



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Catielen Paula Pavi

**Potencial antiviral e virucida de plantas do Bioma Amazônico**

Florianópolis

2022

Catielen Paula Pavi

Potencial antiviral e virucida de plantas do Bioma Amazônico

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal  
de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia e Biociências

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Izabella Thaís da Silva

Coorientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gislaïne Fongaro

Florianópolis

2022

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

Pavi, Catielen Paula  
Potencial antiviral e virucida de plantas  
do Bioma Amazônico / Catielen Paula Pavi ;  
orientador, IzabellaThaís da Silva ,  
coorientador, Gislaine Fongaro , 2022.  
95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal  
de SantaCatarina, Centro de Ciências Biológicas,  
Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e  
Biociências, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2.  
Biotecnologia e Biociências. 3. Cultura celular  
animal . 4. Antivirais e virucidas. 5. Plantas  
medicinais amazônicas . I. , IzabellaThaís da  
Silva. II. , Gislaine Fongaro. III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV.  
Título.

Catielen Paula Pavi

**Potencial antiviral e virucida de plantas do Bioma Amazônico**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabienne Antunes Ferreira  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patricia Hermes Stoco  
Universidade Federal de Santa Catarina  
(Membro suplente)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ingrid Vicente Farias  
Universidade Estácio  
(Membro suplente)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Biociências.

---

Prof. Dr. Glauber Wagner  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof.(a) Dr.(a) Izabella Thaís da Silva  
Orientadora

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado aos meus amigos e aos meus queridos pais.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, inicio agradecendo em memória de meus avós maternos e paternos, por toda a dedicação e o conhecimento passado aos meus pais, para que chegassem até mim. Por todas as vezes que zelaram por mim e todo o carinho durante o tempo que convivemos. Obrigada pelas memórias criadas.

Aos meus pais, que sempre me criaram da melhor maneira possível, com muito amor. À minha mãe, que sempre me apoiou em minhas escolhas, e que sei que irá me apoiar em todas as situações. Agradeço pela relação que desenvolvemos ao longo dos anos, que me permite contar contigo para o que vier. Obrigada, mãe, por todo o cuidado e carinho ao me ouvir e me acalmar ao longo da caminhada. Por sempre me guiar para o melhor caminho. Por me inspirar.

Ao meu pai, por sempre me lembrar quem eu sou. Por ser forte e me ensinar a ser forte, e por ser um exemplo de resiliência. Obrigada pelas palavras de carinho, mesmo que - quase sempre - de longe. Agradeço por me incentivar a chegar até aqui, e sempre me lembrar o quão importante é batalhar pelo que se quer.

À minha irmã, por estar sempre comigo. Por me ouvir, pelos conselhos e todas as trocas que tenho contigo. Por ter me proporcionado momentos na infância que estarão comigo pra sempre. Mana, aprendi e continuo aprendendo muito com você. Obrigada por tanto.

Ao Milo, o melhor cachorro do mundo. Por aparecer na minha vida e me conquistar. Por ser o bichinho mais amoroso e educado. Por aliviar os dias pesados vindo me pedir carinho e por ser o melhor companheiro. Sem você a escrita da dissertação teria sido muito, mas muito mais difícil.

Ao Endri, por ser o melhor amigo possível pra dividir um apartamento. Por me ouvir nos dias difíceis, por cuidar do Milo e por todas as experiências. Obrigada por ser tão presente, atencioso e companheiro, e por estar comigo há tantos anos. A vida é mais divertida contigo por perto.

Às minhas amigas de infância. Tay, obrigado por me acompanhar desde pequena. Obrigada por ser tão diferente e, ao mesmo tempo, tão parecida comigo. Obrigada pelo carinho, pela atenção e amor que conseguimos manter na nossa amizade. Por me apoiar em tudo e por sempre estar de prontidão pra ajudar em qualquer situação. Obrigada por cada conversa ao longo desses anos.

À Diana, por sempre me receber em sua casa como se fosse meu próprio lar. Pelo cuidado e carinho, desde sempre. Obrigada por manter nossa amizade, por todas as conversas e trocas. Cresço muito contigo e teu apoio significa muito pra mim. Agradeço à Geo, por todos

os anos juntas, pelas conversas e companhia. Por ser tão delicada e madura, e por saber que posso contar contigo independentemente do tempo.

Aos meus amigos da faculdade, Vivian e Gabriel. Vivs, obrigada por tudo o que fez por mim ao longo dos nossos anos de convivência. Por cada trabalho de faculdade, por cada serviço, por sempre me receber tão bem. Gabs, obrigada por ser tão único, divertido e por manter a conexão mesmo com a distância. Agradeço também a Bruna e a Natália, que considero muito e guardo com carinho cada momento que vivemos juntas.

À Paula, por ter me acolhido em 2019 e em tantas outras vezes ao longo da nossa amizade. Por tua autenticidade que inspira. Obrigada por todos os papos, as idas à praia, os rolês veganos. Por ter sido meu colo em Florianópolis por diversas vezes. Tua amizade é um presente e sempre aprendo contigo.

Ao Rafa, pela companhia em muitos experimentos, por toda a ajuda e pelos almoços no RU. Por tantas outras trocas, pelas risadas, pelo carinho, por ser único. Obrigada por sempre trazer conversas tão profundas em formato de áudios de 2 minutos. Como tu mesmo diz, sabemos que tudo são ciclos, mas poxa, vai fazer muita falta.

À todas as amigas que criei no LVA. Bea, obrigada por sempre fornecer o teu lar aconchegante pros nossos encontros com pizza caseira. Obrigada por ser uma mulher incrível e dedicada, sensível e carinhosa. Você torna os dias no laboratório mais leves. À Isa, por toda a ajuda e ensinamentos desde que entrei no laboratório, por ser tão companheira pra todos os momentos e por todas as idas ao Seu Caetano.

À Mari, por ser sempre tão divertida, dedicada e inspiradora. Obrigada por sempre ouvir com atenção e por todas as trocas. À Giulia, agradeço por toda a disposição em ajudar, por ser tão companheira, sincera e verdadeira. À Iara, agradeço por ser tão doce e parceira, pelas conversas e companhia na cultura ao longo dos experimentos. Gurias, levo cada memória que tive com vocês com muito amor dentro de mim.

Agradeço especialmente as professoras responsáveis pelo LVA. Obrigada, Dr<sup>a</sup> Izabella, minha orientadora, por ter me acolhido em 2019 e me apresentado a cultura celular e a virologia na prática. Iza, obrigada por ter me inspirado a entrar no mestrado e me guiado ao longo desse processo. Agradeço teus ensinamentos, tua disponibilidade e atenção, e as discussões positivas geradas para a melhoria do trabalho.

Dr<sup>a</sup> Gislaine, minha coorientadora a qual agradeço por ser um exemplo de força, trabalho, resiliência e ternura. Obrigada pelas conversas, oportunidades, projetos e ensinamentos. Por sempre ajudar, corrigir e fazer ser melhor. Dr<sup>a</sup> Ariadne, obrigada por todas

as observações para o aprimoramento do trabalho e toda a dedicação. Com toda a certeza, vocês fazem do LVA uma família.

A todos os demais integrantes do LVA que tenho carinho e, de alguma forma, me ajudaram: Doris, Raphael, Julia K., Mariane, Júlia P., e Helena. À Dr<sup>a</sup> Elizabeth Soares Fernandes pela doação do vírus CHIKV. Estendo meus agradecimentos ao PPG em Biotecnologia e Biociências e seus professores, responsáveis por manter a qualidade do ensino mesmo com as complicações enfrentadas desde 2020. Também agradeço a CAPES, pelo financiamento da bolsa que permitiu a minha permanência em Florianópolis.

Agradeço também a minha psicóloga, Luiza, por me nortear ao longo desse processo. Obrigada pelo vínculo que criamos e por me apresentar novos caminhos com tanta responsabilidade.

Finalizo agradecendo a todos que entraram em minha vida ao longo desse período e puderam se envolver nesta história, me ajudando a seguir com sutileza.

Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade. (CURIE, [ca 1900]).

## RESUMO

Plantas amazônicas possuem compostos bioativos pouco conhecidos que possuem elevado potencial em apresentar atividades biológicas, podendo contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos, como os antivirais e virucidas. O Herpes Simplex Vírus tipo 1 (HSV-1) gera infecção com fase de latência e é relacionado a neuropatologias. Já as infecções ocasionadas pelo arbovírus Chikungunya (CHIKV), não possuem medicamentos antivirais específicos como forma de tratamento. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial efeito citotóxico, antiviral e virucida de plantas medicinais amazônicas frente ao HSV-1 (cepas KOS e 29-R, sensível e resistente ao aciclovir, respectivamente) e Chikungunya (cepa SLZ12). Para isso, 17 extratos de oito espécies de plantas do Bioma Amazônico foram submetidos ao experimento de citotoxicidade por meio do ensaio colorimétrico da Sulforrodamina B. Em posse da  $CC_{50}$ , foi efetuada a triagem antiviral em concentrações não citotóxicas, pelo ensaio de inibição da formação de placas de lise e, com os extratos mais ativos, foi determinada a  $CI_{50}$  e calculado o índice de seletividade (IS). Na sequência foi realizado o ensaio para verificar a capacidade virucida das amostras, na presença ou ausência de soluções proteicas (BSA), com consequente determinação dos valores de  $CV_{50}$ . As amostras mais ativas foram então avaliadas em relação a sua capacidade antisséptica de acordo com a normativa DIN EN 14476. Os extratos etanólico das folhas e aquoso das cascas de *Licania macrophylla* e, os extratos etanólicos das cascas de *Manilkara elata* e de *Vouacapoua americana* apresentaram elevado potencial antiviral frente aos vírus HSV-1 (cepa KOS), com valores de IS de 17,05; 18,70; 19,01 e 9,11 respectivamente. Frente ao CHIKV, o extrato aquoso das cascas de *Licania macrophylla* não foi ativo, enquanto que os extratos etanólicos das folhas de *Licania macrophylla* e das cascas de *Manilkara elata* e de *Vouacapoua americana* apresentaram valores de IS de 21,90; 11,49; e 8,26, respectivamente. O extrato de *M. elata* foi capaz de inibir a cepa 29-R de HSV-1, resistente ao aciclovir, com valores de  $CI_{50}$  17,7  $\mu\text{g/mL}$  e IS 14,12. Foi observada, com base nos valores de  $CV_{50}$ , a elevada capacidade virucida frente HSV-1 (KOS) e CHIKV dos extratos etanólico das folhas (2,74 e 2,16  $\mu\text{g/mL}$ ) e aquoso das cascas (0,27 e 0,34  $\mu\text{g/mL}$ ) de *Licania macrophylla* e, os extratos etanólicos das cascas de *Manilkara elata* (0,28 e 0,07  $\mu\text{g/mL}$ ) e de *Vouacapoua americana* (0,26 e 0,04  $\mu\text{g/mL}$ ), superando a ação antiviral. A presença de soluções proteicas para a cepa KOS de HSV-1 não afetou significativamente a ação virucida das amostras, revelando estabilidade no efeito virucida. O extrato aquoso das cascas de *L. macrophylla* diminuiu a concentração viral após contato por 120 segundos com a cepa KOS de HSV-1, corroborando seu potencial emprego com um antisséptico. Os resultados apontam que os extratos de maior potencial antiviral agiram de forma semelhante na inibição da replicação dos vírus, fato importante para o desenvolvimento de fármacos anti-CHIKV e anti-HSV-1. Propõe-se que o elevado potencial virucida dos extratos teve ação de modo a desestruturar os vírions, gerando a possibilidade de aplicações em formulações microbicidas (HSV-1) e na adição a repelentes (CHIKV). O ensaio conforme a normativa suportou a ideia do desenvolvimento de antissépticos frente HSV-1.

**Palavras-chave:** Antiviral. Virucida. Herpesvírus. Chikungunya. Bioma Amazônico.

## ABSTRACT

Amazonian plants have little-known bioactive compounds with high potential to present biological activities, which may contribute to the development of new drugs, such as antivirals and virucides. The Herpes Simplex virus type 1 (HSV-1) generates infection with a latency phase and is related to neuropathologies. Infections caused by the Chikungunya arbovirus (CHIKV) do not have specific antiviral drugs as a form of treatment. In this sense, the objective of this work was to evaluate the potential cytotoxic, antiviral, and virucidal effect of medicinal plants from the Amazon against HSV-1 (strains KOS and 29-R, sensitive and resistant to acyclovir, respectively) and Chikungunya (strain SLZ12). For this, 17 extracts of eight plant species from the Amazon Biome were submitted to the cytotoxicity experiment employing the Sulforhodamine B colorimetric assay. With the  $CC_{50}$ , the antiviral screening was carried out at non-cytotoxic concentrations, by viral plaque number reduction assay and, with the most active extracts, the  $IC_{50}$  was determined and the selectivity index (IS) was calculated. Subsequently, the virucidal capacity of the samples was verified, in the presence or absence of protein solutions (BSA), with the consequent determination of the  $CV_{50}$  values. The most active samples were then evaluated for their antiseptic capacity according to the DIN EN 14476 standard. The ethanolic extracts of leaves and aqueous extracts of *Licania macrophylla* bark and the ethanolic extracts of *Manilkara elata* and *Vouacapoua americana* bark showed high antiviral potential against HSV-1 virus (KOS strain), with IS values of 17.05, 18.70, 19.01, and 9.11 respectively. Against CHIKV, the aqueous extract of *Licania macrophylla* bark was not active, while the ethanolic extracts of *Licania macrophylla* leaves and *Manilkara elata* and *Vouacapoua americana* bark showed IS values of 21.90; 11.49; and 8.26, respectively. *M. elata* extract was able to inhibit the acyclovir-resistant strain 29-R of HSV-1, with  $IC_{50}$  values of 17.7  $\mu\text{g/mL}$  and IS 14.12. Based on  $CV_{50}$  values, high virucidal capacity against HSV-1 (KOS) and CHIKV was observed in ethanolic extracts from leaves (2.74 and 2.16  $\mu\text{g/mL}$ ) and aqueous extracts from bark (0.27 and 0.34  $\mu\text{g/mL}$ ) of *Licania macrophylla* and the ethanolic extracts of *Manilkara elata* (0.28 and 0.07  $\mu\text{g/mL}$ ) and *Vouacapoua americana* (0.26 and 0.04  $\mu\text{g/mL}$ ) from the bark, surpassing the antiviral. The presence of protein solutions for the KOS strain of HSV-1 did not significantly affect the virucidal action of the samples, revealing stability in the virucidal effect. The aqueous extract of the bark of *L. macrophylla* decreased the viral concentration after contact for 120 seconds with HSV-1 (KOS strain), corroborating its potential use as an antiseptic. The results indicate that the extracts with greater antiviral potential acted in a similar way to inhibit virus replication, an important fact for the development of anti-CHIKV and anti-HSV-1 drugs. It is proposed that the high virucidal potential of the extracts has acted by destructuring the virions, generating the possibility of applications in microbicide formulations (HSV-1) and in addition to repellents (CHIKV). Testing according to regulations supported the idea of developing antiseptics against HSV-1.

**Keywords:** Antiviral. Virucidal. Herpesvirus. Chikungunya. Amazon biome.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do CHIKV. O CHIKV possui um envelope lipoproteico de simetria icosaédrica. É formado por proteínas estruturais (CP, E3, E2, 6k, E1) e não-estruturais (nsP1-nsP4). Seu capsídeo abriga o RNA fita simples senso positivo. ....	22
Figura 2 – Ciclo de replicação viral do CHIKV.....	24
Figura 3 – Estrutura dos HSV-1. O HSV-1 é composto por um envelope de simetria icosaédrica composto por 11 glicoproteínas e duas proteínas de membrana não glicosiladas, e seu nucleocapsídeo abriga o DNA linear de fita dupla.....	31
Figura 4 – Ciclo de replicação do HSV-1.....	34
Figura 5 – Estabelecimento de latência pelo HSV-1.....	35
Figura 6 – Valores de CI <sub>50</sub> (µg/mL) das amostras ativas frente ao HSV-1 (cepa KOS) e CHIKV (cepa SLZ12). ....	60
Figura 7 – Resultados da avaliação da atividade virucida HSV-1 (cepa KOS) e CHIKV (cepa SLZ12) dos extratos mais ativos expressos em valores de CV <sub>50</sub> (µg/mL).....	63

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Levantamento de espécies de plantas medicinais com atividade antiviral frente CHIKV. ....	27
Quadro 2 - Levantamento de espécies de plantas medicinais com atividade antiviral frente HSV-1.....	36
Quadro 3 - Informações sobre as plantas medicinais estudadas.....	41
Quadro 4 – Informações sobre as drogas vegetais e tipos de extratos avaliados. ....	43
Quadro 5 – Particularidades adotadas durante a execução dos experimentos antivirais.....	47
Quadro 6 – Concentrações de cada extrato utilizado no ensaio de atividade virucida na presença de soluções proteicas. ....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados. ....	53
Tabela 2 - Relação de espécies de plantas medicinais avaliadas e seus respectivos valores de citotoxicidade (resultados expressos em $CC_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ e intervalo de confiança de 95%). ....	54
Tabela 3 – Resultados, expressos em % de inibição da replicação viral, da triagem antiviral das plantas medicinais frente ao HSV-1 (cepas KOS e 29R) e CHIKV (cepa SLZ12), por meio do método de inibição da formação das placas de lise. ....	57
Tabela 4 – Valores de $CC_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ , $CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ e IS das amostras mais ativas frente aos HSV-1 (cepa KOS) e CHIKV (cepa SLZ12).....	61
Tabela 5 – Resultados da inativação de HSV-1 (cepa KOS) das amostras mais ativas na presença de soluções proteicas. ....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-OS HS *3-O-Sulfated heparan sulfate*  
A $\beta$  Peptídeo beta-amiloide  
ACV Aciclovir  
ADE *Antibody-Dependent Enhancement*  
BSA Albumina Sérica Bovina  
CC<sub>50</sub> Concentração que reduz em 50 % a viabilidade celular  
CHIKV Chikungunya vírus  
CHIKF Febre da Chikungunya  
CI<sub>50</sub> Concentração que inibe 50% da infecção viral  
CMC Carboximetilcelulose  
CV<sub>50</sub> Concentração virucida a 50%  
DENV Dengue vírus  
DIN *Deutsches Institut für Normung*  
DMSO Dimetilsulfóxido  
HIV Vírus da Imunodeficiência Humana  
ECSA *East/Central/South-African*  
ECP Efeito citopático viral  
GAGs Glicosaminoglicanas  
HSV-1 *Herpes Simplex* vírus tipo 1  
HSV-2 *Herpes Simplex* vírus tipo 2  
ICPs *Infected cell proteins*  
IC 95% Intervalo de confiança de 95%  
IFNs Interferons  
IOL *Indian Ocean Lineage*  
IR Infeciosidade residual  
IS Índice de seletividade  
LAT Transcrito associado à latência  
MEM *Minimal Essential Medium*  
miRNAs microRNAs  
nCAC *New Central African Clade*  
NK *Natural Killer*  
NTR *Non-translated region*

OMS Organização Mundial da Saúde

ORF *Open reading frame*

PCR *Polymerase chain reaction*

PI Pós-infecção

SFB Soro fetal bovino

SRB Sulforrodamina B

TCA Ácido tricloroacético

TCID50 *Tissue Culture Infectious Dose*

TIM-1 *T-cells immunoglobulin and mucin domain 1*

Treg Células T Regulatórias

UFP Unidades Formadoras de Placa

UnB Universidade de Brasília

WA *West African*

ZIKV Zika vírus

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS E METAS RESPECTIVAS.....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
3.1	CHIKUNGUNYA .....	17
3.1.1	<b>Epidemiologia</b> .....	<b>17</b>
3.1.2	<b>Estrutura viral e expressão gênica</b> .....	<b>20</b>
3.1.3	<b>Replicação viral</b> .....	<b>23</b>
3.1.4	<b>Terapias antivirais existentes</b> .....	<b>25</b>
3.2	HERPES SIMPLEX VIRUS .....	28
3.2.1	<b>Epidemiologia</b> .....	<b>28</b>
3.2.2	<b>Estrutura viral e expressão gênica</b> .....	<b>30</b>
3.2.3	<b>Replicação viral</b> .....	<b>32</b>
3.2.4	<b>Terapias antivirais existentes</b> .....	<b>35</b>
3.3	PRODUTOS NATURAIS NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS .....	37
3.3.1	<b>Espécies amazônicas: Etnobotânica e atividades biológicas</b> .....	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
4.1	AQUISIÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS.....	41
4.2	CULTURAS CELULARES ANIMAIS .....	44
4.2.1	<b>Células</b> .....	<b>44</b>
4.2.2	<b>Meio de cultura e reagentes</b> .....	<b>44</b>
4.3	VÍRUS .....	44
4.3.1	<b>Origem das cepas virais</b> .....	<b>44</b>
4.3.2	<b>Preparo das suspensões-estoque virais</b> .....	<b>44</b>
4.3.3	<b>Determinação dos títulos infecciosos virais</b> .....	<b>45</b>
4.4	AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO .....	46
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	47
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA .....	49
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA NA PRESENÇA DE SOLUÇÕES PROTEICAS .....	49

4.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA PARA FINS ANTISSÉPTICOS EM FASE 2 DE DESENVOLVIMENTO .....	51
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
5.1	DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS INFECCIOSOS VIRAIS .....	53
5.2	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	53
5.3	TRIAGEM ANTIVIRAL: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL PELO ENSAIO DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DAS PLACAS DE LISE.....	56
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA DIRETA .....	62
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA DIRETA NA PRESENÇA DE SOLUÇÕES PROTEICAS.....	65
5.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA PARA FINS ANTISSÉPTICOS EM FASE 2 DE DESENVOLVIMENTO .....	66
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
	<b>APÊNDICE A – POTENCIAL ANTIVIRAL E VIRUCIDA DE <i>VITIS</i> SP.....</b>	<b>90</b>
	<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As infecções virais geram a necessidade do desenvolvimento de tratamentos que diminuam a duração e gravidade das suas doenças relacionadas, o que comumente requer o emprego de múltiplas abordagens terapêuticas (ZARNITSYNA et al., 2021). Baseado nisso, o desenvolvimento de fármacos antivirais busca limitar a infecciosidade e disseminação viral, bloqueando os estágios da replicação dos vírus (TOMPA et al., 2021).

A busca por antivirais avançou apenas na década de 70, o que está relacionado a dificuldade no tratamento de doenças infecciosas virais quando em comparação com o primeiro antibiótico descoberto, ainda em 1928 (COS et al., 2004). Além disso, outra problemática envolvendo as infecções virais é o rápido desenvolvimento de cepas resistentes aos fármacos disponíveis (NEAGU et al., 2018).

Baseado na problemática envolvendo os fármacos antivirais, existem registros do uso de plantas na medicina tradicional datados em 2600 A.E.C. na Mesopotâmia. Ao longo dos anos, compostos derivados de plantas vêm sendo utilizados no desenvolvimento de fármacos destinados ao tratamento de diversas doenças. Como exemplo, o Paclitaxel é um diterpeno empregado como um medicamento contra câncer de ovário e mama, derivado de plantas do gênero *Taxus* (NEWMAN; CRAGG, 2020).

Os produtos naturais são geralmente estruturas químicas complexas, servindo de estímulo para o desenvolvimento de medicamentos. Além disso, os compostos naturais costumam apresentar-se seletivos e específicos em suas atividades biológicas, sendo uma excelente fonte para o desenvolvimento de fármacos (NEWMAN; CRAGG; KINGSTON, 2015).

Neste sentido, o Bioma Amazônico apresenta um conjunto de características que o torna um *hotspot* de biodiversidade, como por exemplo a elevada diversidade de espécies endêmicas (CARDOSO et al., 2017). Assim, torna-se um alvo interessante para estudos das espécies que podem apresentar potenciais biológicos, como a atividade antiviral.

Com base nas problemáticas citadas envolvendo o desenvolvimento de fármacos antivirais, os modelos virais utilizados neste trabalho foram os Herpes simplex vírus e Chikungunya vírus.

Os Herpesvírus apresentam cepas resistentes ao aciclovir, antiviral de escolha para o tratamento da infecção, e são caracterizados por persistirem no organismo de seus hospedeiros ao longo da vida (CRIMI et al., 2019; STEMPEL; CHAN; BRINKMANN, 2019). A infecção

primária é lítica e, após isso, torna-se latente com períodos de reativação desencadeados por fatores como estresse, imunossupressão e mudanças ambientais (IVES; BERTKE, 2017).

Já as infecções causadas pelo Chikungunya vírus (CHIKV) não possuem medicamentos antivirais específicos para o seu tratamento (KARLAS et al., 2016). Desde sua descoberta em 1952, até 2018, essa infecção já causou mais de 70 epidemias e seu alto potencial em modificar-se, a partir de mutações, auxilia a transmissão para novos locais do mundo (DEEBA et al., 2020; MATUSALI et al., 2019).

No Brasil, o CHIKV foi relatado a partir de 2013 e desde então vem causando picos de infecção (YACTAYO et al., 2016). No Rio de Janeiro, quando comparado com a dengue e o zika, a febre Chikungunya, como é chamada a infecção provocada pelo CHIKV, é a infecção mais recorrente desde 2016, sendo os primeiros casos relatados em 2015 (SOUZA et al., 2019).

Desta forma, este trabalho objetivou, de modo geral, avaliar a ação antiviral e virucida de diferentes plantas medicinais do Bioma Amazônico frente aos vírus Herpes Simplex e Chikungunya a fim de sustentar novas informações e contribuir na busca por tratamentos alternativos para essas infecções.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial efeito citotóxico, antiviral e virucida de plantas medicinais amazônicas frente aos vírus Herpes simplex e Chikungunya.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS E METAS RESPECTIVAS

- I. Avaliar o efeito citotóxico de plantas medicinais da região amazônica.
  - Realizar a triagem citotóxica de 17 extratos de oito plantas medicinais do Bioma Amazônico.
  
