

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Farmácia**

**DÉBORA DENARDIN LÜCKEMEYER**

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTI-HERPÉTICA DE**  
***Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae (erva-mate)**

**FLORIANÓPOLIS**

**2009**

DÉBORA DENARDIN LÜCKEMEYER

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTI-HERPÉTICA DE  
*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae (erva-mate)**

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

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

FLORIANÓPOLIS

2009

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTI-HERPÉTICA DE**  
***Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae (erva-mate)**

**POR**

**DÉBORA DENARDIN LÜCKEMEYER**

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

**Orientadora:**

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

**Comissão Examinadora:**

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fernão Castro Braga  
(Universidade Federal de Minas Gerais/ MG)

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto  
(MIP/CCB/UFSC)

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Tereza Rojo de Almeida  
(CIF/CCS/UFSC)

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

Lückemeyer, Débora Denardin

Avaliação da ação anti-herpética de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae (erva-mate) / Débora Denardin Lückemeyer. Florianópolis. 2009. 130 p.

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

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

1. atividade antiviral; 2. Herpes Simplex Vírus tipos 1 e 2; 3. *Ilex paraguariensis*; 4. erva-mate; 5. mecanismo de ação. I. Simões, Cláudia Maria Oliveira Simões; II. Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmácia; III. Título.

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

Este trabalho recebeu apoio financeiro do CNPq através do Edital Universal (2008-2010) e da concessão da bolsa de Apoio Técnico (AT).

Aos meus pais Ademir e Angelina e  
às minhas irmãs Graziela e Juliana,  
pelo apoio, compreensão e amor.

## AGRADECIMENTOS

- ☞ Aos meus pais Ademir e Angelina agradeço pelo apoio e todo carinho dedicado durante toda vida. Sou muito grata pelos sacrifícios feitos para minha formação profissional e moral. Acredito que seu maior foi abdicar da convivência diária porém, apesar da distância física sempre senti que eles estavam ao meu lado. Amo muito vocês!
- ☞ Às minhas irmãs Juliana e Graziela pela força, conselhos e amizade. Agradeço também pelos ouvidos de prontidão. Amo vocês!
- ☞ Devo um agradecimento especial ao Marcelo principalmente pelo grande exercício da sua paciência durante esses dois anos do mestrado. Ele foi uma das peças fundamentais, pois deu apoio, compreensão e soube ser minha melhor companhia durante os momentos difíceis.
- ☞ Ao professor, mestre, amigo e “pai científico” Flávio Henrique Reginatto agradeço todo o empenho pela minha formação. Obrigada pelo direcionamento e incentivo na carreira acadêmica. Com certeza sem a sua orientação não teria chegado até aqui.
- ☞ À professora Cláudia Maria Oliveira Simões agradeço pelas grandes lições profissionais e de vida que aprendi trabalhando ao seu lado. Obrigada pelo prazer de fazer parte do grupo de pesquisa sob sua coordenação. Serei sempre muito grata.
- ☞ Ao professor Edmundo Carlos Grisard pela amizade, estímulo e também por abrir oportunidades de crescimento intelectual atuando numa área totalmente diferente daquela que pensei um dia trabalhar. Obrigada por permitir a realização dos experimentos moleculares no Laboratório de Protozoologia.
- ☞ À professora Célia Regina Monte Barardi pelas palavras de incentivo, amizade e colaboração em todos os momentos.
- ☞ Ao professor Eloir Paulo Schenkel e à sua aluna de mestrado Maria Izabel Goulart Moritz, por terem gentilmente cedido as amostras.
- ☞ À professora Cecília Menks por disponibilizar o microscópio utilizado no ensaio de redução do tamanho das placas de lise.
- ☞ Aos membros da banca por avaliarem e melhorarem a qualidade deste trabalho.
- ☞ À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (PGFAR) e ao CNPq pela bolsa de apoio técnico.

- ☞ Aos verdadeiros amigos que fiz durante minha jornada no LVA, em especial Vanessa Müller, Thiago Caon, Patrícia Hermes Stoco, Cassandra Aresi, Beatriz Mendes de Sousa e Aline Schilindwein, que foram meus companheiros inseparáveis. Vocês sempre ocuparão um lugar especial no meu coração.
- ☞ À amiga Izabella Thaís da Silva agradeço pela companhia durante o mestrado e amizade.
- ☞ À amiga Carla Regina Andrighetti-Fröhner, pela amizade, ensinamentos e ajuda durante todo o mestrado.
- ☞ À grande amiga Thaís Bróglia, agradeço pela presença, mesmo estando ausente fisicamente, e à amiga Alessandra Zottis, agradeço pelas palavras de incentivo e amizade.
- ☞ À amiga Ligia Moreiras Sena agradeço por ter aparecido inesperadamente em minha vida e pelos grandes ensinamentos.
- ☞ À Cássia Caon, Virgínia Demarchi Kappel e Vanessa Moresco, com as quais dividi as conquistas, algumas dúvidas e bons momentos.
- ☞ Aos colegas de trabalho do LVA: Jonas, Jadel, Francielle, Francielly, Marina, Jéssica, Adriana, Carol, Cris, Érica, Ariadne, agradeço as palavras de compreensão e paciência nos momentos difíceis.
- ☞ Aos demais amigos, professores e funcionários, que de alguma forma, colaboraram com este trabalho, meu muito obrigado.
- ☞ À Deus pela força e por não me abandonar nos momentos mais difíceis.

*Débora Denardin Lückemeyer*



## RESUMO

Os Herpes Simplex Virus tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) são vírus envelopados de DNA, que causam várias infecções em humanos. O HSV-1 é geralmente associado a infecções orofaciais e encefalites, ao passo que o HSV-2 comumente causa infecções genitais. Ambos estabelecem infecções latentes em neurônios sensoriais e, durante a reativação, causam lesões na pele e mucosas. O aciclovir, um análogo de nucleosídeo, vem sendo muito utilizado para o tratamento sistemático de infecções pelos HSV. Ele é um fármaco antiviral altamente seletivo, pois é fosforilado pela timidina quinase somente em células infectadas. No entanto, o uso indiscriminado do aciclovir e de fármacos correlatos provocou o surgimento de cepas resistentes aos HSV, principalmente, em pacientes imunocomprometidos. Este fato ressalta a necessidade de desenvolver novos fármacos anti-herpéticos frente a cepas virais primitivas e/ou cepas fármaco-resistentes. Os produtos naturais são uma fonte rica de compostos com potenciais atividades farmacológicas, incluindo efeitos antivirais. Uma estratégia que pode ser utilizada para a pesquisa e o desenvolvimento de tais fármacos é a triagem de extratos de plantas, seguida pelo fracionamento bioguiado dos extratos bioativos visando à purificação de frações e subfrações bioativas e/ou ao isolamento do(s) composto(s) bioativo(s). As folhas da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) são amplamente empregadas no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai para a preparação de várias bebidas não alcoólicas, como o chimarrão. Considerando seus aspectos culturais e econômicos, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação anti-HSV-1 e anti-HSV-2 do extrato bruto hidroetanólico e de frações e subfrações de folhas da erva-mate, através de um fracionamento bioguiado. Assim, este extrato bruto e seis subfrações, obtidas a partir da extração do mesmo com *n*-butanol seguida de outros processos extrativos e cromatográficos, foram avaliados frente ao HSV-1 (cepa KOS) e ao HSV-2 (cepa 333), através de diferentes estratégias metodológicas, utilizando as técnicas do MTT e de inibição da formação das placas de lise virais. Todas as amostras demonstraram baixos efeitos citotóxicos nas concentrações avaliadas em células VERO e GMH AH1 pelo ensaio do MTT. Esta triagem preliminar indicou que a subfração 5A (obtida da extração do resíduo NaOH com AcOEt) foi a mais ativa (IS=187,62, HSV-1 e IS=263,63, HSV-2) e seu mecanismo de ação foi investigado. Adicionalmente, foi então avaliada sua atividade virucida, sua ação antiviral em função do tempo de adição da mesma nas células, sua influência sobre a adsorção e a penetração dos vírus nas células, e sua interferência na dispersão viral intercelular e na síntese protéica viral. A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que a atividade anti-herpética detectada parece ser mediada pela redução da infectiosidade viral, inibição da adsorção e da penetração dos vírus nas células e da difusão radial viral, diminuindo ou bloqueando a expressão das proteínas virais ICP27, ICP4, gD e gE. Esses resultados sugerem que a subfração 5A possui atividade anti-HSV-1 e anti-HSV-2, provavelmente correlacionada com as saponinas triterpênicas e os compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos) existentes nesta subfração, através de um efeito sinérgico.

**Unitermos:** Atividade antiviral, Herpes Simplex Virus tipo 1 (HSV-1), Herpes Simplex Virus tipo 2 (HSV-2), *Ilex paraguariensis*, erva-mate, mecanismo de ação antiviral.

## ABSTRACT

### **Evaluation of antiherpes activity of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae (erva-mate)**

Herpes Simplex Virus types 1 and 2 (HSV-1 and HSV-2) are enveloped DNA viruses, which cause several infections in human beings. HSV-1 is generally associated with orofacial infections and encephalitis, whereas HSV-2 usually causes genital infections. Both viruses establish latent infections in sensorial neurons and upon reactivation cause lesions in skin and mucosal membranes. Acyclovir, a nucleoside analog, has been widely used for treatment of HSV infections. It is a highly selective antiviral drug because it is specifically phosphorylated by thymidine kinase in infected cells. However, the extensive clinical use of acyclovir and related drugs has led to the emergence of resistant HSV strains, mainly in immunocompromised patients. This fact highlights a crucial need for the development of new antiherpetic drugs active against wild-type and drug-resistant HSV strains. Natural products are a rich source of compounds with potential pharmacological activities, including antiviral effects. One strategy that can be used for the research and development of such drugs is the antiviral screening of plant extracts followed by the bioassay-guided fractionation of bioactive extracts in order to purify the bioactive fractions and subfractions and/or to isolate the bioactive(s) compound(s). Yerba-mate leaves (*Ilex paraguariensis*) are widely employed in Brazil, Argentina, Paraguay and Uruguay for the preparation of several nonalcoholic beverages, like *chimarrão*. In relation to its chemical composition, the presence of methylxantines, triterpenoid saponins, flavonoids, phenolic acids and minerals was already reported. Considering the cultural and economical aspects of this plant, the aim of this study was to evaluate the anti-HSV-1 and anti-HSV-2 activity of the crude hydroethanolic extract and the fractions and subfractions of *Ilex paraguariensis* leaves through a bioassay-guided fractionation. Thus being, this crude extract and six subfractions, obtained by *n*-butanol extraction of this extract followed by other extractive and chromatographic procedures, were tested against HSV-1 (strain KOS) and HSV-2 (strain 333) replication through different methodological strategies by using MTT and viral plaque reduction assays. All tested samples showed low cytotoxic effects at the tested concentrations on VERO and GMK AH1 cells by MTT assay. This preliminary antiherpes screening indicated that the subfraction 5A (obtained by AcOEt extraction of the NaOH residue) was the most active (IS=187.62, HSV-1 and IS=263.63, HSV-2) and its mechanism of action was elucidated. Additionally, we investigated its virucidal activity, the antiviral action in function of time, the influence on the attachment and penetration of viruses into cells, and the interference with cell-to-cell spread and viral protein synthesis. The mechanism of antiviral action seems to be mediated by the reduction of viral infectivity, the inhibition of virus entry into cells and cell-to-cell viral spread leading to impaired levels of viral proteins ICP27, ICP4, gD and gE. These results suggest that the subfraction 5A shows anti-HSV-1 and HSV-2 action probably linked to a synergic effect of the triterpenoid saponins and the phenolic compounds (flavonoids and phenolic acids) present in this subfraction.

**Keywords:** Antiviral activity, Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1), Herpes Simplex Virus type 2 (HSV-2), *Ilex paraguariensis*, yerba-mate, mechanism of antiviral action.

## LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de etila
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ACV	Aciclovir
BCC	Blocos Completos Casualizados
ABS	Albumina bovina sérica
CC	Controle celular
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica a 50%
CCD	Cromatografia em camada delgada
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória a 50%
CL	Cromatografia líquida
CV	Controle viral
CV <sub>50</sub>	Concentração virucida a 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	Carboximetilcelulose
ECP	Efeito citopático viral
EM	Espectrometria de massas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EtOH	Etanol
G	Glicoproteína viral
GAG	Receptores glicosaminoglicanos
gB	Glicoproteína B do HSV
gC	Glicoproteína C do HSV
gD	Glicoproteína D do HSV
gE	Glicoproteína E do HSV
gH	Glicoproteína H do HSV
gI	Glicoproteína I do HSV
gL	Glicoproteína L do HSV
GMK AH1	Linhagem celular proveniente de fibroblastos de rins de macaco verde da África ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HS	Receptor celular sulfato de heparana
HSV	Herpes Simplex Vírus
HSV-1	Herpes Simplex Virus tipo 1
HSV-2	Herpes Simplex Virus tipo 2
HVEM	<i>Herpesvirus entry mediator</i> – Receptor mediador da entrada do herpesvírus
ICP	Proteína de célula infectada
IR	Infeciosidade residual
IS	Índice de seletividade
Kpb	kilo pares de base
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i> , Meio Essencial Mínimo
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidade de infecção
Nm	Nanômetro
MOI	Multiplicidade de infecção

MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-difeniltetrazólio
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Tampão fosfato
PCR	Reação em Cadeia Polimerase
P.I.	Pós-infecção
PSA	Solução contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina
R	Radical
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SNK	<i>Student-Newman-Keuls</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UFP	Unidade formadora de placa
UFP/ml	Unidade formadora de placa por mililitro
UV	Ultravioleta
V	Volts
VERO	Linhagem celular proveniente de fibroblastos de rim de macaco verde da África ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )
Vhs	<i>Virion host shut</i>
VP	<i>Viral protein</i> , Proteína viral

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Morfologia dos vírions dos herpesvírus .....	29
<b>Figura 2:</b>	Passos da entrada dos herpesvírus na célula.....	31
<b>Figura 3:</b>	Diagrama representando replicação intracelular viral .....	32
<b>Figura 4:</b>	Etapas de liberação do vírion desde o núcleo até o espaço extracelular .....	33
<b>Figura 5:</b>	Etapas da infecção e latência dos herpesvírus.....	35
<b>Figura 6:</b>	Quantidade de erva-mate produzida (folhas verdes) no Brasil em toneladas.....	39
<b>Figura 7:</b>	Aspectos morfológicos de um espécime de <i>Ilex paraguariensis</i> ...	41
<b>Figura 8:</b>	Esquema do fracionamento do extrato bruto hidroetanólico das folhas de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	58
<b>Figura 9:</b>	Perfil cromatográfico do extrato bruto, frações e subfrações das folhas de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	75
<b>Figura 10:</b>	Perfil cromatográfico extrato bruto, frações e subfrações das folhas de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	76
<b>Figura 11:</b>	Efeito citopático causado pelo HSV-1 em células VERO .....	80
<b>Figura 12:</b>	Resultados da avaliação da citotoxicidade e da atividade anti-HSV-1 <i>in vitro</i> do extrato bruto, frações e subfrações de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	82
<b>Figura 13:</b>	Resultados da avaliação da citotoxicidade e da atividade anti-HSV-2 <i>in vitro</i> do extrato bruto, frações e subfrações de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	83
<b>Figura 14:</b>	Efeito da subfração 5A sobre a expressão da proteína $\beta$ -actina (constitutiva) e sobre as proteínas ICP27, ICP4, gD e gE do HSV-1 em células VERO, detectado por <i>Western Blotting</i> .....	107
<b>Figura 15:</b>	Proposta do mecanismo da ação anti-HSV-1 e anti-HSV-2 da subfração 5A .....	109

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b>	Denominação dos vírus herpéticos humanos e características relativas às suas células alvo e latência.....	26
<b>Quadro 2:</b>	Funções de algumas glicoproteínas dos HSV ligadas ao envelope viral.....	28
<b>Quadro 3:</b>	Principais flavonóides encontrados em <i>Ilex paraguariensis</i> .....	46
<b>Quadro 4:</b>	Principais ácidos fenólicos encontrados em <i>Ilex paraguariensis</i> ..	46
<b>Quadro 5:</b>	Saponinas de <i>Ilex paraguariensis</i> que possuem como sapogenina o ácido ursólico .....	50
<b>Quadro 6:</b>	Saponinas de <i>Ilex paraguariensis</i> que possuem como sapogenina o ácido oleanólico .....	51
<b>Quadro 7:</b>	Algumas atividades farmacológicas relatadas para <i>Ilex paraguariensis</i> .....	52
<b>Quadro 8:</b>	Resultado da análise cromatográfica em camada delgada do extrato, fração e subfrações de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	76
<b>Quadro 9:</b>	Títulos infecciosos das suspensões-estoques.....	77

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b>	Resultados da avaliação efeito virucida a 37 °C e a 4 °C (HSV-1 e HSV-2) do extrato (1) e subfrações (4, 5A, 5A1 e 5A2) de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	88
<b>Gráfico 2:</b>	Resultados da avaliação da ação virucida a 4 °C e 37 °C frente ao HSV-1 de diferentes concentrações da subfração 5A.....	89
<b>Gráfico 3:</b>	Resultados da avaliação da ação virucida a 4 °C e 37 °C frente ao HSV-2 de diferentes concentrações da subfração 5A.....	90
<b>Gráfico 4:</b>	Resultados da avaliação do efeito do pré-tratamento com a subfração 5A .....	93
<b>Gráfico 5:</b>	Atividade da subfração 5A sobre as partículas virais .....	94
<b>Gráfico 6:</b>	Resultados da avaliação do efeito do extrato bruto, frações e subfrações de <i>Ilex paraguariensis</i> no ensaio de adsorção tradicional do HSV-1 e HSV-2 .....	97
<b>Gráfico 7:</b>	Resultados da inibição da propagação intercelular do vírus HSV-1 (cepa KOS).....	102
<b>Gráfico 8:</b>	Resultados da inibição da propagação intercelular do vírus HSV-2 (cepa 333).....	102
<b>Gráfico 9:</b>	Efeito do tempo de adição da subfração 5A e do aciclovir no ciclo de replicação do HSV-1.....	103
<b>Gráfico 10:</b>	Efeito do tempo de adição da subfração 5A e do aciclovir no ciclo de replicação do HSV-2.....	104

