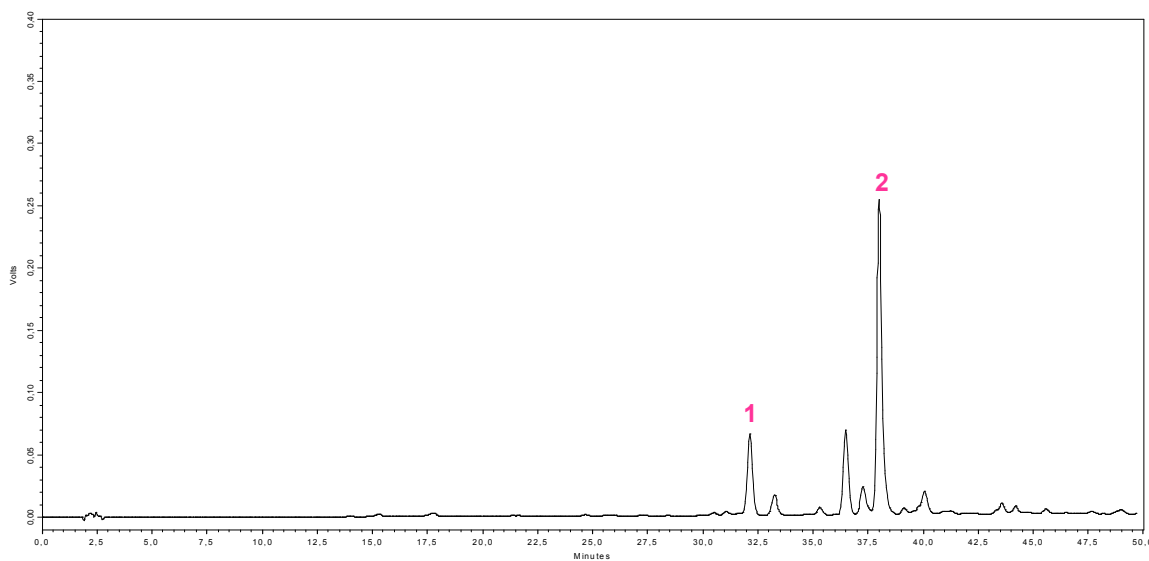
ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 577 - 614.

## ANEXO

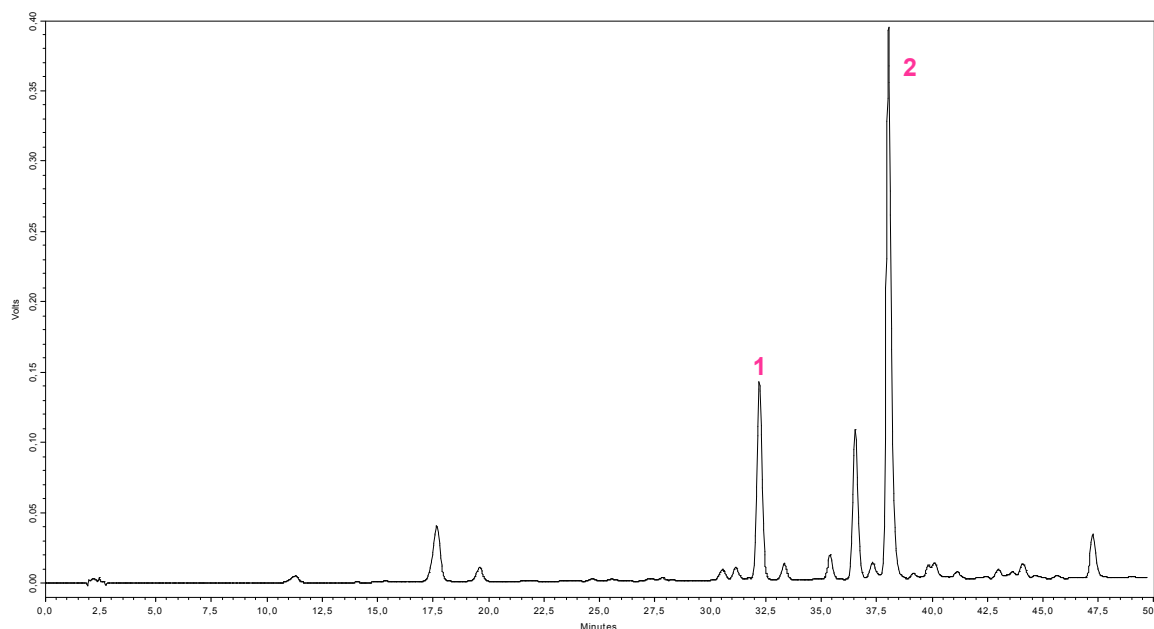
Análises realizadas pelo mestrando Geison Modesti Costa, sob orientação do Prof. Dr. Flávio H. Reginatto.