- II. Avaliar a ação antiviral e virucida *in vitro* das amostras frente ao Herpes simples vírus tipo 1 e frente ao Chikungunya vírus.
  - Realizar a triagem antiviral com os 17 extratos frente aos dois modelos virais [HSV-1 (cepas KOS e 29-R) e CHIKV (cepa SLZ12)];
  - Identificar os extratos mais ativos para determinar as concentrações inibitórias aos vírus e o índice de seletividade [HSV-1 (cepas KOS e 29-R) e CHIKV (cepa SLZ12)];
  - Realizar a triagem virucida com os 17 extratos frente aos dois modelos virais [HSV-1 (cepas KOS e 29-R) e CHIKV (cepa SLZ12)];
  - Identificar os extratos mais ativos para determinar as concentrações que reduziram a infecciosidade dos modelos virais [HSV-1 (cepas KOS e 29-R) e CHIKV (cepa SLZ12)];
  - Realizar o ensaio virucida mimetizando a presença de matéria orgânica com a cepa KOS de HSV-1, visando a aplicação em formulações microbicidas.
  
- III. Avaliar o potencial antisséptico, contra vírus, dos extratos virucidas.
  - Com os extratos mais ativos, realizar o ensaio virucida conforme normativa relativa ao desenvolvimento de antissépticos de interesse médico frente a cepa KOS de HSV-1.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CHIKUNGUNYA

##### 3.1.1 Epidemiologia

O Chikungunya vírus é um arbovírus responsável por surtos periódicos de uma doença febril, e foi primeiramente observado na Tanzânia, em 1952 por M. Robinson (LUMSDEN, 1955). Em 1953 o vírus foi descrito por R. W. Ross, que realizou ensaios *in vivo* a partir de amostras de soro sanguíneo humano infectadas com CHIKV (ROSS, 1956).

O vírus é transmitido, no ciclo urbano, pela picada dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (SHANMUGARAJ; MALLA; RAMALINGAM, 2019). Já o ciclo enzoótico envolve outras espécies do gênero *Aedes*, como: *Aedes furcifer*, *A. taylori*, *A. luteocephalus*, *A. vittatus* e *A. fulgens*. Nesse caso, os reservatórios e hospedeiros são primatas não humanos, principalmente macacos do velho mundo como macacos-verdes (*Chlorocebus sabaesus*) e babuínos (*Papio papio*) (SILVA et al., 2018).

Além disso, as espécies de *Aedes* possuem preferência pelo sangue humano, são ativas durante o dia, alimentando-se de indivíduos diferentes num curto espaço de tempo (WILDER-SMITH et al., 2017). Com isso, as infecções causadas pelo arbovírus Chikungunya vêm demandando maior cautela quando se pensa na disseminação da doença em novas regiões brasileiras (CAMPBELL et al., 2015; DIAS et al., 2018).

Além da transmissão horizontal entre indivíduos de *Aedes*, é reconhecida a transmissão vertical entre os mosquitos e essa auxilia na persistência do vírus em condições ambientais adversas. Ademais, a transmissão materno-fetal é observada em humanos (SILVA et al., 2018). Sabe-se que no mosquito, o vírus infecta inicialmente as células epiteliais do intestino, replicando-se. Após isso, infecta as glândulas salivares e ovários. Das glândulas, os vírus são liberados aos dutos salivares para assim serem transmitidos aos hospedeiros vertebrados, como os humanos (LIM et al., 2018).

As manifestações clínicas da fase aguda da infecção pelo CHIKV incluem artralgia e artrite severas, febre, dor muscular, cefaleia, fadiga e manifestações cutâneas, que caracterizam a febre Chikungunya (CHIKF) (SILVA et al., 2018). A fase aguda da doença provoca respostas imunes inatas que resultam na elevação de IFNs tipo I, quimiocinas pró-inflamatórias, citocinas e fatores de crescimento, caracterizando uma doença na qual uma baixa proporção de indivíduos permanecem assintomáticos (entre 5 e 28%) (SILVA; DERMODY, 2017). Sabe-se que a

resposta imune inata é desencadeada pela replicação viral, a partir da elevação de Interferons do tipo 1, fazendo com que sejam recrutadas células inflamatórias para os tecidos infectados, resultando nos danos que geram as dores características dessa infecção. Os sintomas agudos, como a febre e cefaleia, demoram cerca de 15 dias para o total desaparecimento, devido ao desenvolvimento da imunidade adaptativa no organismo com a atuação dos linfócitos T CD8+ (SILVA; DERMODY, 2017).

Entretanto, a fase crônica da doença costuma ser problemática. Caracterizada 12 semanas após o início dos sintomas, a doença crônica costuma gerar artralgia persistente e outros distúrbios musculoesqueléticos que prolongam-se por meses ou anos. A proporção de indivíduos que passa pela fase crônica varia de 3% a 83% (FARIA et al., 2016; JAVELLE et al., 2017; O'DRISCOLL et al., 2021; PAIXÃO et al., 2018; YACTAYO et al., 2016). Na fase crônica, linfócitos T CD4+ são responsáveis pela resposta imune (SILVA; DERMODY, 2017). Em um trabalho recente desenvolvido por Gois et al. (2022) foi constatado que as células T regulatórias (Treg) apresentam redução em sua frequência nas fases aguda e crônica, facilitando o estabelecimento da patogênese.

Após a primeira ocorrência da CHIKV verificada no Oeste Africano, o CHIKV foi descrito em países como a Uganda, pertencente à África Subsaariana, nessa mesma década. A partir de estudos filogenéticos, este genótipo passou a ser designado como *East/Central/South-African* (ECSA) (MATUSALI et al., 2019; MCCRAE et al., 1971). Baseado na distribuição geográfica do vírus, amostras isoladas de Senegal e Nigéria em 1966 caracterizaram o genótipo *West African* (WA). A partir disso o vírus foi encontrado na Ásia, primeiramente em Bangkok (Tailândia, 1958) sendo confundido com o vírus da dengue que emergiu no mesmo momento. Dessa forma, foi estruturado o genótipo Asiático a partir da sua ocorrência em Bangkok e demais regiões vizinhas onde se espalhou até 1964 (DEEBA et al., 2020; MATUSALI et al., 2019; WAHID et al., 2017; WIMALASIRI-YAPA et al., 2019; ZELLER; VAN BORTEL; SUDRE, 2016).

Ao longo dos anos, o genótipo ECSA se mostrou mais dominante, emergindo em diferentes locais do mundo, especialmente em países asiáticos, principalmente a partir de 2004 e, mais recentemente, nas Américas e Europa. Antes de 2004, os genótipos dificilmente eram encontrados fora de suas áreas geográficas de origem, mas nos anos seguintes o genótipo ECSA já apareceu em locais da Ásia, por exemplo (DEEBA et al., 2020; SAM et al., 2015; WAHID et al., 2017). Em 2004 surgiu uma nova linhagem de CHIKV derivada de ECSA no Quênia, responsável por infectar um grande número de viajantes e, dessa forma, provocar epidemias na bacia do Oceano Índico, Sudeste Asiático e Europa. A linhagem ficou conhecida como *Indian*

*Ocean Lineage* (IOL), infectou mais de 10 milhões de pessoas e causou diversas mortes em um curto espaço de tempo. A linhagem IOL é majoritariamente transmitida pelo *Aedes albopictus*, capaz de sobreviver em ambientes tropicais e temperados, o que explica a expansão da infecção para a Europa (MORENS; FAUCI, 2014; TSETSARKIN et al., 2014).

Sabe-se que uma mutação na proteína E1 do envelope do CHIKV (E1-A226V) aumenta significativamente a capacidade do *Aedes albopictus* de transmitir o vírus, o que, por sua vez, possibilitou a disseminação da doença em regiões temperadas, explicando os surtos causados nas últimas décadas (KRIL et al., 2021; TSETSARKIN et al., 2007). Em 2005, a Ilha da Reunião (Departamento da França localizado no Oceano Índico) passou por um surto de CHIKV, provavelmente transmitido por *A. albopictus*, onde estima-se que 266 mil pessoas foram contaminadas de uma população total de 770 mil habitantes (BORGHERINI et al., 2007).

Outras ilhas próximas também passaram por surtos de CHIKV, que na França também ocorreu em 2010, 2013/2014 e 2017 sendo identificadas as linhagens ECSA, Asiática, WA e IOL. Os surtos na França em 2013 espalharam-se para as ilhas caribenhas e Américas, somando mais de 1,7 milhões de casos suspeitos e confirmados (DELISLE et al., 2015; GRANDADAM et al., 2011; LINDH et al., 2019; MORENS; FAUCI, 2014; WIMALASIRI-YAPA et al., 2019). Além disso, a linhagem IOL derivada do Quênia facilitou epidemias e surtos mundiais na última década na Ásia e Índia. Em 2007, a Itália passou por um surto de CHIKV, linhagem IOL, resultando em uma morte (HAPUARACHCHI et al., 2010; KUMAR et al., 2008; REZZA et al., 2007).

Uma nova linhagem, também derivada de ECSA e classificada como um clado monofilético, é a nCAC (*New Central African Clade*), originada provavelmente ainda em 1998. Sugere-se, atualmente, que essa foi a linhagem responsável por surtos na África Central ao longo dos anos 2000, devido à sua endemicidade (AGBODZI et al., 2021).

Até outubro de 2020, foram relatados 114 países com ocorrência de casos de CHIKV. No Brasil, foram documentadas ao menos duas linhagens de CHIKV a partir de 2014: a Asiática, introduzida no Amapá; e a de genótipo ECSA, identificada inicialmente na Bahia. O vírus teve mais de 356 mil casos prováveis reportados entre 2013 e 2015, sendo 48% desses confirmados (AGUIAR et al., 2018; VASCONCELLOS et al., 2019; WANG et al., 2022). Os casos mais bem documentados são da região Centro-Sul e os litorais apresentam-se como regiões de alto risco. O clima brasileiro, as constantes mudanças ambientais produzidas pelo homem e o aumento populacional exacerbado levam ao aumento de infecções gerando um desafio no contexto de saúde pública (NSOESIE et al., 2016; ZANOTTO; LEITE, 2018).

A espécie *A. aegypti* é também vetor de outras arboviroses. Sendo o Brasil um país de

ocorrência de outros arbovírus tais como dengue (DENV) e zika vírus (ZIKV), a provável epidemia simultânea dessas infecções, incluindo o CHIKV, todas transmitidas por *A. aegypti*, tem a capacidade de sobrecarregar o sistema de saúde, levando à um colapso (LIMA-CAMARA, 2016). Baseado nisso, sabe-se que o *A. aegypti* é capaz de transmitir CHIKV, DENV e ZIKV de maneira simultânea, na mesma picada, e que a múltipla coinfeção no mosquito acelera a replicação de CHIKV, cenário que ocorre de maneira similar em humanos e gera o agravamento da infecção (LIM et al., 2018; SUBUDHI et al., 2018). Taraphdar et al. (2022) demonstraram, *in vitro*, as consequências da coinfeção de CHIKV e DENV, levando à ocorrência do fenômeno ADE (*Antibody-Dependent Enhancement*) que resulta na complicação grave dos sintomas da doença.

A ocorrência da coinfeção de CHIKV também é observada com o vírus causador da Febre Amarela (MASCARENHAS et al., 2018). Além disso, há indícios de que pacientes infectados com HIV são mais facilmente infectados por CHIKV devido à imunossupressão grave (HERTZ et al., 2012). Outra preocupação, no âmbito de saúde única, é a relação do CHIKV com infecções causadas por SARS-CoV-2, vírus causador da pandemia da COVID-19, já que os sintomas iniciais como dor muscular e febre podem ser confundidos e, o aumento de casos sem o correto diagnóstico, sobrecarrega o sistema de saúde público (SILVA; MAGALHÃES; PENA, 2021).

No Brasil, foi reconhecida a transmissão do CHIKV apenas por *A. aegypti* (ARAGÃO et al., 2018). Segundo Kraemer et al. (2019), a partir de técnicas de mapeamento estatístico, é possível perceber que os padrões de movimento humano explicam a disseminação das espécies de *Aedes* na Europa e nos Estados Unidos após sua introdução, fato que pode ser extrapolado para a situação brasileira.

Ademais, há de se pensar na problemática econômica gerada pelo CHIKV. A mortalidade entre os casos é rara, mas as dores articulares causadas pela infecção podem durar anos, afetando a qualidade de vida e mantendo os pacientes afastados de suas atividades durante um longo período (WATSON et al., 2020). Entre 2014 e 2019 mais de 100 países reportaram casos de chikungunya, incluindo países das Américas, Europa, África e Ásia, o que levou a infecção a ser citada na lista *Blueprint* de doenças prioritárias da Organização Mundial da Saúde (OMS) (VAIRO et al., 2019).

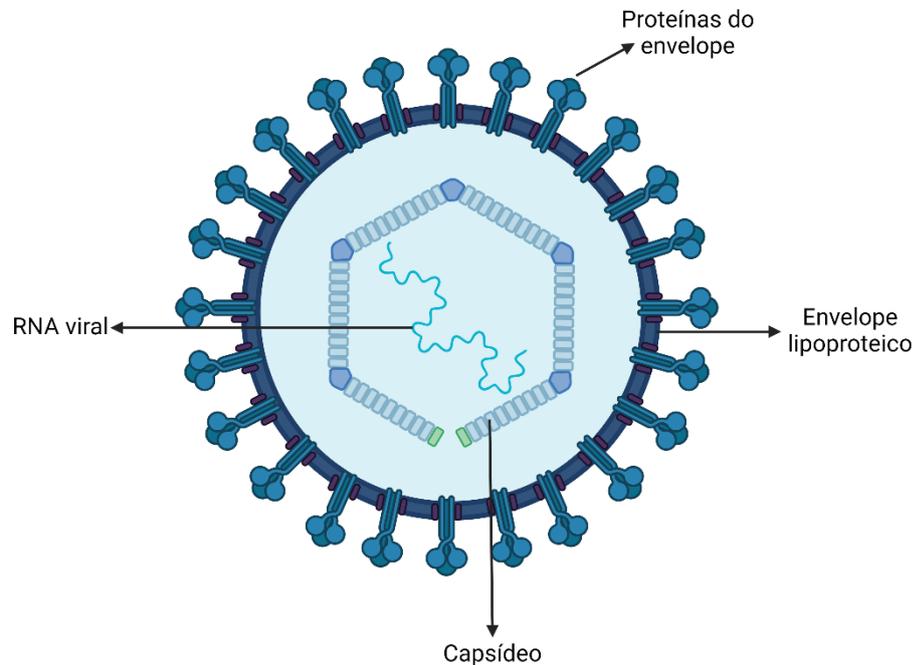
### 3.1.2 Estrutura viral e expressão gênica

O CHIKV é classificado como membro da família *Togaviridae*, gênero *alphavirus* (KENDRA et al., 2018). O vírus possui uma fita simples positiva de RNA, seu genoma possui 12kb e codifica duas poliproteínas capazes de formar proteínas estruturais (CP, E3, E2, 6k, E1) traduzidas do RNA subgenômico (26S) na extremidade 3' e não-estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) na extremidade 5' (VASCONCELLOS et al., 2019).

Possuem dois quadros de leitura abertos (ORFs, *open reading frames*) em seu genoma. O primeiro ORF é maior e codifica as proteínas não estruturais, já o segundo ORF codifica as cinco proteínas estruturais. Na extremidade 5' está presente uma região não traduzida (NTR, *non-translated region*), contendo 76 nucleotídeos, a segunda NTR localiza-se na extremidade 3' do genoma e contém 526 nucleotídeos. Por último, há uma NTR entre os ORFs que possui 68 nucleotídeos e carrega a sequência responsável por gerar o RNA subgenômico (26S) (WONG; CHU, 2018).

A proteína C é clivada e encapsulada nos genomas de RNA viral positivo no citoplasma para formar o nucleocapsídeo com 240 unidades de proteína (FROS; PIJLMAN, 2016; THOMAS et al., 2013). O nucleocapsídeo é cercado pelo envelope de bicamada lipídica, sendo que as proteínas E1 e E2 formam tríades glicoproteicas em forma de *spikes* (SOLIGNAT et al., 2009; WONG; CHU, 2018). As proteínas E3 e 6k atuam na sinalização, facilitando a translocação da proteína precursora do envelope (E1) para a membrana do retículo endoplasmático (Figura 1) (METZ; PIJLMAN, 2016; TUEKPRAKHON et al., 2018).

Figura 1 – Estrutura do CHIKV. O CHIKV possui um envelope lipoproteico de simetria icosaédrica. É formado por proteínas estruturais (CP, E3, E2, 6k, E1) e não-estruturais (nsP1-nsP4). Seu capsídeo abriga o RNA fita simples senso positivo.



Fonte: A autora (Biorender®)

Os aminoácidos presentes na proteína E2 interagem com o núcleo do nucleocapsídeo, conduzindo o processo de brotamento; a proteína E3 realiza a atividade dissulfeto isomerase que auxilia na formação de ligações dissulfeto e dobras nas glicoproteínas virais (MURUGAN; SATHISHKUMAR, 2016; SINGH et al., 2018).

Cada proteína não estrutural desempenha um papel durante e após a replicação (LAW et al., 2019; NG; HAPUARACHCHI, 2010; RUPP et al., 2015; SOLIGNAT et al., 2009). A proteína NsP1 catalisa a iniciação do RNA de fita negativa e exibe as atividades de metil e guanililtransferase necessárias para a síntese do cap 5' e ancoragem à membrana plasmática para a formação do RNA de fita positiva (FEIBELMAN et al., 2018; KUMAR et al., 2018; SPUUL et al., 2007).

A NsP2 possui uma RNA helicase N-terminal com atividades de nucleotídeo trifosfatase (NTPase) e RNA trifosfatase e uma cisteína protease na região C-terminal responsável pelo processamento de poliproteínas, atuando na modulação da atividade como enzimas helicase e proteinase (DAS; MERITS; LULLA, 2014; FROS; PIJLMAN, 2016; KARPE; AHER; LOLE, 2011).

A NsP3 realiza a iniciação da replicação do genoma no início da infecção com atividades de ligação de ADP ribosil e hidrolase, facilitando o recrutamento de RNA por outras proteínas não estruturais (ABRAHAM et al., 2018; FROS; PIJLMAN, 2016). A proteína NsP4 catalisa a iniciação ou continuação da síntese da fita negativa de RNA, juntamente com NsP1, apresentando também atividade de metilação e capeamento da fita de RNA positiva (CHEN et al., 2017; SOLIGNAT et al., 2009).

### 3.1.3 Replicação viral

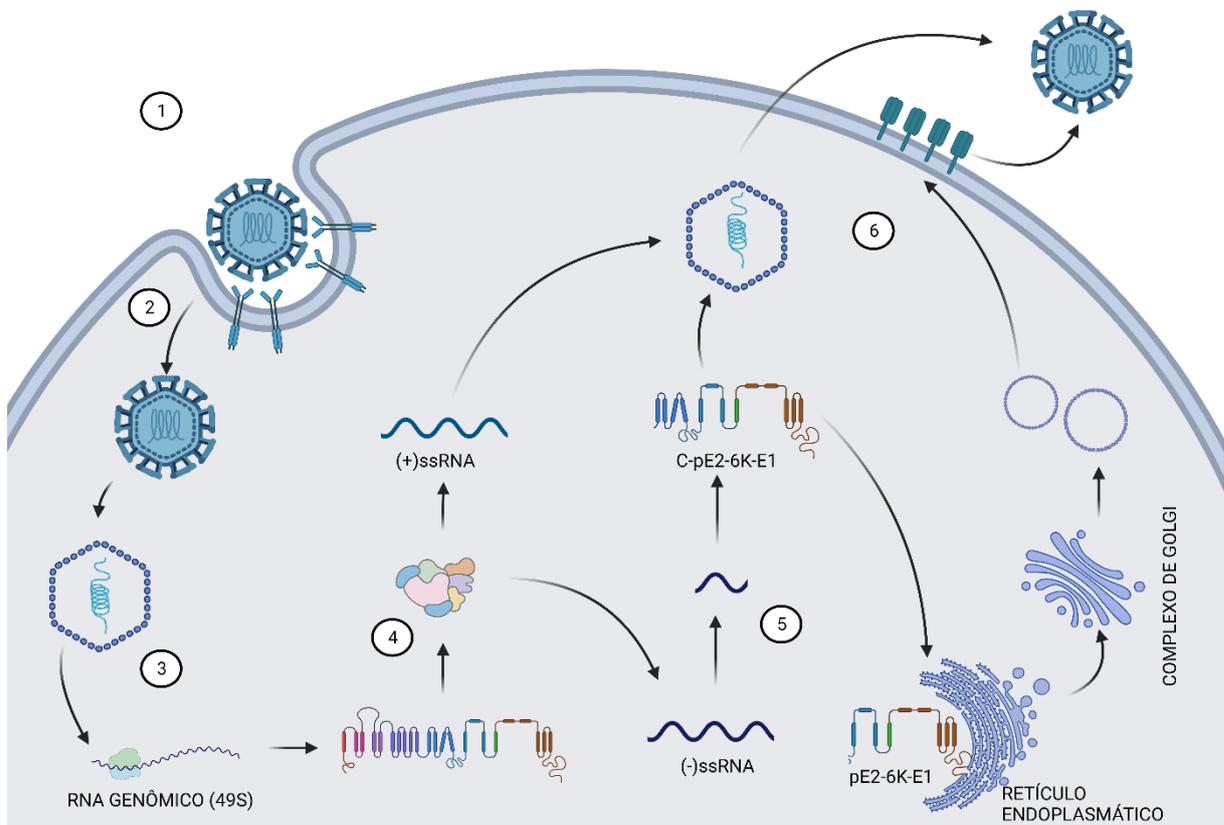
Inicialmente, o mosquito, ao picar o hospedeiro mamífero, transfere as partículas virais que são liberadas na corrente sanguínea e infectam os leucócitos a partir dos sítios de ligação localizados na proteína do envelope viral. Assim, o CHIKV entra nas células por endocitose mediada por receptores específicos expressos na superfície das células alvo (Figura 2). A partir daí, o baixo pH endossomal é responsável pela fusão das membranas viral e do endossomo ao reorganizar os heterodímeros das proteínas E1 e E2 (KRIL et al., 2021; RODRIGUEZ et al., 2019).

Na sequência, o nucleocapsídeo é desmontado e libera o RNA genômico viral no citoplasma. Ocorre a tradução das poliproteínas precursoras P123 e P1234, que são clivadas e resultam nas proteínas não estruturais (NsP1 a NsP4). Essas proteínas formam o complexo de replicação viral, responsável por sintetizar um RNA de fita negativa que serve como intermediário para a replicação viral (RODRIGUEZ et al., 2019; SILVA; DERMODY, 2017).

Há o acúmulo da poliproteína P123, que é totalmente processada e passa a transcrever novos genomas de RNA de fita positiva e as proteínas virais responsáveis por codificar o RNA subgenômico (26S) ao ser formado o complexo de replicação viral. o RNA subgenômico é traduzido na poliproteína C-pE2-6K-E1. Interações entre os genomas recém sintetizados promovem a liberação da proteína C e a montagem do nucleocapsídeo é iniciada (SILVA; DERMODY, 2017; SOLIGNAT et al., 2009).

A poliproteína C-pE2-6K-E1 é inserida na membrana do retículo endoplasmático para ser processada. A liberação da proteína 6K permite a associação entre E1, E2 e E3 que, conforme são transportadas, sofrem mudanças conformacionais. Ao mesmo tempo, as glicoproteínas E são transportadas ao longo do complexo de Golgi até a membrana plasmática e recrutam os nucleocapsídeos já montados. O brotamento das partículas virais é promovido pela interação entre as proteínas C e E2 (KRIL et al., 2021; RODRIGUEZ et al., 2019).

Figura 2 – Ciclo de replicação viral do CHIKV.



1) A adsorção ocorre com receptores de proibitina e glicosaminoglicanos (GAGs); 2) A penetração do vírus ocorre por endocitose mediada por clatrina; 3) A alteração do pH leva à liberação de nucleocapsídeo no citosol e entrega de RNA genômico viral para a tradução; 4) Nsp4 forma o complexo de replicação que produz a fita de RNA negativa, enquanto a poliproteína nsP123 é clivada para formar nsP1-3 que produz o RNA subgenômico de fita positiva 26S; 5) O RNA subgenômico codifica uma poliproteína responsável pelas proteínas estruturais: proteínas 6K e C formam novos nucleocapsídeos e E1-3 são glicosiladas e liberadas na membrana celular; 6) O nucleocapsídeo e as glicoproteínas interagem, as partículas virais adquirem um envelope de membrana e são liberadas por exocitose. Fonte: A autora (Biorender®)

O tropismo é definido como a capacidade do vírus em infectar células, órgãos e tecidos específicos. Sabe-se que a proteína E2 do CHIKV é responsável por facilitar a ligação entre vírus e célula. Tratando-se das células presentes nos mamíferos, a proibitina 1 foi indicada como a primeira molécula receptora para CHIKV e presente em células microgлияis. Além dessa, as moléculas TIM-1 (*T-cells immunoglobulin and mucin domain 1*) e glicosaminoglicanos (GAGs) também foram reconhecidas como moléculas receptoras (MATUSALI et al., 2019).

As primeiras células que suportam a replicação viral em humanos são os fibroblastos da derme, além de queratinócitos, melanócitos e macrófagos. A partir daí, o CHIKV viaja até os linfonodos axilares e causa viremia. Quanto às células sanguíneas, sabe-se que ocorre a replicação viral em monócitos, linfócitos B e células dendríticas plasmocitoides, além de estudos que sugerem a associação viral à plaquetas e hemácias (MATUSALI et al., 2019).

No músculo esquelético, a replicação viral é associada ao desenvolvimento da doença grave (LENTSCHER et al., 2020). Já a infecção nos tecidos sinoviais ocorre pela replicação nos fibroblastos sinoviais e macrófagos e contribuem para os sintomas crônicos. Nas cartilagens, é reconhecida a replicação viral em condrócitos primários. Nos ossos, a replicação nos osteoblastos leva à perda óssea (MATUSALI et al., 2019).

Por fim, o vírus também afeta tecidos neurais. Complicações neurológicas como meningite, encefalite e a síndrome de Guillain Barré já foram associadas ao CHIKV e o vírus foi detectado no líquido cefalorraquidiano. *In vitro*, células de neuroblastoma, células gliais e células microgliais foram suscetíveis a replicação. Além disso, pode ocorrer infecção em células de órgãos secundários, o que reflete nas síndromes renais, respiratórias, hepáticas, cardíacas e neurais. Nesse caso, há infecção de fibroblastos e células epiteliais (MATUSALI et al., 2019).