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Citotoxicidade do extrato bruto, fração e subfrações isoladas de <i>Ilex paraguariensis</i> , frente às células VERO e GMK AH1.....	79
<b>Tabela 2:</b>	Resultados obtidos da triagem anti-herpética (anti-HSV-1 e anti-HSV-2) do extrato bruto, frações e subfrações de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	81
<b>Tabela 3:</b>	Resultados da avaliação do efeito virucida a 37°C e a 4°C (HSV-1 e HSV-2) do extrato bruto (1) e subfrações (4, 5A, 5A1, 5A2) de <i>Ilex paraguariensis</i> .....	87
<b>Tabela 4:</b>	Resultados da atividade virucida frente ao HSV-2 da subfração 5A na presença de soluções ricas em proteínas.....	91
<b>Tabela 5:</b>	Resultados da avaliação do efeito das diferentes amostras avaliadas de <i>Ilex paraguariensis</i> na adsorção do HSV-1 e do HSV-2.....	96
<b>Tabela 6:</b>	Resultados do efeito da subfração 5A de <i>Ilex paraguariensis</i> na penetração do HSV-1 e do HSV-2.....	99



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	22
2.1	Plantas medicinais e metabólitos secundários com ação antiviral....	22
2.2	Vírus herpéticos.....	26
2.2.1	Aspectos Gerais .....	26
2.2.2	Herpes Simplex Virus tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2).....	34
2.2.3	Latência viral.....	32
2.2.4	Terapêutica anti-herpética.....	35
2.3	<i>Ilex paraguariensis</i> .....	38
2.3.1	Aspectos Gerais .....	38
2.3.2	Aspectos botânicos .....	40
2.3.3	Aspectos fitoquímicos .....	41
2.3.3.1	Compostos fenólicos da erva-mate (flavonoides e ácidos fenólicos)	42
2.3.3.2	Saponinas da erva-mate.....	46
2.3.4	Aspectos farmacológicos .....	51
2.3.5	Potenciais aplicações das saponinas da erva-mate.....	53
3	OBJETIVOS .....	55
3.1	Objetivo geral .....	55
3.2	Objetivos específicos .....	55
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	57
4.1	Material vegetal .....	57
4.2	Preparo e fracionamento do extrato bruto .....	57
4.3	Análise cromatográfica .....	57
4.4	Preparo das soluções das amostras .....	59
4.5	Culturas celulares .....	59
4.6	Vírus .....	60
4.6.1	Origem das cepas virais .....	60
4.6.2	Preparo das suspensões-estoques virais .....	60
4.6.3	Determinação dos títulos infecciosos virais .....	61
4.7	Avaliação da citotoxicidade .....	62
4.7.1	Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio (MTT) .....	62
4.8	Avaliação da potencial atividade antiviral.....	63

4.8.1	Método de inibição da formação das placas de lise.....	63
4.9	Avaliação do provável mecanismo da ação anti-herpética.....	64
4.9.1	Avaliação da ação virucida direta das amostras.....	64
4.9.2	Avaliação da ação virucida da amostra selecionada em presença de soluções protéicas.....	65
4.9.3	Avaliação do efeito do pré-tratamento com a amostra selecionada.	66
4.9.4	Avaliação do efeito das amostras na adsorção viral.....	66
4.9.4.1	Ensaio de adsorção tradicional.....	66
4.9.4.2	Ensaio de pós-adsorção.....	67
4.9.5	Avaliação do efeito da amostra selecionada na penetração viral.....	67
4.9.6	Avaliação do efeito da amostra selecionada na propagação intercelular viral.....	68
4.9.7	Avaliação do efeito do tempo de adição da amostra selecionada no ciclo de replicação viral.....	69
4.9.8	Avaliação do efeito da amostra selecionada na expressão das proteínas virais .....	70
4.10	Delineamento experimental e análise estatística .....	71
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	73
5.1	Preparo e fracionamento do extrato bruto.....	73
5.2	Determinação dos títulos virais .....	77
5.3	Avaliação da Citotoxicidade .....	77
5.4	Avaliação da potencial atividade antiviral .....	79
5.5	Avaliação do provável mecanismo da ação anti-herpética detectada .....	86
5.5.1	Avaliação da ação virucida .....	86
5.5.2	Avaliação do efeito do pré-tratamento com a amostra selecionada.....	93
5.5.3	Avaliação do efeito das amostras na adsorção viral.....	95
5.5.4	Avaliação do efeito da amostra selecionada na penetração viral.....	99
5.5.5	Avaliação do efeito da amostra selecionada na propagação intercelular viral.....	100
5.5.6	Avaliação do efeito do tempo de adição da amostra selecionada no ciclo de replicação viral.....	103
5.5.7	Avaliação do efeito da amostra selecionada na expressão das proteínas virais .....	107
5.6	Proposta preliminar do mecanismo da ação anti-herpética da subfração 5A .....	108
6	CONCLUSÕES .....	110

7	PERSPECTIVAS .....	112
	REFERÊNCIAS.....	113

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas virais são um importante problema de saúde no mundo. Embora a busca por novos fármacos antivirais seja intensa, os avanços são poucos, já que a maioria destes compostos possui aplicações restritas, fazendo com que um baixo número deles seja aprovado pelas autoridades governamentais para uso clínico (VLINCK; VANDEN BERGHE, 1998). O atual arsenal terapêutico para infecções virais consiste em torno de 40 fármacos aprovados para uso clínico, sendo 20 deles utilizados para o tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os demais antivirais são utilizados contra os vírus das hepatites B e C, vírus influenza, vírus respiratório sincicial e vírus herpéticos, incluindo neste último grupo o vírus da varicela zoster, o citomegalovírus e os Herpes Simplex Virus tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) (DE CLERCQ, 2005b; ROTTINGHAUS; WHITLEY, 2007).

Dentre os inúmeros vírus de importância clínica, destaca-se a família dos vírus herpéticos, onde encontram-se os HSV-1 e HSV-2, que infectam grande número de pessoas no mundo todo. Os sintomas da doença não são sempre aparentes, mesmo durante a infecção primária, e podem variar desde lesões cutâneas ou de mucosas até encefalites ou doenças sistêmicas, envolvendo múltiplos órgãos. A transmissão da infecção de pessoa a pessoa ocorre, geralmente, pelo contato íntimo e compartilhamento de fluidos contendo os vírus (WHITLEY; ROIZMAN, 2001; SPEAR et al., 2006).

A pesquisa por agentes antivirais seletivos tem sido intensa nos últimos anos, mas a necessidade de novas terapias antivirais ainda persiste já que muitos dos problemas relacionados ao tratamento das infecções herpéticas, tais como o aparecimento de cepas virais resistentes, alta toxicidade sistêmica e baixa eficácia em pacientes imunocomprometidos, ainda não foram solucionados (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; SUPERTI; AMMENDOLI; MARCHETTI, 2008).

Os produtos naturais possuem grande diversidade química, podendo ser considerados uma fonte inesgotável de compostos com promissoras atividades biológicas, não apenas pelo grande número de espécies com propriedades medicinais inexploradas, mas principalmente pela variedade estrutural dos metabólitos sintetizados. Além disso, grande parte das substâncias bioativas pode

ser isolada e modificada estruturalmente, buscando maior eficácia e menor toxicidade (HUDSON, 1990; NAITHANI et al., 2008; SCHMIDT et al., 2008).

Uma espécie vegetal que possui relevância econômica, cultural e social na região sul do Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai é a erva-mate, pois é muito consumida nestes locais na forma de chimarrão ou outros tipos de bebidas. Esta espécie é também utilizada na medicina popular como estimulante do sistema nervoso central, digestiva e diurética (PIO-CORRÊA, 1978; LORENZI; MATOS, 2008). Sua constituição química já é bem conhecida e, várias atividades biológicas já foram relatadas para esta planta (ver item 2.3.4 da revisão bibliográfica).

O Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC (LVA) vem, há vários anos, investigando a potencial atividade antiviral de produtos sintéticos e naturais. Nosso grupo de pesquisa relatou recentemente os resultados de uma triagem antiviral de plantas da América do Sul (MÜLLER et al., 2007), tendo sido demonstrada a atividade anti-herpética do extrato aquoso das folhas da erva-mate frente ao HSV-1. Em paralelo, outro trabalho, também realizado por Müller (2006), descreveu a atividade antiviral dos seus extratos aquoso, acetato de etila, *n*-butanólico e resíduo aquoso. Entretanto, os ácidos fenólicos (ácidos caféico e clorogênico) presentes no extrato acetato de etila (que foi estudado de forma mais aprofundada por este autor) não apresentaram atividade promissora frente ao HSV-1.

No presente trabalho, foi dada ênfase ao estudo da potencial ação antiviral de algumas frações e subfrações obtidas do fracionamento de um extrato hidroetanólico de folhas da erva-mate, mais especificamente da fração *n*-butanólica, por ter sido aquela com atividade mais relevante na triagem preliminar.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Plantas medicinais e metabólitos secundários com ação antiviral

O metabolismo primário das plantas é responsável pela produção de celulose, ligninas, proteínas, lipídios, açúcares e outras substâncias, que realizam suas principais funções vitais. Além disso, considera-se que uma das principais funções do seu metabolismo secundário seja a biossíntese de moléculas, muito diversificadas estruturalmente, tais como alcaloides, terpenoides e derivados de fenilpropanoides, que protegem as plantas de agentes nocivos, tais como microorganismos patogênicos, insetos e animais herbívoros (SANTOS, 2007).

Além disso, estes metabólitos vêm sendo estudados, ao longo dos tempos, e há inúmeros relatos de atividades farmacológicas e aplicações clínicas, tanto de extratos e frações purificadas de plantas medicinais quanto de compostos isolados (WANG, 2008). Análises recentes da origem de fármacos, desenvolvidos no período de 1981 a 2006, mostraram que produtos naturais ou seus derivados compreendem cerca de 50% de todos os novos medicamentos lançados no mercado farmacêutico neste período (NEWMAN; CRAGG, 2007; NEWMAN, 2008).

É bem conhecido que desde os tempos antigos, as plantas são utilizadas com finalidades terapêuticas. Enquanto buscava alimentação para sua sobrevivência, o homem foi descobrindo as propriedades tóxicas ou curativas das plantas. O conhecimento empírico associado ao conhecimento científico permitiu grandes avanços no tratamento de doenças, através do uso de fármacos extraídos de plantas, como por exemplo, atropina (*Atropa belladona*), morfina (*Papaver somniferum*) e digoxina (*Catharanthus roseus*), entre tantos outros (VERPOORTE, 2000; ALVES, 2001; CHATTOPADHYAY; NAIK, 2007).

Adicionalmente, entre 2000 e 2005, 23 novos fármacos de origem natural foram lançados no mercado, incluindo aqueles derivados de microorganismos, animais e, principalmente, plantas. Cinco destes novos fármacos são derivados de plantas ou de seus metabólitos. Entre eles, podemos citar apomorfina (derivado da morfina extraída de *Papaver somniferum*), utilizada para tratar doença de Parkinson; tiotrópio, (derivado da atropina extraída de *Atropa belladona*), utilizado para tratar broncoespasmos associados com doença pulmonar obstrutiva crônica; e galantamina (alcaloide de *Galanthus nivalis*), utilizada para tratar doença de Alzheimer por sua ação inibitória sobre a acetilcolinesterase (CHIN et al., 2006).

Assim sendo, uma das estratégias na busca de novos fármacos antivirais derivados de produtos naturais baseia-se no estudo de extratos de plantas medicinais. Vários estudos têm sido realizados com o intuito de avaliar a atividade anti-HSV de extratos destas plantas e de compostos delas isolados, utilizando informações etnofarmacológicas como base para a seleção das espécies (VLIETINCK; VANDEN BERGHE, 1998; CHATTOPADHYAY; NAIK, 2007).

Agentes antivirais, inclusive os derivados de produtos naturais, podem atuar nas diversas etapas da replicação viral, desde a adsorção do vírus na célula hospedeira até sua liberação, o que pode resultar em mecanismos de ação complementar àqueles dos fármacos atualmente disponíveis (HUDSON; TOWERS, 1999; KHAN et al., 2005; DIXON et al., 2007; NAITHANI et al., 2008; XIANG; PEI; WANG, 2008).

Como citado anteriormente, inúmeros estudos com extratos de plantas já foram realizados e mostraram algum tipo de atividade antiviral e, atualmente, se conhece vários grupos de metabólitos secundários que seriam os responsáveis pelas atividades detectadas (HUDSON, 1990; SIMÕES et al., 1999; JASSIM; NAJI, 2003; CHATTOPADHYAY; NAIK, 2007; NEWMAN; CRAGG, 2007; CHATTOPADHYAY; KHAN, 2008; MUKHTAR et al., 2008; XIANG; PEI; WANG, 2008). À título ilustrativo, dentre os metabólitos bioativos, pode-se citar alcaloides, taninos, cumarinas, terpenos, quinonas, lignanas, polissacarídeos, ácidos fenólicos, flavonoides e saponinas triterpênicas. Nesta revisão, mais especificamente, alguns exemplos de relatos de ação anti-HSV dos três últimos grupos serão abordados com maior profundidade, tendo em vista sua presença nas folhas da erva-mate (ver item 2.3.3 desta revisão bibliográfica).

A atividade antiviral de saponinas triterpênicas isoladas de *Anagallis arvensis* foi avaliada frente a vários vírus, incluindo o HSV-1. Os resultados demonstraram que a ação antiviral parece envolver a inibição da adsorção viral às células, não apresentando efeito virucida (AMOROS; FAUCONNIER; GIRRE, 1987).

Duas saponinas triterpênicas isoladas de fontes naturais demonstraram atividade anti-herpética. A saponina isolada da planta brasileira *Thinouia coriacea* (s21), com aglicona do ácido oleanólico, e a saponina isolada da planta chinesa *Sargentodoxa cuneata* (s17), com aglicona do ácido ursólico. Ambas foram ativas e demonstraram efeito concentração-dependente. Os índices de seletividade foram de 16 para a s17 e de 7,4 para a s21. Os resultados obtidos sugerem que ambas

interferem no estágio de replicação viral dentro da célula. A atividade do composto s21 pode ser explicada pela redução da síntese do DNA viral e pela pronunciada atividade na fase inicial (3-9h) do ciclo de replicação viral. O composto s17 inibiu significativamente a replicação viral entre 9-12h pós-infecção e sua atividade parece estar relacionada com a fase tardia da síntese protéica (proteínas estruturais do capsídeo viral). Apesar das diferenças estruturais destas duas saponinas, o alvo de ação parece ser sempre após a penetração, preferencialmente nas etapas precoce e tardia da replicação viral (SIMÕES; AMOROS; GIRRE, 1999). A característica que contribui positivamente para a atividade antiviral das saponinas do grupo ursano é a hidroxila ligada ao C19 do ácido ursólico, enquanto que para as do grupo oleanano, o grupamento carboxílico livre na posição C28 do ácido ursólico parece ser essencial, pois quando substituídas a ação diminui ou até mesmo desaparece. Além disso, o número, a posição e o tipo de açúcar podem interferir na atividade antiviral das saponinas (SIMÕES et al., 1990).

A atividade antiviral de duas saponinas triterpênicas (soyasaponinas I e II), isoladas de *Glycine max* (soja), foi avaliada frente ao HSV-1. A soyasaponina II foi mais ativa que a soyasaponina I, inibindo a replicação do HSV-1, através de um efeito na penetração e na síntese de proteínas; um efeito virucida parece também estar envolvido. Quando o aciclovir e as soyasaponinas foram avaliados em combinação, houve um efeito aditivo na ação antiviral (HAYASHI et al., 1997).

Ikeda e colaboradores (2005) avaliaram a atividade anti-HSV-1 de 15 compostos com núcleo triterpênico do tipo oleanano. Os resultados *in vitro* revelaram que o ácido glicirrético possui atividade anti-HSV 10 vezes maior do que a glicirrizina. Entretanto, *in vivo* a atividade da glicirrizina administrada oralmente pôde ser atribuída ao ácido glicirrético liberado após a hidrólise da glicirrizina pelas bactérias intestinais.

Extratos aquosos de *Quillaja saponaria* contendo saponinas triterpênicas foram capazes de inibir, em baixas concentrações não-citotóxicas, seis tipos de vírus, entre eles o HSV. Os ensaios realizados revelaram ausência de efeito virucida, porém houve interação das amostras com os receptores celulares e virais, impedindo a adsorção e reduzindo a propagação viral para células não infectadas. Os autores sugeriram a associação de extratos de *Q. saponaria* com agentes espermicidas para produzir um produto com efeito espermicida e virucida, capaz



também de bloquear a adsorção viral às células no local tratado (RONER et al., 2007).

Amoros, Simões e Girre (1992) investigaram a atividade *in vitro* frente ao HSV-1 de alguns flavonoides isolados de um tipo de própolis. Os flavonóis foram mais ativos que as flavonas, e quando associados foi detectado um aumento da ação antiviral, confirmando que a própolis é mais ativa do que seus constituintes isolados.

Bettega e colaboradores (2004) avaliaram três formulações (N1, N2 e N3) contendo um extrato padronizado de *Achyrocline satureioides*, enriquecido em flavonoides (quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina), frente a duas cepas do HSV-1 (sensível e resistente ao aciclovir). O melhor resultado antiviral foi obtido com a formulação N2 frente à cepa KOS (sensível ao aciclovir), que não demonstrou efeito virucida, inibição da síntese do DNA viral, nem atividade nos receptores celulares, mas interferiu com a síntese protéica viral.