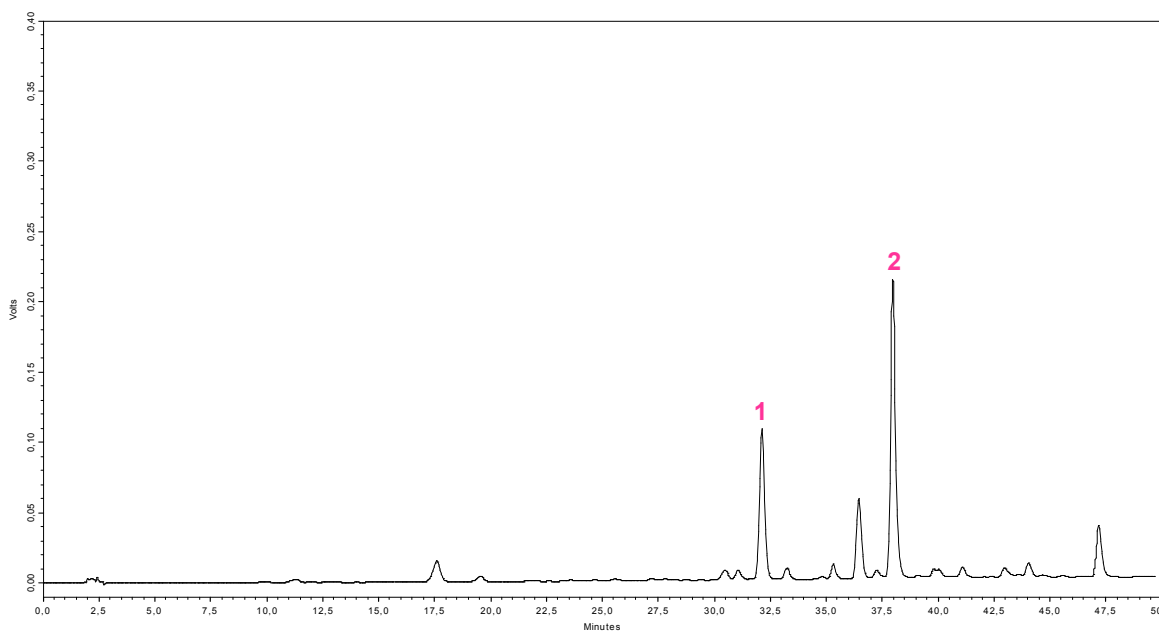
Perfil cromatográfico (CLAE) da fração **MeOH<sub>AMB</sub>** obtido a partir de folhas de *Cecropia glaziovii* (1000 µg/mL). Condições cromatográficas: Fase móvel: [A: Acetonitrila; B: (Ácido acético 1% : Água)]. Fluxo: 0,8 mL/min; Fase fixa: coluna RP-C18 Phenomenex Luna<sup>®</sup> (150 x 4,6mm; 5µm); Detecção: UV 330 nm; (1) **isorientina** (2) **isovitexina**.



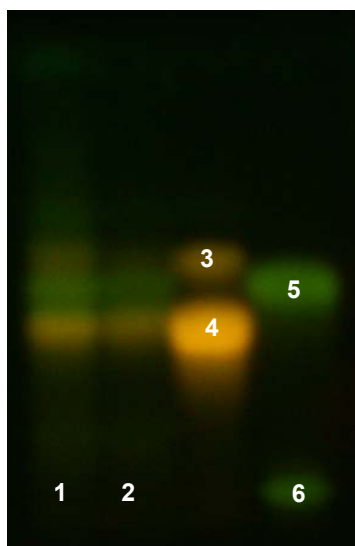
Perfil cromatográfico (CLAE) da subfração **AMB<sub>1</sub>** obtido a partir de folhas de *Cecropia glaziovii* (1000 µg/mL). Condições cromatográficas: Fase móvel: [A: Acetonitrila; B: (Ácido acético 1%: Água)]. Fluxo: 0,8 mL/min; Fase fixa: coluna RP-C18 Phenomenex Luna<sup>®</sup> (150 x 4,6mm; 5µm); Detecção: UV 330 nm; (1) **isorientina** (2) **isovitexina**.



Perfil cromatográfico (CLAE) da subfração **AMB<sub>2</sub>** obtido a partir de folhas de *Cecropia glaziovii* (1000 µg/mL). Condições cromatográficas: Fase móvel: [A: Acetonitrila; B: (Ácido acético 1% : Água)]. Fluxo: 0,8 mL/min; Fase fixa: coluna RP-C18 Phenomenex Luna<sup>®</sup> (150 x 4,6mm; 5µm); Detecção: UV 330 nm; (1) isoorientina (2) isovitexina.



Perfil cromatográfico (CLAE) da subfração **AMB<sub>3</sub>** obtido a partir de folhas de *Cecropia glaziovii* (1000 µg/mL). Condições cromatográficas: Fase móvel: [A: Acetonitrila; B: (Ácido acético 1% : Água)]. Fluxo: 0,8 mL/min; Fase fixa: coluna RP-C18 Phenomenex Luna<sup>®</sup> (150 x 4,6mm; 5µm); Detecção: UV 330 nm; (1) isoorientina (2) isovitexina.



Análise por cromatografia em camada delgada da fração  $\text{MeOH}_{\text{AMB}}$ (1), da subfração  $\text{AMB}_2$ (2), e padrões orientina(3), isoorientina(4), isovitexina(5) e vicenina(6). Fase Fixa: Sílica gel;  $F_{254\text{nm}}$ ; Fase Móvel: AcOEt : Ác. Acético: Água (8:1:1 v/v); Revelador: Reagente Natural, seguido de polietilenoglicol 4000 / UV 366 nm.