### **3.1.4 Terapias antivirais existentes**

Apesar de toda a problemática em torno da infecção por CHIKV, ainda não existem fármacos específicos para o tratamento da doença. O tratamento de suporte compreende opioides como morfina, antipiréticos como paracetamol, corticoides (prednisolona), anti-inflamatórios não esteroidais (rofecoxibe e celecoxibe) e antirreumáticos (sulfassalazina e metotrexato) (BHAT et al., 2019). A conduta preconizada pelo Ministério da Saúde foca na hidratação, repouso e terapia dos sintomas com analgésicos e anti-inflamatórios, dependendo da fase da infecção (BRASIL, 2017). No entanto, o mecanismo pelo qual a doença progride para a fase crônica não é completamente compreendido e, além dos já citados, os pacientes são tratados com hidroxicloroquina, metotrexato e sulfassalazina (AMARAL; BILSBORROW; SCHOEN, 2020).

Existem estudos de reposicionamento de fármacos utilizando ribavirina, favipiravir, cloroquina e outros, mas geralmente as concentrações efetivas necessárias para a atividade antiviral são superiores às já aprovadas (PÉREZ-PÉREZ et al., 2019). Os testes realizados com cloroquina, medicamento utilizado contra a malária, foram capazes de inibir os efeitos do CHIKV quando em uma infecção recente, mas foram ineficazes em infecções já tardias tendo em vista que o fármaco age impedindo a fusão da proteína viral E1 à membrana plasmática (KHAN et al., 2010).

Os testes *in vitro* e *in vivo* utilizando a ribavirina demonstraram atividade frente CHIKV. Sabe-se que esse medicamento age gerando mutações no genoma viral, resultando na inibição da polimerase viral e, dessa forma, atuando na replicação viral. O estudo em questão

demonstrou que a combinação de ribavirina com doxiciclina resultou em alta inibição viral *in vitro* e diminuição do título viral *in vivo* (ROTHAN et al., 2015). O sofosbovir, utilizado no tratamento de hepatite C crônica, pode controlar a replicação do CHIKV de modo mais eficiente que a ribavirina (GHILDIYAL; GABRANI, 2020).

Os relatos de reposicionamento de fármacos já abrangem diversos medicamentos além dos antivirais, incluindo a suramina (antiparasitário) e cefalosporinas (antibacterianos) (GHILDIYAL; GABRANI, 2020). As estratégias de reposicionamento de fármacos podem derivar de situações distintas, como a sua compreensão farmacológica ou a partir de análises de seus efeitos clínicos (PUSHPAKOM et al., 2018). Baseado nessas características, os fármacos são selecionados para testagem nos novos alvos.

O desenvolvimento de antivirais é necessário para reduzir os sintomas durante a fase aguda da infecção, o que pode ajudar a diminuir a eficiência de transmissão do vírus pelos mosquitos, e também a probabilidade de desenvolver sintomas crônicos (ABDELNABI et al., 2020). Os antivirais podem inibir a entrada viral, controlar a infecção ligando-se às proteínas do envelope viral, ou ainda, inibir a replicação do CHIKV. Também podem ser explorados componentes das células hospedeiras, como os lipídeos e proteínas (WONG; CHU, 2018).

Neste sentido, os produtos naturais são uma importante fonte de metabólitos bioativos secundários e têm demonstrado enorme importância na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, com amplas atividades terapêuticas, que podem ser utilizados no tratamento de diversas doenças, como diabetes, cardiopatias, câncer e doenças infecciosas (ALAMGIR, 2018). O Quadro 1 concentra informações sobre trabalhos que exemplificam ações antivirais de extratos de plantas frente ao CHIKV.

Quadro 1 – Levantamento de espécies de plantas medicinais com atividade antiviral frente CHIKV.

Espécie	Solvente extrator	SI*	Metabólitos	Ação biológica	Referência
<i>Ampelocissus tomentosa</i>	Metanol e etanol	4,69	Cumarinas	Inibe a replicação viral	JOSHI et al., 2020
<i>Aphloia theiformis</i>	Acetato de etila	5,5	Saponinas, xantonas, glicosídeos	Inibe a replicação viral	LEDOUX et al., 2018
<i>Croton mauritianus</i>	Acetato de etila	> 5,4	12-O-decanoylphorbol-13-acetate, 12-O-decanoyl-7-hydroperoxy-phorbol-5-ene-13-acetate	Inibe a morte celular induzida por CHIKV <i>in vitro</i>	LEDOUX et al., 2018
<i>Euphorbia amygdaloides</i> subsp. <i>semiperfoliata</i>	Acetato de etila	208	<i>Jatrophane ester</i> (composto 3)	Inibe a replicação viral via mecanismo PKC	NOTHIAS-SCAGLIA et al., 2014
		29	<i>Jatrophane ester</i> (composto 4)		
<i>Kalanchoe pinnata</i>	Metanol e etanol	4,29	Saponinas	Inibe a replicação viral	JOSHI et al., 2020
<i>Mammea americana</i>	Etanol	295,2	Cumarinas	Inibe a replicação viral	GÓMEZ-CALDERÓN et al., 2017
<i>Paris polyphylla</i>	Metanol e etanol	1,75	Alcaloides	Inibe a replicação viral	JOSHI et al., 2020
<i>Securinega durissima</i>	Acetato de etila	1,57	N.I.*	Inibe a replicação viral	LEDOUX et al., 2018
<i>Stillingia lineata</i>	Acetato de etila	10,9	4'-acetoxylonantzitlone	Inibe a replicação viral	LEDOUX et al., 2018
<i>Trigonostemon cherrieri</i>	Acetato de etila	23	<i>Trigocherrin 1</i>	Inibe a replicação viral e protege as células do ECP	ALLARD et al., 2012
		36	<i>Trigocherrin 2</i>		
		8	<i>Trigocherrin 6</i>		
		2-3	<i>Trigocherriolide 7</i>		
		2-3	<i>Trigocherriolide 8</i>		
		2-3	<i>Trigocherriolide 9</i>		

IS: índice de seletividade. N.I.: não informado. Fonte: A autora

Ademais, desde 2001 mais de 20 vacinas foram desenvolvidas utilizando diferentes abordagens. Durante esse tempo, foi observado que, devido à homologia entre as diferentes

linhagens de CHIKV, as sequências genéticas escolhidas para o desenvolvimento das vacinas podem ser distintas e, mesmo assim, manter a proteção (THOMPSON et al., 2022).

No Brasil, atualmente, há uma vacina contra o CHIKV no final da fase 3 de desenvolvimento, sendo que já ao final da fase 1 foi demonstrada a sua proteção de 94 a 100% dentre os imunizados (WRESSNIGG et al., 2020). Em São José do Rio Preto, São Paulo, uma região endêmica da doença, adolescentes de 12 a 17 anos estão passando por testagens clínicas da vacina ao longo de 2022. A vacina em questão foi desenvolvida em uma parceria entre o Butantan e a empresa franco-austriaca Valneva e trata-se de uma vacina atenuada (BUTANTAN, 2022).

## 3.2 HERPES SIMPLEX VIRUS

### 3.2.1 Epidemiologia

Além das infecções em expansão, prevalecem aquelas que ainda não possuem cura. Neste contexto, o *Herpes Simplex* vírus tipo 1 (HSV-1) possui soroprevalência de mais de 85% na população brasileira adulta e em média 83,1% na população da América Latina. A soroprevalência média combinada na América Latina diminuiu com o tempo entre as populações. Antes dos anos 2000, atingia 90,8% da população; entre 2000 e 2009 a média é de 80,7% e, entre 2010-2018, 78,8% (SUKIK et al., 2019).

A soroprevalência de HSV-1 aumenta linearmente com a idade e é maior no sexo feminino, sendo que em 2012 a estimativa entre a população mundial foi de 67% (LOOKER et al., 2015). Além disso, tem sido observado o aumento expressivo de HSV-1 como causador do herpes genital em jovens, avançando de 30,9% em 1993 para 77,6% em 2001 (KNIPE; WHITLEY, 2021).

As primeiras descrições de infecções herpéticas datam da Grécia antiga. Hipócrates utilizou o termo ‘herpes’ para descrever “lesões que rastejavam ao longo da pele”, mesmo sem o conhecimento do agente etiológico. De outra forma, aponta-se que em 1500 A.E.C. foram descritas lesões semelhantes às causadas por HSV em tabuletas Sumérias (ROIZMAN; WHITLEY, 2001).

Com o avanço da tecnologia, já no século XX, foram propostos que dois tipos diferentes de HSV estavam envolvidos nas infecções orais e genitais. A infecção cerebral foi primeiramente descrita em 1940 e, ao final da década de 1950, já existiam relatos da infecção por HSV envolvendo outros órgãos do corpo (ROIZMAN; WHITLEY, 2001).

A transmissão do HSV-1 se dá pelo contato com as lesões herpéticas, superfícies das mucosas e secreções genitais ou orais. Sabe-se que o contato oral-genital pode levar à transmissão do HSV-1, mesmo sendo o *Herpes Simplex* vírus tipo 2 (HSV-2) o principal agente causador da herpes genital (COLE, 2020). A transmissão primária é via oral e, a secundária, via oral-genital. Além disso, o vírus pode ser transmitido durante o parto e costuma ser adquirido ainda na primeira infância por meio de secreções da mucosa oral contaminadas, sendo que a transmissão pode se dar sem a presença de sintomas (THELLMAN; TRIEZENBERG, 2017).

A apresentação dos sintomas da doença se dá de forma cíclica, tendo em vista que o HSV-1 é um vírus que gera latência. O primeiro episódio é muitas vezes mais grave e pode estar associado a febre, dores musculares, linfadenopatia e cefaleia, além de produzir as lesões orais características. Ao longo do tempo, os episódios de doença diminuem tanto em frequência como em gravidade (COLE, 2020; STEMPEL; CHAN; BRINKMANN, 2019).

A latência do HSV-1 tem um importante papel no sucesso da infecção. O vírus, quando em estado latente, mantém seu genoma epissomal nos núcleos dos neurônios do gânglio trigêmeo e não produz vírions infecciosos. Ocorrendo a reativação, o vírus volta a replicar e garante a persistência e disseminação para as células e gera excreção viral assintomática ou novas lesões no local da infecção primária – local da inoculação (YAN et al., 2020).

Fatores como mudanças ambientais, exposição à luz ultravioleta e estresse estão estreitamente ligados com a reativação do HSV-1. Acredita-se que o estresse, ao suprimir o sistema imunológico, permite a saída da latência do vírus. Além disso, a epinefrina e o cortisol contribuem de modo a afetar a gravidade dos sintomas da reativação e da recorrência da infecção primária (IVES; BERTKE, 2017).

A resposta imune primária à infecção por HSV-1 ocorre pelo sistema imune inato, envolvendo células NK (*Natural Killer*), neutrófilos, células B e T, produção de citocinas inflamatórias e, na sequência, o recrutamento da resposta imune adaptativa e humoral. Com o tempo, linfócitos TCD4 e TCD8 são envolvidos (KNIPE; WHITLEY, 2021).

Ao se estabelecer no corpo, o HSV-1, além das lesões primárias, pode levar a doenças como a gengivoestomatite e eczema herpético. Complicações neurológicas são sabidamente conhecidas, como a encefalite e ceratite acompanhada de conjuntivite, as quais aparecem com base nos ciclos de latência e reativação do vírus. A reativação do HSV-1, quando a infecção é ocular, pode levar à cegueira (YAN et al., 2020).

Quando infecta neonatos, o HSV-1 manifesta-se de três modos: herpes localizada na pele, olhos e boca, herpes disseminada e herpes do sistema nervoso central. A maioria das infecções é acompanhada de febre, letargia, lesões na pele ou convulsões. Ao envolver o

sistema nervoso central, é comum ocorrer encefalites. Já a herpes disseminada pode resultar em coagulação, pneumonite hemorrágica, hepatite e lesões cutâneas e pode chegar em 60% de mortalidade quando não tratada (KNIPE; WHITLEY, 2021).

Outros distúrbios causados pelo herpes simples incluem doenças sistêmicas, assim como ocorre em outras patologias com correlações orais e sistêmicas. Já são levantadas evidências de que os efeitos cumulativos de repetidas infecções cerebrais por HSV-1 podem resultar em danos neuronais semelhantes aos encontrados em doenças neurodegenerativas (MARCOCCI et al., 2020).

Atualmente, sabe-se que a reativação do HSV-1 tem papel na patogênese da doença do Alzheimer. Estudos demonstram maior taxa de risco de desenvolvimento de demência em pessoas infectadas com HSV-1 (TZENG et al., 2018). O Alzheimer é uma doença inflamatória neurodegenerativa que acarreta na perda progressiva de habilidades cognitivas, e é a maior causa de demência. A forma autossômica dominante dessa doença é caracterizada pela superprodução do peptídeo beta-amiloide (A $\beta$ ) a partir de mutações em três genes: APP, PSEN1 ou PSEN2 (HARRIS; HARRIS, 2018).

A infecção das células neuronais por HSV-1 leva ao acúmulo do peptídeo A $\beta$ , induzindo o desenvolvimento do Alzheimer. A infecção por HSV-1, gerando encefalite crônica, já foi hipotetizada como fator causador do Alzheimer. Realizando a técnica de PCR (*polymerase chain reaction*), é possível identificar o HSV-1 em cérebros de idosos que sofreram de Alzheimer, ou cérebros normais que apresentam áreas comumente afetadas pela doença, como o hipocampo e os lobos temporais e frontais (HARRIS; HARRIS, 2018).

Outra correlação do HSV-1 surge com o câncer esofágico. A prevalência de HSV-1 associado ao câncer esofágico chega a 30% dos casos e tornam a doença ainda mais grave. Entretanto, o mecanismo pelo qual o vírus influencia o desenvolvimento do câncer ainda não foi elucidado (LI et al., 2022).

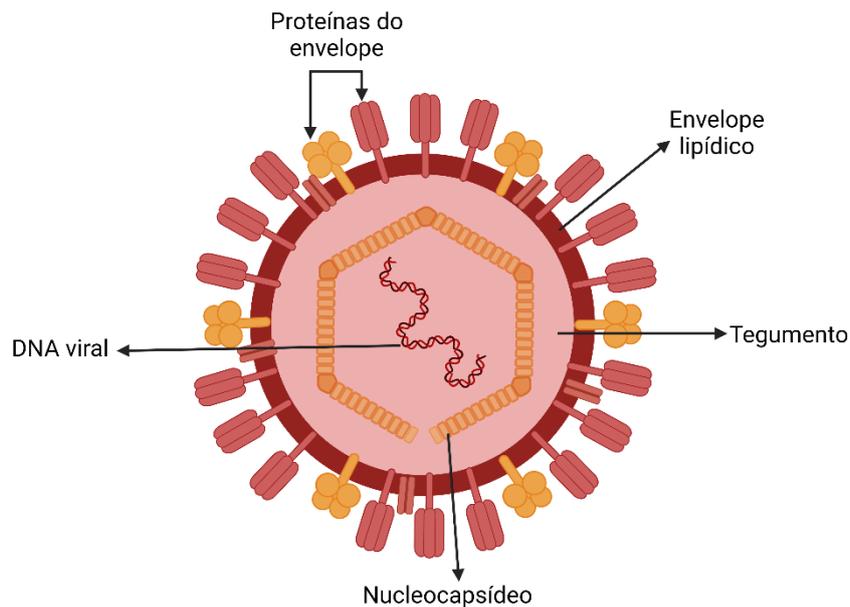
Ademais, em pacientes imunocomprometidos, mais de 90% dos casos de encefalite são causados pelo HSV-1. De modo geral, as infecções em imunocomprometidos são clinicamente mais graves e progressivas. Outras manifestações que podem ocorrer com frequência nesses pacientes são: pneumonite, esofagite, hepatite e colite (KNIPE; WHITLEY, 2021). Além disso, pacientes imunocomprometidos sofrem mais com resistência as drogas utilizadas no tratamento do HSV-1 (STEINER; BENNINGER, 2018).

### **3.2.2 Estrutura viral e expressão gênica**

O HSV-1 é classificado na família Herpesviridae, subfamília alfa herpesvirinae, é envelopado e possui DNA dupla fita (CRIMI et al., 2019; HO; ENRIQUEZ; MULTANI, 2020). O DNA consiste em dois componentes ligados covalentemente, um longo (L) e um curto (S), com sequências únicas (UL e US, respectivamente) flanqueadas por sequências repetitivas invertidas (WHITLEY; ROIZMAN, 2001). O genoma possui três origens de replicação, duas curtas (S) e uma longa (L) (MUYLAERT; TANG; ELIAS, 2011).

As partículas virais são estruturadas da seguinte forma (Figura 3): DNA nuclear (152 pb) rico em GC (68%), capsídeo icosaédrico (150 héxons, 12 pentons), tegumento contendo 26 proteínas não estruturais e envelope (KELLY et al., 2009). O envelope é composto por uma bicamada lipídica, 11 glicoproteínas (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL e gM) e duas proteínas de membrana não glicosiladas (UL20 e US9) (HUANG et al., 2022).

Figura 3 – Estrutura dos HSV-1. O HSV-1 é composto por um envelope de simetria icosaédrica composto por 11 glicoproteínas e duas proteínas de membrana não glicosiladas, e seu nucleocapsídeo abriga o DNA linear de fita dupla.



Fonte: A autora (Biorender®)

As sequências repetitivas invertidas de HSV-1 são regiões extremamente importantes do genoma viral.  $R_L$  é a sequência de 9 kpb que codifica proteína regulatória inicial  $\alpha 0$ , bem como o promotor e a maioria dos genes associados aos transcritos associados à latência.  $R_S$  é a segunda região de sequências repetitivas e possui 6,6 kpb. É responsável por codificar a proteína inicial imediata  $\alpha$ , uma ativadora da transcrição. Além disso, atua juntamente com proteínas

regulatórias iniciais imediatas para estimular a expressão de genes que levam à replicação viral (KNIPE; WHITLEY, 2021).

O HSV-1 codifica ao menos 84 polipeptídeos, que possuem centenas de funções diferentes. Ao menos 47 desses polipeptídeos não são necessários a replicação viral. Alguns desses são utilizados para alterar o metabolismo celular, garantindo o sucesso da progênie viral (WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

Ao menos seis proteínas virais são responsáveis por garantir a expressão dos genes virais, mobilizando as proteínas da célula hospedeira para sintetizar o DNA e as proteínas virais. Como exemplo, as proteínas reguladoras ICP0, ICP4 e ICP22 permitem a expressão dos genes virais e são alvos para a terapia antiviral (WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

### 3.2.3 Replicação viral

A replicação dos HSV é um processo complexo (Figura 4). O HSV sofre uma infecção produtiva lítica nas células epiteliais e fibroblastos quando é inoculado na mucosa oral, se espalha e causa a lesão herpética primária. O vírus entra nos axônios dos neurônios sensoriais do gânglio trigêmeo e estabelece uma infecção latente no corpo celular neuronal (KNIPE; WHITLEY, 2021).

De modo geral, um ciclo replicativo *in vitro* tem um tempo de duração entre 18 a 20 horas. Inicialmente, os vírus são adsorvidos aos receptores da superfície celular e o seu envelope funde-se com a membrana plasmática da célula hospedeira. O capsídeo desenvolvido é transportado aos poros nucleares e o genoma viral é liberado no núcleo da célula. Ali, ocorrem a transcrição, síntese do DNA, montagem do capsídeo, empacotamento do DNA e o envelopamento viral, resultando na nova progênie infecciosa (KNIPE; WHITLEY, 2021).

A adsorção viral ocorre por meio da fusão do envelope viral com a membrana plasmática e os receptores celulares, ou por meio da endocitose do capsídeo a partir da diferença de pH, que permite a fusão à membrana da vesícula endocítica dependente de pH. Assim, a adsorção depende da ligação via glicoproteínas gB e gC a um tipo de GAG, o sulfato de heparana. Pode ocorrer a adsorção sem o sulfato de heparana, mas sua presença aumenta o sucesso de infecção. Já para a ocorrência da penetração, a glicoproteína gD se liga a receptores [HVEM, Nectina-1 ou 2, e 3-OS HS (*3-O-Sulfated heparan sulfate*)], sofre alterações conformacionais que facilitam a interação entre gB com o dímero gH-gL. Esse conjunto de acontecimentos resulta na fusão do envelope com a membrana e leva a entrada do

nucleocapsídeo e do tegumento viral no citoplasma (HUANG et al., 2022).

A partir disso, o nucleocapsídeo é transportado aos poros da membrana nuclear e, ali, o DNA viral é liberado já no núcleo. Ocorre então a transcrição, replicação e montagem dos capsídeos. A síntese do DNA é feita por um replissoma composto de uma DNA polimerase heterodimérica (codificada por UL30 e UL42), uma helicase-primase trimérica (codificada por UL5, UL8 e UL52) e a proteína ICP8 (codificada por UL29). Durante esse estágio, cerca de 84 proteínas diferentes são expressas e divididas em três fases: imediata ( $\alpha$ ), precoce ( $\beta$ ) e tardia ( $\gamma$ ) (MUYLAERT; TANG; ELIAS, 2011).

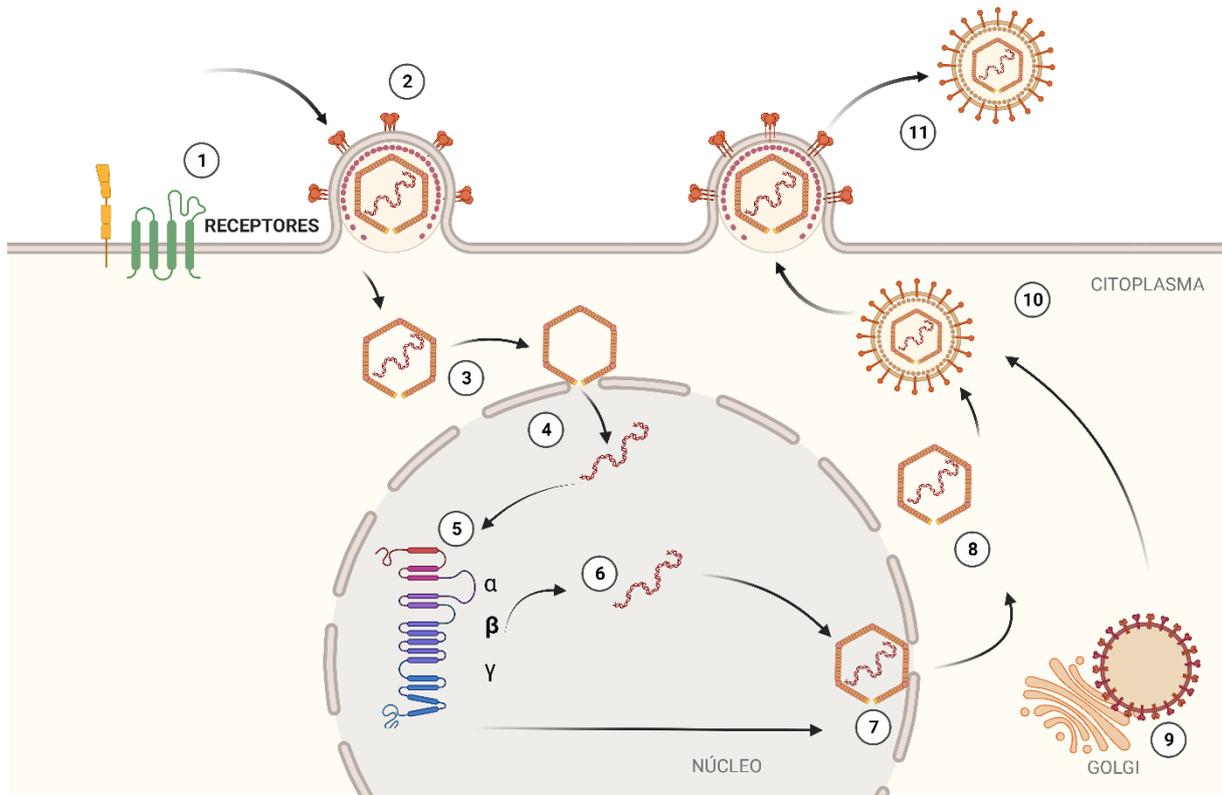
Na fase imediata, a expressão gênica leva a produção de proteínas que regulam a replicação viral, sintetizadas 3 a 4 h P.I. Elas também bloqueiam a apresentação de peptídeos antigênicos na superfície celular, desligando o sistema imune. As ICPs (*infected cell proteins*) são proteínas multifuncionais que alteram o ambiente celular de modo a permitir a replicação viral com a expressão eficiente dos genes (DONG et al., 2021).

Na sequência, na fase precoce, a replicação viral e a expressão de proteínas tardias são promovidas cerca de 5 a 7 h P.I. As proteínas da fase precoce incluem enzimas requeridas para a síntese do genoma e para o metabolismo viral. Os produtos dessa fase induzem a expressão dos genes tardios, que geram a síntese do nucleocapsídeo e glicoproteínas do envelope viral cerca de 12 h P.I (KOBILER et al., 2011).

Nesse momento, os capsídeos são montados em torno das proteínas virais no núcleo celular, enquanto demais proteínas interagem com o DNA viral para gerar a encapsulação. As proteínas do tegumento migram para o núcleo celular e formam depósitos sobre a membrana. Os capsídeos, já com o DNA viral, associam-se com as proteínas do tegumento. Após modificações pós-traducionais no complexo de Golgi, as glicoproteínas são inseridas nas membranas nucleares (OWEN; CRUMP; GRAHAM, 2015).

Os nucleocapsídeos, ao serem liberados da membrana, recebem o envelope e o tegumento. O processo de infecção lítica envolve os produtos gênicos virais que inibem o metabolismo da célula hospedeira, o que eventualmente resulta na morte e lise da célula hospedeira (KNIFE; WHITLEY, 2021; OWEN; CRUMP; GRAHAM, 2015).

Figura 4 – Ciclo de replicação do HSV-1.