Lyu, Rhim e Park (2005) avaliaram 18 flavonoides frente ao HSV-1. Galangina e canferol apresentaram atividade, enquanto que naringenina, crisina, fisetina, miricetina, quercetina e genisteína demonstraram moderado efeito inibitório da replicação viral.

Extratos etanólicos e aquosos de *Salvia officinalis*, cultivada em duas localizações diferentes da Alemanha, foram avaliados em relação à sua atividade antiviral frente aos HSV-1 e HSV-2. Todos os extratos avaliados apresentaram efeito virucida para ambos os vírus. Os dados obtidos revelaram que os extratos de uma localidade foram mais ativos que os da outra, indicando que a ação anti-herpética detectada estaria relacionada com a composição quali e quantitativa dos compostos fenólicos desta planta, tais como flavonoides (apigenina e luteolina) e ácidos fenólicos (ácidos caféico, rosmarínico e salvianólico) (SCHNITZLER et al., 2008).

O extrato hidroetanólico das folhas de *Melissa officinalis* foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e avaliado em relação à sua atividade frente ao HSV-2. Os resultados revelaram que este extrato contém compostos derivados do ácido cinâmico, principalmente ácido rosmarínico (4,1%), que poderiam ser os responsáveis pela inibição do efeito citopático viral, em concentrações não-citotóxicas. No entanto, o extrato previniu a entrada do HSV nas células, sugerindo que a inibição viral ocorreu após a penetração do vírus na célula, possivelmente nos estágios intracelulares da replicação viral (MAZZANTI et al., 2008).

Considerando-se os exemplos acima citados, fica claro o potencial das plantas medicinais e seus metabólitos como antivirais *per se* ou em associação com fármacos já disponíveis, pois podem atuar nos diferentes estágios de replicação dos HSV.

## 2.2 Vírus herpéticos

### 2.2.1 Aspectos gerais

Os vírus pertencem a uma classe especial de microrganismos patogênicos, pois dependem das células hospedeiras para sua replicação (VOYLES, 1993; WHITE; FENNER, 1994).

Dentre os milhares de vírus existentes, o grupo dos vírus herpéticos é bastante estudado devido ao seu envolvimento em patologias humanas. Os vírus herpéticos são altamente disseminados na natureza e fazem parte da família Herpesviridae, sendo divididos em três subfamílias:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -Herpesvirinae. Atualmente, existem cerca de 100 herpesvírus conhecidos, sendo oito deles humanos, além do herpesvírus símio, que pode também infectar o homem, causando encefalite mortal (ROIZMAN, 1996; DA SILVA, 2000; SANTOS; SILVA; PEREIRA JUNIOR, 2000) (Quadro 1).

**Quadro 1:** Denominação dos vírus herpéticos humanos e características relativas às suas células alvo e latência.

Nome Sigla	Subfamília	Nome oficial	Células alvo	Latência
Herpes Simplex Vírus tipo 1 HSV-1	$\alpha$	Herpesvírus humano-1	Muco-epiteliais	Gânglios sensoriais
Herpes Simplex Vírus tipo 2 HSV-2	$\alpha$	Herpesvírus humano-2	Muco-epiteliais	Gânglios sensoriais
Varicella Zoster Vírus VZV	$\alpha$	Herpesvírus humano-3	Muco-epiteliais	Gânglios sensoriais
Epstein-Barr Vírus EBV	$\gamma$	Herpesvírus humano-4	Linfócitos B Epiteliais	Linfócito B Glândulas salivares
Citomegalovírus CMV	$\beta$	Herpesvírus humano-5	Epiteliais Monócitos Linfócitos	Monócitos Linfócitos
Herpes Humano Vírus tipo 6 HHV-6	$\beta$	Herpesvírus humano-6	Linfócitos T	Linfócitos T
Herpes Humano Vírus tipo 7 HHV-7	$\beta$	Herpesvírus humano-7	Linfócitos T	Linfócitos T
Herpes Humano Vírus tipo 8 HHV-8	$\gamma$	Herpesvírus humano-8	Endoteliais	desconhecida

Fonte: GESSER (1997) e HUNT(2007).

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

Dentre os inúmeros vírus de importância clínica da família Herpesviridae, destaca-se a subfamília dos Alphaherpesvirinae. Nela encontram-se os Herpes Simplex Virus tipos 1 e 2 (HSV-1 e 2), que infectam grande número de pessoas no mundo todo. São vírus citolíticos, com ciclo reprodutivo relativamente curto e capacidade de estabelecer infecções latentes. Os sintomas da doença não são sempre aparentes, mesmo durante a infecção primária, e podem variar desde lesões cutâneas ou de mucosas até encefalites ou doenças sistêmicas envolvendo múltiplos órgãos (DA SILVA, 2000; ROIZMAN; KNIFE, 2001). A transmissão da infecção pessoa a pessoa ocorre, geralmente, pelo contato íntimo e compartilhamento de fluidos contendo os vírus. Por exemplo, o HSV-2 causa principalmente o herpes genital, que é uma das doenças sexualmente transmissíveis de maior prevalência no mundo. O HSV-1, apesar de também poder causar infecções genitais, provoca mais comumente o herpes labial, e estima-se que 60-95% das pessoas adultas, no mundo, sejam portadoras destes vírus (WHITLEY; ROIZMAN, 2001; FATAHZADEH; SCHATZ, 2007).

Os HSV-1 e HSV-2 apresentam homologia genômica (DNA) de 83% em regiões codificadoras de proteínas virais (GUPTA; WARREN; WALD, 2007). As lesões causadas pelo HSV-1 podem não ser distinguidas daquelas causadas pelo HSV-2, mas há diferenças genéticas e biológicas, que permitem sua diferenciação sorológica. O mapa genético de ambos é colinear e o genoma apresenta aproximadamente o mesmo tamanho (152 kpb e 155 kpb para HSV-1 e HSV-2, respectivamente), que codificam genes correspondentes; porém, há diferenças nos locais de restrição das endonucleases do genoma e no tamanho aparente das proteínas codificadas (SPEAR, 2004; ROIZMAN; KNIFE; WHITLEY, 2007).

Além disso, nos últimos anos, as infecções pelo HSV-2 têm sido associadas a um risco três vezes maior de adquirir sexualmente o HIV. As perturbações na mucosa causadas pelas úlceras genitais favorecem as infecções pelo HIV, por fornecerem uma porta de entrada. Além disso, a infecção pelo HSV-2 resulta no recrutamento de células do sistema imune para as mucosas afetadas, acarretando em uma maior disponibilidade das células-alvo do vírus HIV, tais como os linfócitos TCD<sub>4</sub> (GUPTA; WARREN; WALD, 2007).

Os HSV-1 e HSV-2 são vírus envelopados de grandes dimensões (120-220 nm) constituídos por uma estrutura helicoidal de DNA linear de fita dupla, com dois

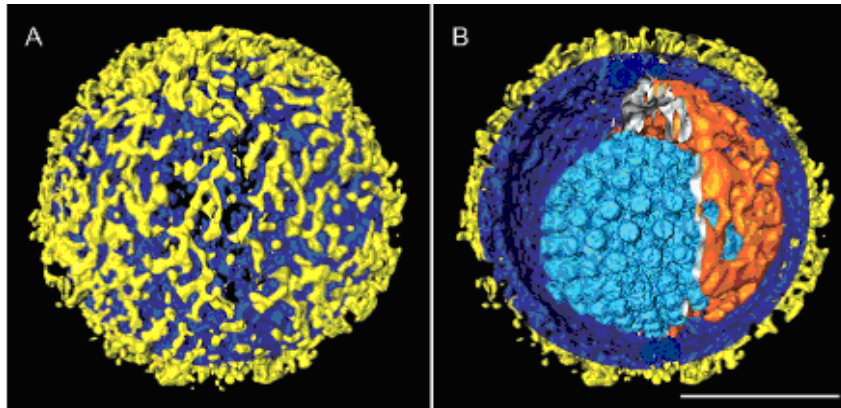
segmentos [um longo (L) e um curto (S)], ligados covalentemente e flanqueados por sequências invertidas e repetidas (WHITLEY, 1996; FATAHZADEH; SCHARTZ, 2007). O material genético é recoberto por um capsídeo de 100 nm de diâmetro composto por 162 capsômeros (150 hexâmeros e 12 pentâmeros), envolto por uma proteína de preenchimento denominada tegumento, e envelopado por uma bicamada lipídica, com aproximadamente 150 nm de diâmetro. À essa bicamada lipídica estão ligadas, no mínimo, 11 glicoproteínas de superfície (Quadro 2), conferindo à partícula viral um diâmetro aproximado de 220 nm. Eles contêm um dos maiores genomas virais dos herpesvírus humanos, codificando cerca de 70 a 200 proteínas (ROIZMAN, 1996; SANTOS; SILVA; PEREIRA JUNIOR, 2000; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

**Quadro 2:** Funções de algumas glicoproteínas dos HSV ligadas ao envelope viral.

<b>Glicoproteína</b>	<b>Gene</b>	<b>Função</b>
<b>gB</b>	U <sub>L</sub> 27	Interação com as células (receptores glicosaminoglicanos - GAG); adsorção e fusão; formação de sincício
<b>gC</b>	U <sub>L</sub> 44	Interação com as células (receptores GAG), ligação à fração C3b do complemento
<b>gD</b>	U <sub>S</sub> 6	Adsorção em receptores diferentes dos receptores GAG; dispersão célula-célula, fusão do envelope viral com a membrana celular
<b>gE</b>	U <sub>S</sub> 8	Receptor para fração Fc das imunoglobulinas, dispersão célula-célula
<b>gI</b>	U <sub>S</sub> 7	Forma complexo com gE, dispersão célula-célula
<b>gH</b>	U <sub>L</sub> 22	Forma complexo com gL; envolvido na fusão do envelope viral com a membrana plasmática
<b>gL</b>	U <sub>L</sub> 1	Forma complexo com gH
<b>gK</b>	U <sub>L</sub> 53	Envolvido com o transporte do vírion pelo citoplasma, envelopamento e saída
<b>gM</b>	U <sub>L</sub> 20	Interação com receptores nas junções intercelulares, mediando a dispersão viral

Fonte: SUBAK-SHARPE; DARGAN (1998)

O tegumento, rico em glicoproteínas (ICP5 majoritariamente), serve como um compartimento de liberação de proteínas requeridas na fase precoce da replicação. Dentro do envelope, o nucleocapsídeo ocupa um terço do volume; o tegumento ocupa o restante do envelope e esse, por sua vez, possui as já citadas glicoproteínas ligadas à sua superfície (GRUNEWALD et al., 2003) (Figura 1).



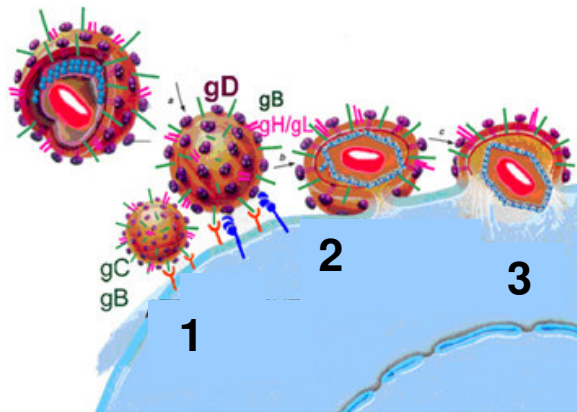
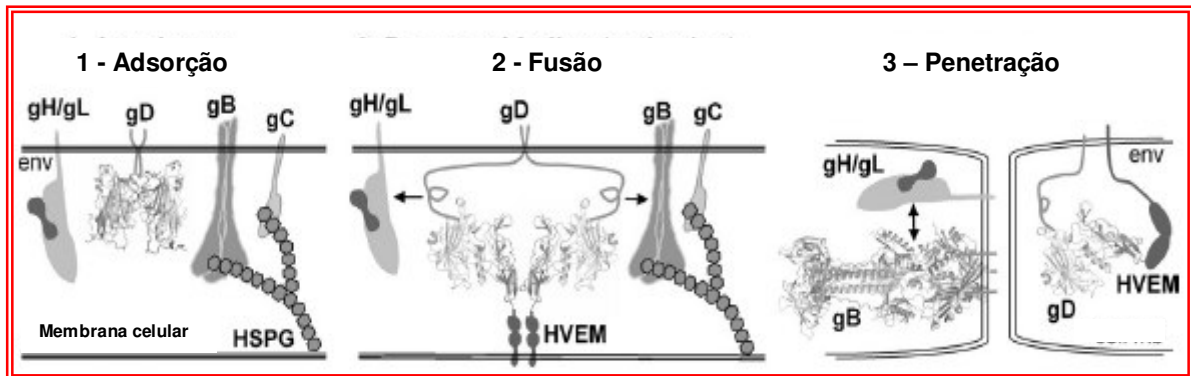
**Figura 1:** Morfologia dos vírions dos HSV. (A) Imagem da superfície externa do HSV obtida de uma tomografia crio-eletrônica, mostrando as glicoproteínas virais em amarelo e o envelope em azul escuro. (B) Corte transversal do interior do vírion, mostrando o capsídeo (azul claro), o tegumento (alaranjado) e o envelope com as glicoproteínas (azul escuro e amarelo). Escala 100nm. Fonte: GRÜNEWALD et al. (2003).

O ciclo de multiplicação dos HSV-1 e HSV-2 é um processo composto de várias etapas, que vão desde a penetração do genoma viral na célula até a liberação dos vírions. Na primo-infecção, os vírus adsorvem aos receptores celulares fusionando seu envelope com a lamela externa da membrana celular. Nesta etapa a entrada do vírion pode também ocorrer por endocitose. O capsídeo desenvolvido é, então, transportado até o núcleo, onde o DNA viral é liberado para dentro do núcleo celular e ocorrerá a transcrição, replicação do DNA viral e produção de novos vírions (DA SILVA, 2000; MARSH; PELCHEN-MATTHEWS, 2000).

A primeira etapa da infecção viral inicia-se no momento em que ocorre a **adsorção** dos HSV nas células hospedeiras. Nesta etapa, ocorre a interação das glicoproteínas virais gC e gB com receptores proteoglicanos celulares, principalmente com moléculas de sulfato de heparana (HS). Após este processo, há uma alteração conformacional aproximando a glicoproteína gD ao complexo. A gD pode interagir com três tipos distintos de receptores secundários, responsáveis pela entrada do vírus na célula hospedeira: 1) o mediador da entrada de herpesvírus (HVEM - *herpesvirus entry mediator*), membro da família dos receptores do TNF; os receptores da família da Nectina-1 e Nectina-2, membros da família das imunoglobulinas; e 3) moléculas de sulfato de heparana modificadas em sítios específicos pela ação da enzima 3-O-sulfotransferase (SPEAR; ELISENBERG; COHEN, 2000; SPEAR; LONGNECKER, 2003; SPEAR, 2004; SPEAR et al., 2006; TIWARI et al., 2008)

O receptor HVEM é um receptor da família do TNF que pode ser encontrado em uma grande variedade de tecidos e tipos celulares, incluindo células T e B, células epiteliais e fibroblastos. Porém, ainda não foi constatada sua presença em neurônios (MONTGOMERY et al., 1996). Os receptores Nectina-1 e Nectina-2 são as únicas isoformas dos receptores da nectina capazes de permitir a entrada do HSV, apresentando uma grande importância, sobretudo no que diz respeito à dispersão célula-célula deste vírus (YOON; SPEAR, 2002; MAROZIN; PRANK; SODEIK, 2004; TIWARI et al., 2008). Estes receptores podem ser encontrados em células epiteliais, fibroblastos e neurônios, co-localizando com caderinas em junções aderentes, participando dos processos de adesão celular (SPEAR, 2004). Já as moléculas de sulfato de heparana são glicosaminoglicanas, sintetizadas pela adição de unidades repetidas de N-acetil-glicosamina e ácido glicurônico seguido pela sulfatação por ação enzimática (LINDAHL; KUSCHE-GULLBERG; KJELLÉN, 1998).