1) Adsorção da partícula viral à membrana celular, mediada por glicoproteínas; 2) Fusão do envelope viral e membrana celular; 3) Transporte do nucleocapsídeo e proteínas cutâneas (vp16 e vp1-2) para o núcleo da célula; 4) Liberação de DNA viral no núcleo da célula; 5) Expressão gênica viral (genes imediatos ( $\alpha$ ), precoces ( $\beta$ ) e tardios ( $\gamma$ )); 6) Replicação do DNA viral; 7) Produção de novos nucleocapsídeos; 8) Maturação do nucleocapsídeo; 9) Formação do envelope primário; 10) Saída da partícula viral; 11) Liberação dos novos vírions. Fonte: A autora (Biorender®)

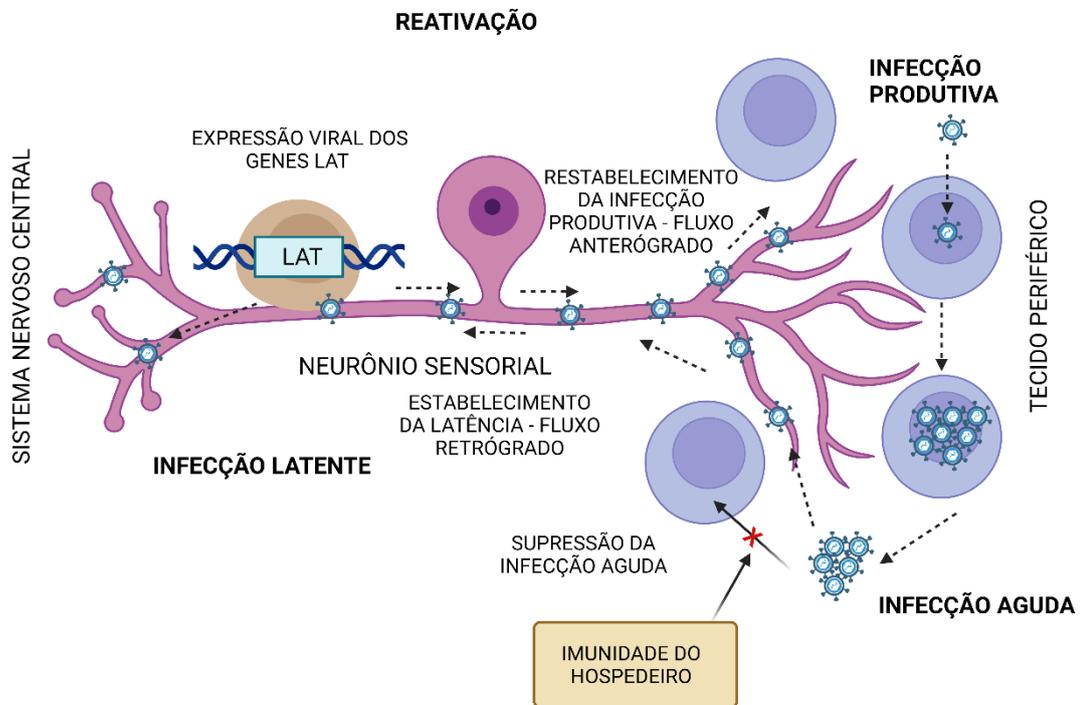
Outro ponto importante que caracteriza o HSV-1 é o estabelecimento de latência (Figura 5). O vírus chega ao corpo celular neuronal por meio do transporte axonal retrógrado e entra nas células neuronais possivelmente pelos mesmos mecanismos conhecidos do ciclo lítico. O genoma é liberado no núcleo neuronal e é carregado por histonas, mas a transcrição do gene lítico é limitada devido à falta de VP16 (KNIPE; WHITLEY, 2021).

O principal gene viral responsável pela latência é o gene que codifica o transcrito associado à latência (LAT), que é um transcrito primário de RNA não codificante (8,3 Kb). O gene LAT é processado por *splicing* para produzir um íntron circular estável de 2 Kb, um transcrito instável de 6,3 Kb e cinco microRNAs (miRNAs). A expressão de LAT atua para promover a sobrevivência do neurônio infectado aumentando a heterocromatina no genoma viral, reduzindo a expressão do gene lítico viral e inibindo a apoptose (HARRISON; JONES, 2022).

Durante a manutenção da infecção latente há a expressão mínima dos genes líticos do

HSV-1. O DNA viral é mantido de forma estável no neurônio, sem replicar. Na ocorrência de fatores que reativam o HSV-1, as vias de sinalização de quinase fosforilam as histonas na cromatina viral para permitir a transcrição do genoma latente, e assim fornecer VP16 suficiente para desencadear a cascata transcripcional lítica. Isso permite a formação de capsídeos, ocorrendo a movimentação dos vírions ao longo do axônio por transporte anterógrado e gerando uma infecção recorrente, que costuma manifestar-se como a herpes labial (KUMAR et al., 2016).

Figura 5 – Estabelecimento de latência pelo HSV-1.



Após estabelecer uma infecção lítica, os vírus penetram pelas terminações nervosas e são transportados pelos axônios, em um sentido retrógrado ao estímulo nervoso, para os neurônios do gânglio trigêmeo. A latência se estabelece e o genoma viral é encontrado na forma de epissoma circular no núcleo dos neurônios até que sinais de reativação sejam recebidos e ele retorne ao sítio de infecção produtiva no tecido periférico, causando a recorrência da doença. Durante a latência, o DNA viral é expresso a partir dos genes LAT. Fonte: SANTOS; ROMANO; WIGG, 2015.

### 3.2.4 Terapias antivirais existentes

A infecção por HSV-1 não possui cura ou vacinas aprovadas até então. O histórico da busca por fármacos que inibam o HSV-1 é longo, e a primeira demonstração de sucesso no

controle da mortalidade dos casos por encefalite foi demonstrada com o antiviral vidarabina, que teve seu uso dificultado pela alta citotoxicidade (ROIZMAN; WHITLEY, 2001).

Como os principais sintomas que afetam a população são as lesões corporais, havia a urgência na descoberta de tratamentos voltados para essa complicação clínica. Assim, o fármaco aciclovir, um análogo acíclico nucleosídico, foi descoberto em 1977 ao agir como o antagonista da DNA polimerase viral, inibindo a replicação do HSV-1. Mesmo não sendo capaz de eliminar o vírus do organismo, o aciclovir atua diminuindo a frequência, duração e severidade dos surtos de infecção, e é altamente seletivo, já que é convertido à sua forma ativa apenas nas células infectadas (CRIMI et al., 2019).

Atualmente, apesar do aciclovir ser o fármaco referência no tratamento de HSV-1, outros fármacos antivirais também são utilizados, como o valaciclovir, famciclovir, foscarnet e penciclovir (CRIMI et al., 2019). As limitações à terapia antiviral incluem baixa biodisponibilidade, toxicidade e surgimento de cepas resistentes aos medicamentos, que foram relatadas principalmente em indivíduos imunocomprometidos (STEMPEL; CHAN; BRINKMANN, 2019).

Os medicamentos contra infecções por herpesvírus são principalmente de dois tipos: análogos de nucleosídeos e inibidores da helicase-primase (amenamevir), tendo ambos a capacidade de reduzir ou interromper a replicação do genoma viral. Outros alvos de medicamentos antivirais podem ser as proteínas virais envolvidas na adesão e penetração, a replicação do genoma a nível de proteína e a nível de DNA/RNA. Diante disso, tecnologias envolvendo CRISPR/Cas9 e RNA de interferência já comprovaram eficácia na inibição de infecções herpéticas, mas com limitações específicas, como o surgimento de variantes resistentes a CRISPR/Cas9 ou instabilidade das técnicas (DONG et al., 2021).

Assim, a pesquisa por fármacos capazes de inibir a infecção por HSV-1 é um trabalho contínuo. O aciclovir, por exemplo, é derivado da esponja marinha *Cryptotethya crypta*, exemplificando o potencial presente em produtos naturais no desenvolvimento de novos fármacos eficazes (ÁLVAREZ et al., 2020). O Quadro 2 reúne exemplos de espécies que apresentam potencial antiviral frente o HSV-1.

Quadro 2 - Levantamento de espécies de plantas medicinais com atividade antiviral frente HSV-1.

<b>Espécie</b>	<b>Solvente extrator</b>	<b>SI*</b>	<b>Metabólitos</b>	<b>Ação biológica</b>	<b>Referência</b>
----------------	--------------------------	------------	--------------------	-----------------------	-------------------

<i>Baccharis gaudichaudiana</i>	Água	>117	N.I.	Inibição da adsorção e pós-adsorção	VISINTINI JAIME et al., 2013
<i>Baccharis anomala</i>	Água	421,21	Compostos fenólicos	Atividade virucida	VENTURI et al., 2018
<i>Cecropia glaziovii</i>	Água	>56,1	Extrato	Indefinido	SILVA et al., 2010
<i>Cecropia glaziovii</i>	Água	>130,9	Fração enriquecida em C-glicosil flavonoides	Inibe a penetração, a disseminação viral célula a célula e reduz a expressão das proteínas gD e gE do envelope viral	SILVA et al., 2010
<i>Enteromorpha compressa</i>	N.I.	35,3	Polissacarídeos	Inibição viral total no ensaio no momento da adição e mantida no pós-tratamento	LOPES et al., 2017
<i>Hypnea musciformis</i>	Água	>298,5	Polissacarídeos e proteínas	Inibe a penetração viral e apresenta ação virucida	MENDES et al., 2012
<i>Mentha suaveolens</i>	Óleo essencial	>700	Óxido de piperitenona	Inibe os últimos estágios de replicação	CIVITELLI et al., 2014
<i>Mentha suaveolens</i>	Óleo essencial	67	N.I.	Ação sinérgica com o aciclovir após adsorção	CIVITELLI et al., 2014

N.I.: não informado. Fonte: A autora

### 3.3 PRODUTOS NATURAIS NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

Para que novos fármacos sejam desenvolvidos, existem diversas etapas de estudos.

Primeiramente, na etapa de estudos pré-clínicos, são realizados testes em células, *in vitro*, e em animais, *in vivo* (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2013). Esse é o passo inicial, o qual foi aplicado no presente estudo por meio de ensaios *in vitro* com cultura de células animais, visando simular as reações de um “organismo” a um potencial candidato a fármaco.

Após as pesquisas pré-clínicas iniciais, inicia-se a etapa de pesquisa clínica, dividida em quatro fases. Na fase 1, o fármaco é testado em humanos saudáveis para verificar a sua segurança e possível toxicidade. A fase 2 concentra-se em avaliar a eficácia do fármaco frente à doença para o qual foi desenvolvido e a dose-resposta, a partir de um pequeno grupo de pacientes afetados pela doença. Na fase 3, os testes ocorrem num número maior de doentes e ocorre o acompanhamento por até quatro anos, para que então o medicamento seja registrado junto às agências regulatórias. Por fim, na fase 4, os estudos são conduzidos após a inserção do medicamento no mercado, objetivando a farmacoepidemiologia, farmacovigilância e bioequivalência (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2013).

Nas últimas cinco décadas, cerca de 90 medicamentos antivirais foram aprovados mundialmente, muitos deles tendo origem em produtos naturais. Os compostos bioativos de origem natural com reconhecida atividade antiviral correspondem aos grupos de metabólitos secundários, tais como: polifenóis, cumarinas, flavonoides, terpenos, quinonas e outros (CLERCQ; E., 2016).

Sendo as infecções virais uma das maiores causas de mortalidade e morbidade mundial, a maioria dos antivirais disponíveis tratam apenas um seletivo grupo de agentes infecciosos e, na maioria dos casos, são ineficazes contra vírus resistentes (BEN-SHABAT et al., 2020). Neste contexto, diversas plantas já possuem estudos demonstrando seu potencial antiviral, muitas dessas sendo utilizadas há milênios por populares, fato responsável por impulsionar estudos com essas espécies (BEN-SHABAT et al., 2020; NEWMAN; CRAGG, 2020).

O Bioma Amazônico é reconhecido por ser a maior floresta do mundo, abrigar a maior bacia hidrográfica e possuir nove tipos de vegetação. Partindo disso, a riqueza de espécies endêmicas comporta um elevado potencial de geração de recursos no âmbito do desenvolvimento de fármacos (JÚNIOR; SOUZA, 2021).

### **3.3.1 Espécies amazônicas: Etnobotânica e atividades biológicas**

A etnobotânica fornece informações sobre o uso popular das plantas medicinais, sendo base para o desenvolvimento de estudos aprofundados sobre as espécies utilizadas. Dentro de

seu significado cultural, as plantas possuem importância espiritual para as populações locais (CRAGG; NEWMAN, 2013). O presente trabalho buscou demonstrar a potencial ação antiviral de espécies pouco estudadas de plantas endêmicas do bioma amazônico, as quais serão expostas a seguir.

A espécie *Vouacapoua americana* Aubl. distribui-se entre os estados brasileiros do Amapá e Pará e nos países Guiana Francesa e Suriname, ocorrendo, portanto, em florestas neotropicais (DUTECH; MAGGIA; JOLY, 2000). Desta árvore deriva a substância conhecida como piceatannol, um polifenol análogo ao resveratrol e com atividades anti-inflamatória, antioxidante, anticarcinogênica e antiviral já descritas (AGGARWAL et al., 2004; SATO et al., 2014; YOUNG HAN et al., 2009). Além desse composto, há presença de diterpenos com potencial ação antitumoral, antioxidante, antibacteriana e antiviral (DICKSON; HOUGHTON; HYLANDS, 2007; DICKSON; FLEISCHER; HOUGHTON, 2011). Popularmente, é utilizada como antisséptico, fortificante e no tratamento de úlceras gástricas (VIANA et al., 2011).

*Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. é uma espécie de trepadeira lenhosa originada nas Américas Central e do Sul, distribuindo-se também na África e Ásia sendo que no Brasil ocorre na Amazônia (POLLITO; TOMAZELLO, 2006). No uso popular, é empregada no tratamento de tumores, artrite, diabetes e inflamações (HEITZMAN et al., 2005). Estudos comprovam seu potencial antiviral, anti-inflamatório, antialérgico, citotóxico e antioxidante, parte desses devido à presença de compostos alcaloides (CARVALHO et al., 2006; LEE et al., 1999; MELLO et al., 2017; SANDOVAL et al., 2002).

Ocorrendo em alta densidade, principalmente no Cerrado brasileiro, a espécie lenhosa *Ouratea hexasperma* (A. St.-Hil.) Baill. possui preferência ao solo seco (FONSECA; JÚNIOR, 2004). Biflavonoides isolados das folhas apresentaram potencial citotóxico contra linhagens tumorais humanas e, os demais compostos possuem propriedades antioxidantes, anticolinesterásicas e antidiabéticas. Já na medicina popular, a planta é utilizada no alívio de distúrbios reumáticos e gástricos (DANIEL et al., 2005, 2007; FIDELIS et al., 2019).

O látex produzido por *Brosimum acutifolium* Huber é utilizado tradicionalmente na Amazônia, desde o século XVIII, para o tratamento da sífilis (VIEIRA et al., 2019). Distribuída principalmente do leste do Estado do Pará (Brasil) ao leste do Suriname, também é utilizada popularmente como anti-inflamatório e anti-reumático (TORRES et al., 2000). Possui, em suas folhas, flavonoides e lignoides com ação antibacteriana, e lignoides com atividade inibidora da proteína quinase - alterando o controle da regulação de glicogênio, açúcar, metabolismo de lipídio e outras cascatas de transdução de sinal - (ROUMY et al., 2020; TAKASHIMA; ASANO; OHSAKI, 2002). Além disso, já foi constatado seu potencial antioxidante bem como

a ação contra bactérias patogênicas resistentes a medicamentos (CORREIA et al., 2008; MARTINS et al., 2016).

*Manilkara elata* (Allemão ex Miq.) Monach. é uma árvore que distribui-se na floresta amazônica e mata atlântica (ALMEIDA et al., 2013). Há pouca bibliografia quanto à atividade biológica da espécie mas de sua resina já foram isolados compostos do tipo hidrocarbonetos, triterpenos, esteroides, ligninas e açúcares (SEGOVIA et al., 2010).

*Tabebuia serratifolia* (Vahl) é uma árvore amazônica e demonstra atividade antitumoral, antiviral, antibacteriana, antioxidante, antialérgica, anti-inflamatória, larvicida e potencial contra lúpus por conter quinonas, lignanas e triterpenos (BARCELOS et al., 2017; CRAGG; NEWMAN, 2005; LEMOS et al., 2007; MORAIS et al., 2005). A *T. serratifolia* é utilizada popularmente para o tratamento de cancro, doenças renais, hepáticas e intestinais (CHAVES; BARROS, 2012).

Nativa da Amazônia e de pequeno porte, a espécie *Ambelania acida* Aubl. possui uso popular a partir de infusões dos frutos para diarreia e disenteria, e seu látex serve como expectorante (LÉVI-STRAUSS, 1952; OLIVEIRA; ALMEIDA, 2016). Estudos revelam a presença de alcaloides, esteroides, triterpenoides, fenóis, taninos, açúcares redutores e resinas em sua composição (OLIVEIRA; ALMEIDA, 2016).

*Licania macrophylla* Benth, na fitoterapia popular, é utilizada como cicatrizante, antiinflamatória, contra amebíase e distúrbios disentéricos, e possui flavonóides, taninos, saponinas, esteróides e triterpenóides (GOMES et al., 2006; SALES et al., 2019). Há demonstração de seu potencial contra bactérias resistentes e ação contra úlceras do trato gastrointestinal (CORREIA et al., 2008; SALES et al., 2019).

Portanto, devido a importância dessas espécies no âmbito popular, cultural e de preservação da biodiversidade brasileira, objetivou-se seu estudo na intenção de aperfeiçoar os conhecimentos sobre suas atividades biológicas, representadas no presente estudo pelos potenciais antiviral e virucida.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AQUISIÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Os extratos de oito espécies de plantas medicinais (*Vouacapoua americana*, *Uncaria guianensis*, *Ouratea hexasperma*, *Brosimum acutifolium*, *Manilkara elata*, *Tabebuia serratifolia*, *Ambelania acida*, *Licania macrophylla*) foram fornecidos por meio de colaborações já estabelecidas com o Prof.º Dr.º Isamu Kanzaki da Universidade de Brasília (UnB) (Quadros 3 e 4).

Quadro 3 - Informações sobre as plantas medicinais estudadas.

Nome científico	Sinonímia científica	Nome popular	Exsicata
<i>Ambelania acida</i> Aubl.	<i>Ambelania cucumerina</i> Spruce ex Miers, <i>Ambelania sagotii</i> Müll.Arg., <i>Ambelania tenuiflora</i> Müll.Arg., <i>Ambelania tenuiflora</i> var. <i>tenuiramea</i> Müll.Arg., <i>Willughbeia acida</i> (Aubl.) Oken	Pepino do mato/Papaia-do-veado-vermelho	
<i>Brosimum acutifolium</i> Huber	<i>Brosimopsis acutifolia</i> (Huber) Ducke, <i>Brosimopsis obovata</i> Ducke, <i>Brosimum caniceps</i> Standl., <i>Piratinera acutifolia</i> (Huber) Pittier.	Mururé/ Mercúrio vegetal	
<i>Licania macrophylla</i> Benth	<i>Licania laxiflora</i> Fritsch	Anoerá/ Anauerá	
<i>Manilkara elata</i> (Allemão ex Miq.) Monach.	<i>Mimusops elata</i> Allemão ex Miq., <i>Manilkara huberi</i> (Ducke) A.Chev., <i>Mimusops huberi</i> Ducke, <i>Kaukenia elata</i> (Allemão ex Miq.) Kuntze	Maçaranduba /Maçarandub eira	

<p><i>Ouratea hexasperma</i> (A. St.-Hil.) Baill.</p>	<p><i>Ouratea boliviana</i> Tiegh., <i>Ouratea crispa</i> Tiegh., <i>Ouratea denudata</i> Tiegh., <i>Ouratea hexasperma</i> var. <i>planchonii</i> Engl., <i>Ouratea undulata</i> Tiegh., <i>Ouratea weddelliana</i> Tiegh.</p>	<p>Vassoura-de-bruxa/ Barba-de-bode</p>	
<p><i>Tabebuia serratifolia</i> (Vahl) Nich.</p>	<p><i>Handroanthus serratifolius</i> (Vahl) S.Grose</p>	<p>Ipê-amarelo/ Pau-d'arco</p>	
<p><i>Uncaria guianensis</i> (Aubl.) Gmel.</p>	<p><i>Ourouparia guianensis</i> Aubl., <i>Uncaria aculeata</i> Willd., <i>Uncaria spinosa</i> Raeusch., <i>Uruparia versicolor</i> Raf., <i>Nauclea guianensis</i> (Aubl.) Poir.</p>	<p>Unha de gato/ Garra de gato</p>	
<p><i>Vouacapoua americana</i> Aubl.</p>	<p><i>Andira aubletii</i> Benth., <i>Vouacapoua aubletii</i> (Benth.) Lyons</p>	<p>Acapu</p>	

Fonte: Sistema de informação sobre a biodiversidade brasileira; Re flora: Plantas do Brasil; Herbário virtual austral Americano.

Quadro 4 – Informações sobre as drogas vegetais e tipos de extratos avaliados.

<b>Código</b>	<b>Espécie</b>	<b>Droga vegetal</b>	<b>Extrato</b>
9	<i>Ambelania acida</i>	Folhas	Etanólico
14	<i>Ambelania acida</i>	Folhas	Etanólico
7	<i>Brosimum acutifolium</i>	Folhas	Aquoso
10	<i>Licania macrophylla</i>	Folhas	Etanólico
11	<i>Licania macrophylla</i>	Casca	Aquoso
13	<i>Manilkara elata</i>	Casca	Etanólico
4	<i>Ouratea hexasperma</i>	Folhas	Etanólico
6	<i>Ouratea hexasperma</i>	Folhas	Etanólico
15	<i>Tabebuia serratifolia</i>	Casca	Etanólico
2	<i>Uncaria guianensis</i>	Folhas	Aquoso
3	<i>Uncaria guianensis</i>	Folhas	Etanólico
8	<i>Uncaria guianensis</i>	Folhas	Etanólico
12	<i>Uncaria guianensis</i>	Casca	Etanólico
16	<i>Uncaria guianensis</i>	Folhas	Aquoso
1	<i>Vouacapoua americana</i>	Medula	Etanólico
5	<i>Vouacapoua americana</i>	Casca	Etanólico
17	<i>Vouacapoua americana</i>	Casca	Etanólico

Fonte: A autora

A partir dos extratos vegetais liofilizados foram preparadas as soluções-estoques na concentração de 25 mg/mL, sendo realizada a pesagem do material em balança analítica e posterior diluição em dimetilsulfóxido (DMSO). Na sequência, os extratos foram armazenados a -20°C até o uso. A porcentagem de DMSO empregada nos ensaios não ultrapassou 1% nas maiores concentrações testadas, não havendo influência do solvente nos experimentos realizados.

Os extratos vegetais de códigos 5 e 17 (*Vouacapoua americana*, extrato etanólico das cascas), 2 e 16 (*Uncaria guianensis*, extrato aquoso das folhas), 4 e 6 (*Ouratea hexasperma*, extrato etanólico das folhas) e 9 e 14 (*Ambelania acida*, extrato etanólico das folhas) possuem o mesmo líquido extrator e droga vegetal em seus pares, porém são extratos distintos já que a coleta do material vegetal ocorreu em tempos diferentes.

## 4.2 CULTURAS CELULARES ANIMAIS

### 4.2.1 Células

Foram utilizadas células Vero (ATCC:CCL 81), provindas de fibroblastos de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*) e imortalizadas, mantidas em atmosfera umedecida e controlada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A linhagem celular foi escolhida por ser permissiva a replicação *in vitro* de HSV-1 e CHIKV (AGGARWAL; GARG, 2018; ARAKAWA et al., 2009; BARRETT et al., 2017; HU; HSIUNG, 1989).

### 4.2.2 Meio de cultura e reagentes

Para o cultivo das células Vero foi utilizado o meio de cultivo celular MEM (*Minimal Essential Medium*) com bicarbonato de sódio para tamponamento do pH em 7,4 e suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) na concentração de 10% para promoção de crescimento e manutenção da linhagem celular. Para obtenção de subculturas e realização dos experimentos foi utilizada a enzima proteolítica tripsina que age dissociando a cadeia polipeptídica em determinadas sequências de aminoácidos.

## 4.3 VÍRUS

### 4.3.1 Origem das cepas virais

Os vírus utilizados foram *Herpes Simplex* vírus tipo 1 cepas KOS e 29-R (sensível e resistente ao aciclovir, respectivamente) proveniente da Faculdade de Farmácia, Universidade de Rennes, França e o *Chikungunya* vírus (CHIKV) cepa SLZ12, coletada, isolada e identificada de acordo com o protocolo 2.498.658 e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos, CEP-UNICEUMA, Maranhão.

### 4.3.2 Preparo das suspensões-estoque virais

As suspensões-estoques foram preparadas com base na metodologia de Simões, Amoros e Girre (1999). Garrafas de cultivo foram semeadas com células Vero, 24 h antes da infecção viral. Após aspirar o meio e lavar a monocamada com solução tampão fosfato (PBS), foi realizada a infecção com 1 mL da suspensão viral e a garrafa foi incubada (37°C e 5% CO<sub>2</sub>) por 1 h para adsorção e penetração viral. O excesso de meio foi aspirado e foram adicionados 10 mL de MEM sem SFB, ocorrendo nova incubação nas condições já citadas.

O efeito citopático viral (ECP) foi monitorado por microscópio invertido a cada ciclo de replicação viral (18 h). Após a monocamada ser totalmente infectada, o frasco foi congelado a -80°C e descongelado a 37°C por três vezes a fim de romper as membranas celulares, permitindo a liberação das partículas virais. As suspensões-virais foram centrifugadas a 4°C e 350 x g. Por fim, o sobrenadante foi aliquoteado em microtubos estéreis, titulado e armazenado a -80°C até a utilização nos experimentos.

### 4.3.3 Determinação dos títulos infecciosos virais

No intuito de observar o número de partículas virais por mL dos inóculos virais produzidos, foi realizada a titulação viral a partir do método de contagem de placas de lise, que determina as Unidades Formadoras de Placa (UFP) (BURLESON; CHAMBERS; WIEDBRAUK, 1992).

Para a titulação das suspensões-virais de HSV-1 foram utilizadas placas de 24 cavidades preparadas com células Vero na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/cavidade em MEM suplementado com 10% de SFB, ocorrendo incubação em estufa de CO<sub>2</sub> (37°C) até confluência (24 h). Para a titulação das suspensões-virais de CHIKV foram utilizadas placas de 12 cavidades com uma densidade de  $3,5 \times 10^5$  células/cavidade.

Após aspiração e lavagem com PBS, as células foram infectadas com diferentes diluições da suspensão-estoque viral (razão 1:10). Após um período de incubação de 1 h, foi adicionada a solução de carboximetilcelulose (CMC)<sup>1</sup> e feita uma nova incubação durante 48 h. Após este período, as células foram fixadas e coradas com corante preto de naftaleno<sup>2</sup> para a

---

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

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

titulação do HSV-1 e com cristal violeta<sup>3</sup> para a titulação do CHIKV. O corante foi aspirado e, após a secagem total, as placas de lise foram contabilizadas em microscópio estereoscópico, permitindo o cálculo do título viral conforme equação abaixo, e expresso em Unidades Formadoras de Placas por mililitro (UFP/mL):

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de placas formadas na última diluição} \times \text{Recíproca da diluição}}{\text{Volume (em mL)}}$$

#### 4.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO

A citotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico da sulforrodamina B (SRB), verificando a viabilidade celular da linhagem após tratamento com as amostras (VICHAI; KIRTIKARA, 2006). O ensaio se baseia na capacidade da SRB de ligar-se a proteínas celulares que, após fixação, são quantificadas e correlacionando-se a viabilidade das células. O ensaio foi realizado conforme adaptações da metodologia por Silva (2009).

Para isso, placas de 96 cavidades foram semeadas com células Vero na densidade de  $2,5 \times 10^4$  células/cavidade. As placas foram incubadas à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h para obtenção da confluência do tapete celular. O tratamento foi realizado com diferentes concentrações das amostras (faixa de 250 a 0,24 µg/mL), em diluições na razão 1:2, por 48 h nas condições de incubação já citadas. Após o período de incubação, as células foram fixadas com 100 µL de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e incubadas por 1 h a 4°C. As placas foram então lavadas cuidadosamente com água destilada por três vezes e, após secagem, foram coradas com 100 µL da solução de SRB<sup>4</sup> durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Foram realizadas três lavagens com uma solução de ácido acético a 1% para retirar o excesso de corante e, então 100 µL de uma solução de Tris Base 10mM<sup>5</sup> foram adicionados em cada cavidade de modo a extrair o corante ligado às proteínas das células viáveis. Em um espectrofotômetro (Spectramax, Molecular Devices), as placas sofreram agitação durante cinco segundos e a leitura da absorbância foi feita em 510 nm.

<sup>3</sup> Preparação da solução de cristal violeta: 0,4 mg do corante cristal violeta foram dissolvidos em 88 mL de água Milli-Q contendo 10 µL de fenol e 12 mL de etanol absoluto. A solução foi filtrada em papel filtro e diluída na razão 1:2 para uso nos experimentos.

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

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

Os valores de absorvância foram transformados em porcentagens de viabilidade celular em relação ao controle celular (100% de viabilidade) pela fórmula:

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

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

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

O ensaio de inibição da formação das placas de lise foi realizado para verificar a atividade antiviral dos extratos de plantas medicinais frente aos vírus HSV-1 (cepas KOS e 29-R) e CHIKV (cepa SLZ12) (BURLINSON; CHAMBERS; WIEDBRAUK, 1992). A padronização da técnica para o ensaio com o CHIKV foi realizada pela autora do presente trabalho. Inicialmente, foi realizada uma triagem de todos os 17 extratos das oito diferentes espécies de plantas, nas concentrações de 100 ou 50  $\mu\text{g/mL}$ . Após a identificação dos extratos mais ativos, o ensaio foi realizado novamente, desta vez observando as concentrações não citotóxicas para as células e utilizando cinco diluições seriadas das amostras, de modo a permitir a determinação dos valores de  $CI_{50}$  por meio de análise de regressão não linear. Cada modelo viral requisitou particularidades durante a execução do experimento, como podem ser visualizadas no Quadro 5:

Quadro 5 – Particularidades adotadas durante a execução dos experimentos antivirais.

<b>HSV-1 (cepas KOS e 29-R)</b>	<b>CHIKV (cepa SLZ12)</b>
Placas de 24 cavidades	Placas de 12 cavidades
$32,5 \times 10^5$ células/cavidade	$3,5 \times 10^5$ células/cavidade
Coloração das placas de lise com solução ácida de preto de naftaleno	Coloração das placas de lise com formaldeído + cristal violeta

Fonte: A autora

Inicialmente, placas de 24 cavidades foram semeadas com células Vero na densidade descrita no Quadro 5 e incubadas em condições padrão por 24 h até obter confluência. O meio de cultivo foi aspirado cuidadosamente e adicionados 400 µL da suspensão viral contendo 100 UFP/cavidade para os experimentos com os vírus herpéticos ou 50 UFP/cavidade para os experimentos com CHIKV. As placas foram incubadas durante 1 h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as suspensões virais foram aspiradas, os materiais-teste diluídos na razão 1:2 em uma solução de CMC e adicionados cuidadosamente às placas. Uma nova incubação das placas ocorreu durante 48 h.

Em cada experimento foram realizados controles virais contendo somente a suspensão viral sem os tratamentos e, para HSV-1, o controle positivo contendo o fármaco aciclovir (ACV - Sigma®). Além disso, também foram realizados controles celulares não tratados, ou seja, contendo somente células não infectadas e não tratadas com as amostras.

Decorrido este período, as placas de HSV-1 foram fixadas e coradas com uma solução de preto de naftaleno sob agitação durante 20 minutos. As placas de CHIKV foram primeiramente fixadas com formaldeído 10% durante 40 minutos sob agitação, e coradas com uma solução de cristal violeta durante 30 minutos sob agitação. As soluções foram aspiradas e as placas deixadas em repouso para completa secagem.

Após a contagem das placas em lupa, a porcentagem de inibição da replicação viral induzida por cada amostra em relação aos controles virais foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 1 - \left[ \frac{\text{número de placas}_{\text{material-teste}}}{\text{número de placas}_{\text{controle viral}}} \right] \times 100$$

Em seguida, os percentuais calculados foram inseridos em um gráfico e por meio da análise de regressão não linear foi possível calcular os valores de CI50, ou seja, a concentração de cada amostra que inibiu 50% a infecção viral. Os valores de CI50 representam a média de, no mínimo, três experimentos independentes com seu intervalo de confiança de 95% (IC 95%). De posse dos valores de CC50 e CI50 foi possível calcular o índice de seletividade (IS) de cada amostra (IS = CC50/CI50). Sabe-se que quanto maior o valor de IS, mais seletiva é a amostra em relação ao vírus e não às células hospedeiras (COS et al., 2006). Os valores calculados representam a média de três experimentos independentes.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA

Este ensaio foi realizado de modo a determinar se as amostras que se mostraram ativas nos experimentos antivirais seriam capazes de inativar as partículas virais na ausência de células, ou seja, avaliar a ação direta das amostras sobre as partículas virais, e sua consequente diminuição da capacidade infectante dos vírus estudados (EKBLAD et al., 2006). Novamente a padronização da técnica para os ensaios com CHIKV foi realizada pela autora e, inicialmente, foi realizada a triagem com os 17 extratos das oito espécies de plantas de modo a identificar as amostras com maior potencial virucida, as quais passaram novamente pelo ensaio virucida com cinco diferentes diluições seriadas, para a determinação dos valores de  $CV_{50}$  por meio de análise de regressão não linear.

Inicialmente, misturas de 50  $\mu$ L da suspensão viral contendo  $4 \times 10^4$  UFP de HSV-1 (KOS) ou  $2 \times 10^4$  UFP de CHIKV (SLZ12) 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. Na sequência, foram realizadas diluições 1:100 em MEM, de modo a obter concentrações não inibitórias de cada amostra. A infecciosidade residual foi determinada pelo método de placas de lise (item 4.5). Após a contagem das placas de lise a infecciosidade residual (IR) foi determinada conforme a fórmula:

$$\% \text{ IR} = 1 - \left[ \frac{\text{número de placas}_{\text{material-teste}}}{\text{número de placas}_{\text{controle viral}}} \right] \times 100$$

Os percentuais de IR calculados foram inseridos no gráfico e, por análise de regressão não linear, os valores de  $CV_{50}$  foram calculados, sendo esse a concentração da amostra que diminuiu em 50% a capacidade infectante de cada vírus. Os valores calculados representam a média de três experimentos independentes.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA NA PRESENÇA DE SOLUÇÕES PROTEICAS

Este ensaio foi conduzido para verificar a capacidade virucida das amostras mais ativas na presença de proteínas, as quais podem interferir na capacidade virucida dos extratos (EKBLAD et al., 2006).

Volumes equivalentes (25 µL) de cada amostra na concentração da CV<sub>50</sub><sup>6</sup> (Quadro 6) e de diferentes diluições seriadas (razão 1:10) de uma solução de BSA (Albumina Sérica Bovina – 0,00005 a 0,5%) foram misturados em tubos e incubados em temperatura ambiente por 5 minutos. Após, foram adicionados 4x10<sup>4</sup> UFP de HSV-1 (cepa KOS) ou 2x10<sup>4</sup> UFP de CHIKV (cepa SLZ12) em 50 µL de meio MEM sem SFB e incubados por mais 15 min a 37°C. Controles virais foram feitos usando-se 50 µL de meio MEM + 50 µL da suspensão viral contendo 4x10<sup>4</sup> UFP de HSV-1 (cepa KOS) ou 2x10<sup>4</sup> UFP de CHIKV (cepa SLZ12), e também controles utilizando 50 µL das diferentes concentrações das soluções proteicas + 50 µL da mesma suspensão viral.

Quadro 6 – Concentrações de cada extrato utilizado no ensaio de atividade virucida na presença de soluções proteicas.

ESPÉCIE	CÓDIGO	CV <sub>50</sub> (µg/mL)	CONCENTRAÇÃO x4 (µg/mL)*
<i>Licania macrophylla</i>	10	0,44	2
<i>Licania macrophylla</i>	11	0,23	0,3
<i>Manilkara elata</i>	13	0,103	0,2
<i>Vouacapoua americana</i>	17	0,203	0,3

\*A concentração utilizada é multiplicada por 4 devido às diluições realizadas ao longo do experimento com a adição de volumes equivalentes da solução proteica e suspensão viral. Fonte: A autora

Decorrido este período, foi realizada a diluição das misturas (1:100) a fim de se obter a concentração não inibitória das amostras, utilizando-se MEM gelado. A IR foi determinada pelo método de placas de lise (item 4.5), conforme a fórmula:

$$\% \text{ IR} = 1 - \left[ \frac{\text{número de placas}_{\text{material-teste}}}{\text{número de placas}_{\text{controle viral}}} \right] \times 100$$

<sup>6</sup> A concentração utilizada é 4x maior que o valor de CV<sub>50</sub> de cada extrato, considerando que ela é reduzida ao longo da adição de volumes equivalentes da solução proteica e suspensão viral.

Os percentuais de IR calculados foram inseridos no gráfico e por análise de regressão não linear os valores de  $CV_{50}$  foram calculados, sendo esse a concentração da amostra que diminuiu em 50% a capacidade infectante de cada vírus. Os valores calculados representam a média de três experimentos independentes.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA PARA FINS ANTISSEPTICOS EM FASE 2 DE DESENVOLVIMENTO

Este ensaio foi conduzido conforme a normativa DIN EM 14476-2015, que busca validar o desenvolvimento de desinfetantes químicos e antissépticos por meio de um teste quantitativo de suspensão para avaliação da atividade virucida na área médica e foi desenvolvida por um instituto europeu de padronização (DIN, *Deutsches Institut für Normung*). No presente trabalho, a normativa foi aplicada com adaptações objetivando avaliar a potencial aplicação como antissépticos dos extratos mais ativos.

O preparo foi realizado em água não-filtrada conforme descrito na normativa<sup>7</sup>. As suspensões virais de HSV-1 cepa KOS foram preparadas de modo a gerar um título inicial de  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL. O ensaio foi realizado com as amostras que mostraram maior potencial virucida no ensaio realizado no item 4.6, utilizando as concentrações obtidas pelo cálculo dos valores de  $CC_{50}$  de cada um dos extratos, devido às diluições realizadas ao longo deste ensaio.

Em um tubo cônico de 15 mL foram adicionados 100  $\mu$ L de uma substância de interferência (BSA 0,3%), 100  $\mu$ L da suspensão viral e 800  $\mu$ L das soluções contendo os extratos. As soluções foram homogeneizadas e mantidas em banho-maria a 22 °C por 120 segundos. Após esse período, 500  $\mu$ L das soluções foram misturados a 4,5 mL de meio de cultivo (MEM + 2% de SFB) gelado para a inativação das partículas virais em banho de gelo. Foram realizadas cinco diluições virais para o teste.

Em placas de 96 cavidades, contendo  $2,5 \times 10^4$  células/cavidade da linhagem celular Vero, foram adicionados 100  $\mu$ L de cada diluição viral em cada cavidade, cujo meio de cultivo

---

<sup>7</sup> O preparo da solução + extrato para aplicação na norma foi realizado da seguinte forma: Solução A + Solução B = Solução C + Extrato.

- Preparo da solução A: 0,1984g de cloreto de magnésio e 0,4624g de cloreto de cálcio foram dissolvidos em 100 mL de água destilada. A solução foi esterilizada em autoclave.
- Preparo da solução B: 0,3502g de bicarbonato de sódio foram dissolvidos em 100 mL de água destilada e a esterilização ocorreu por filtração em membrana de 0,22 $\mu$ m.
- Preparo da solução C: 600  $\mu$ L da solução A e 800  $\mu$ L da solução B foram adicionados em 70 mL de água destilada filtrada em membrana.

Nessa solução, a partir do cálculo da concentração desejada, o extrato foi adicionado.

foi previamente aspirado. Foram mantidas cavidades apenas com meio de cultivo, caracterizando o controle celular; cavidades com as suspensões virais, caracterizando os controles virais; e cavidades contendo MEM + amostra, para visualizar possíveis efeitos citopáticos dos extratos. Após incubação de 1 h à 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>, 100 µL de meio foram adicionados em cada cavidade.

As placas foram novamente incubadas por 48 h. A visualização do efeito citopático viral de cada cavidade permitiu a determinação da TCID<sub>50</sub> (*Tissue Culture Infectious Dose*) pelo método adaptado de Spearman-Kärber, considerando as cavidades e as recíprocas das diluições onde houve efeito citopático evidente.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos experimentos, foram utilizados delineamentos de blocos completamente casualizados e um arranjo fatorial dos tratamentos (SOKAL; ROHLF, 1995). Cada cavidade caracterizou uma unidade experimental e os tratamentos foram as diferentes concentrações dos extratos das plantas testadas. Os tratamentos e os controles positivos e negativos foram distribuídos aleatoriamente e as repetições foram feitas em placas e momentos diferentes.

Os valores de CC<sub>50</sub> e CI<sub>50</sub> foram estimados por meio de curvas concentração-resposta por análise de regressão não-linear. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos por meio da média de experimentos independentes com seu intervalo de confiança de 95%.

As diferenças estatisticamente significativas ou não foram realizadas através dos testes ANOVA/Tukey ou teste t não pareado, utilizando o programa GraphPad Prism® 8.2.1 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, EUA). O intervalo de confiança adotado foi de 95% (p<0,05).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS INFECCIOSOS VIRAIS

Os títulos infecciosos das suspensões-estoques virais foram determinados conforme a metodologia descrita no item 4.3.3. Ao longo do trabalho, mais de uma suspensão viral foi produzida e utilizada. Os resultados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados.

Vírus	Suspensão-estoque viral	Título (UFP/mL)
HSV-1 (KOS)	1	$6,8 \times 10^7$
	2	$1,0 \times 10^7$
HSV-1 (29-R)	1	$5,0 \times 10^6$
	2	$5,0 \times 10^6$
CHIKV (SLZ12)	1	$2,4 \times 10^5$
	2	$7,2 \times 10^6$

Fonte: A autora (2022)

### 5.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Para o desenvolvimento de novos fármacos, os testes de citotoxicidade são um pré-requisito para avaliar a saúde celular após a exposição ao material teste. Isso é feito por meio de ensaios *in vitro* utilizando o cultivo de células animais, e permite a identificação de substâncias tóxicas de maneira precisa antes mesmo dos testes *in vivo* e em seres humanos (LIU *et al.*, 2018).

Os ensaios de citotoxicidade permitem a rápida obtenção de resultados quantitativos devido a possibilidade de triar grandes quantidades de materiais-testes em um curto espaço de tempo e o controle das variáveis experimentais (BRIOSCHI *et al.*, 2022). Além disso, os testes podem ser utilizados para analisar a citotoxicidade de compostos além das células-alvo do tratamento, permitindo uma observação preliminar de possíveis efeitos adversos (CHI; BURROWS; ANDERSON, 2022).

Nesse sentido, foram testados 18 extratos de diferentes plantas medicinais quanto à sua citotoxicidade por meio do ensaio colorimétrico da sulforrodamina B conforme o item 4.4, frente a linhagem de células imortalizadas Vero, de modo a caracterizar a concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>) após 48h de ação dos extratos (Tabela 2).

A concentração inicial testada para todas as amostras foi de 250 µg/mL e foram realizadas diluições seriadas (1:2), resultando em 11 concentrações diferentes para a análise em regressão não-linear, conforme descrito no item 4.4. O experimento foi realizado em triplicata, bem como todos os experimentos do presente trabalho.

Tabela 2 - Relação de espécies de plantas medicinais avaliadas e seus respectivos valores de citotoxicidade (resultados expressos em CC<sub>50</sub> µg/mL e intervalo de confiança de 95%).

ESPÉCIE	CÓDIGO	DROGA VEGETAL	LÍQUIDO EXTRATOR	CC <sub>50</sub> (IC 95%)
<i>Ambelania acida</i>	9	folhas	etanol	138,70 (57,69 a 333,4)
<i>Ambelania acida</i>	14	folhas	etanol	52,84 (36,40 a 76,68)
<i>Brosimum acutifolium</i>	7	folhas	água	> 250,00
<i>Licania macrophylla</i>	10	folhas	etanol	221,90 (92,40 a 533,1)
<i>Licania macrophylla</i>	11	casca	água	> 250,00
<i>Manilkara elata</i>	13	casca	etanol	240,60 (92,67 a 624,7)
<i>Ouratea hexasperma</i>	4	folhas	etanol	3,94 (1,132 a 1,374)
<i>Ouratea hexasperma</i>	6	folhas	etanol	> 250,00
<i>Tabebuia serratifolia</i>	15	casca	etanol	> 250,00
<i>Uncaria guianensis</i>	2	folhas	água	> 250,00
<i>Uncaria guianensis</i>	3	folhas	etanol	> 250,00
<i>Uncaria guianensis</i>	8	folhas	etanol	101,40 (39,60 a 259,8)
<i>Uncaria guianensis</i>	12	casca	etanol	> 250,00
<i>Uncaria guianensis</i>	16	folhas	água	> 250,00
<i>Vouacapoua americana</i>	1	medula	etanol	31,56 (25,92 a 38,43)
<i>Vouacapoua americana</i>	5	casca	etanol	73,80 (49,38 a 110,3)
<i>Vouacapoua americana</i>	17	casca	etanol	> 250,00

Os valores de CC<sub>50</sub> representam a média de três experimentos independentes com seu respectivo Intervalo de confiança de 95%. Fonte: A autora

Analisando os resultados do teste de citotoxicidade, os extratos que apresentaram maior citotoxicidade ( $CC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ ) foram: os extratos etanólicos da medula e casca da espécie *V. americana* (extratos 1 e 5, respectivamente); o extrato etanólico das folhas de *A. acida* (extrato 14) e, por fim, o extrato etanólico das folhas de *O. hexasperma* (extrato 4). Esse último apresentou-se como o mais citotóxico ( $CC_{50} = 3,94 \mu\text{g/mL}$ ). Estes extratos, possivelmente contém metabólitos citotóxicos, sinalizando que não seriam bons candidatos para os ensaios subsequentes, em razão da elevada citotoxicidade em células da linhagem Vero, inviabilizando a sobrevivência de células saudáveis e hospedeiras virais.

Ainda, cada solvente utilizado na extração é capaz de extrair classes de metabólitos específicas com base em sua polaridade. A água e o etanol, os dois solventes utilizados na extração das drogas vegetais das 8 espécies do presente estudo, são líquidos extratores polares. A água extrai majoritariamente metabólitos das classes das antocianinas, taninos, saponinas, terpenos, polipeptídios e lecitinas. Já o etanol extrai principalmente compostos das classes dos taninos, polifenóis, poliacetilenos, flavonoides, terpenos, alcaloides e esteróis (PANDEY; TRIPATHI, 2014).

Tratando-se da espécie *V. americana*, um trabalho desenvolvido por Kido *et al.* (2003) revelou a presença de cassanos diterpenoides no extrato das cascas utilizando o solvente cloreto de metileno, além do trabalho de King (1955) e colaboradores, de 1955, que isolou dois compostos cassanos furanoditerpênicos, o ácido (+)-vouacapênico e (+)-metilvouacapenato. Como será exposto em mais detalhes na sequência do presente trabalho, o extrato etanólico das cascas de *V. americana* de código 17 apresentou inibição significativa dos modelos virais estudados. Além disso, os extratos das cascas se apresentaram menos citotóxicos quando em comparação com o extrato da medula de *V. americana*.

De modo interessante, os extratos de código 5 e 17 utilizaram o solvente etanol para extração dos compostos das cascas de *V. americana*, entretanto, o extrato de código 5 foi mais citotóxico quando em comparação ao de código 17 ( $CC_{50} = 73,80$  e  $> 250 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente). Isso pode ser explicado pelo fato de que as coletas do material vegetal para a extração foram realizadas em momentos diferentes, o que sustenta a presença de diferentes compostos conforme as variações das condições ambientais (LOPES *et al.*, 2017).

O extrato mais citotóxico dentre a triagem do presente estudo foi o da espécie *O. hexasperma*, que também apresentou diferenças nos valores de  $CC_{50}$  entre seus dois extratos etanólicos das folhas da planta, semelhante à condição encontrada para os extratos de *V. americana* citados anteriormente. O gênero *Ouratea* possui documentação da presença de diversos flavonoides e diflavonoides, e da espécie *O. hexasperma* foram isolados compostos

como C-glicosilflavonas, prenilflavonoides, derivados de metoxi-isoflavonas, biisoflavonas (FIDELIS, *et al.*, 2014; MOREIRA *et al.*, 1994). A espécie revelou, *in vitro*, possuir capacidade antioxidante e antidiabética ao serem isolados os compostos trans-3-O-etilresveratrol-2-C- $\beta$ -glicosídeo, litospermosídeo, 2,5-dimetoxi-benzoquinona, lup-20(30)-eno-3 $\beta$ ,28-diol, 7-O-metilgenisteína, apigenina, luteolina e mentoflavona (FIDELIS, *et al.*, 2019). Desses compostos, luteolina e apigenina exibiram os melhores índices de capacidade antioxidante e antidiabética.

Para *A. acida*, não foram encontradas informações em bibliografia sobre a composição fitoquímica da espécie. Considerando outra espécie do gênero *Ambelania*, a *Ambelania occidentalis*, o extrato metanólico das partes aéreas da planta permitiram o isolamento de dois alcaloides indólicos denominados vincamina 1 e 14-epi-vincamina (AYYAD *et al.*, 2012). O composto vincamina, quando isolado, já demonstrou potencial anti-inflamatório em lesões pulmonares *in vitro* e *in vivo*, bem como atividade anticancerígena frente a linhagem de câncer pulmonar humana (A549) (AL-RASHED *et al.*, 2021; RENUSSHE *et al.*, 2022).

Dessa forma, mesmo apresentando citotoxicidade na linhagem celular Vero, os extratos etanólicos da medula e casca da espécie *V. americana*, o extrato etanólico das folhas de *A. acida* e o extrato etanólico das folhas de *O. hexasperma* possuem bibliografia relatando atividades biológicas importantes, que não as antivirais, necessitando de estudos mais aprofundados voltados para esses potenciais, bem como a análise fitoquímica detalhada.

### 5.3 TRIAGEM ANTIVIRAL: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL PELO ENSAIO DE INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DAS PLACAS DE LISE

O ensaio de inibição de formação de placas de lise é utilizado como padrão ouro para testes com HSV e, como o CHIKV é um vírus de ciclo lítico, a metodologia também foi utilizada para esse modelo viral. No ensaio, um título viral conhecido é inoculado em uma linhagem celular permissiva à replicação viral e, as amostras-testes são aplicadas diluídas em uma solução espessante que previne a propagação dos vírus para as células adjacentes no momento da lise celular. Com isso, ao final do experimento é possível observar a formação de placas de lise celular que, ao serem quantificadas permitem o cálculo da CI<sub>50</sub>, ou seja, a concentração de cada amostra necessária para inibir 50% da replicação viral (JEFFERY; AARONS, 2009).

Após a determinação da CC<sub>50</sub>, os extratos foram submetidos a uma triagem antiviral frente aos modelos virais de HSV-1 (cepas KOS e 29-R) e de CHIKV (cepa SLZ12). O ensaio

de inibição da formação das placas de lise permitiu selecionar os extratos mais ativos para cada modelo viral e que, ao mesmo tempo, também apresentaram baixa citotoxicidade para a linhagem celular Vero (Tabela 3).

A triagem frente ao HSV-1 cepa 29-R foi inicialmente realizada na concentração de 50 µg/mL, entretanto, devido à citotoxicidade de algumas amostras, optou-se por continuar a triagem na concentração de 25 µg/mL.

Tabela 3 – Resultados, expressos em % de inibição da replicação viral, da triagem antiviral das plantas medicinais frente ao HSV-1 (cepas KOS e 29R) e CHIKV (cepa SLZ12), por meio do método de inibição da formação das placas de lise.