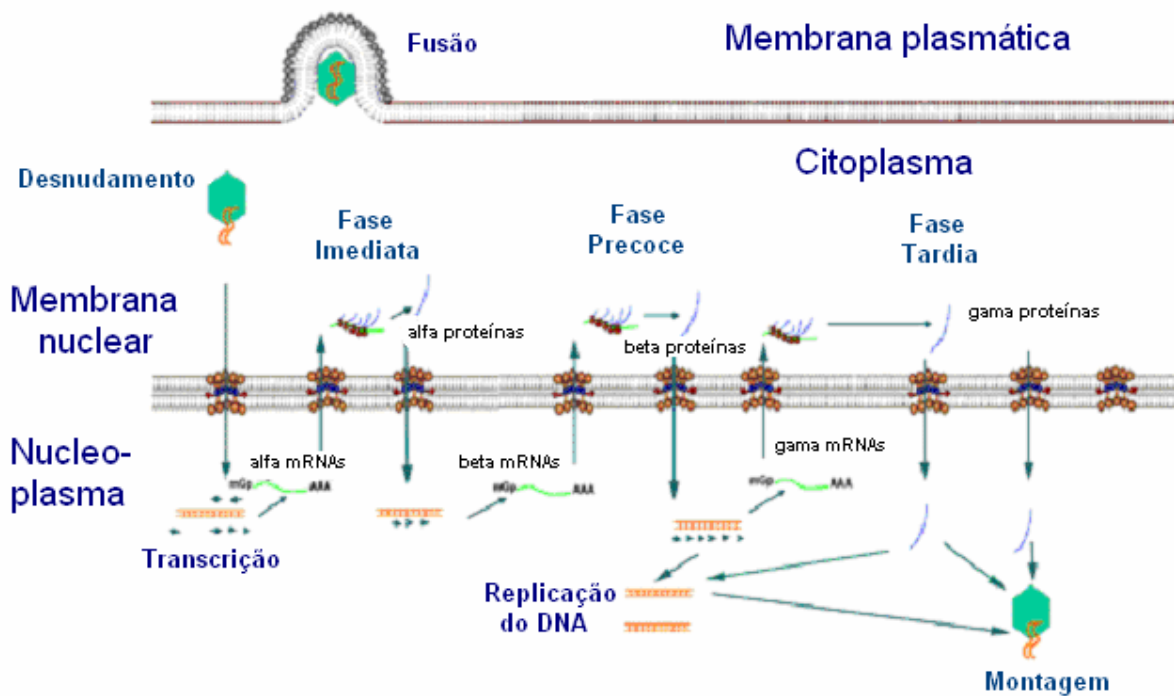
Após o processo de adsorção ocorre a **penetração**, que consiste na exposição de resíduos hidrofóbicos de diversas glicoproteínas virais, como a gD e o heterodímero gH/gL, resultando na fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira. Em seguida, as proteínas do tegumento ( $\alpha$ -TIF ou VP26 e *vhs*), juntamente com o nucleocapsídeo, são liberadas no citoplasma da célula hospedeira (Figura 2). O nucleocapsídeo será, então, transportado via citoesqueleto para a área perinuclear, onde o capsídeo é desmontado, ocorrendo a liberação do genoma viral no núcleo da célula hospedeira (ROIZMAN; KNIFE, 2001). O  $\alpha$ -TIF possui a função de promover a transcrição viral imediata, através da formação de um complexo multiprotéico com os fatores celulares de transcrição Oct1 e HCF, que se liga a uma região específica do genoma viral. Já a proteína *vhs* parece permanecer no citoplasma, onde desempenha a função de degradar RNA celular (WHITE; FENNER, 1994; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).



**Figura 2:** Ilustração dos passos da entrada do HSV na célula. (1) gB e gC interagem com o receptor celular (HSPG). (2) Por alteração conformacional, a gD se aproxima do complexo gB-gC-HSPG ligando-se ao receptor celular HVEM e interagindo com o complexo viral gH-gL. (3) Alteração do citoesqueleto celular e entrada do nucleocapsídeo na célula. Fonte: Adaptado de HELDWEIN; KRUMMENACHER (2008).

O ciclo produtivo do HSV pode ser cineticamente dividido em três fases. A primeira delas é denominada fase alfa (***Immediately-early*** - imediata), que tem início no momento em que a proteína do tegumento viral  $\alpha$ -TIF ou VP16, associada a fatores nucleares se liga ao genoma viral, formando o complexo de pré-iniciação viral. Inicia-se, então, a transcrição viral imediata a partir da síntese de proteínas da fase alfa, denominadas de proteínas de células infectadas (ICP – *Infected Cell Proteins*), tais como ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47, responsáveis pela regulação positiva das fases beta e gama, além de inibir a ação das proteínas de apresentação de antígenos virais pelo MHC de classe I. O pico de síntese ocorre de 2-4 h pós-infecção. Após a fase alfa, inicia-se a fase beta (***Early*** - precoce), na qual são sintetizadas enzimas análogas às celulares e que possibilitam a replicação do DNA, como a timidina quinase (TQ) e UL30/UL42 (DNA polimerase viral). A síntese de  $\beta$ -proteínas ocorre de 5-7 horas pós-infecção. A síntese do DNA viral começa

logo após o aparecimento das  $\beta$ -proteínas e já pode ser detectado nas primeiras 3 h e continua até 15 h pós-infecção (P.I.), com a maior parte do DNA sendo sintetizado durante a parte final do período (7-10 h). A replicação termina com o aparecimento das proteínas  $\gamma$  (**Late** – tardias). Com o início da replicação e, conseqüentemente, com o acúmulo do DNA viral, ocorre a sinalização para que os genes tardios codifiquem as proteínas estruturais do capsídeo, do tegumento e de outras proteínas, que formarão os vírions, tais como as glicoproteínas do envelope viral (BOEHMER; LEHMAN, 1997; WHITLEY; ROIZMAN, 2001) (Figura 3).



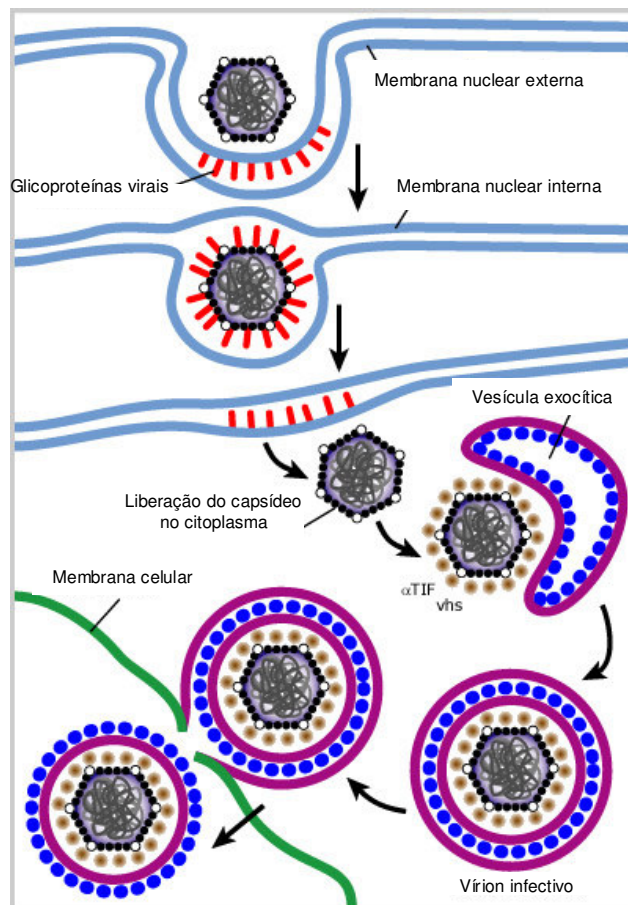
**Figura 3:** Diagrama representando a fusão, desnudamento, transcrição, tradução, replicação do DNA e montagem dos vírus herpéticos. Fonte: Adaptado de HUNT (2007).

As proteínas estruturais do capsídeo são transportadas, então, para o núcleo, onde são reunidas em pró-capsídeos vazios, que posteriormente serão preenchidos com DNA viral associado às poliaminas de caráter básico. Os nucleocapsídeos ligam-se em porções modificadas da membrana nuclear interna, que contém glicoproteínas virais, sendo assim rapidamente envelopados e liberados no espaço nuclear intermediário (BIENZ, 2005).

Para que as partículas virais possam ser liberadas do núcleo da célula hospedeira deve ocorrer a fusão do nucleocapsídeo com a membrana interna do



núcleo. Logo em seguida, há a fusão do envelope viral com a membrana nuclear externa, havendo um acúmulo de capsídeos sem envelope no citoplasma. Os capsídeos são então re-envelopados por vesículas exocíticas derivadas do complexo de Golgi (MELANCON; FOSTER; KOUSOULAS, 2004). Assim, os vírions maduros migram para a superfície celular, onde se fundem à membrana citoplasmática, e são liberados no espaço extracelular por exocitose. Portanto, a infecção produtiva de uma célula resulta na sua destruição, devido às mudanças bioquímicas e estruturais induzidas pela replicação viral (WHITE; FENNER, 1994; ELLERMANN-ERIKSEN, 2005) (Figura 4).



**Figura 4:** Etapas de liberação dos vírions dos HSV desde o núcleo até o espaço extracelular. Fonte: adaptado de WAGNER (2009).

O progresso de uma infecção herpética é influenciado pela capacidade dos HSV de infectarem células adjacentes diretamente através das junções celulares. Os vírus estarão, deste modo, evitando a exposição à substâncias extracelulares, tais como anticorpos e complemento (ELLERMANN-ERIKSEN, 2005). As mesmas

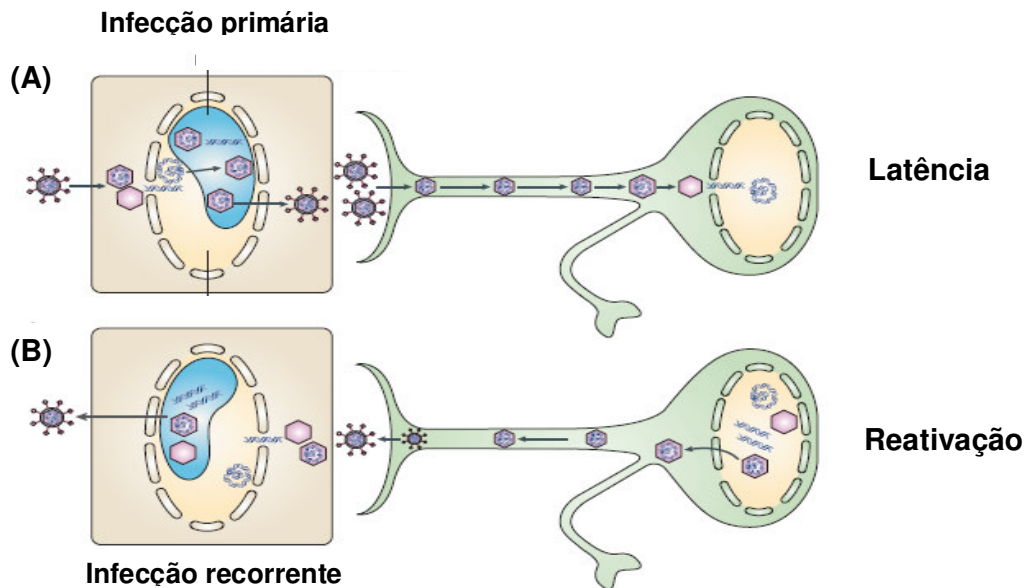
glicoproteínas virais (gB, gD, gH/gL) e os mesmos receptores celulares, que promovem a entrada dos HSV, via superfície apical da célula, possibilitam a propagação viral célula a célula, isto é, o movimento do vírus no espaço entre as células infectadas e células vizinhas não infectadas (NYBERG et al., 2004). Adicionalmente, o heterodímero viral gE/gI participa da propagação viral entre as células, através da ligação a receptores presentes nas junções celulares, facilitando a entrada dos vírions em células adjacentes; este processo é conhecido como *cell-to-cell spread* (JOHNSON et al., 2001; POLCICOVA et al., 2005).

### **2.2.3 Latência viral**

A sobrevivência dos vírus na natureza requer a infecção contínua de hospedeiros suscetíveis. Os HSV estabelecem latência nos gânglios sensoriais e a total ausência de síntese protéica permite que eles fiquem completamente inacessíveis ao sistema imunológico (LUPI; PEREIRA JR, 2000).

Durante o período de latência, os HSV associam-se a histonas, formando um DNA episomal. Além disso, a latência ocorre principalmente no sistema nervoso, onde há uma maior expressão do fator nuclear OCT-2 em relação a isoforma OCT-1, que é expressa principalmente em outros tecidos. Na maioria dos tecidos, a proteína do tegumento viral  $\alpha$ -TIF interage preferencialmente com a proteína OCT-1. Esta ligação inicia a transcrição de genes de fase alfa e conseqüente infecção produtiva, enquanto que a OCT-2 desempenha papel contrário, reprimindo a transcrição (LUPI; PEREIRA JR, 2000; KNIPE; CLIFFE, 2008).

Em algumas situações, tais como estresse, hipertermia, transplante de órgãos e imunossupressão, os HSV podem ser reativados. Durante a reativação, as partículas virais são transportadas via transporte anterógrado ao longo dos neurônios sensoriais periféricos, causando a infecção produtiva, podendo provocar lesões no tecido mucocutâneo. Em alguns casos, como em pacientes imunocomprometidos e neonatos, as partículas virais podem migrar em direção ao sistema nervoso central, podendo provocar quadros de encefalite e ceratoconjuntivite (GESSER, 1997; ROIZMAN; KNIFE, 2001) (Figura 5).



**Figura 5:** Etapas da infecção e latência dos HSV. **(A)** A infecção de células epiteliais dá origem a infecção primária. Os vírus invadem os neurônios e o nucleocapsídeo é transportado através do neurônio até o núcleo onde o DNA viral é liberado e os genes associados à latência são expressos. **(B)** Após a reativação, a expressão dos genes de infecção lítica se inicia, e os nucleocapsídeos são transportados para a porção terminal do neurônio. As partículas virais infecciosas são liberadas a partir do axônio e infectam células epiteliais, resultado na infecção recorrente. Fonte: adaptado de KNIPE, CLIFFE (2008).

Após a infecção primária, o indivíduo retém por toda a vida o DNA herpético nos gânglios trigêminos (no caso do HSV-1) e nos gânglios sacrais (no caso do HSV-2), com no mínimo 50% de chances de sofrer episódios recorrentes de herpes labial ou genital, várias vezes no decorrer da vida. Em pacientes imunocomprometidos (submetidos a transplantes, quimioterapia anticâncer ou HIV+/AIDS), as infecções latentes são frequentemente reativadas (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

#### 2.2.4 Terapêutica anti-herpética

O atual arsenal terapêutico para infecções virais consiste em torno de 40 fármacos aprovados para uso clínico pelas autoridades governamentais, sendo que 20 deles são utilizados para o tratamento da infecção pelo vírus HIV. Os demais antivirais são utilizados contra os vírus das hepatites B e C, vírus influenza, vírus respiratório sincicial, vírus herpéticos, incluindo neste último grupo o vírus da varicela zoster, o citomegalovírus e os HSV tipos 1 e 2 (DE CLERCQ, 2005b; ROTTINGHAUS; WHITLEY, 2007).

A terapia antiviral disponível para os HSV consiste principalmente de análogos de nucleosídeos, que são substratos para a polimerase viral. Dentro deste grupo, encontram-se aciclovir (ACV), valaciclovir, penciclovir e famciclovir (DE CLERCQ, 2004). A administração oral dos fármacos aciclovir e penciclovir na forma dos pró-fármacos valaciclovir e famciclovir, respectivamente, resulta em maiores níveis plasmáticos e aumento da disponibilidade do fármaco ativo (VISALLI; VAN ZEIJL, 2003).

O fármaco antiviral ideal é aquele que não interfere com os mecanismos normais de defesa celular contra a infecção viral, e complementa a imunidade celular e a resposta humoral de anticorpos para deter a replicação viral. Por isso, o ACV é o fármaco de primeira escolha para infecções herpéticas, pois atua seletivamente na replicação viral, sem interferir nos processos bioquímicos das células hospedeiras (LUPI, 2000; BRADY; BERNSTEIN, 2004; ROTTINGHAUS; WHITLEY, 2007).

Depois de administrado, o ACV sofre conversão a um derivado fosforilado (monofosfato) pela ação da enzima timidina quinase, que é codificada pelo próprio vírus. Em seguida, as enzimas celulares completam a fosforilação da molécula transformando-a em trifosfatada (forma ativa). Assim, o fármaco se concentra nas células infectadas, reduzindo os efeitos colaterais observados com os antivirais mais antigos. O aciclovir trifosfatado inibe a replicação do DNA do HSV ao competir com o trifosfato de desoxiguanosina pela DNA polimerase viral. A molécula do aciclovir trifosfatada se liga ao genoma do HSV, através da DNA polimerase, durante o processo de alongamento da estrutura helicoidal do DNA viral. A ausência do grupo 3'-hidroxila impede a incorporação de outro nucleotídeo, inibindo a sua síntese de forma irreversível e efetuando a terminação obrigatória da cadeia de DNA à qual foi incorporado (ELION et al., 1977; SCHAEFFER et al., 1978).

Uma alternativa terapêutica clinicamente disponível é o foscarnet, um análogo do pirofosfato, que inibe diretamente a DNA polimerase viral. Esse fármaco é usado frequentemente como segunda escolha, quando é verificada resistência aos análogos dos nucleosídeos (DE CLERCQ, 2004).

Adicionalmente, há mais alguns agentes anti-herpéticos utilizados na clínica, sendo descritos a seguir (CASSADY; WHITLEY, 1997; BRADY; BERNSTEIN, 2004; DE CLERCQ, 2004; 2005a; SUPERTI; AMMENDOLI; MARCHETTI, 2008):

- Trifluoridina: o trifosfato de trifluoridina inibe a DNA polimerase celular e viral, em baixas concentrações; porém, é tóxico no uso sistêmico. Está disponível como solução nos tratamentos de infecções oculares pelos HSV.

- Vidarabina: análogo da adenina, que é fosforilado por quinases celulares à trifosfato de vidarabina, o qual; inibe a DNA polimerase viral e, um pouco menos, a celular. Está disponível em pomadas para o tratamento de infecções oculares.

- Cidofovir: nucleosídeo 5'-monofosfato que é fosforilado pela timidina quinase de células hospedeiras em um metabólito biologicamente ativo, o qual inibe seletivamente a replicação viral. Por não ser dependente da timidina quinase viral, pode ser ativo contra vírus deficientes em timidina quinase (resistentes ao ACV). A resistência do cidofovir é rara e surge de mutações virais. Seu tempo de meia-vida é longo e, por isso, permite apenas uma dose semanal. Pode ser usado topicamente ou por via intravenosa no tratamento dos HSV resistentes ao aciclovir e ao foscarnet.

- Docosanol: inibe a fusão entre a membrana plasmática da célula hospedeira e o envelope dos HSV, bloqueando a entrada do vírus. É disponível em cremes tópicos para tratamento de herpes labial recorrente.

- Brivudina: atua como inibidor da DNA polimerase viral após fosforilação intracelular. Pode atuar como substrato alternativo e, portanto, ser incorporado pelo DNA viral, reduzindo sua integridade e prejudicando seu funcionamento. Está disponível para uso tópico e oral no tratamento de infecções causadas pelo HSV-1.