ESPÉCIE	CD*	DROGA VEGETAL	LÍQUIDO EXTRATOR	% INIBIÇÃO VIRAL		
				HSV-1 KOS (50 µg/mL)	HSV-1 29-R (25 µg/mL)	CHIKV SLZ12 (50 µg/mL)
		Aciclovir		100	0	NR
<i>Ambelania acida</i>	9	folhas	etanol	79,00	21,81	87,57
<i>Ambelania acida</i>	14	folhas	etanol	90,36	30,58	100,00
<i>Brosimum acutifolium</i>	7	folhas	água	0,49	NR	30,13
<i>Licania macrophylla</i>	10	folhas	etanol	100,00	50,67	99,41
<i>Licania macrophylla</i>	11	casca	água	96,35	12,04	68,36
<i>Manilkara elata</i>	13	casca	etanol	98,54	68,69	100,00
<i>Ouratea hexasperma</i>	4	folhas	etanol	95,26	25,61	80,67
<i>Ouratea hexasperma</i>	6	folhas	etanol	99,27	14,11	88,17
<i>Tabebuia serratifolia</i>	15	casca	etanol	3,77	NR	26,29
<i>Uncaria guianensis</i>	2	folhas	água	22,85	NR	39,12

<i>Uncaria guianensis</i>	3	folhas	etanol	24,21	NR	41,78
<i>Uncaria guianensis</i>	8	folhas	etanol	57,61	NR	43,91
<i>Uncaria guianensis</i>	12	casca	etanol	53,30	NR	19,49
<i>Uncaria guianensis</i>	16	folhas	água	1,58	NR	28,35
<i>Vouacapoua americana</i>	1	medula	etanol	100,00	92,26	100,00
<i>Vouacapoua americana</i>	5	casca	etanol	100,00	53,60	95,56
<i>Vouacapoua americana</i>	17	casca	etanol	97,81	11,35	68,61

Aciclovir foi empregado como controle positivo nos experimentos com HSV-1; NR = não realizado; CD = código do extrato; Os valores % representam a média de três experimentos independentes. A triagem da cepa 29-R de HSV-1 foi realizada a 25 µg/mL devido a citotoxicidade apresentada por alguns extratos.

Fonte: A autora

Analisando os resultados da triagem antiviral dispostos na tabela 3, os extratos que apresentaram inibição maior que 50% foram considerados ativos. Assim, 12 extratos foram ativos frente ao HSV-1 cepa KOS, dez foram ativos frente ao CHIKV, e quatro extratos foram ativos para o HSV-1 cepa 29-R.

Todos os quatro extratos ativos para a cepa 29-R foram os mesmos que inibiram a cepa KOS do HSV-1, sendo esses: extratos etanólicos da medula e cascas de *V. americana* (códigos 1 e 5, respectivamente), extrato etanólico das folhas de *L. macrophylla* (código 10) e extrato etanólico das cascas de *M. elata* (código 13). Dentre esses, apenas o extrato etanólico da medula de *V. americana* inibiu em mais de 90% o modelo viral 29-R, resistente ao aciclovir.

Os demais extratos que inibiram em mais de 50% a cepa KOS foram: extratos etanólicos das folhas de *O. hexasperma* (códigos 4 e 6), extrato etanólico das folhas de *U. guianensis* (código 8), extratos etanólicos das folhas de *A. acida* (códigos 9 e 14), extrato aquoso das cascas de *L. macrophylla* (código 11), extrato etanólico das cascas de *U. guianensis* (código 12) e extrato etanólico das cascas de *V. americana* (código 17).

Já os 10 extratos que inibiram o CHIKV em mais de 50% foram: extratos etanólicos da medula e cascas de *V. americana* (códigos 1, 5 e 17, respectivamente), extratos etanólicos das folhas de *O. hexasperma* (códigos 4 e 6), extratos etanólicos das folhas de *A. acida* (códigos

9 e 14), extrato etanólico das folhas de *L. macrophylla* (código 10), extrato aquoso das cascas de *L. macrophylla* (código 11) e extrato etanólico das cascas de *M. elata* (código 13).

Não foram encontrados resultados documentados de atividade antiviral frente HSV-1 ou CHIKV da espécie *V. americana* (extratos ativos de códigos 1, 5 e 17). Entretanto, cassanos diterpenos e furanoditerpenos que podem estar presentes nesta espécie já demonstraram potencial antiviral frente o Parainfluenza virus tipo 3 e o vírus sincicial respiratório (MAURYA et al., 2012).

A espécie *O. hexasperma* (extratos ativos de códigos 4 e 6) não possui bibliografia antiviral documentada, mas outras espécies do gênero já demonstraram potencial antiviral. Avaliando extratos etanólicos, aquosos, diclorometano e de éter de petróleo da espécie *Ouratea lucens*, foi constatada a atividade antiviral frente HSV-1, HSV-2, poliovírus, vírus da estomatite vesicular e vírus parainfluenza tipo 3 (FIDELIS, et al., 2014). Outro trabalho demonstrou atividade antiviral das espécies *Ouratea castaneifolia*, *O. semiserrata* e *O. spectabilis* frente HSV-1, Vaccinia virus e vírus da encefalomiocardite murina (BAGLA; MCGAW; ELOFF, 2012).

Há documentação sobre as atividades anti-inflamatória e antioxidante, e atividade antiviral frente DENV para a espécie *Uncaria guianensis* (extrato ativo de código 8) (ABDUL et al., 2022). Outra espécie desse gênero, *U. tomentosa*, também foi ativa frente DENV e, além desse, frente o vírus influenza A (subtipo H3N2) (QIN et al., 2021). Da mesma espécie foram sugeridos efeitos anti-HSV-1 relacionados a presença de polifenóis ou seu efeito sinérgico com alcaloides (CAON et al., 2014).

Não foram encontrados trabalhos sobre a atividade antiviral de *A. acida* (extratos ativos de códigos 9 e 14), ou mesmo sobre outras espécies do gênero *Ambelania*. Isso fortalece o ineditismo do presente estudo. O trabalho de Oliveira e Almeida (2016) isolou compostos alcaloides, esteroides, triterpenoides, fenóis, taninos, açúcares redutores e resinas nesta mesma espécie. Dessa forma, pode-se supor que esses compostos sejam os responsáveis pela ação antiviral observada no presente estudo.

Espécies do gênero *Licania* apresentam atividade antioxidante com a presença de taninos (LUNA et al., 2022). Já a espécie *L. canii* possui flavonoides e triterpenoides (BILIA; MENDEZ; MORELLI, 1996). Na sequência do presente trabalho serão discutidos os resultados relacionados a atividade antiviral de *Licania macrophylla* (extratos ativos de códigos 10 e 11).

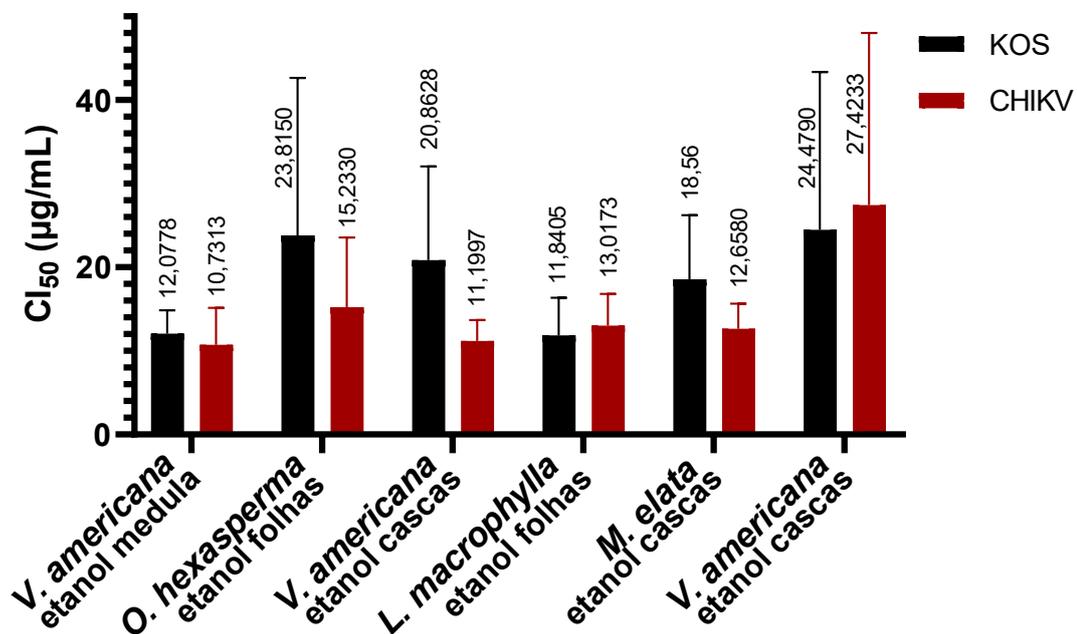
O gênero *Manilkara* possui documentação da presença de triterpenoides em sua composição (HILL; CONNOLLY, 2018). A espécie *M. elata* (extrato ativo de código 13) não possui bibliografia sobre seu potencial antiviral, mas outras espécies do gênero apresentaram

atividade *in silico* frente SARS-CoV-2 devido a compostos fenólicos (EL-MORDY *et al.*, 2020).

Com base nas amostras que inibiram os vírus em ao menos 50%, foi realizado o ensaio de inibição da formação das placas de lise em um segundo momento, de modo a viabilizar o cálculo da  $CI_{50}$  e do IS. O IS é calculado por meio da razão  $CC_{50}/CI_{50}$  e, quanto maior o seu valor, maior a seletividade em relação ao vírus, poupando a célula hospedeira em termos de citotoxicidade (ANDERSEN *et al.*, 2020).

A Figura 6 demonstra os valores de  $CI_{50}$  calculados para as seis amostras que foram consideradas ativas, num primeiro momento, tanto em relação ao HSV-1 (cepa KOS), quanto ao CHIKV. Aplicando o teste de ANOVA seguido de Tukey, não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os valores de  $CI_{50}$  dos mesmos extratos ativos para as duas cepas virais. Isso demonstra que os extratos foram ativos de maneira similar entre os diferentes modelos virais, atuando possivelmente na inibição da replicação viral de modo semelhante.

Figura 6 – Valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) das amostras ativas frente ao HSV-1 (cepa KOS) e CHIKV (cepa SLZ12).



Comparação da análise da atividade antiviral frente a cepa KOS de HSV-1 e frente ao CHIKV expressa em  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por meio do ensaio de inibição da formação de placas de lise. Eixo X: seis extratos ativos para ambos os vírus. Eixo Y:  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Extrato etanólico da medula de *Vouacapoua americana* (Código 1). Extrato etanólico das folhas de *Ouratea hexasperma* (Código 4). Extrato etanólico das cascas de *Vouacapoua americana* (Código 5). Extrato etanólico das folhas de *Licania macrophylla* (Código 10). Extrato etanólico das cascas de *Manilkara elata* (Código 13). Extrato etanólico das cascas de *Vouacapoua americana* (Código 17). Estatística: ANOVA, pós-teste Tukey,  $p < 0,05$  indica diferença significativa. Fonte: A autora

A partir do cálculo do IS, foram definidos os extratos de maior atividade frente HSV-1 (KOS e 29-R) e CHIKV (SLZ12). A Tabela 4 mostra os extratos que apresentaram o maior potencial na atividade antiviral para HSV-1 (cepa KOS) e CHIKV (cepa SLZ12), selecionados a partir da observação dos elevados valores dos IS e  $CC_{50}$ , bem como baixas concentrações na  $CI_{50}$ . O extrato aquoso das cascas de *L. macrophylla* não apresentou elevada capacidade antiviral frente CHIKV, inviabilizando o cálculo dos valores de  $CI_{50}$  e IS.

Entre os extratos testados no segundo ensaio de inibição da formação das placas de lise, quatro apresentaram maior potencial antiviral frente ao HSV-1 (cepa KOS) e ao CHIKV (cepa SLZ12), sendo eles: o extrato aquoso das folhas e o extrato etanólico das cascas de *Licania macrophylla*, e os extratos etanólicos das cascas de *Manilkara elata* e de *Vouacapoua americana*, sendo que o extrato etanólico das cascas de *Manilkara elata* também foi o único ativo frente a cepa do HSV-1 resistente ao aciclovir (29-R), apresentando valores de  $CI_{50}$  17,9  $\mu\text{g/mL}$  e IS 14,2.

Tabela 4 – Valores de  $CC_{50}$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $CI_{50}$   $\mu\text{g/mL}$  e IS das amostras mais ativas frente aos HSV-1 (cepa KOS) e CHIKV (cepa SLZ12)

ESPÉCIE	CD	$CC_{50}$	HSV-1 KOS		CHIKV SLZ12	
			$CI_{50}$ (IC 95%)	IS	$CI_{50}$ (IC 95%)	IS
<i>Licania macrophylla</i> (extrato etanólico das folhas)	10	221,9	11,84 (10,91 a 16,99)	18,74	13,01 (8,04 a 16,32)	17,05
<i>Licania macrophylla</i> (extrato aquoso da casca)	11	> 250	13,37 (11,11 a 16,09)	18,70	ND	ND
<i>Manilkara elata</i> (extrato etanólico da casca)	13	240,6	18,56 (9,98 a 19,2)	12,96	12,66 (12,16 a 21,89)	19
<i>Vouacapoua americana</i> (extrato etanólico da casca)	17	> 250	24,48 (14,12 a 30,49)	10,21	27,42 (12,82 a 30,45)	9,12

ND: não definido, o extrato não apresentou potencial antiviral, inviabilizando o cálculo de  $CI_{50}$  e IS; CD: código; os valores representam a média de três experimentos independentes com seu respectivo intervalo de confiança de 95% (IC95%). Fonte: A autora

Estudos com outras espécies do gênero *Licania* já demonstraram o seu potencial antiviral. Miranda e colaboradores (2002) testaram um extrato das sementes da espécie *Licania tomentosa* (Benth.) frente a uma cepa de HSV-1 resistente ao aciclovir e, o mesmo apresentou atividade virucida e antiviral em concentrações não-tóxicas, revelando um potencial microbicida. O extrato das sementes de *L. tomentosa* apresentaram elevada seletividade (IS = 851) para a cepa resistente ao aciclovir quando em comparação com os extratos de *L. macrophylla* utilizados neste trabalho, que apresentaram valores de IS de 18,74 e 18,7 (extratos das folhas e cascas, respectivamente) quando testados frente a cepa sensível ao aciclovir.

Tratando-se do gênero *Manilkara*, em um estudo conduzido por Liu et al. (2019), utilizando cumarinas derivadas dos frutos maduros da espécie *Manilkara zapota*, foi demonstrado o potencial anti-HIV, sobretudo com ação na atividade da transcriptase reversa do vírus. Outros trabalhos citam a atividade de plantas do gênero *Mimusops* (sinônimo do gênero *Manilkara*) frente ao HIV e HSV-1 (GAMI; PATHAK; PARABIA, 2012). A espécie *Mimusops elengi* L., no trabalho realizado por Hattori et al. (1995) inibiu cerca de 46% a replicação do HSV-1 numa concentração de 100 µg/mL. Em comparação, a espécie *M. elata* (extrato de código 13) do presente estudo inibiu em 98,54% a replicação de HSV-1 quando testada em 50 µg/mL, demonstrando seu elevado potencial antiviral.

A estatística de teste t não pareado entre os valores de CI<sub>50</sub> de KOS e 29-R para o extrato de *M. elata* (extrato etanólico da casca) também não demonstrou diferença significativa. Sabe-se que 95% dos casos resistentes a aciclovir são devido a mutações no gene UL23 que codifica a timidina quinase, e 5% são atribuídos a mutações no gene UL30 que codifica a DNA polimerase viral (FROBERT et al., 2014). No caso do aciclovir, ocorre a fosforilação pela enzima timidina quinase de origem viral, para que o fármaco seja incorporado ao DNA do vírus e interrompa sua síntese e replicação (BRIK, 1993). Desse modo, pode-se dizer que, como não houve diferença significativa entre a CI<sub>50</sub> do extrato de *M. elata* entre a cepa sensível (KOS) e resistente ao aciclovir (29-R), o extrato possivelmente agiu em alvos semelhantes ao longo da replicação viral. Avaliando esse cenário, o extrato de *M. elata* apresenta potencial com vistas ao desenvolvimento de fármacos antivirais em especial frente às cepas resistentes de HSV-1.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA DIRETA

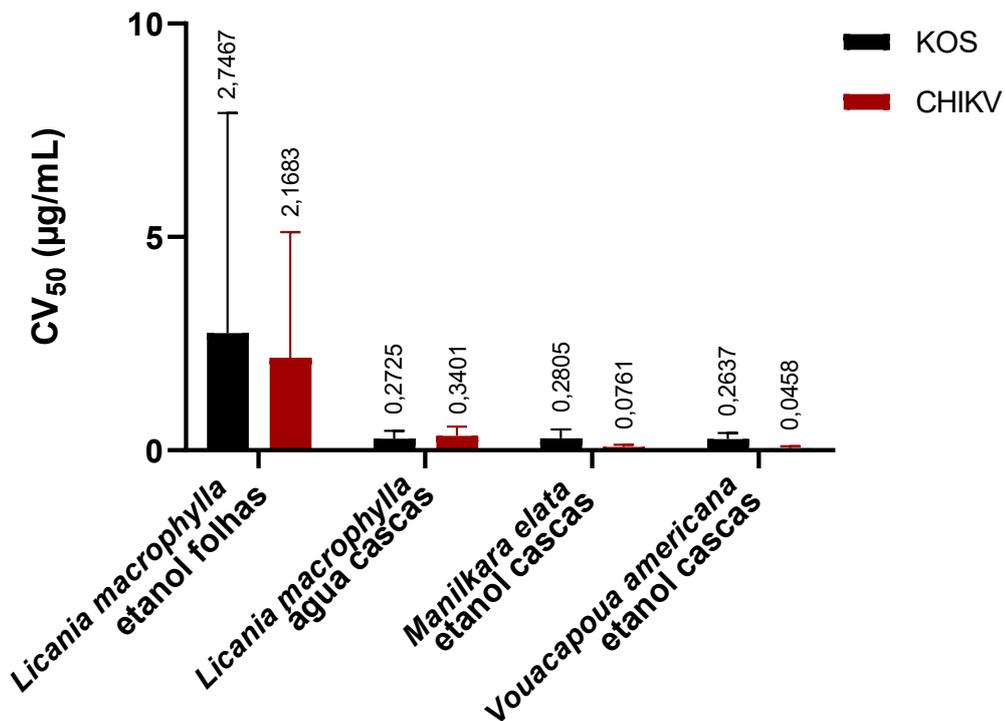
O efeito virucida ocorre baseado em um mecanismo de ação, envolvendo a interação de uma amostra com o envelope ou proteínas do capsídeo viral, interferindo diretamente na estrutura do vírus e reduzindo sua infectividade (ZHOU et al., 2021). Isso pode ser interessante

no combate à determinadas infecções virais, como por exemplo as infecções herpéticas, onde a aplicação de produtos de uso tópico podem inativar diretamente as partículas virais (EKBLAD et al., 2010).

Com base nos resultados obtidos pelos testes antivirais, os extratos mais ativos foram escolhidos para avaliar seu efeito virucida direto. No teste, é observado se há inibição direta das partículas virais antes mesmo de ocorrer contato com as células. Na metodologia realizada (segundo item 4.6) uma mistura das amostras a serem testadas com um número conhecido de partículas virais é incubada por 15 min à 37 °C para mimetizar a temperatura corporal humana.

Os resultados dispostos na Figura 7 demonstram os valores de  $CV_{50}$  para cada um dos extratos testados frente HSV-1 (cepa KOS) e CHIKV (cepa SLZ12). Em um primeiro momento, todas as amostras foram testadas na faixa de concentração de 50 – 0  $\mu\text{g/mL}$  (diluições na razão 1:2). Como todos os extratos inibiram 100% a infecciosidade viral das cepas testadas, revelando um alto potencial virucida, novos ensaios foram realizados empregando-se menores concentrações até que, por fim, foram alcançadas as concentrações que permitiram os cálculos das  $CV_{50}$ . Para a cepa 29-R de HSV-1, resistente ao aciclovir, a única amostra ativa foi o extrato etanólico das cascas de *M. elata*, resultando no valor de  $CV_{50}$  de 1,52  $\mu\text{g/mL}$ .

Figura 7 – Resultados da avaliação da atividade virucida frente HSV-1 (cepa KOS) e CHIKV (cepa SLZ12) dos extratos mais ativos expressos em valores de  $CV_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ).



Comparação da análise da atividade virucida frente a cepa KOS de HSV-1 e frente ao CHIKV expressa em  $CV_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) por meio do ensaio de atividade virucida direta. Eixo X: extratos ativos. Eixo Y:  $CV_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ). Extrato

etanólico das folhas de *Licania macrophylla* (Código 10). Extrato aquoso das cascas de *Licania macrophylla* (Código 11). Extrato etanólico das cascas de *Manilkara elata* (Código 13). Extrato etanólico das cascas de *Vouacapoua americana* (Código 17). Estatística: ANOVA, pós-teste Tukey. Fonte: A autora

Todos os valores de  $CV_{50}$  foram menores do que os valores obtidos para  $CI_{50}$  nos testes da atividade antiviral anteriormente citados. A fim de constatar se as concentrações antivirais e virucidas foram significativamente diferentes entre os extratos mais ativos foi aplicada ANOVA seguida de teste de Tukey. Quando comparados os valores de  $CI_{50}$  e  $CV_{50}$  entre os extratos mais ativos e as três cepas virais, o extrato 13 (*Manilkara elata*) foi o único a apresentar diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores encontrados para a cepa resistente ao aciclovir de HSV-1 (29-R) e para CHIKV. De toda forma, todos os extratos mais ativos testados apresentaram atividade virucida em uma concentração menor do que a utilizada nos ensaios antivirais, mostrando maior potencial virucida do que antiviral.

Além disso, todos extratos apresentaram uma atividade virucida estatisticamente mais expressiva quando comparado ao seu potencial antiviral, em especial o extrato etanólico das cascas de *Vouacapoua americana* (extrato 17), o qual apresentou valores de  $CV_{50}$  estatisticamente menores do que os valores de  $CI_{50}$  frente ao HSV-1 (KOS) e CHIKV ( $p < 0,05$ , teste de Tukey).

Levando em consideração que os extratos mais ativos apresentaram maior potencial virucida do que antiviral pode-se propor que esses atuaram de forma semelhante, possivelmente causando danos à estrutura das três cepas virais e, desse modo, inviabilizando o processo de adsorção e penetração viral nas células. Mais especificamente, a inativação viral a partir dos extratos pode estar relacionada com a ligação dos componentes dos extratos às proteínas dos envelopes virais, influenciando nos primeiros estágios de replicação.

Pode-se sugerir, dessa forma, que os quatro extratos de maior atividade das espécies *Licania macrophylla*, *Manilkara elata* e *Vouacapoua americana*, após isolamento e identificação dos compostos com atividades virucidas, poderiam ser empregados em formulações microbicidas para utilização no combate a infecções por HSV-1 e CHIKV, reduzindo a transmissão viral. O presente estudo trata-se de um trabalho inicial, com pesquisas *in vitro*, na tentativa de identificar novas possibilidades no tratamento das infecções causadas por HSV-1 e CHIKV, sendo necessários estudos extras para a validação e implementação de produtos baseados nas informações apresentadas neste trabalho.

## 5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA DIRETA NA PRESENÇA DE SOLUÇÕES PROTEICAS

Como os resultados da atividade virucida direta descritos anteriormente demonstraram potente atividade virucida dos extratos, com 100% de inibição nas maiores concentrações testadas, foi realizada a avaliação da atividade virucida na presença de BSA conforme a metodologia descrita no item 4.7. O teste foi realizado com o objetivo de analisar se a presença de soluções ricas em proteína teria influência na ação virucida das amostras testadas, visualizando o uso clínico dos extratos.

Objetivando o desenvolvimento de um possível medicamento virucida de uso tópico, os testes foram conduzidos apenas com a cepa KOS de HSV-1 devido à problemática das lesões em mucosas causadas durante a infecção por esse vírus. Os resultados estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5 – Resultados da inativação de HSV-1 (cepa KOS) das amostras mais ativas na presença de soluções proteicas.

BSA (%)	<i>L. macrophylla</i> (ext. etan. folhas)		<i>L. macrophylla</i> (ext. aq. cascas)		<i>M. elata</i> (ext. etan. cascas)		<i>V. americana</i> (ext. etan. cascas)	
	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
0,5	31,72	13,38	48,12	11,71	35,70	24,54	45,52	20,23
0,05	34,95	14,38	52,52	4,66	62,44	10,15	32,87	18,83
0,005	33,64	17,87	47,50	7,97	23,74	7,26	47,60	28,48
0,0005	57,03	8,29	30,35	26,14	25,10	5,61	39,78	35,55
0,00005	44,66	9,21	31,70	25,88	15,41	16,85	51,19	30,83

Resultados expostos em porcentagem de inativação viral.  $\bar{x}$ : média;  $\sigma$ : desvio padrão. Extrato etanólico das folhas de *Licania macrophylla*. Extrato aquoso das cascas de *Licania macrophylla*. Extrato etanólico das cascas de *Manilkara elata*. Extrato etanólico das cascas de *Vouacapoua americana*. Fonte: A autora

Com base nos resultados apresentados na tabela 5, pode-se observar que, apesar da infecciosidade residual ter sofrido uma pequena variação na presença de soluções proteicas, a capacidade virucida dos extratos manteve-se constante reafirmando a capacidade virucida dos extratos. Essa constatação foi confirmada a partir da análise dos dados por meio de ANOVA, não havendo diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) quando analisados as porcentagens de inibição nas diferentes concentrações de BSA.

## 5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA PARA FINS ANTISSEPTICOS EM FASE 2 DE DESENVOLVIMENTO

Visando a aplicação dos extratos mais ativos em um produto de ação antisséptica contra HSV-1 (cepa KOS), o protocolo de DIN EN 14476:2015-12 foi aplicado com adaptações, conforme descrito no item 4.8.

Os resultados apontaram o extrato aquoso das cascas de *Licania macrophylla* e o extrato etanólico das cascas de *Vouacapoua americana* como sendo os mais ativos, com a média entre as triplicatas resultando na diminuição do título viral de  $10^6$  para  $10^3$  TCID<sub>50</sub> e  $10^5$  TCID<sub>50</sub> para os respectivos extratos. Estes resultados sugerem que esses extratos possuem uma relevante ação virucida mesmo em um curto tempo de ação (120 segundos) e sem expressiva influência na presença de matéria orgânica (BSA), sendo bons candidatos para o desenvolvimento de formulações para aplicação em antissépticos para o HSV-1.

Um trabalho desenvolvido por Pradhan e Nguyen (2018) verificou a ação virucida de dois compostos, MST-312 (inibidor de telomerase sintético) e o seu correspondente natural, o galato de epigallocatequina (EGCG) frente HSV-1, constatando a inativação dos vírions na temperatura de 37° e temperatura ambiente. O mesmo foi observado no presente trabalho, onde os extratos etanólico das folhas e aquoso das cascas de *Licania macrophylla* e extratos etanólicos das cascas de *Manilkara elata* e *Vouacapoua americana* apresentaram relevante ação virucida quando em contato com o vírus a 37 °C durante 15 minutos, enquanto que os extratos aquoso das cascas de *Licania macrophylla* e etanólico das cascas de *Vouacapoua americana* apresentaram ação virucida em temperatura ambiente após 120 segundos de contato com HSV-1.

Os achados desse ensaio corroboram a hipótese descrita anteriormente (item 5.4), de que a ação virucida possivelmente se deu em razão da desestruturação dos vírions pelos extratos mais ativos citados acima, impossibilitando o início do processo de replicação do HSV-1 (estágios de adsorção e penetração viral).

## 6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os extratos etanólico das folhas e aquoso das cascas de *Licania macrophylla* e os extratos etanólicos das cascas de *Manilkara elata* e de *Vouacapoua americana* apresentaram elevado potencial antiviral frente aos vírus HSV-1 (cepa KOS) e CHIKV. Possivelmente, os extratos agiram de modo semelhante, indicando sua ação na replicação viral dos modelos testados. Assim, os extratos tornam-se bons candidatos ao desenvolvimento de fármacos antivirais, principalmente observando a falta de medicamentos específicos anti-CHIKV. O extrato de *M. elata* foi capaz de inibir a cepa 29-R de HSV-1, sendo de interesse para o desenvolvimento de fármacos capazes de combater as cepas resistentes ao aciclovir.

De modo interessante, os quatro extratos de maior potencial antiviral também demonstraram elevada capacidade virucida, constatando que a ação virucida foi superior a ação antiviral. Nesse caso, sugere-se que os extratos induziram a desintegração da estrutura dos vírions, agindo nas etapas anteriores à replicação viral. Desse modo, testes futuros devem ser realizados de modo a viabilizar a utilização dos compostos ativos isolados destes extratos em formulações microbidas (HSV-1) e, no caso de CHIKV, a adição em fórmulas de repelentes para aumentar a eficiência destes produtos. Além disso, a influência de soluções proteicas (BSA), tratando-se da cepa KOS de HSV-1, não afetou significativamente a ação virucida das amostras, revelando estabilidade no efeito virucida.

Por fim, o extrato aquoso das cascas de *L. macrophylla* manteve sua ação virucida, diminuindo a concentração viral após contato por 120 segundos com a cepa KOS de HSV-1. Assim, suportando a ideia do desenvolvimento de antissépticos frente ao HSV-1.

Para validar a aplicação biotecnológica desses extratos, serão necessários ensaios de mecanismo de ação das amostras frente os modelos virais estudados, bem como a análise fitoquímica detalhada para a formulação de produtos em fases posteriores.

## REFERÊNCIAS

- ABD EL-MORDY, F. M. et al. Inhibition of SARS-CoV-2 main protease by phenolic compounds from *Manilkara hexandra* (Roxb.) Dubard assisted by metabolite profiling and in silico virtual screening. **RSC advances**, v. 10, n. 53, p. 32148–32155, 28 ago. 2020.
- ABDELNABI, R. et al. Antiviral drug discovery against arthritogenic alphaviruses: Tools and molecular targets. **Biochemical Pharmacology**, v. 174, p. 113777, 1 abr. 2020.
- ABDUL, R. et al. An updated review on the antimicrobial and pharmacological properties of *Uncaria* (Rubiaceae). **Journal of Herbal Medicine**, v. 34, p. 100573, 1 jul. 2022.
- ABRAHAM, R. et al. ADP-ribosyl-binding and hydrolase activities of the alphavirus nsP3 macrodomain are critical for initiation of virus replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 44, p. E10457–E10466, 30 out. 2018.
- AGBODZI, B. et al. Chikungunya viruses containing the A226V mutation detected retrospectively in Cameroon form a new geographical subclade. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 113, p. 65–73, 1 dez. 2021.
- AGGARWAL, A.; GARG, N. Newer Vaccines against Mosquito-borne Diseases. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 85, n. 2, p. 117–123, fev. 2018.
- AGGARWAL, B. B. et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. **Anticancer research**, v. 24, n. 5A, p. 2783–840, 2004.
- AGUIAR, B. S. et al. Potential risks of Zika and chikungunya outbreaks in Brazil: A modeling study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 70, p. 20–29, 1 maio 2018.
- AL-RASHED, S. et al. Vincamine, a safe natural alkaloid, represents a novel anticancer agent. **Bioorganic Chemistry**, v. 107, p. 104626, 1 fev. 2021.
- ALAMGIR, A. N. M. **Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts: Volume 2:**

**Phytochemistry and Bioactive Compounds.** [s.l.] Springer International Publishing, 2018.  
v. 2.

ALLARD, P.-M. et al. Antiviral chlorinated daphnane diterpenoid orthoesters from the bark and wood of *Trigonostemon cherrieri*. **Phytochemistry**, v. 84, p. 160–168, 1 dez. 2012.

ALMEIDA, E. B. DE et al. Leaf morphology and anatomy of *Manilkara Adans.* (Sapotaceae) from northeastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 299, n. 1, p. 1–9, 29 jan. 2013.

ÁLVAREZ, D. M. et al. Current Antivirals and Novel Botanical Molecules Interfering With Herpes Simplex Virus Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 139, p. 1–19, 11 fev. 2020.

AMARAL, J. K.; BILSBORROW, J. B.; SCHOEN, R. T. Chronic Chikungunya Arthritis and Rheumatoid Arthritis: What They Have in Common. **The American Journal of Medicine**, v. 133, n. 3, p. e91–e97, 1 mar. 2020.

ANDERSEN, P. I. et al. Discovery and development of safe-in-man broad-spectrum antiviral agents. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 93, p. 268–276, 1 abr. 2020.

ARAGÃO, C. F. et al. Circulation of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* in Maranhão, Northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 186, p. 1–4, 1 out. 2018.

ARAKAWA, T. et al. Antiviral and Virucidal Activities of Natural Products. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 20, p. 2485–2497, 1 jul. 2009.

AYYAD, S. E. N. et al. Vincamine and 14-epi-vincamine indole alkaloids from *Ambelania occidentalis*. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 419–422, 1 out. 2012.

BAGLA, V. P.; MCGAW, L. J.; ELOFF, J. N. The antiviral activity of six South African plants traditionally used against infections in ethnoveterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 155, n. 2–4, p. 198–206, 23 mar. 2012.

BARCELOS, I. B. et al. Análise fitoquímica e das atividades citotóxica, antioxidante, e antibacteriana das flores de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson. **Revista Fitos**, v. 11, n. 1, 2017.

BARRETT, P. N. et al. Vero cell technology for rapid development of inactivated whole virus vaccines for emerging viral diseases. **Expert Review of Vaccines**, v. 16, n. 9, p. 883–894, 2 set. 2017.

BEN-SHABAT, S. et al. Antiviral effect of phytochemicals from medicinal plants: Applications and drug delivery strategies. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 2, p. 354–367, 1 abr. 2020.

BHAT, S. M. et al. Spectrum of candidate molecules against Chikungunya virus - an insight into the antiviral screening platforms. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 17, n. 4, p. 243-264, 3 abr. 2019.

BILIA, A. R.; MENDEZ, J.; MORELLI, I. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania carii*. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 71, n. 3, p. 191–197, 1 ago. 1996.

BORGHERINI, G. et al. Outbreak of chikungunya on Reunion Island: Early clinical and laboratory features in 157 adult patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 11, p. 1401–1407, 1 jun. 2007.

BRASIL. **Chikungunya: Manejo Clínico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. v. 2ª edição.

BRIK, D. Antivirais. **Arq. Bras. Oftal.**, v. 56, n. 6, p. 302–307, 1993.

BRIOSCHI, M. B. C. et al. Models for cytotoxicity screening of antileishmanial drugs: what has been done so far? **International Journal of Antimicrobial Agents**, p. 106612, 9 jun. 2022.

BUTANTAN. Vacina da chikungunya é segura e gera resposta imune duradoura em 96% dos

voluntários, apontam resultados finais de fase 3 nos EUA. Disponível em: <<https://butantan.gov.br/noticias/vacina-da-chikungunya-e-segura-e-gera-resposta-imune-duradoura-em-96-dos-voluntarios-apontam-resultados-finais-de-fase-3-nos-eua>>. Acesso em: 10 jul. 2022.

CAMPBELL, L. P. et al. Climate change influences on global distributions of dengue and chikungunya virus vectors. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1665, p. 1–9, 2015.

CAON, T. et al. Antimutagenic and antiherpetic activities of different preparations from *Uncaria tomentosa* (cat's claw). **Food and Chemical Toxicology**, v. 66, p. 30–35, 1 abr. 2014.

CARDOSO, D. et al. Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 40, p. 10695–10700, 3 out. 2017.

CARVALHO, M. V. et al. Investigations on the anti-inflammatory and anti-allergic activities of the leaves of *Uncaria guianensis* (Aublet) J. F. Gmelin. **Inflammopharmacology**, v. 14, n. 1–2, p. 48–56, mar. 2006.

CHAVES, E. M. F.; BARROS, R. F. M. Diversidade e uso de recursos medicinais do carrasco na APA da Serra da Ibiapaba, Piauí, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 476–486, 2012.

CHEN, M. W. et al. Chikungunya virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase core domain displays detergent-sensitive primer extension and terminal adenylyltransferase activities. **Antiviral Research**, v. 143, p. 38–47, 1 jul. 2017.

CHI, L. H.; BURROWS, A. D.; ANDERSON, R. L. Can preclinical drug development help to predict adverse events in clinical trials? **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 1, p. 257–268, 1 jan. 2022.

CIVITELLI, L. et al. In vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication by *Mentha*

suaveolens essential oil and its main component piperitenone oxide. **Phytomedicine**, 2014.

CLERCQ, E. DE; E., D. C. Approved antiviral drugs over the past 50 years. . **Clinical Microbiology Reviews** , v. 29, n. 3, p. 695–747, 2016.

COLE, S. Herpes Simplex Virus: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Nursing Clinics of North America**, v. 55, n. 3, p. 337–345, 1 set. 2020.

CORREIA, A. F. et al. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 12, n. 6, p. 369–380, nov. 2008.

COS, P. et al. Plant Substances as Anti-HIV Agents Selected According to Their Putative Mechanism of Action  $\perp$ . **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 284–293, fev. 2004.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290–302, 19 jul. 2006.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 72–79, 22 ago. 2005.

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

CRIMI, S. et al. Herpes Virus, Oral Clinical Signs and QoL: Systematic Review of Recent Data. **Viruses**, v. 11, n. 5, p. 463, 21 maio 2019.

DANIEL, J. F. D. S. et al. Others flavonoids from *Ouatea hexasperma* (Ochnaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 3 B, p. 634–638, 2005.

DANIEL, J. F. DE S. et al. Antitumor activity of biflavonoids from *Ouatea* and *Luxemburgia* on human cancer cell lines. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 39, n. 4, p. 184, 2007.

DAS, P. K.; MERITS, A.; LULLA, A. Functional Cross-talk between Distant Domains of

Chikungunya Virus Non-structural Protein 2 Is Decisive for Its RNA-modulating Activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 9, p. 5635–5653, 28 fev. 2014.

DEEBA, F. et al. Global transmission and evolutionary dynamics of the Chikungunya virus. **Epidemiology and Infection**, v. 148, p. e63, 19 fev. 2020.

DELISLE, E. et al. Chikungunya outbreak in Montpellier, France, september to october 2014. **Eurosurveillance**, v. 20, n. 17, p. 21108, 30 abr. 2015.

DIAS, J. P. et al. Seroprevalence of Chikungunya Virus after Its Emergence in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 617, 1 abr. 2018.

DICKSON, R. A.; HOUGHTON, P. J.; HYLANDS, P. J. Antibacterial and antioxidant cassane diterpenoids from *Caesalpinia benthamiana*. **Phytochemistry**, v. 68, n. 10, p. 1436–1441, maio 2007.

DICKSON, R.; FLEISCHER, T.; HOUGHTON, P. Cassane-type diterpenoids from the genus *Caesalpinia*. **Pharmacognosy Communications**, v. 1, n. 1, p. 63–77, 1 jul. 2011.

DONG, H. et al. Antiviral strategies targeting herpesviruses. **Journal of Virus Eradication**, v. 7, n. 3, p. 100047, 1 set. 2021.

DUTECH, C.; MAGGIA, L.; JOLY, H. I. Chloroplast diversity in *Vouacapoua americana* (Caesalpinaceae), a neotropical forest tree. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 9, p. 1427–1432, 1 set. 2000.

EKBLAD, M. et al. A highly lipophilic sulfated tetrasaccharide glycoside related to muparfostat (PI-88) exhibits virucidal activity against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 86, n. 2, p. 196–203, 1 maio 2010.

FARIA, N. R. et al. Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. **PLoS Currents**, 1 fev. 2016.

FEIBELMAN, K. M. et al. Identification of small molecule inhibitors of the Chikungunya

virus nsP1 RNA capping enzyme. **Antiviral Research**, v. 154, p. 124–131, jun. 2018.

FIDELIS, Q. C. et al. Ouratea genus: chemical and pharmacological aspects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 1, p. 1–19, 1 jan. 2014.

FIDELIS, Q. C. et al. Chemical and Biological insights of *Ouratea hexasperma* (A. St.-Hil.) Baill.: a source of bioactive compounds with multifunctional properties. **Natural Product Research**, v. 33, n. 10, p. 1500–1503, 19 maio 2019.

FONSECA, M. S. DA; JÚNIOR, M. C. DA S. Fitossociologia e similaridade florística entre trechos de Cerrado sentido restrito em interflúvio e em vale no Jardim Botânico de Brasília, DF. **Acta bot. bras.**, v. 18, n. 1, p. 19-29, 2004.

FROBERT, E. et al. Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: An update from a ten-year survey in France. **Antiviral Research**, v. 111, p. 36–41, 1 nov. 2014.

FROS, J. J.; PIJLMAN, G. P. Alphavirus infection: Host cell shut-off and inhibition of antiviral responses. **Viruses**, v. 8, n. 6, p. 166, 11 jun. 2016.

GAMI, B.; PATHAK, S.; PARABIA, M. Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological review of *Mimusops elengi* Linn. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 9, p. 743–748, 1 set. 2012.

GHILDIYAL, R.; GABRANI, R. Antiviral therapeutics for chikungunya virus. **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 30, n. 6, p. 467–480, 2 jun. 2020.

GOIS, B. M. et al. Regulatory T cells in acute and chronic human Chikungunya infection. **Microbes and Infection**, v. 24, n. 3, p. 104927, 1 abr. 2022.

GOMES, M. DO L. et al. Usos medicinais e composição química das folhas de *Licania macrophylla* Benth.(Chrysobalanaceae). **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 87, n. 1, p. 26–29, 2006.

GÓMEZ-CALDERÓN, C. et al. Antiviral effect of compounds derived from the seeds of

Mammea americana and Tabernaemontana cymosa on Dengue and Chikungunya virus infections. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 57, 18 dez. 2017.

GRANDADAM, M. et al. Chikungunya Virus, Southeastern France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 910, 2011.

HAPUARACHCHI, H. C. et al. Re-emergence of Chikungunya virus in South-east Asia: Virological evidence from Sri Lanka and Singapore. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 4, p. 1067–1076, 1 abr. 2010.

HARRIS, S. A.; HARRIS, E. A. Molecular Mechanisms for Herpes Simplex Virus Type 1 Pathogenesis in Alzheimer's Disease. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 10, n. MAR, 6 mar. 2018.

HARRISON, K. S.; JONES, C. Regulation of herpes simplex virus type 1 latency-reactivation cycle and ocular disease by cellular signaling pathways. **Experimental Eye Research**, v. 218, p. 109017, 1 maio 2022.

HATTORI, M. et al. Inhibitory effects of various ayurvedic and Panamanian medicinal plants on the infection of herpes simplex virus-1 in vitro and in vivo. **Phytotherapy Research**, v. 9, n. 4, p. 270–276, 1995.

HEITZMAN, M. E. et al. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of Uncaria (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 66, p. 5–29, 1 jan. 2005.

HERBÁRIO VIRTUAL AUSTRAL AMERICANO. Disponível em:  
<<https://herbariovaa.org/>>. Acesso em: 09 set. 2022.

HERTZ, J. T. et al. Chikungunya and Dengue Fever among Hospitalized Febrile Patients in Northern Tanzania. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 1, p. 171, 1 jan. 2012.

HILL, R. A.; CONNOLLY, J. D. Triterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 12, p.

1294–1329, 1 jan. 2018.

HO, D. Y.; ENRIQUEZ, K.; MULTANI, A. Herpesvirus Infections Potentiated by Biologics. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 34, n. 2, p. 311–339, 1 jun. 2020.

HU, J. M.; HSIUNG, G. D. Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. **Antiviral Research**, v. 11, n. 5–6, p. 217–232, 1 jun. 1989.

HUANG, Y. et al. Receptors and ligands for herpes simplex viruses: Novel insights for drug targeting. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 1, p. 185–195, 1 jan. 2022.

IVES, A. M.; BERTKE, A. S. Stress Hormones Epinephrine and Corticosterone Selectively Modulate Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1) and HSV-2 Productive Infections in Adult Sympathetic, but Not Sensory, Neurons. **Journal of Virology**, v. 91, n. 13, 1 jul. 2017.

JAVELLE, E. et al. The challenge of chronic chikungunya. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 15, p. 3-4, 1 jan. 2017.

JOSHI, B. et al. Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Anthelmintic Activities of Medicinal Plants of Nepal Selected Based on Ethnobotanical Evidence. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, p. 1–14, 22 abr. 2020.

JÚNIOR, J. G. DE P.; SOUZA, I. L. L. DE. Medicinal plants used in the Amazon region : a systematic review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. 1–16, 2021.

KARLAS, A. et al. A human genome-wide loss-of-function screen identifies effective chikungunya antiviral drugs. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 12 set. 2016.

KARPE, Y. A.; AHER, P. P.; LOLE, K. S. NTPase and 5'-RNA Triphosphatase Activities of Chikungunya Virus nsP2 Protein. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e22336, 19 jul. 2011.

KELLY, B. J. et al. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. **Virus Research**, v. 145, n. 2, p. 173–186, 1 nov. 2009.

KENDRA, J. A. et al. Functional and structural characterization of the chikungunya virus translational recoding signals. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 45, p. 17536–17545, 9 nov. 2018.

KHAN, M. et al. Assessment of in vitro prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against chikungunya virus in vero cells. **Journal of Medical Virology**, v. 82, n. 5, p. 817–824, 1 maio 2010.

KIDO, T.; TANIGUCHI, M.; BABA, K. Diterpenoids from Amazonian crude drug of Fabaceae. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 51, n. 2, p. 207–208, fev. 2003.

KING, F. E.; JONES, G. The Chemistry of Extractives from Hardwoods. Part XXI.\* The Structure of Eperuic Acid. **Journal of the Chemical Society**, n. 658, 1955.

KNIPE, D. M.; WHITLEY, R. Herpes Simplex Virus 1 and 2 (Herpesviridae). In: **Encyclopedia of Virology**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 404–413.

KOBILER, O. et al. Herpesvirus replication compartments originate with single incoming viral genomes. **mBio**, v. 2, n. 6, 20 dez. 2011.

KRAEMER, M. U. G. et al. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. **Nature Microbiology** 2019 4:5, v. 4, n. 5, p. 854–863, 4 mar. 2019.

KRIL, V. et al. New Insights into Chikungunya Virus Infection and Pathogenesis. **Annual review of virology**, v. 8, n. 1, p. 327–347, 29 set. 2021.

KUMAR, N. P. et al. A226V mutation in virus during the 2007 chikungunya outbreak in Kerala, India. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 8, p. 1945–1948, 1 ago. 2008.

KUMAR, S. et al. Chikungunya virus nsP1 interacts directly with nsP2 and modulates its ATPase activity. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1045, 18 dez. 2018.

KUMAR, S. P. et al. Pathogenesis and life cycle of herpes simplex virus infection-stages of primary, latency and recurrence. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine**,

**and Pathology**, v. 28, n. 4, p. 350–353, 1 jul. 2016.

LAW, Y.-S. et al. Structural insights into RNA recognition by the Chikungunya virus nsP2 helicase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 19, p. 9558–9567, 7 maio 2019.

LEDOUX, A. et al. Antiplasmodial, anti-chikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 5, p. 622–628, 1 nov. 2018.

LEE, K. et al. Bioactive Indole Alkaloids from the Bark of *Uncaria guianensis*. **Planta Medica**, v. 65, n. 08, p. 759–760, 4 dez. 1999.

LEMOS, T. L. G. et al. Quinones from plants of northeastern Brazil: structural diversity, chemical transformations, NMR data and biological activities. **Natural Product Research**, v. 21, n. 6, p. 529–550, 20 maio 2007.

LENTSCHER, A. J. et al. Chikungunya virus replication in skeletal muscle cells is required for disease development. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 3, p. 1466–1478, 2 mar. 2020.

LÉVI-STRAUSS, C. The use of wild plants in tropical South America. **Economic Botany**, v. 6, n. 3, p. 252–270, jul. 1952.

LI, S. et al. Oesophageal carcinoma: The prevalence of DNA tumour viruses and therapy. **Tumour Virus Research**, v. 13, p. 200231, 1 jun. 2022.

LIM, E. X. Y. et al. Mosquitoes as Suitable Vectors for Alphaviruses. **Viruses** 2018, v. 10, n. 2, p. 84, 14 fev. 2018.

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, p. 36, 27 jun. 2016.

LINDH, E. et al. The Italian 2017 Outbreak Chikungunya Virus Belongs to an Emerging

*Aedes albopictus*–Adapted Virus Cluster Introduced From the Indian Subcontinent. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, 1 jan. 2019.

LIU, X. et al. A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, v. 97, p. 24–32, 1 ago. 2018.

LIU, Y. P. et al. Prenylated Coumarins from the Fruits of *Manilkara zapota* with Potential Anti-inflammatory Effects and Anti-HIV Activities. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 43, 2019.

LOOKER, K. J. et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. **PLOS ONE**, v. 10, n. 1, p. e0140765, 28 jan. 2015.

LOPES, N. et al. Green seaweed *Enteromorpha compressa* (Chlorophyta, Ulvaceae) derived sulphated polysaccharides inhibit herpes simplex virus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 605–612, set. 2017.

LUMSDEN, W. H. . An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II. General description and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 33–57, 1 jan. 1955.

LUNA, E. M. et al. Antioxidant potential of the Caatinga flora. **Phytomedicine Plus**, v. 2, n. 2, p. 100240, 1 maio 2022.

MARCOCCI, M. E. et al. Herpes Simplex Virus-1 in the Brain: The Dark Side of a Sneaky Infection. **Trends in Microbiology**, p. 1–13, maio 2020.

MARTINS, F. J. et al. Antioxidant activity and potential photoprotective from amazon native flora extracts. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 34–39, 1 ago. 2016.

MASCARENHAS, M. et al. A scoping review of published literature on chikungunya virus. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, 1 nov. 2018.

MATUSALI, G. et al. Tropism of the Chikungunya Virus. **Viruses**, v. 11, n. 2, p. 175, 20 fev. 2019.

MAURYA, R. et al. A review on cassane and norcassane diterpenes and their pharmacological studies. **Fitoterapia**, v. 83, n. 2, p. 272–280, 1 mar. 2012.

MCCRAE, A. W. R. et al. Chikungunya virus in the entebbe area of Uganda: Isolations and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 2, p. 152–168, jan. 1971.

MELLO, C. DA S. et al. Decrease in Dengue virus-2 infection and reduction of cytokine/chemokine production by *Uncaria guianensis* in human hepatocyte cell line Huh-7. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 6, p. 458–468, jun. 2017.

MENDES, G. DA S. et al. Anti-HSV activity of *Hypnea musciformis* cultured with different phytohormones. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 2012.

METZ, S. W.; PIJLMAN, G. P. Function of Chikungunya Virus Structural Proteins. In: **Chikungunya Virus**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 63–74.

MIRANDA, M. M. F. S. et al. Anti-herpes simplex virus effect of a seed extract from the tropical plant *Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch (Chrysobalanaceae). **Phytomedicine**, v. 9, n. 7, p. 641–645, 1 jan. 2002.

MORAIS, S. M. DE et al. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 169-177, 2005.

MOREIRA, I. C. et al. Isoflavanone dimers hexaspermone A, B and C from *Ouratea hexasperma*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 6, p. 1567–1572, 19 abr. 1994.

MORENS, D. M.; FAUCI, A. S. Chikungunya at the Door — Déjà Vu All Over Again? **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 10, p. 885–887, 4 set. 2014.

MURUGAN, S. B.; SATHISHKUMAR, R. Chikungunya infection: A potential re-emerging

global threat. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 933–937, 1 out. 2016.

MUYLAERT, I.; TANG, K. W.; ELIAS, P. Replication and Recombination of Herpes Simplex Virus DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 18, p. 15619–15624, 6 maio 2011.

NEAGU, I. A. et al. Life cycle synchronization is a viral drug resistance mechanism. **PLOS Computational Biology**, v. 14, n. 2, p. 1–26, 15 fev. 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I. Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures. In: **The Practice of Medicinal Chemistry: Fourth Edition**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2015.