- Ganciclovir: atua na DNA polimerase viral, onde é fosforilado a trifosfato de ganciclovir, sendo então incorporado ao DNA viral, impedindo a sua replicação. É encontrado em formas intravenosas, orais e implantes intra-oculares.

A resistência dos vírus herpéticos não é uma questão recente, mas a disseminação de cepas resistentes em pacientes imunocomprometidos tornou-se um fato preocupante. Tal resistência é o resultado de uma ou mais mutações no genoma viral, causando mudanças no alvo de atuação do fármaco ou de seus metabólitos, o que reflete em diferenças na sensibilidade da cepa mutante e da cepa primitiva (SNOECK, 2000; FIELD, 2001).

O mecanismo de resistência ao aciclovir foi relatado, pela primeira vez, já em 1980, por Coen e Schaffer e por Schnipper e Crumpacker (FIELD, 2001), confirmando que dois *loci* específicos estavam envolvidos: o da enzima timidina quinase (TK) induzida pelo vírus e o da DNA polimerase. Essa mutação pode ocorrer por deleção, inserção ou substituição de bases ao longo do DNA viral.

Embora existam fármacos disponíveis para o tratamento de algumas infecções virais, as limitações de seu uso, devido à especificidade de ação, biodisponibilidade, toxicidade e/ou desenvolvimento de resistência (WAINBERG, 2009), justificam a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos antivirais, tanto aqueles obtidos por síntese quanto aqueles de origem natural.

## **2.3 *Ilex paraguariensis***

### **2.3.1 Aspectos gerais**

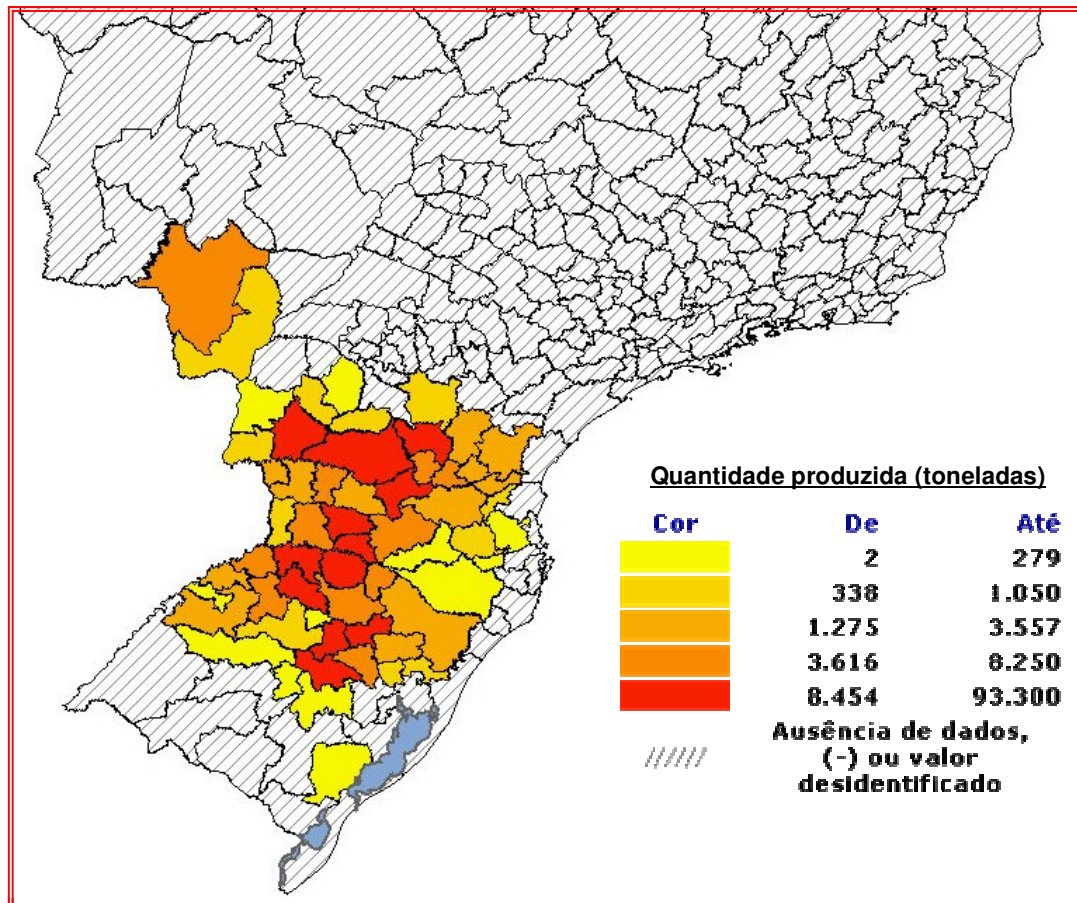
A espécie *Ilex paraguariensis* St. Hilaire pertence à subdivisão Angiospermae, classe das Dicotiledôneas e família Aquifoliaceae, tendo sido classificada por August Saint Hilaire, e publicada em 1825 nas Memórias do Museu de História Natural de Paris (CARVALHO, 1994). Esta espécie vegetal é conhecida popularmente por chá-mate, erva-mate, caá e congonha, entre outras denominações, e consumida tradicionalmente pelos cidadãos de alguns países da América do Sul, tais como Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai, na forma de infusão (chimarrão) ou macerado (tererê), por apresentar propriedades diuréticas, digestivas e estimulantes do sistema nervoso central (PIO-CORRÊA, 1978; BLUMENTHAL; DGOLDBERG; BRINCKMANN, 2000; DERMARDEROSIAN, 2001; WICHTL, 2003).

Este vegetal, por sua importância sociocultural e econômica, tornou-se a árvore símbolo do Rio Grande do Sul (BRASIL, 1980) e o chimarrão sua bebida símbolo (BRASIL, 2003). Além disso, a erva-mate também foi oficialmente incorporada à cesta básica desse Estado. O hábito de beber chimarrão faz parte do perfil comportamental do gaúcho, significando que a erva-mate é um produto de aquisição essencial para garantir a qualidade de vida. O consumo da erva-mate como infusão é uma herança dos indígenas, e que hoje caracteriza as populações de todo o Cone Sul (CARPANEZZI, 1995; TORMEN, 1995).

Em 1938, o Instituto Nacional do Mate (INM), com sede no Rio de Janeiro, fazia campanhas de divulgação do chá-de-mate. A empresa que na época soube explorar melhor esse setor foi a Mate Leão. Em 1964, o INM foi extinto e, em 1965, foi criado o Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal (IBDF), que deixou a produção ervateira de lado para preocupar-se com a arrecadação dos incentivos fiscais com a plantação de pinus, eucaliptos e outras espécies. Logo, o IBDF foi extinto e a produção de erva-mate foi regida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (TORMEN, 1995).

No Brasil, os quatro maiores produtores são os Estados do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A disseminação do consumo do chimarrão no nosso país decorreu, em grande parte, pela migração de gaúchos para diferentes regiões do território nacional, pois eles levaram consigo este hábito (TORMEN, 1995).

Esta espécie vegetal cresce em regiões subtropicais e temperadas da América do Sul. No Brasil, a erva-mate é nativa da Bahia ao Rio Grande do Sul, com maior área de frequência no Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Mato Grosso (Figura 6). A fácil adaptação às áreas de cultivo em campo aberto possibilitou a exploração agrícola e comercial desta espécie vegetal (PIO-CORRÊA, 1978).



**Figura 6:** Quantidade de erva-mate produzida (folhas verdes) no Brasil em toneladas de acordo com o Sistema IBGE de Recuperação Automática. Fonte: (IBGE - Banco de dados, 2007).

O melhor período para a colheita da erva-mate é de maio a setembro, quando a planta está em processo de dormência e há maior concentração dos constituintes

químicos nas folhas. O preparo da matéria-prima vegetal envolve uma série de operações típicas, a saber: sapeco<sup>1</sup>, secagem<sup>2</sup>, cancheamento<sup>3</sup> e industrialização<sup>4</sup>, originando os produtos e subprodutos/resíduos (NUÑEZ; KÄNZIG, 1995; ESMELINDRO et al., 2002). Os principais produtos derivados da erva-mate são chimarrão, tererê, chá mate tostado natural, chá mate solúvel e chás saborizados.

A crescente importância da erva-mate para os países do Cone Sul implica na necessidade de um produto competitivo, onde o aspecto qualidade é o principal diferencial. Adulterações, tal como adição de açúcar, farinhas, farelos, areia e outras substâncias estranhas podem ser detectadas através de análises bromatológicas (determinação de resíduo seco, de cinzas, teor de umidade, lipídeos, açúcares, proteínas) (TAKETA, 1997). Com o intuito de aumentar o rendimento do produto erva-mate e evitar variações bromatológicas acentuadas que denunciem adulterações, outras espécies de *Ilex* também têm sido utilizadas para este fim.

A detecção da adulteração pela adição de outras espécies do mesmo gênero é de difícil determinação, especialmente no produto já processado, mas em tese poderia ser realizada mediante o estudo de marcadores químicos, onde cada planta seria caracterizada em função dos compostos que possui e comparada com a constituição química da planta adulterante. Além da queda da qualidade do produto, variações quanto às atividades farmacológicas podem ser detectadas (TAKETA, 1997; REGINATTO et al., 1999). Por este motivo, várias espécies de *Ilex* são estudadas em relação aos teores dos seus constituintes (HECK; DE MEJIA, 2007).

### 2.3.2 Aspectos botânicos

A erva-mate é uma árvore umbrófila<sup>5</sup> de crescimento lento ou moderado e de altura variável, podendo atingir 25 metros de altura em seu habitat natural. Em

---

<sup>1</sup> Sapeco: é um processo de tratamento térmico com alta temperatura, realizado para impedir a ação de enzimas (oxidase e polifenoloxidase). É a passagem das folhas e ramos sobre uma chama viva durante alguns segundos. Deve ser rápido exigindo prática e habilidade. Se não for realizado corretamente, o aspecto, aroma e sabor da erva-mate ficam comprometidos, alterando a qualidade e o valor do produto.

<sup>2</sup> Secagem: é a operação posterior ao sapeco.

<sup>3</sup> Cancheamento: é a redução do tamanho do material vegetal antes de ir para o moinho, porém de uma forma mais grosseira. A erva cancheada é peneirada para a separação dos pedaços de galhos maiores.

<sup>4</sup> Industrialização: é realizada a moagem e o produto obtido é classificado em diversos tipos e/ou classes e embalado de acordo com a finalidade comercial.

<sup>5</sup> Umbrófila: Plantas que vivem em baixas intensidades luminosas, nas sombras, entradas de cavernas ou sob as copas de árvores maiores.



cultivos agrícola, a altura média é de 3-5 metros (PIO-CORRÊA, 1978; CARVALHO, 1994) (Figura 7A).

Suas folhas são simples, alternas, oblongas, estreitas na base e ligeiramente obtusas no vértice. Suas bordas são denteadas, especialmente da metade para a extremidade, medindo 8 a 10 cm de comprimento e 4 a 5 cm de largura, com nervuras salientes, apresentando coloração verde escura na face adaxial e verde clara na abaxial (CARVALHO, 1994; GUPTA, 1995). O pecíolo é curto e retorcido e as flores são brancas, pequenas, dispostas na região axilar das folhas superiores, com quatro pétalas agrupadas em cachos (Figura 7B). Apesar de conter estames e pistilos, as flores são unissexuais, pois nas femininas o estames não funcionam e nas masculinas o pistilo aborta (CARVALHO, 1994).

O fruto é uma baga globosa, pequena (4-6 mm de diâmetro), de cor verde quando novo e vermelho-arroxeadado quando maduro (Figura 7C). Possui 4-5 sementes (Figura 7D). É muito apreciado pelos pássaros, que disseminam naturalmente essa espécie (CARVALHO, 1994).



**Figura 7:** Aspectos morfológicos de um espécime de *Ilex paraguariensis* St. Hil. A) exemplar adulto, B) folhas e flores, C) frutos e D) sementes desta espécie. Fonte: LORENZI; MATOS (2008).

### 2.3.3 Aspectos fitoquímicos

Os estudos fitoquímicos realizados com *Ilex paraguariensis* relatam a presença dos seguintes constituintes:

- **metilxantinas** (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; MAZZAFERA, 1997; REGINATTO et al., 1999; SALDAÑA et al., 1999; ATHAYDE; COELHO; SCHENKEL, 2000; COELHO; ATHAYDE; SCHENKEL, 2001; ESMELINDRO et

- al., 2002; POMILIO; TRAJTEMBERG; VITALE, 2002; MARKOWICZ BASTOS et al., 2006; SCHUBERT et al., 2006; CARDOSO JR et al., 2007; COELHO et al., 2007; RIVELLI et al., 2007; STREIT et al., 2007; STRASSMANN et al., 2008);
- **flavonoides** (MARTÍNEZ; PELOTTO; BASUALDO, 1997; CARINI et al., 1998; FILIP et al., 2001; MARKOWICZ BASTOS et al., 2007);
  - **ácidos fenólicos** (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; MAZZAFERA, 1997; FILIP et al., 2001; CHANDRA; DE MEJIA, 2004; MARKOWICZ BASTOS et al., 2006; CARDOSO JR et al., 2007; MARKOWICZ BASTOS et al., 2007; RIVELLI et al., 2007; STREIT et al., 2007; MARQUES; FARAH, 2009);
  - **saponinas triterpênicas** (GOSMANN, 1989; GOSMANN; SCHENKEL; SELIGMANN, 1989; MONTANHA, 1990; GOSMANN et al., 1995; KRAEMER et al., 1996; SCHENKEL; MONTANHA; GOSMANN, 1996; MARTINET et al., 2001; GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005; SUGIMOTO et al., 2009);
  - **minerais** (TENORIO SANZ; TORIJA ISASA, 1991; VERA GARCIA et al., 1997; CARDUCCI; DABAS; MUSE, 2000; WROBEL; URBINA, 2000; DUCAT; QUINÁIA, 2004; GIULIAN et al., 2009; GOMES DA COSTA et al., 2009).

Embora vários compostos estejam presentes em *Ilex paraguariensis*, os que nos despertaram especial interesse foram as saponinas triterpênicas e os compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos), visto que eles ocorrem em grande quantidade nesta matéria-prima vegetal e existem vários relatos de atividades biológicas/farmacológicas relacionados a esses metabólitos, incluindo **ação antiviral** (MILGATE; ROBERTS, 1995; VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997; HUDSON; TOWERS, 1999; FRANCIS et al., 2002; JASSIM; NAJI, 2003; SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004; GÜÇLÜ-ÜSTÜNDA; MAZZA, 2007; HECK; DE MEJIA, 2007; CHATTOPADHYAY; KHAN, 2008; XIANG; PEI; WANG, 2008).

### 2.3.3.1 Compostos fenólicos da erva-mate (flavonoides e ácidos fenólicos)

Compostos fenólicos apresentam em sua estrutura um anel aromático substituído por um ou mais grupamentos hidroxilas, com grande diversidade estrutural, sendo que a origem biogenética dos mesmos determina o padrão de substituição do composto fenólico resultante (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

Os flavonoides representam um dos grupos de compostos fenólicos mais importantes e diversificados, que são amplamente distribuídos no reino vegetal. Os flavonoides apresentam-se, frequentemente, oxigenados e conjugados com açúcares (heterosídeos). As principais classes de flavonoides são: flavonas, flavonóis, flavanonas, leucoantocianidinas, proantocianidinas *O*-heterosídeos, *C*-heterosídeos, antocianos, chalconas, auronas, di-hidro-chalconas, isoflavonoides, neoflavonoides, biflavonoides, entre outras. (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Assim como os flavonoides, os ácidos fenólicos são amplamente distribuídos no reino vegetal e apresentam grande diversidade estrutural, sendo classificados como derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico. Quatro derivados do ácido cinâmico são frequentemente detectados nos vegetais: ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico. Ainda dentro deste grupo, pode-se encontrar os ésteres e heterosídeos de ácidos fenólicos e cinâmico. Nesse grupo de substâncias, também referido como derivados do ácido fenilacrílico, destacam-se os derivados do ácido caféico, como por exemplo o ácido clorogênico (3-*O*-cafeoilquínico) e seus isômeros (ácidos criptoclorogênico, neoclorogênico e isoclorogênico) (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

As estruturas dos principais flavonóides e ácidos fenólicos isolados de *I. paraguariensis*, estão representadas nos Quadros 3 e 4, respectivamente.

O estudo realizado por Martinez, Pelotto e Basualdo (1997) avaliaram o conteúdo de flavonoides de 59 espécies de *Ilex* por cromatografia bidimensional em papel, co-cromatografia e análises espectroscópicas. Dentre os flavonoides avaliados (canferol, quercetina, isoramnetina, apigenina e luteolina) apenas o canferol foi detectado na amostra de *Ilex paraguariensis*.

Carini et al. (1998) determinou o perfil de compostos fenólicos em extratos brutos das folhas de erva-mate, através de cromatografia líquida/espectrometria de massas (CL/EM). Foi possível identificar 10 compostos, incluindo três isômeros naturais do ácido cafeoilquínico (ácidos neoclorogênico, clorogênico e criptoclorogênico), três isômeros do ácido dicafeoilquínico, rutina, diglicosil derivado da luteolina e 2 isômeros do cafeoil-glicosídeo.

Filip et al. (2001) analisaram a presença de derivados cafeoilquínicos, rutina, quercetina e canferol no extrato aquoso de *I. paraguariensis* e outras sete espécies de *Ilex* (*I. brevicuspis*; *I. theezans*; *I. microdonta*; *I. dumosa* var. *dumosa*; *I. taubertiana*; *I. pseudobuxus* e *I. argentina*) através de CLAE/detector PDA. Os autores

identificaram e quantificaram os derivados do ácido cafeoilquínico (ácidos caféico, clorogênico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico) e os flavonoides (quercetina, rutina e canferol) e constataram que *I. paraguariensis* apresentou os teores mais elevados de derivados do ácido cafeoilquínico (9,608%) e de flavonoides (rutina-0,06%; quercetina-0,003% e canferol-0,001%), quando comparada às outras espécies.