NG, L. C.; HAPUARACHCHI, H. C. Tracing the path of Chikungunya virus—Evolution and adaptation. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 876–885, 1 out. 2010.

NOTHIAS-SCAGLIA, L.-F. et al. Jatrophone Diterpenes as Inhibitors of Chikungunya Virus Replication: Structure–Activity Relationship and Discovery of a Potent Lead. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 6, p. 1505–1512, 27 jun. 2014.

NSOESIE, E. O. et al. Global distribution and environmental suitability for chikungunya virus, 1952 to 2015. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 20, p. 30234, 19 maio 2016.

O'DRISCOLL, M. et al. Arthralgia resolution rate following chikungunya virus infection. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 112, p. 1–7, 1 nov. 2021.

OLIVEIRA, N. T.; ALMEIDA, S. S. M. DA S. DE A. Análise fitoquímica, citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas da espécie *Ambelania acida* Aublet (Apocynaceae). **Biota Amazônia**, v. 6, n. 1, p. 20–25, 2016.

OWEN, D. J.; CRUMP, C. M.; GRAHAM, S. C. Tegument Assembly and Secondary Envelopment of Alphaherpesviruses. **Viruses** **2015**, v. 7, n. 9, p. 5084–5114, 18 set. 2015.

PAIXÃO, E. S. et al. Chikungunya chronic disease: a systematic review and meta-analysis. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 112, n. 7, p. 301–316, 1 jul. 2018.

PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Extraction of Pharmaceutical Drugs. 2014. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 5, p. 115–119, 2014.

PATANGRAO RENUŠE, A. et al. Vincamine, an active constituent of *Vinca rosea* ameliorates experimentally induced acute lung injury in Swiss albino mice through modulation of Nrf-2/NF- $\kappa$ B signaling cascade. **International Immunopharmacology**, v. 108, p. 108773, 1 jul. 2022.

PÉREZ-PÉREZ, M.-J. J. et al. Chikungunya virus drug discovery: still a long way to go? **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 9, p. 855–866, 2 set. 2019.

POLLITO, P. A. Z.; TOMAZELLO, M. Anatomia do lenho de *Uncaria guianensis* e *U. tomentosa* (Rubiaceae) do Estado do Acre, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 36, n. 2, p. 169-176, 2006.

PRADHAN, P.; NGUYEN, M. L. Herpes simplex virus virucidal activity of MST-312 and epigallocatechin gallate. **Virus Research**, v. 249, p. 93–98, 2 abr. 2018.

PUSHPAKOM, S. et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, p. 41–58, 12 out. 2018.

QIN, N. et al. Recent research progress of *Uncaria* spp. based on alkaloids: phytochemistry, pharmacology and structural chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 210, p. 112960, 15 jan. 2021.

REFLORA. Disponível em:

<<https://reflora.jbrj.gov.br/reflora/PrincipalUC/PrincipalUC.do;jsessionid=35A14437EB6933433D0D64E1E0C88324>>. Acesso em: 30 ago. 2020.

REZZA, G. et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **The Lancet**, v. 370, n. 9602, p. 1840–1846, 1 dez. 2007.

RODRIGUEZ, A. K. et al. Molecular characteristics and replication mechanism of dengue, zika and chikungunya arboviruses, and their treatments with natural extracts from plants: An updated review. **EXCLI Journal**, v. 18, p. 988–1006, 2019.

ROIZMAN, B.; WHITLEY, R. J. The nine ages of herpes simplex virus. **Herpes**, v. 8, n. 1, p. 23–27, 2001.

ROSS, R. W. The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **Journal of Hygiene**, v. 54, n. 2, p. 177–191, 15 jun. 1956.

ROTHAN, H. A. et al. A Combination of Doxycycline and Ribavirin Alleviated Chikungunya Infection. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0126360, 13 maio 2015.

ROUMY, V. et al. Plant therapy in the Peruvian Amazon (Loreto) in case of infectious diseases and its antimicrobial evaluation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 249, p. 112411, 1 mar. 2020.

RUPP, J. C. et al. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 9, p. 2483–2500, 1 set. 2015.

SALES, P. F. et al. Antiulcerogenic activity of the ethanolic extract of *Licania macrophylla* Benth. **O Mundo da Saúde**, v. 43, n. 4, p. 814–833, 5 dez. 2019.

SAM, I.-C. et al. Updates on Chikungunya Epidemiology, Clinical Disease, and Diagnostics. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 4, p. 223–230, abr. 2015.

SANDOVAL, M. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. **Phytomedicine**,

v. 9, n. 4, p. 325–337, jan. 2002.

SANTOS, N. S. de O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Virologia humana**. 3. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

SATO, D. et al. Synthesis of glycosides of resveratrol, pterostilbene, and piceatannol, and their anti-oxidant, anti-allergic, and neuroprotective activities. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 78, n. 7, p. 1123–1128, 3 jul. 2014.

SEGOVIA, J. F. O. et al. A detecção de produtos naturais biologicamente ativos no estado do Amapá. In: **Programa Primeiros Projetos - PPP**. Macapá: [s.n.]. p. 93–117.

SHANMUGARAJ, B.; MALLA, A.; RAMALINGAM, S. Epidemiology, clinical features and transmission of re-emerging arboviral infection chikungunya. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 9, n. 4, p. 135–139, 2019.

SILVA, I. T. DA. **Triagem anti-herpética de alguns táxons da biodiversidade brasileira: Fracionamento biomonitorado de Cecropia glaziovii Sneth., Urticaceae (embaúba)**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

SILVA, S. J. R. DA; MAGALHÃES, J. J. F. DE; PENA, L. Simultaneous Circulation of DENV, CHIKV, ZIKV and SARS-CoV-2 in Brazil: an Inconvenient Truth. **One Health**, v. 12, p. 100205, 1 jun. 2021.

SILVA, I. T. et al. In vitro antiherpes effects of a C -glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth \*. **The Society for Applied Microbiology**, v. 51, p. 143–148, 2010.

SILVA, J. V. J. et al. A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. **Acta Tropica**, v. 188, p. 213–224, dez. 2018.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 737-749, 1 mar. 2017.

SIMÕES, C. M. O.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 4, p. 323–328, 1 jun. 1999.

SINGH, A. et al. Understanding the interactability of chikungunya virus proteins via molecular recognition feature analysis. **RSC Advances**, v. 8, n. 48, p. 27293–27303, 31 jul. 2018.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA. Disponível em: <<https://www.sibbr.gov.br/>>. Acesso em: 30 ago. 2020.

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

SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183–197, 25 out. 2009.

SOUZA, T. M. L. et al. Emergence of the East-Central-South-African genotype of Chikungunya virus in Brazil and the city of Rio de Janeiro may have occurred years before surveillance detection. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2019.

SPUUL, P. et al. Role of the Amphipathic Peptide of Semliki Forest Virus Replicase Protein nsP1 in Membrane Association and Virus Replication. **Journal of Virology**, v. 81, n. 2, p. 872–883, 15 jan. 2007.

STEINER, I.; BENNINGER, F. Manifestations of Herpes Virus Infections in the Nervous System. **Neurologic Clinics**, v. 36, n. 4, p. 725–738, 1 nov. 2018.

STEMPEL, M.; CHAN, B.; BRINKMANN, M. M. Coevolution pays off: Herpesviruses have the license to escape the DNA sensing pathway. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 208, p. 495–512, 1 ago. 2019.

SUBUDHI, B. B. et al. Current strategies for inhibition of Chikungunya infection. **Viruses**, v. 10, n. 235, 3 maio 2018.

SUKIK, L. et al. Herpes simplex virus type 1 epidemiology in Latin America and the Caribbean: Systematic review and meta-analytcs. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, p. e0215487, 1 abr. 2019.

TAKASHIMA, J.; ASANO, S.; OHSAKI, A. Mururins A-C, Three New Lignoids from *Brosimum acutifolium* and their Protein Kinase Inhibitory Activity. **Planta Medica**, v. 68, n. 7, p. 621–625, 22 jul. 2002.

TARAPHDAR, D. et al. Comodulation of Dengue and Chikungunya Virus Infection During a Coinfection Scenario in Human Cell Lines. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. April, p. 1–15, 2022.

THELLMAN, N. M.; TRIEZENBERG, S. J. Herpes simplex virus establishment, maintenance, and reactivation: In vitro modeling of latency. **Pathogens**, v. 6, n. 28, 1 set. 2017.

THOMAS, S. et al. Chikungunya virus capsid protein contains nuclear import and export signals. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p. 269, 28 ago. 2013.

THOMPSON, D. et al. Immunological implications of diverse production approaches for Chikungunya virus-like particle vaccines. **Vaccine**, v. 40, n. 22, p. 3009–3017, 11 maio 2022.

TOMPA, D. R. et al. Trends and strategies to combat viral infections: A review on FDA approved antiviral drugs. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 172, p. 524–541, 1 mar. 2021.

TORRES, S. L. et al. Flavonoids from *Brosimum acutifolium*. **Phytochemistry**, v. 53, n. 8, p. 1047–1050, 1 abr. 2000.

TSETSARKIN, K. A. et al. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 12, p. 1895–1906, dez. 2007.

TSETSARKIN, K. A. et al. Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution

predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 1–14, 16 jun. 2014.

TUEKPRAKHON, A. et al. Broad-spectrum monoclonal antibodies against chikungunya virus structural proteins: Promising candidates for antibody-based rapid diagnostic test development. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0208851, 17 dez. 2018.

TZENG, N. S. et al. Anti-herpetic Medications and Reduced Risk of Dementia in Patients with Herpes Simplex Virus Infections—a Nationwide, Population-Based Cohort Study in Taiwan. **Neurotherapeutics**, v. 15, n. 2, p. 417–429, 1 abr. 2018.

VAIRO, F. et al. Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention. **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 4, p. 1003-1025, 1 dez. 2019.

VASCONCELLOS, A. F. et al. Genome sequences of chikungunya virus isolates circulating in midwestern Brazil. **Archives of Virology**, v. 164, n. 4, p. 1205–1208, 3 abr. 2019.

VENTURI, C. R. et al. Chemical analysis and antiviral activity evaluation of *Baccharis anomala*. **Natural Product Research**, v. 32, n. 16, p. 1960–1962, 2018.

VIANA, C. A. DOS S. et al. **Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral**. [s.l: s.n.].

VIEIRA, E. F. DE M. et al. Mururé (*Brosimum acutifolium* Huber) in the treatment of syphilis in colonial Amazonia: historical data to the actual contribution to treatment. **Acta Botanica Brasilica**, v. 33, n. 2, p. 183–190, 1 jun. 2019.

VISINTINI JAIME, M. F. et al. In vitro antiviral activity of plant extracts from Asteraceae medicinal plants. **Virology Journal**, v. 10, p. 1–10, 2013.

WAHID, B. et al. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 58, p. 69–76, 1 maio 2017.

WANG, Y. et al. A periodic Chikungunya model with virus mutation and transovarial transmission. **Chaos, Solitons & Fractals**, v. 158, p. 112002, 1 maio 2022.

WATSON, H. et al. Stiffness, pain, and joint counts in chronic chikungunya disease: relevance to disability and quality of life. **Clinical Rheumatology**, v. 39, n. 5, p. 1679–1686, 1 maio 2020.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **The Lancet**, v. 357, n. 9267, p. 1513–1518, 12 maio 2001.

WILDER-SMITH, A. et al. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. e101–e106, 1 mar. 2017.

WIMALASIRI-YAPA, B. M. C. R. et al. Chikungunya virus in Asia – Pacific: a systematic review. **Emerging Microbes & Infections**, v. 8, n. 1, p. 70–79, 16 jan. 2019.

WONG, K. Z.; CHU, J. J. H. The Interplay of Viral and Host Factors in Chikungunya Virus Infection: Targets for Antiviral Strategies. **Viruses**, v. 10, n. 6, p. 294, 30 maio 2018.

WRESSNIGG, N. et al. Single-shot live-attenuated chikungunya vaccine in healthy adults: a phase 1, randomised controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 10, p. 1193–1203, 1 out. 2020.

YACTAYO, S. et al. Epidemiology of chikungunya in the americas. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 5, 15 dez. 2016.

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

YOUNG HAN, S. et al. Efficient Total Synthesis of Piceatannol via ( E )-Selective Wittig–Horner Reaction. **Synthetic Communications**, v. 39, n. 8, p. 1425–1432, 25 mar. 2009.

ZANOTTO, P. M. DE A.; LEITE, L. C. DE C. The Challenges Imposed by Dengue, Zika, and Chikungunya to Brazil. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 1964, p. 1–10, 28 ago. 2018.

ZARNITSYNA, V. I. et al. Advancing therapies for viral infections using mechanistic computational models of the dynamic interplay between the virus and host immune response. **Current Opinion in Virology**, v. 50, p. 103–109, 1 out. 2021.

ZELLER, H.; VAN BORTEL, W.; SUDRE, B. Chikungunya: Its History in Africa and Asia and Its Spread to New Regions in 2013–2014. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. suppl 5, p. S436–S440, 15 dez. 2016.

ZHOU, J. et al. Nanotechnology for virus treatment. **Nano Today**, v. 36, p. 101031, 1 fev. 2021.

## APÊNDICE A – Potencial antiviral e virucida de *Vitis* sp.

### Introdução

As espécies de *Vitis* sp. são conhecidas pelo uso na produção de vinhos, sucos e alimentos. A uva é nativa do Ásia Ocidental, atualmente distribuída por todo o mundo e com aplicações medicinais já conhecidas (CHEN et al., 2020). Como exemplo, polifenóis presentes na espécie *Vitis amurensis* demonstraram potencial na inibição do SARS-CoV-2, segundo Souid et al. (2022). Dessa forma, o aproveitamento da uva é intensificado a medida em que são constatadas novas atividades farmacológicas dentre as espécies.

Sabe-se, inclusive, que as sementes de uva possuem alto potencial biológico e diversos polifenóis em sua composição que atuam como antioxidantes, anticancerígenos, anti-inflamatórios, neuro protetivos e bacteriostáticos (CHEN et al., 2020). Um trabalho desenvolvido por Wang et al. (2019) demonstrou o potencial *in vitro* e *in vivo* de proantocianidinas presentes nas sementes de uva frente o câncer de fígado, resultando na inibição da autofagia e aumento de apoptose de células cancerígenas. Outro grande potencial das sementes de uva é relacionado a proteção contra doenças cardiovasculares, já que possuem compostos que agem como cardioprotetores (SABRA; NETTICADAN; WIJEKOON, 2021).

Dessa forma, estudos envolvendo o potencial biológico das sementes de uva possibilitam o aproveitamento total da planta, diminuindo o desperdício e fornecendo conhecimento para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento. O objetivo desse projeto foi verificar o potencial antiviral e virucida de um extrato de sementes de *Vitis* sp. (ESU) adquiridos comercialmente (*OptiPure*, *Chemco Industries*, Los Angeles, EUA.) frente ao HSV-1 (cepas KOS e 29-R) e ao CHIKV (cepa SLZ12). Este mesmo extrato já foi previamente avaliado para outros fins por nosso grupo de pesquisa (GARCIA et al., 2019).

### Material e métodos

A citotoxicidade do extrato foi verificada por meio do ensaio colorimétrico da sulforrodamina B, conforme item 4.4 da metodologia descrita anteriormente, para determinação da CC<sub>50</sub>. A concentração inicial utilizada foi de 250 µg/mL.

O ensaio de inibição da formação de placas de lise foi empregue para verificar a atividade anti-HSV-1 (KOS e 29-R) e anti-CHIKV do ESU. Foram realizadas cinco diluições 1:2, conforme metodologia descrita em 4.5 de modo a viabilizar a determinação da CI<sub>50</sub> e IS.

Na sequência, o ensaio virucida direto foi executado frente HSV-1 (KOS e 29-R) e CHIKV conforme o item 4.6 já descrito. Para a cepa KOS de HSV-1, também foi realizado o ensaio virucida na presença de soluções proteicas (BSA, albumina sérica bovina) conforme item 4.7. Após ambos os testes foram calculados os respectivos valores de  $CV_{50}$ . Por fim, a normativa DIN EN 14476 adaptada foi aplicada frente a mesma cepa viral (item 4.8).

## Resultados e discussão

O ESU apresentou  $CC_{50}$  de 138,2  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados dos ensaios antivirais, expressos em  $CI_{50}$  e IS, e virucida direto, expressos em  $CV_{50}$ , estão expostos na tabela a seguir.

Tabela 1 – Resultados dos ensaios antivirais e virucida [HSV-1 (KOS e 29-R) e CHIKV (SLZ12)] do extrato de semente de *Vitis* sp.

ENSAIO	HSV-1 KOS	HSV-1 29-R	CHIKV
ANTIVIRAL ( $CI_{50}$ )	8,25	16,75	14,95
ÍNDICE DE SELETIVIDADE	16,75	7,89	9,56
VIRUCIDA DIRETO ( $CV_{50}$ )	0,26	16,75	14,45

Os valores representam a média de três experimentos independentes. Fonte: A autora (2022)

O extrato obtido a partir de sementes de *Vitis* sp. não demonstrou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) ao se comparar os valores de  $CI_{50}$  de 29-R e KOS por ANOVA seguida de teste de Tukey.

As espécies de uva, pertencentes ao gênero *Vitis*, são plantas ricas em compostos bioativos com potencial medicinal, como os polifenóis. Um estudo recente constatou a inibição da replicação viral nos estágios iniciais da infecção causada por HSV-1 e SARS-CoV-2, utilizando compostos fenólicos obtidos do extrato das folhas de *Vitis vinifera* (ZANNELLA et al., 2021). Foi observado que os extratos de maior atividade para HSV-1 foram aqueles de pH 7 e 13.

Outro estudo demonstrou que o resveratrol, polifenol presente em *Vitis* sp., também atua nos estágios iniciais da replicação de HSV-1, afetando a proteína regulatória ICP-4. Pesquisas subsequentes observaram que o resveratrol também age inibindo a indução do fator nuclear kappa B – necessário para a replicação viral (DATE; DESTACHE, 2016). Corroborando esses resultados, o extrato de semente de uva utilizado no presente trabalho apresentou elevada inibição da replicação do HSV-1, tanto para cepa sensível quanto para a cepa resistente ao

aciclovir (IS = 16,75 e 7,89, respectivamente), indicando uma possível inibição da replicação viral.

Os resultados da análise por ANOVA seguida de teste de Tukey revelaram diferença significativa entre os valores de  $CV_{50}$  de KOS e 29-R e KOS e CHIKV ( $p < 0,05$ ). Esse resultado demonstra um elevado potencial virucida do extrato em uma concentração extremamente baixa (0,2610  $\mu\text{g/mL}$ ) em especial para a cepa KOS de HSV-1. Possivelmente, o ESU inviabiliza a replicação viral ao desestruturá-lo, impedindo todo o processo de replicação viral.

Isso ampara, por exemplo, a aplicação do extrato em formulações de repelentes contra *Aedes aegypti* já existentes já que não se sabe com exatidão os mecanismos pelos quais os repelentes atuam mas há conhecimento de que eles funcionam anulando o odor da pele humana e, dessa forma, redirecionam e previnem os mosquitos (GOMES FERNANDES et al., 2021). Entretanto, observando os resultados do ensaio virucida na presença de BSA para HSV-1 (KOS), devem ser utilizadas concentrações maiores que a  $CV_{50}$  para manter a atividade virucida do extrato.

Tabela 2 – Resultados da inativação de HSV-1 (cepa KOS) do extrato de semente de uva na presença de soluções proteicas.

BSA (%)	$\bar{x}$	$\sigma$
0,5	0,00	0,00
0,05	0,00	0,00
0,005	50,92	17,74
0,0005	47,28	34,28
0,00005	69,45	24,71

$\bar{x}$ : média;  $\sigma$ : desvio padrão. Fonte: A autora (2022)

Por fim, o ESU não demonstrou atividade virucida significativa em 120 segundos, pela normativa DIN EN 14476, não sendo um bom candidato ao desenvolvimento de antissépticos frente HSV-1.

### Conclusão e perspectivas

O extrato de semente de uva apresentou elevado potencial antiviral e, principalmente, virucida, podendo ser empregue em formulações microbicidas frente HSV-1, por exemplo. Entretanto, são necessários estudos de elucidação de mecanismo de ação e a análise fitoquímica para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos.

## REFERÊNCIAS

- CHEN, Y. et al. Effective utilization of food wastes: Bioactivity of grape seed extraction and its application in food industry. **Journal of Functional Foods**, v. 73, p. 104113, 1 out. 2020.
- DATE, A. A.; DESTACHE, C. J. Natural polyphenols: potential in the prevention of sexually transmitted viral infections. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 333–341, 1 fev. 2016.
- GARCIA, L. A. T. et al. Inactivation of Adenovirus in Water by Natural and Synthetic Compounds. **Food and Environmental Virology**, v. 11, n. 2, p. 157–166, 1 jun. 2019.
- GOMES FERNANDES, M. R. et al. Efficacy and safety of repellents marketed in Brazil against bites from *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: A systematic review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 44, p. 102179, 1 nov. 2021.
- SABRA, A.; NETTICADAN, T.; WIJEKOON, C. Grape bioactive molecules, and the potential health benefits in reducing the risk of heart diseases. **Food Chemistry: X**, v. 12, p. 100149, 30 dez. 2021.
- SOUID, I.; KORCHEF, A.; SOUID, S. In silico evaluation of *Vitis amurensis* Rupr. Polyphenol compounds for their inhibition potency against COVID-19 main enzymes Mpro and RdRp. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 30, n. 5, p. 570–584, 1 maio 2022.
- WANG, L.; HUANG, W.; ZHAN, J. Grape Seed Proanthocyanidins Induce Autophagy and Modulate Survivin in HepG2 Cells and Inhibit Xenograft Tumor Growth in Vivo. **Nutrients** **2019, Vol. 11, Page 2983**, v. 11, n. 12, p. 2983, 6 dez. 2019.
- ZANNELLA, C. et al. Antiviral activity of *vitis vinifera* leaf extract against sars-cov-2 and hsv-1. **Viruses**, v. 13, n. 7, 1 jul. 2021.

## APENDICE B

### 1 Participação em eventos e publicações em anais de eventos

**1.1 PAVI, C. P.;** ZUCHI, I. D. P.; KANZAKI, L. I. B.; SEGOVIA, J. F. O.; FONGARO, G.; SILVA, I. T. Preliminary antiviral and virucidal activity of Amazonian medicinal plants against Chikungunya and Herpes viroses – Apresentado no XXXII Congresso Brasileiro de Virologia de 2021.

**1.2 PAVI, C. P.;** SILVA, S. S. F. ; ZUCHI, I. D. P. ; GARCIA, L. ; FONGARO, G. ; SILVA, I. T. Preliminary evaluation of Grape Seed Extract (GSE) against Chikungunya and Herpes viruses – Apresentado no XXXII Congresso Brasileiro de Virologia de 2021.

**1.3 PAVI, C. P.;** ZUCHI, I. D. P. ; KANZAKI, L. I. B. ; BEZERRA, R. M. ; FONGARO, G. ; SILVA, I. T. Atividades antiviral e virucida de plantas medicinais amazônicas frente ao chikungunya e herpes vírus – Apresentado no XIII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia de 2021.

**1.4 PAVI, C. P.;** ZUCHI, I. D. P. ; PAULERT, P. ; FONGARO, G. ; SILVA, I. T. Preliminary evaluation of cytotoxic and antiherpes activities of Curcuma zedoaria (Christm.) Roscoe and Solanum cernuum Vell. – Apresentado no XXXI Congresso Brasileiro de Virologia de 2020.

**1.5 SILVA, R.;** PAVI, C. P. ; ZUCHI, I. D. P. ; SAVI, B. P. ; SOUZA, E. B. ; CADAMURO, R. D. ; ROGOVSKI, P. ; GUTERRES, I. Z. ; REIS, J. G. ; SILVA, V. C. ; SILVA, S. S. F. ; SOUZA, D. S. M. ; CRUZ, A. C. C. ; SILVA, I. T. ; FONGARO, G. VirAll Brazil: Brazilian virology network focused on one health approach – Apresentado no XXXI Congresso Brasileiro de Virologia de 2020.

### 2 Curso de curta duração ministrado

**2.1 FONGARO, G.;** CADAMURO, R. D.; SILVA, R.; **pavi, c. p.;** SOUZA, E. B.; CORREA, V. S.; REIS, J. G. Virologia Aplicada à Saúde Única – Ministrado na Semana Acadêmica da Biologia, UFSC (2021)

### **3 Projetos realizados em paralelo**

#### **3.1 Prestações de serviço**

Ensaio virucidas conforme a normativa internacional ISO 18184-2019, utilizando modelos virais envelopados (vírus da Hepatite Murina 3 (MHV-3)) e não-envelopados (adenovírus humanos tipos 2 e 5 (HaDV-2 e HaDV-5)) frente amostras de tecidos, plásticos e outras superfícies enviadas por empresas e outras instituições do Brasil.

#### **3.2 Citotoxicidade de compostos sintéticos e semissintéticos**

Triagem citotóxica de mais de 100 compostos sintéticos e semissintéticos fornecidos em parceria com o Departamento de Química, pelo ensaio colorimétrico da sulforrodamina B na linhagem celular Vero.

#### **3.3 Citotoxicidade de peptídeos**

Ensaio colorimétrico da sulforrodamina B frente peptídeos fornecidos em parceria com o Laboratório de Imunologia Aquática.

#### **3.4 Atividade virucida de formulações a partir de produtos naturais pelo ensaio DIN EN 14476:2015-12 adaptado**

Atividade virucida utilizando MHV-3, HaDV-2 e HaDV-5, HSV-1 (KOS) utilizando formulações de produtos naturais fornecidas em parceria com o Laboratório de Farmacotécnica da UFSC e utilizando a DIN EN 14476:2015-12 conforme adaptações.

### **4 Publicações em fase de elaboração**

**4.1 PAVI, C.P.; PRÁ, I.D.; KANZAKI, L.I.B.; FONGARO, G.; SILVA, I.T..** Antiviral and Virucidal potential of Amazonian Medicinal Plants.

**4.2 PAVI, C.P.; PRÁ, I.D.; KANZAKI, L.I.B.; FONGARO, G.; SILVA, I.T..** Grape seed extract for control of Herpes Simplex infections.