Markowicz Bastos et al. (2007) investigaram os teores de ácidos fenólicos e de flavonoides em extratos aquosos e etanólicos de folhas verdes e tostadas de erva-mate, através de EM. Os principais compostos fenólicos identificados nestes extratos foram: ácidos caféico, quínico, cafeoilquínico, feruloilquínico, dicafeoilquínico, cafeoil-glicosídeo e rutina. Após o processo de sapeco, dois novos compostos foram formados tendo sido identificados como ácidos cafeoilchiquímico e dicafeoilchiquímico.

Clifford e Ramirez-Martinez (1990) analisaram a presença de ácido clorogênico em cinco amostras de folhas de erva-mate, e detectaram a presença dos ácidos 3-cafeoilquínico e 3,5-dicafeoilquínico.

Em seu estudo, Mazzafera (1997) preparou extratos, de acordo com a utilização popular (infusão) da erva-mate, respeitando a proporção de droga-vegetal e líquido extrator (água), e determinou a quantidade de cafeína, ácido clorogênico e ácido caféico em 18 amostras, provenientes de diferentes locais de cultivo. Houve variações nos teores porém estes três constituintes estavam presentes em todas as amostras.

A análise realizada por Chandra e De Mejia (2004), através de CLAE/detector PDA, determinou a presença do galato de epigalocatequina, ácido gálico e catequina no extrato aquoso da erva-mate.

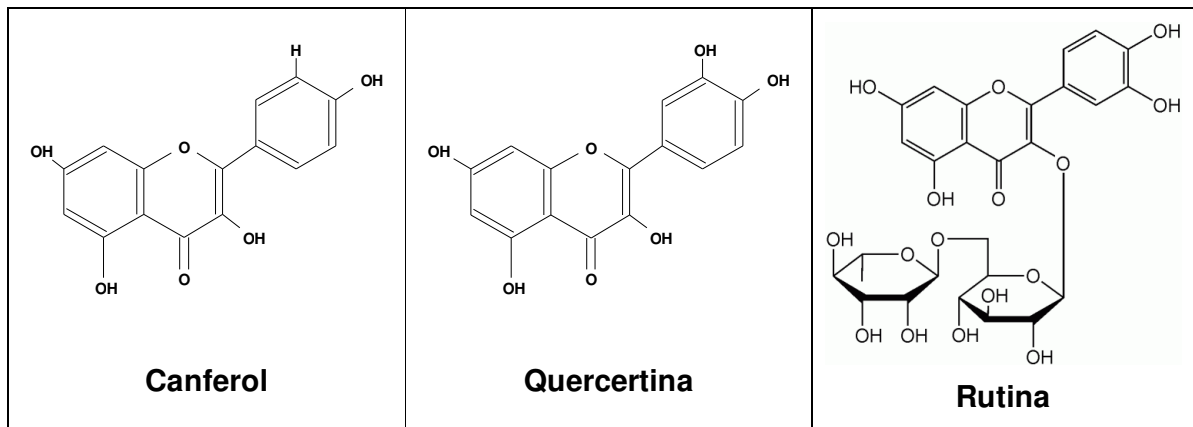
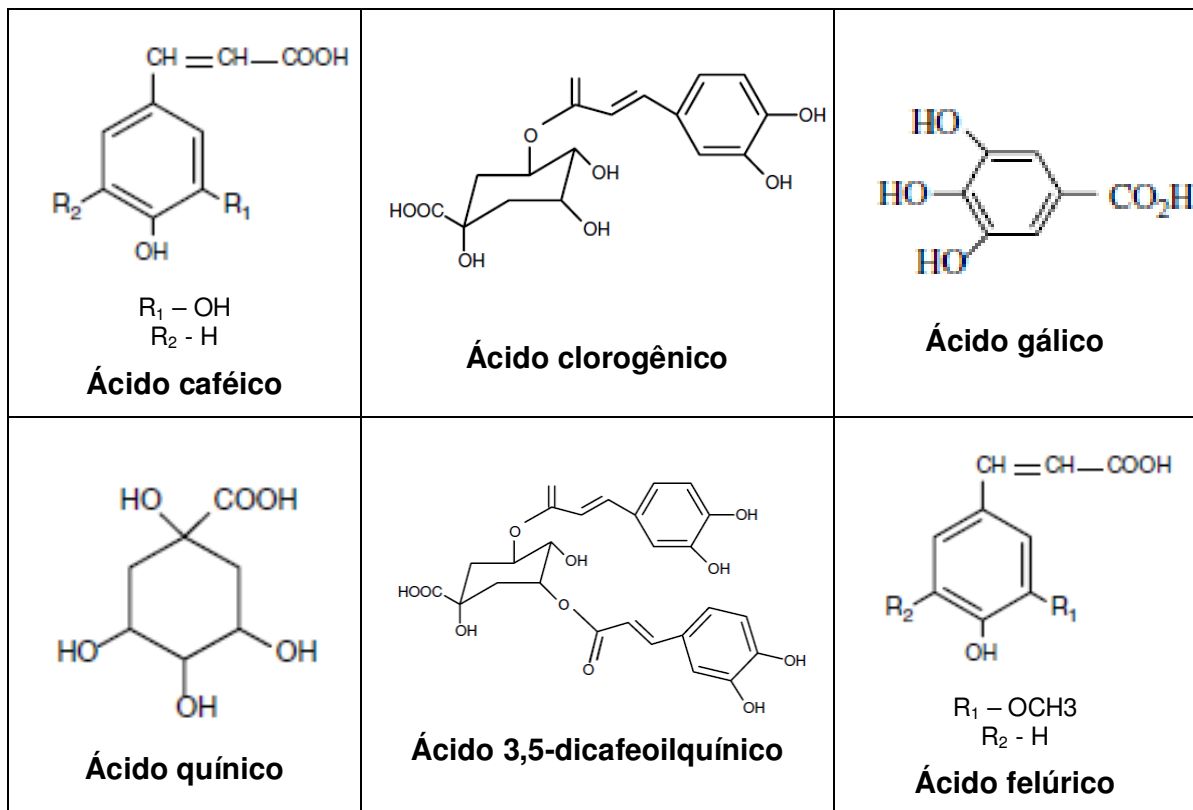
Markowicz Bastos e colaboradores (2006) investigaram os teores de ácidos fenólicos (ácidos caféico e 5-cafeoilquínico) e de flavonoides (quercetina, canferol e miricetina) em extratos aquosos de erva-mate, provenientes de diferentes estágios do seu processamento, por CLAE/detector PDA. Não foi possível detectar a presença de quercetina, miricetina e canferol nas amostras avaliadas, e os teores dos ácidos caféicos e 5-cafeoilquínico variaram de acordo com o estágio do beneficiamento, ou seja, quanto mais beneficiada a amostra, menor o percentual de água e os metabólitos encontram-se mais concentrados.

Cardozo Jr et al. (2007) quantificaram os teores de compostos fenólicos (ácidos caféico e clorogênico) de 16 amostras de erva-mate provenientes do Brasil e de três amostras de diferentes plantações do Estado do Paraná através de CLAE/detector UV-vis. Os resultados obtidos não demonstraram diferenças significativas entre os conteúdos de compostos fenólicos totais e dos ácidos caféico e clorogênico, em relação, porém houveram diferenças significativas entre as amostras das três plantações do Paraná.

Rivelli et al. (2007) detectaram a presença dos ácidos clorogênico e caféico em extratos aquosos e hidroetanólicos por CLAE/detector UV e encontraram altos teores do ácido clorogênico nos extratos hidroetanólicos e aquosos (8,09% e 9,66%, respectivamente).

As análises realizadas por Streit e colaboradores (2007) mostraram a presença dos ácidos caféico, clorogênico e gálico em amostras de erva-mate nativas e proveniente de áreas de reflorestamento dos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Marques e Farah (2009) analisaram a presença de derivados cafeoilquínicos nos extratos aquosos e metanólicos de dois tipos de amostras de erva-mate (folhas verdes e tostadas) e outras 13 plantas medicinais, através de CLAE/detector UV e CL/detector DAD acoplado à EM. Além do ácido caféico, os autores quantificaram e identificaram nove derivados cafeoilquínicos (ácidos 3-cafeoilquínico, 4-cafeoilquínico, 5-cafeoilquínico, 3-feruloilquínico, 4-feruloilquínico, 5-feruloilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico), sendo que os ácidos 3-feruloilquínico e 4-feruloilquínico foram identificados, pela primeira vez, em amostras de *Ilex paraguariensis*. As análises demonstraram também que os teores destes compostos nos extratos aquosos foram muito similares aos dos extratos metanólicos, e que nesta espécie vegetal há em média 55% e 73% de derivados cafeoilquínicos nas folhas verdes e tostadas, respectivamente, com relação ao conteúdo total de compostos fenólicos.

**Quadro 3:** Principais flavonóides encontrados em *Ilex paraguariensis*.**Quadro 4:** Principais ácidos fenólicos encontrados em *Ilex paraguariensis*.

### 2.3.3.2 Saponinas da erva-mate

Saponinas são glicosídeos de esteróides ou triterpenos policíclicos de elevada massa molecular (600-2000 Da) produzidos principalmente por plantas, mas também por alguns animais marinhos e bactérias. A denominação deriva do latim

*sapone* (= sabão), ou seja, são capazes de formar espuma estável e persistente em soluções aquosas, não sendo afetada pela ação de ácidos minerais diluídos e diferindo-se assim da espuma dos sabões comuns (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2007). A definição clássica das saponinas envolve algumas de suas características (formação de espuma em água, atividades hemolítica e ictiotóxica, e amargor), mas existem exceções. Por exemplo, as saponinas de *Ilex paraguariensis* não apresentam atividade hemolítica (GOSMANN, 1989), as saponinas de *Ilex pseudobuxus* apresentam resposta negativa no teste de espuma (TAKETA; SCHENKEL, 1994) e em *Glycyrrhiza glabra* ocorre a presença de saponinas doces (GIBSON, 1978).

A estrutura das saponinas consiste basicamente de duas porções, uma com característica lipofílica denominada de sapogenina ou aglicona, que pode ser triterpênica ou esteroidal, e outra com caráter hidrofóbico, que é composta por açúcares (usualmente glicose, galactose, ácido glicurônico, xilose, ramnose ou metilpentoses). O açúcar pode estar ligado a um ou dois sítios de glicosilação, o que originou a classificação em saponinas monodesmosídicas e bidesmosídicas, respectivamente. A porção açúcar pode ser linear ou ramificada, contendo de 2 a 5 resíduos monossacarídeos. Geralmente, numa mesma planta encontram-se misturas complexas, devido à presença concomitante de estruturas com um número variado de açúcares ou devido à presença de diversas agliconas (SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004; SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2007).

O grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Eloir Paulo Schenckel, na época vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, foi pioneiro no estudo das saponinas do gênero *Ilex*. A seguir, estão descritos os trabalhos deste grupo, que relataram a identificação das saponinas presentes nas folhas de *Ilex paraguariensis*.

Os estudos das saponinas de *Ilex paraguariensis* permitiram detectar diferenças significativas na composição desses constituintes na fração aglicona, por meio de métodos diversificados. As saponinas das folhas de *Ilex paraguariensis* apresentam exclusivamente agliconas derivadas dos ácidos ursólico e oleanólico, o que permite diferenciá-las das saponinas das folhas das demais espécies do gênero *Ilex*, as quais são derivadas do ácido 19- $\alpha$ -hidróxi-ursólico (GOSMANN et al., 1995; SCHENKEL; MONTANHA; GOSMANN, 1996).

As estruturas que serão descritas das saponinas isoladas de *I. paraguariensis*, derivadas dos ácidos ursólico e oleanólico, estão representadas nos Quadros 5 e 6, respectivamente.

Gosmann, Schenkel e Seligmann (1989) elucidaram, através de reações químicas e métodos espectroscópicos, a estrutura de uma saponina isolada da fração *n*-butanólica do extrato etanólico, identificada como **Matesaponina 1** (ácido ursólico-3-*O*-[ $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopiranosil]-(28 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-glicopiranosil éster).

Em 1995, três novas saponinas foram isoladas da fração *n*-butanólica, tendo sido caracterizada, nomeadas de **Matesaponinas 2, 3 e 4** e, respectivamente, identificadas como ácido ursólico-3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-( $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2))- $\alpha$ -L-arabinopiranosil-(28 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-glicopiranosil éster; ácido ursólico-3-*O*-[ $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopiranosil]-(28 $\rightarrow$ 1)-[ $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glicopiranosil] éster e ácido ursólico-3-*O*-[ $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\alpha$ -L-arabinopiranosil-(28 $\rightarrow$ 1)-[ $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glicopiranosil] éster (GOSMANN et al., 1995).

A partir das folhas secas maceradas em etanol 60%, foi possível isolar e elucidar a estrutura de outra nova saponina, denominada **Matesaponina 5**: ácido ursólico-3-*O*-( $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- $\alpha$ -L-arabinopiranosil)-(28 $\rightarrow$ 1)-[ $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glicopiranosil] éster (KRAEMER et al., 1996).

Adicionalmente, em frações de saponinas purificadas, obtidas de um extrato hidroetanólico, foi verificada a presença de três compostos minoritários denominados **J1, J2 e J3**. A mistura apresentou uma quantidade maior do composto 3, o qual foi isolado na sua forma peracetilada, sendo formado pela mistura de duas substâncias J3a (ácido oleanólico 3-*O*-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopiranosil]-(28 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-glicopiranosil éster) e J3b (ácido ursólico 3-*O*-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopiranosil]-(28 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-glicopiranosil éster). Os autores verificaram que os compostos J1 e J2 também são misturas de pares de glicosídeos derivados dos ácidos oleanólico e ursólico (J1a e J1b; J2a e J2b) (MONTANHA, 1990; SCHENKEL; MONTANHA; GOSMANN, 1996).

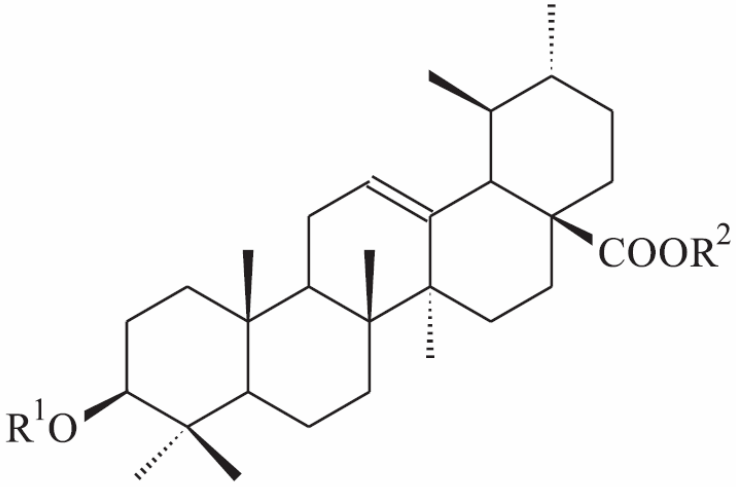


Além destas 11 saponinas, outros pesquisadores isolaram do extrato metanólico das folhas de *I. paraguariensis* duas saponinas conhecidas como **guaiacina B** e **nudicaucina C**, as quais apresentam o ácido oleanólico como aglicona e são formas isoméricas das matesaponinas 1 e 2, que diferentemente possuem como aglicona o ácido ursólico. Estas substâncias já haviam sido isoladas de outras espécies, sendo que a primeira foi isolada de folhas de *Guaiacum officinale* e a segunda de *Hedyotis nudicaulis* (MARTINET et al., 2001).

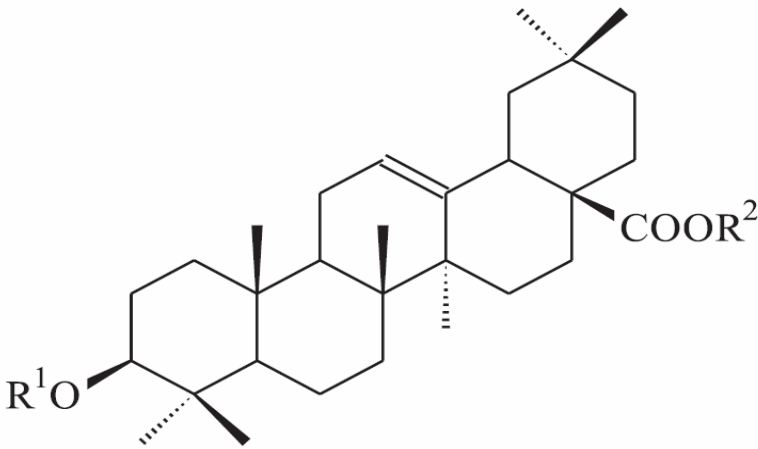
Recentemente, Sugimoto e colaboradores (2009) isolaram três novos glicosídeos triterpênicos das folhas de *I. paraguariensis* que foram identificados como **mateglicosídeo A** [3- O-  $\alpha$ - L- ramnopiranosil (1  $\rightarrow$  2) [ $\beta$ - D-glicopiranosil (1 $\rightarrow$ 3)]- $\alpha$ -L-arabinopiranosil-ácido oleanólico- 28- O-  $\beta$ - D- glicopiranosil (1  $\rightarrow$  6)-  $\beta$ - D- glicopiranosídeo], **mateglicosídeo B** [3- O-  $\beta$ - D- glicopiranosil (1  $\rightarrow$  3)-  $\alpha$ - L- arabinopiranosil- 23- hidroxí-ácido ursólico- 28- O-  $\beta$ - D- glicopiranosídeo] e **mateglicosídeo C** (ácido 23-hidroxí ursólico).

Adicionalmente, Gnoatto, Schenkel e Bassani (2005) desenvolveram um método para extração e quantificação das saponinas presentes em *I. paraguariensis*. As saponinas foram extraídas por decocção, hidrolisadas e quantificadas por CLAE/detector UV, sendo que a concentração de saponinas totais foi expressa em relação ao ácido ursólico. A concentração total de saponinas na fração obtida foi de 704  $\mu\text{g/ml}$ , correspondendo a 352  $\mu\text{g/ml}$  no extrato aquoso.

**Quadro 5:** Saponinas de *Ilex paraguariensis* que possuem como aglicona o ácido ursólico.

<b>Aglicona</b>		
		
<b>Ácido ursólico</b>		
Saponinas	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>Matesaponina 1</b>	β-D-glicopiranosil (1→3)-α-L-arabinopiranosil	β-D-glicopiranosil
<b>Matesaponina 2</b>	β-D-glicopiranosil(1→3)-[α-L-ramnopiranosil(1→2)]arabinopiranosil	β-D-glicopiranosil
<b>Matesaponina 3</b>	β-D-glicopiranosil(1→3)- α-L-arabinopiranosil	β-D-glicopiranosil(1→6)-β-D-glicopiranosil
<b>Matesaponina 4</b>	β-D-glicopiranosil(1→3)-[α-L-ramnopiranosil(1→2)]arabinopiranosil	β-D-glicopiranosil(1→6)-β-D-glicopiranosil
<b>Matesaponina 5</b>	β-D-glicopiranosil(1→3)-[α-L-ramnopiranosil(1→2)]arabinopiranosil	β-D-glicopiranosil(1→4)-α-L-ramnopiranosil(1→6)-β-D-glicopiranosil
<b>J1b</b>	α-L- ramnopiranosil(1→2)-α-L-arabinopiranosil	H
<b>J2b</b>	β -D- glicopiranosil(1→3)-arabinopiranosil	H
<b>J3b</b>	α-L- ramnopiranosil(1→2)-α-L-arabinopiranosil	β-D-glicopiranosil
<b>Mateglicosídeo B</b>	β-D-glicopiranosil(1→3)-α-L-arabinopiranosil-23-hidroxi	β -D-glicopiranosil

**Quadro 6:** Saponinas de *Ilex paraguariensis* que possuem como aglicona o ácido oleanólico.

<b>Aglicona</b>		
		
<b>Ácido oleanólico</b>		
<b>Saponinas</b>	<b>R<sup>1</sup></b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>J1a</b>	$\alpha$ -L- ramnopiranosil(1→2)- $\alpha$ -L-arabinopiranosil	H
<b>J2a</b>	$\beta$ -L- glicopiranosil(1→3)-arabinopiranosil	H
<b>J3a</b>	$\alpha$ -L- ramnopiranosil(1→2)- $\alpha$ -L-arabinopiranosil	$\beta$ -D-glicopiranosil
<b>guaiacina B</b>	$\beta$ -D-glicopiranosil-(1→3)- $\alpha$ -L-arabinopiranosil	$\beta$ -D-glicopiranosil
<b>nudicaucina C</b>	$\beta$ -D-glicopiranosil-(1→3)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1→2)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil	$\beta$ -D-glicopiranosil
<b>Mateglicosídeo A</b>	$\alpha$ -L-ramnopiranosil(1→2)[ $\beta$ -D-glicopiranosil(1→3)]- $\alpha$ -L-arabinopiranosil	$\beta$ -D-glicopiranosil(1→6)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo

#### 2.3.4 Aspectos farmacológicos

Várias atividades farmacológicas já foram descritas para o grupo das saponinas, como por exemplo, atividade imunoestimulante (YANG et al., 1983; WU et al., 1991; SMOLINA; SOLOVÉVA; BESEDNOVA, 2001; QUENELLE et al., 2006; QUENELLE et al., 2008; SUN; XIE; YE, 2009), atividade hipocolesteremiante (GUGLIUCCI, 1996; AL-HABORI; RAMAN, 1998; MATSUURA, 2001), atividade

anticarcinogênica (CAI et al., 2002; XIAO; HUANG; ZHANG, 2007), atividade antiparasitária (GERMONPREZ et al., 2005), atividade anti-inflamatória (WANG et al., 2008), atividade antifúngica (BELHOUCHE et al., 2008; DENG et al., 2008) e **atividade antiviral** (SIMÕES et al., 1990; SIMÕES, 1992; SERRA et al., 1994; HAYASHI et al., 1997; SIMÕES; AMOROS; GIRRE, 1999; MENGONI et al., 2002; SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004; RONEER et al., 2007; WU et al., 2007; GERRISH et al., 2008), entre outras.

No Quadro 7 estão apresentadas algumas das atividades farmacológicas já relatadas na literatura para a erva-mate.

**Quadro 7:** Algumas atividades farmacológicas relatadas para *Ilex paraguariensis*.

<b>Atividades farmacológicas</b>	<b>Referência</b>
<b>Antiviral (HSV-1)</b>	MÜLLER (2006) MÜLLER et al. (2007)
<b>Antioxidante</b>	GUGLIUCCI; STAHL (1995) GUGLIUCCI (1996) FILIP et al. (2000) SCHINELLA et al. (2000) BRACESCO et al. (2003) BIXBY et al. (2005) GORGEN et al. (2005) SCHINELLA; FANTINELLI; MOSCA (2005) ANESINI; FERRARO; FILIP (2006) BRAVO; GOYA; LECUMBERRI (2007) FILIP et al. (2007) MARKOWICZ BASTOS et al. (2007) RIVIELLI et al. (2007)
<b>Antiedematogênica</b>	MONTANHA (1990)
<b>Antiparkinsoniana</b>	MILIOLI et al. (2007)
<b>Antiobesidade</b>	MARTINET; HOSTETTMANN; SCHUTZ (1999) PAGANINI STEIN et al. (2005) DICKEL; RATES; RITTER (2007) PANG; CHOI; PARK (2008)
<b>Anticarcinogênica</b>	RAMIREZ-MARES; CHANDRA; GONÇALVEZ DE MEJIA (2004) ARBISER et al. (2005) GONÇALVEZ DE MEJIA et al. (2005)
<b>Antidiabética</b>	OLIVEIRA et al. (2008)

### 2.3.5 Potenciais aplicações das saponinas da erva-mate

Devido ao seu caráter anfifílico, as saponinas são conhecidas como tensoativos naturais, sendo utilizadas pelas suas propriedades emulsificantes, espumógenas e detergentes em diversos setores industriais, tais como o têxtil, farmacêutico, alimentício e cosmético (TANAKA et al., 1996; MITRA; DUNGAN, 1997; GÜÇLÜ-ÜSTÜNDA; MAZZA, 2007).

As principais fontes de saponinas para a indústria são as raízes de diferentes espécies de *Gypsophilla* e cascas dos troncos de *Quillaja saponaria*. Para a utilização em nível industrial, é essencial, no entanto, que a matéria-prima vegetal seja disponível em quantidade suficiente, e que o conteúdo em saponinas seja elevado; ainda para o emprego em alimentos e cosméticos, a planta deve ter um histórico de utilização por humanos e sua segurança deve estar oficialmente comprovada (TANAKA et al., 1996).

Notavelmente, as saponinas podem ativar o sistema imunológico humano, o que despertou grande interesse no seu potencial como adjuvante de vacinas (ODA et al., 2000; SUN et al., 2009). O adjuvante à base de saponinas mais utilizado em ensaios clínicos é o “Quil A” e seu derivado “QS-21”, isolados a partir das cascas de *Quillaja saponaria*. Sua capacidade de estimular, tanto a resposta imune Th1 quanto a produção de linfócitos T-citotóxicos contra antígenos exógenos, os torna ideais para uso em vacinas e subunidades vacinais direcionadas a patógenos intracelulares, bem como para terapêutica contra o câncer. O adjuvante “Quil A” é comercializado para uso veterinário na vacinação contra a febre aftosa (RAGUPATHI; GATHURU; LIVINGSTON, 1990; SOLTYSIK et al., 1995; MOREIN; HU; ABUSUGRA, 2004; RAGUPATHI et al., 2005). No entanto, as saponinas de *Quillaja* têm graves inconvenientes, tais como alta toxicidade, efeitos hemolíticos indesejáveis e instabilidade aquosa, que limitam sua utilização como adjuvante na vacinação humana (DALSGAARD, 1974; CAMPBELL; PEERBAYE, 1992; DIRK; WEBB, 2005). Atualmente, vários estudos estão em andamento com o intuito de investigar adjuvantes à base de saponinas extraídas de fontes naturais menos tóxicas (SUN; XIE; YE, 2009).

Sendo assim, devido ao seu uso tradicional como alimento (o que garantiria em tese sua segurança), ao alto teor de saponinas em suas folhas, ao domínio das técnicas agrônômicas que garantem seu cultivo e sua disponibilidade em grande

escala, este vegetal possui grande potencial comercial a ser explorado, além dos já conhecidos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a citotoxicidade e a potencial ação anti-herpética *in vitro* do extrato, frações e subfrações purificadas de *Ilex paraguariensis* e correlacionar a atividade detectada com sua composição química.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do extrato bruto hidroetanólico, da fração *n*-butanólica e das suas subfrações, obtidas das folhas de *Ilex paraguariensis*, frente às células VERO e GMK AH1, através do ensaio colorimétrico do MTT;
- Avaliar a potencial atividade anti-herpética das amostras já citadas, frente ao HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333), através do ensaio de inibição da formação das placas de lise;
- Avaliar a atividade virucida de algumas amostras já citadas, através de diferentes estratégias metodológicas;
- Selecionar a amostra que apresentar atividade anti-herpética mais promissora;
- Avaliar o efeito da amostra selecionada na adsorção dos vírus nas células, através de diferentes estratégias metodológicas;
- Avaliar a interferência da amostra selecionada na penetração dos vírus nas células, através do ensaio de inibição da formação das placas de lise;
- Avaliar o efeito da amostra selecionada na propagação intercelular viral, através do ensaio de redução do tamanho das placas de lise;
- Avaliar a influência da amostra selecionada na replicação viral em função do tempo, através da sua adição em diferentes períodos da replicação viral;

- Avaliar a interferência da amostra selecionada na expressão de algumas proteínas virais, através do ensaio de *Western blotting*;
- Correlacionar a ação anti-herpética detectada com os compostos presentes na amostra selecionada;
- Propor o mecanismo da ação anti-herpética da amostra selecionada.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

As partes aéreas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. foram coletadas em Erechim, Rio Grande do Sul, em outubro de 2006. A identificação botânica foi realizada pela Prof<sup>a</sup>. Branca Maria Aimi Severo e a exsicata está depositada no Herbário da Universidade de Passo Fundo sob número RSPF 11074.

A droga vegetal (folhas) foi seca à temperatura ambiente, protegida do sol e calor, durante 15 dias.

### 4.2 Preparo e fracionamento do extrato bruto

As folhas secas e trituradas (50g) foram extraídas sob refluxo (90° C) com etanol 40° GL (500 ml) por 30 min. Após, o extrato foi filtrado, o volume ajustado para 500 ml com água destilada, e dividido em duas alíquotas, que foram evaporadas sob pressão reduzida. Uma das alíquotas originou o extrato bruto (EtOH40° GL) e a outra foi retomada em 250 ml de água destilada e fracionada com diferentes solventes, conforme esquema apresentado na Figura 8. O extrato bruto, frações e subfrações resultantes do processo de fracionamento foram fornecidos pela mestrandia Maria Izabel Goulart Moritz, orientada pelo Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel (Laboratório de Química Farmacêutica, Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS), a quem agradecemos esta frutuosa colaboração.

### 4.3. Análise cromatográfica

Os perfis químicos das diferentes amostras obtidas foram determinados por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como fase estacionária cromatoplasmas de alumínio GF<sub>254nm</sub> (Merck<sup>®</sup>), 20 x 20 cm, como fase móvel a mistura clorofórmio:etanol:água (80:40:5 v/v/v) e como reveladores o agente cromogênico anisaldeído sulfúrico<sup>6</sup> após aquecimento a 100°C e o Reagente Natural A<sup>7</sup>. As placas cromatográficas foram observadas sob luz ultravioleta a 254 e 366 nm.

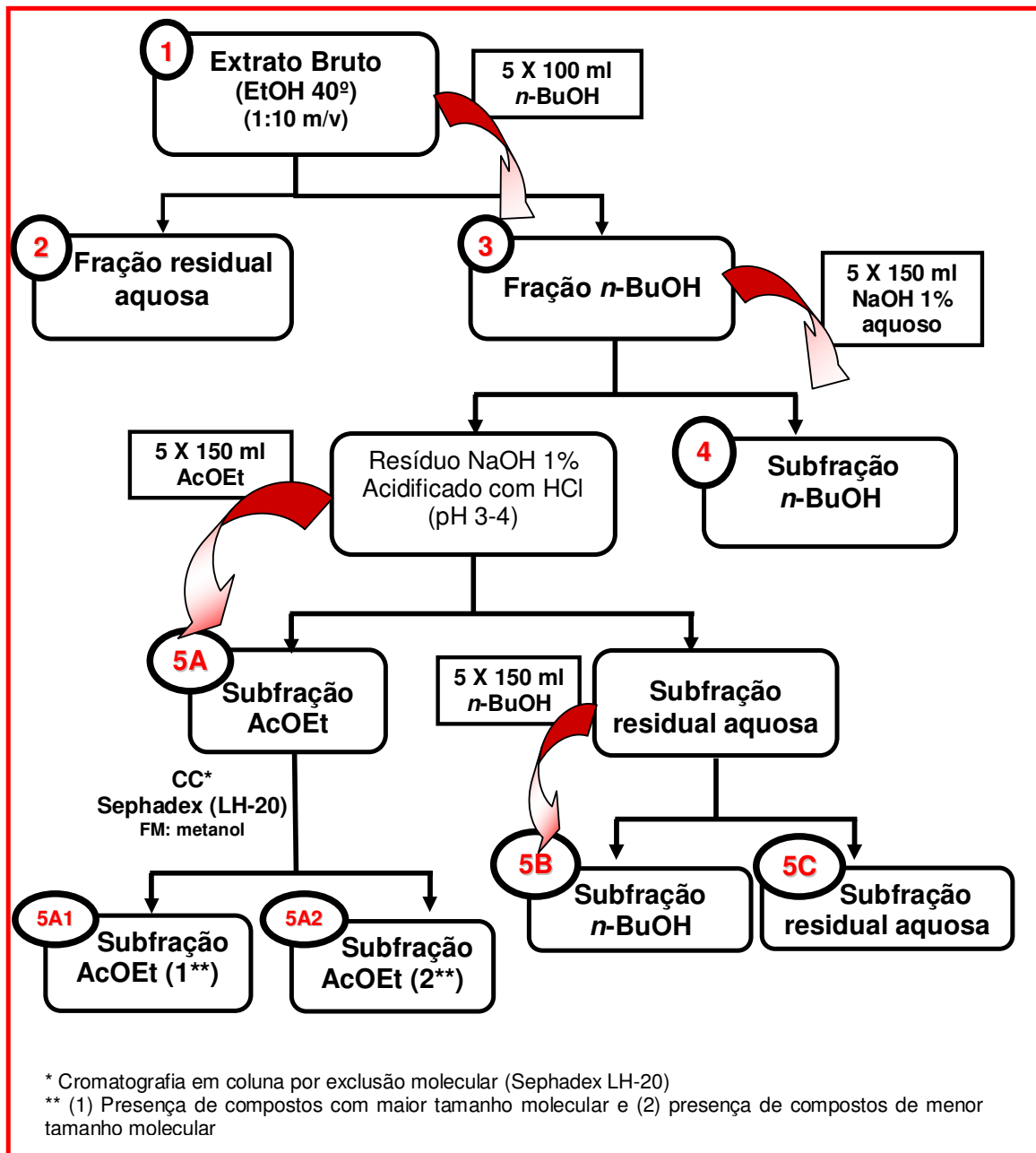
<sup>6</sup> Composição do anisaldeído sulfúrico: diluir 0,5 ml de anisaldeído sulfúrico em 10 ml de ácido acético, acrescentar 85 ml de metanol e 5 ml de ácido sulfúrico concentrado.

<sup>7</sup> Composição do Reagente Natural A:

Solução 1: 1% de difenilboriloxietilamina em metanol;

Solução 2: 5% de polietilenoglicol 4.000 em etanol.

Nas análises por CCD, foram utilizadas como substâncias de referência matesaponina 1, quercetina, isoquercetina, rutina, ácidos caféico, clorogênico, ursólico e oleanólico, todas de procedência Sigma<sup>®</sup>, com exceção da matesaponina 1 (GOSMANN, 1989).



**Figura 8:** Esquema do fracionamento do extrato bruto hidroetanólico das folhas de *Ilex paraguariensis*.

#### 4.4 Preparo das soluções das amostras

Para a preparação das soluções das amostras foram pesadas as quantidades necessárias para obtenção de soluções a 2 ou 6 mg/ml, utilizando-se meio MEM (*Minimal Essential Medium* - Cultilab<sup>®</sup>), acrescido de 1% de PSA (10.000 U de penicilina G, 10.000 µg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B – Cultilab<sup>®</sup>). Posteriormente, elas foram filtradas assepticamente em filtro 0,22 µm (Millipore<sup>®</sup>), aliquotadas em tubos de 2 ml e armazenadas a -20°C até a realização dos ensaios. Para utilização das mesmas durante os ensaios, as soluções foram diluídas em meio MEM até a concentração desejada.

#### 4.5 Culturas celulares

Foram utilizadas células VERO (ATCC: CCL 81) e GMK AH1 (GUNALP, 1965), que são culturas contínuas de fibroblastos de rins de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*), cultivadas a 37° C, em atmosfera umedecida de 5% de CO<sub>2</sub>. As mesmas foram escolhidas por serem permissivas à replicação *in vitro* do HSV-1 e HSV-2, respectivamente, possibilitando sua multiplicação e demonstrando efeito citopático visível e reprodutível ao microscópio invertido (HU; HSIUNG, 1989). As células VERO foram adquiridas do Instituto Adolfo Lutz/SP e as GMH AH1 cedidas gentilmente pelo Departamento de Virologia Clínica da Universidade de Göteborg (Suécia).

O meio utilizado para o crescimento e manutenção das células foi o meio MEM ("*Minimal Essential Medium*", Cultilab<sup>®</sup>), adicionado de 0,22 % de bicarbonato de sódio (Sigma<sup>®</sup>) para que o pH do meio permaneça entre 7,25 e 7,4. O meio MEM foi suplementado com soro fetal bovino (SFB - Cultilab<sup>®</sup>) na proporção de 10% para promoção do crescimento e 5 % para manutenção da linhagem celular. Como incubadora foi utilizada estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> e atmosfera umedecida. Para prevenir a contaminação das culturas celulares por bactérias, fungos e leveduras foram adicionados ao meio 1 % de PSA (10.000 U de penicilina, 10.000 µg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B – Cultilab<sup>®</sup>). Para a obtenção de subculturas celulares, manutenção das células e realização dos experimentos, utilizou-se como agente dissociante, a tripsina (tripsina de pâncreas de porco preparada em uma solução de EDTA 1:250 - Sigma<sup>®</sup>), que é uma enzima proteolítica que catalisa reações de quebra de cadeia polipeptídica em determinadas

seqüências de aminoácidos promovendo a individualização das células. As células utilizadas neste trabalho foram rotineiramente avaliadas para verificação de contaminação por bactérias, fungos e micoplasma.

## **4.6 Vírus**

### **4.6.1 Origem das cepas virais**

Os experimentos foram realizados com Herpes Simplex Vírus tipo 1 (HSV-1) cepa KOS (Faculdade de Farmácia, Universidade de Rennes, França) e com Herpes Simplex Vírus tipo 2 (HSV-2) cepa 333 (Departamento de Virologia Clínica da Universidade de Göteborg, Suécia).

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

Os estoques virais foram preparados conforme metodologia descrita anteriormente por Simões e colaboradores (1999).

As suspensões virais já existentes de HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333) foram inoculadas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo uma monocamada de células VERO e GMK AH1, respectivamente, tripsinizadas 24 h antes da infecção. O meio de cultura foi aspirado da garrafa e a monocamada celular foi lavada 3X com solução de tampão fosfato (PBS), com o objetivo de retirar células inviáveis e resquícios de SFB; em seguida, a monocamada celular foi inoculada com 1 ml da suspensão viral estoque e o frasco incubado por 1 h a 37°C, em estufa de CO<sub>2</sub> para permitir a adsorção e penetração viral. O excesso de inóculo foi retirado por sucção a vácuo, e adicionou-se meio MEM suplementado apenas com 1 % de PSA. As condições de incubação foram as mesmas descritas acima.

O efeito citopático viral (ECP) foi monitorado por microscópio invertido a cada ciclo de replicação (18 h para o HSV). Após total destruição do tapete celular pela infecção viral, o frasco foi congelado a -80°C e descongelado a 37°C por 3X para o rompimento total das células e liberação das partículas virais. O fluido viral foi centrifugado por 10 min a 350 Xg em centrífuga refrigerada a 4°C e o sobrenadante aliqotado em microtubos estéreis, titulados e armazenados a -80 °C até sua utilização.

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

#### 4.6.3 Determinação dos títulos infecciosos virais

Antes de iniciar os ensaios da potencial atividade antiviral das amostras, foi essencial obter inóculos virais com infecciosidade conhecida. A infecciosidade do vírus pode usualmente ser determinada como unidades formadoras de placa (UFP). Os vírus HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333) foram titulados pelo método de contagem das placas de lise (BURLESON; CHAMBERS; WIEDBRAUK, 1992).

Células VERO ou GMK AH1, em uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/cavidade, foram cultivadas em placas de 24 cavidades, com meio MEM suplementado com 5% de SFB e 1% de PSA, e incubadas a 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após confluência (24 h), o meio de cultura de cada cavidade foi aspirado cuidadosamente e a monocamada celular foi lavada com PBS. Essas células foram infectadas com 400 µL da suspensão estoque viral diluída em forma seriada (razão 1:10), em meio MEM sem SFB e com 1 % de PSA (3 réplicas para cada diluição). As placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> durante 1 h, sendo agitadas cuidadosamente a cada 15 min para melhor distribuição da suspensão viral. Após, o inóculo foi aspirado, as células lavadas com PBS e foram adicionados em cada cavidade 500 µL de uma solução de carboximetilcelulose (CMC<sup>8</sup>). As placas foram novamente incubadas por 48 h para o HSV-2 (cepa 333) e por 72 h para o HSV-1 (cepa KOS). Após este período, o meio foi retirado e as células fixadas e coradas pela adição de 200 µL do corante preto de naftaleno<sup>9</sup> por 40 min, à temperatura ambiente, em agitador mecânico. Em seguida, o corante foi aspirado e as placas colocadas para secar a temperatura ambiente, sendo quantificadas através da visualização em microscópio estereoscópio. Para calcular o título, contaram-se os focos de infecção na última diluição, que se caracterizam por áreas claras de lise celular, denominadas de placas. O título infeccioso é expresso através do número de unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/ml) e, portanto, de partículas virais, já que teoricamente cada placa é iniciada pela infecção de uma única partícula viral infectante. O título viral foi calculado através da fórmula:

---

<sup>8</sup>Preparo da solução de carboximetilcelulose (CMC): Meio MEM 2X + solução aquosa a 1,5 % de carboximetilcelulose (Sigma®), na proporção 1:1, ambos previamente esterilizados e acrescidos de 1 % de PSA.

<sup>9</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 (v/v) (Nuclear®), sendo o pH ajustado, se necessário, para 2,3-2,5. Esta mistura foi filtrada através de papel filtro e estocada a 4°C, sendo aquecida em banho-maria a 37° C, antes de seu uso.

$$\text{Título infeccioso (UFP/ml)} = \frac{\text{média do número de UFP} \times \text{recíproca da diluição}}{\text{volume}}$$

#### 4.7 Avaliação da citotoxicidade

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

Foi utilizado o ensaio colorimétrico do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio], conforme proposto por Mosmann (1983) e Takeuchi, Baba e Shigeta (1991) com modificações propostas por Sieuwerts e colaboradores (1995).

Uma suspensão de células VERO ou GMK AH1, contendo aproximadamente  $2,0 \times 10^5$  células/ml, obtida por tripsinização de um frasco de cultura celular, foi distribuída em uma placa de 96 cavidades (100  $\mu$ L/cavidade). Após 24 h de incubação a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>, o meio MEM foi retirado por aspiração e foram adicionados 200  $\mu$ L das amostras, em diferentes concentrações (diluições sucessivas na razão 1:2). A placa foi incubada por 72 h e após este período o meio foi substituído por 50  $\mu$ L de MTT<sup>10</sup> (Sigma®, 1 mg/ml). A placa foi novamente incubada por 4 h. O meio com MTT foi então removido e substituído por 100  $\mu$ L de DMSO/cavidade (Nuclear®) para solubilizar os cristais de formazana. A placa foi então agitada por 10 min e realizada a leitura em espectrofotômetro (Bio-Tek, Elx 800) a 540nm.

Os valores de absorbância medidos para cada concentração de cada amostra foram transformados em porcentagem (%) em relação ao controle celular, o qual é considerado 100% viável, através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{A_{AM} \times 100\%}{A_{CC}}$$

<sup>10</sup> Preparo da solução estoque e da solução de uso de MTT:

Solução estoque (5 mg/ml): 250 mg do pó de MTT (Sigma®), foram dissolvidos em 50 ml de PBS. Esta mistura foi estocada a -20° C, sendo aquecida em banho-maria a 37° C, antes de seu uso.

Solução de uso (1 mg/ml): 1 ml da solução estoque de MTT (5mg/ml) foi aliqotado com auxílio de pipetador automático e adicionado a 4 ml de meio MEM. Esta mistura foi imediatamente adicionada a placa teste.

Onde:  $A_{AM}$  e  $A_{CC}$  correspondem às absorvâncias das amostras e dos controles celulares, respectivamente.

Em seguida, os percentuais calculados, referentes às diferentes concentrações das amostras, foram inseridos num gráfico, e através da análise de regressão, 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  $\pm$  desvio padrão.

#### **4.8 Avaliação da potencial atividade antiviral**

##### **4.8.1 Método de inibição da formação das placas de lise**

Este ensaio foi realizado para avaliar a potencial atividade anti-herpética das amostras, frente ao HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333), através do ensaio de inibição de formação das placas de lise e seguiu os procedimentos descritos por Kuo et al. (2001), com algumas modificações.

Células VERO ou GMK AH1 foram cultivadas em placas de 24 cavidades ( $2,5 \times 10^5$  células/cavidade) e incubadas a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  até a confluência (24 h). O meio foi aspirado cuidadosamente com auxílio de vácuo, preservando-se a integridade da monocamada celular e foram feitas três lavagens com PBS. Após a lavagem, as placas foram infectadas com as suspensões de HSV-1 (cepa KOS) ou de HSV-2 (cepa 333) (100 UFP/cavidade), exceto nos controles celulares. Após 1 h de adsorção a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ , as células foram novamente lavadas com PBS e, então, adicionou-se 500  $\mu\text{l}$  da solução de CMC contendo as diferentes amostras. Os controles virais e celulares receberam apenas 500  $\mu\text{l}$  da solução de diluição das amostras (solução de CMC a qual foi descrita no item 4.6.3) e foram incubados por 72 h (para o HSV-1) ou 48 h (para HSV-2), a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Passado este período, o meio contendo a amostra foi aspirado e as células coradas com 200  $\mu\text{l}$  de solução de preto de naftaleno (preparada conforme descrito no item 4.6.3). Após 40 min, à temperatura ambiente e em agitador horizontal, o corante foi aspirado e as placas contadas através da visualização em microscópio estereoscópio. A porcentagem de inibição da replicação viral de cada amostra, com relação aos controles virais, foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição da replicação viral} = \frac{(\text{NP}_{CV} - \text{NP}_{AM}) \times 100\%}{\text{NP}_{CV}}$$

Onde:  $\text{NP}_{CV}$   $\text{NP}_{MT}$  correspondem aos números de placas de lise formadas nos controles virais e nas amostras, respectivamente.

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

Com posse dos valores de  $\text{CC}_{50}$  e  $\text{CI}_{50}$  foi possível calcular o índice de seletividade (IS) de cada amostra em relação a cada cepa viral utilizada conforme fórmula descrita abaixo:

$$\text{IS} = \frac{\text{CC}_{50}}{\text{CI}_{50}}$$

Onde:  $\text{CC}_{50}$  e  $\text{CI}_{50}$  correspondem à concentração citotóxica a 50% do tapete celular e a concentração efetiva a 50%, respectivamente.

Em todos os experimentos foram realizados controles celulares (CC – células não infectadas), virais (CV – células infectadas) e como controle positivo utilizou-se o aciclovir (Fundação Oswaldo Cruz/Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS).

#### **4.9 Avaliação do provável mecanismo da ação anti-herpética**

##### **4.9.1 Avaliação da ação virucida direta das amostras**

A suspensão viral (50  $\mu\text{l}$ ) contendo  $4,0 \times 10^4$  UFP de vírus (HSV-1 ou HSV-2) em meio MEM sem SFB foi co-incubada com as amostras diluídas seriadamente (1:2) (50  $\mu\text{l}$ ) em meio MEM sem SFB ou com MEM (controle viral), por 20 min a 37°C em banho-maria ou a 4°C em geladeira. Feito isto, foi realizada a diluição (1:100) dos fluidos virais tratados com MEM gelado contendo 1% de PSA para um volume



final de 10 ml, a fim de se obter a concentração não inibitória das amostras. A placa, previamente preparada, contendo a monocamada de células confluentes (24h) foi lavada 3X com PBS e foram adicionados 400 µl de cada diluição nas cavidades. As placas foram incubadas a 37°C durante 1 h, em estufa de CO<sub>2</sub>. Após este período, as diluições foram retiradas, a monocamada lavada 3X com PBS e adicionado 500 µl da solução de CMC (descrita no item 4.6.3). As placas foram incubadas a 37°C durante 48h para o HSV-2 e 72 h para o HSV-1, em estufa de CO<sub>2</sub>. O restante do experimento foi realizado conforme descrito no item 4.8.1 (EKBLAD et al., 2006).

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

$$IR (\%) = \frac{NP_{AM} \times 100\%}{NP_{CV}}$$

Onde: NP<sub>CV</sub> NP<sub>AM</sub> correspondem aos números de placas de lise formadas nos controles virais e amostras, respectivamente.

Em seguida, os percentuais calculados foram inseridos em um gráfico e, através da análise de regressão, foi possível calcular os valores de CV<sub>50</sub>, ou seja, a concentração de cada amostra que foi virucida 50% dos vírions. Os valores de CV<sub>50</sub> representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão da média.

#### **4.9.2 Avaliação da ação virucida da amostra selecionada na presença de soluções protéicas**

Este ensaio foi realizado para avaliar o efeito das soluções protéicas na inativação do HSV-2 pela amostra selecionada e seguiu os procedimentos descritos por Ekblad et al. (2006).

Volumes equivalentes (25 µL) da amostra e de diluições seriadas (1:10) das soluções proteicas de BSA (Albumina Sérica Bovina – 0,0005 a 0,5%) ou SFB (0,005 a 5%) foram misturadas e incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Após, foram adicionados 50 µL de uma suspensão viral contendo 4x10<sup>4</sup> UFP de HSV-2 (cepa

333) e incubado por 15 min a 37° C. Controles virais foram feitos usando-se 50 µL de meio MEM + 50 µL da suspensão viral, e também controles usando-se 50 µL das diferentes concentrações das soluções protéicas + 50 µL da suspensão viral. Decorrido este período, foi realizada a diluição das misturas (1:100) a fim de se obter a concentração não inibitória da amostra, utilizando-se MEM gelado com 1% de PSA. Essas misturas (400 µL) foram transferidas para uma placa contendo tapete celular confluyente (24 h) de células GMK AH1. A placa foi incubada por 48 h e o restante do experimento foi realizado conforme descrito no item 4.8.1.

#### **4.9.3 Avaliação do efeito do pré-tratamento com a amostra selecionada**

A amostra foi diluída seriadamente (1:2) em meio MEM + 1% PSA e colocada em contato com o tapete celular. Após 2 h de incubação em estufa de CO<sub>2</sub>, a diluição da amostra foi aspirada e uma suspensão viral (100 UFP) foi adicionada. Após 1 h em estufa de CO<sub>2</sub> a suspensão viral foi removida e foram cuidadosamente adicionados 500 µL da solução de CMC (preparada conforme descrito no item 4.6.3). A placa foi incubada por 72 h para o HSV-1 ou 48 h para o HSV-2, e o restante do experimento foi realizado conforme descrito no item 4.8.1 (EKBLAD et al., 2006).

#### **4.9.4 Avaliação do efeito das amostras na adsorção viral**

##### **4.9.4.1 Ensaio de adsorção tradicional**

Este ensaio foi conduzido para determinar se as amostras serão capazes de inibir a adsorção viral. Este ensaio é realizado, em parte, a 4°C, temperatura na qual os vírus adsorvem nas células, mas não as penetram. O ensaio seguiu os procedimentos descritos por Schmidtke et al. (2003) e Cheng et al. (2004), com algumas modificações.

Células foram cultivadas em placas de 24 cavidades ( $2,5 \times 10^5$  células/cavidade) até a confluência (24 h) em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Antes de iniciar o procedimento, as placas foram deixadas à temperatura de 4°C, por 30 min. Após, o meio foi aspirado, o tapete celular lavado com PBS e infectado com 100 UFP do vírus em presença ou não das amostras em diferentes concentrações por 2h a 4°C. Após o período de adsorção, as amostras e a suspensão viral foram aspiradas, o

tapete celular lavado 2X com PBS gelado\*<sup>11</sup> e 500 µL de CMC (preparado conforme descrito no item 4.6.3) foram adicionados ao tapete celular. A placa foi incubada por 72 h para o HSV-1 e 48 h para o HSV-2 e realizou-se o procedimento conforme descrito no item 4.8.1.

#### 4.9.4.2 Ensaio de pós-adsorção

Este ensaio foi conduzido para determinar a possível interferência das amostras sobre as partículas virais que já estavam estavelmente adsorvidas nas células. Esta metodologia seguiu as orientações de Piret et al. (2002)

Células (VERO ou GMK AH1) foram cultivadas em placas de 24 cavidades ( $2,5 \times 10^5$  células/cavidade) até a confluência (24 h) em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Antes de iniciar o procedimento, as placas foram deixadas a temperatura de 4°C, por 1 h. Após, o meio foi aspirado, o tapete celular lavado 2X com PBS gelado e infectado com 100 UFP do vírus (HSV-1 ou HSV-2) por 2 h a 4°C. Em seguida, as cavidades foram lavadas com PBS gelado\* para retirar os vírus não adsorvidos. As placas foram incubadas na presença ou ausência de diferentes concentrações da amostra diluída em meio MEM suplementado com 1 % de PSA, por 2 h a 4°C. A amostra foi removida, o tapete celular lavado 2X PBS gelado. O PBS foi removido e foram adicionados 500 µL da solução de CMC. O restante do ensaio foi realizado conforme descrito no item 4.8.1 para o ensaio de inibição da formação das placas de lise.

#### 4.9.5 Avaliação do efeito da amostra selecionada na penetração viral

Este ensaio foi conduzido para determinar se as amostras serão capazes de inibir a penetração viral e seguiu os procedimentos descritos por Piret et al. (2002) e Su et al. (2008) com algumas modificações.

Células (VERO ou GMK AH1) foram cultivadas em placas de 24 cavidades ( $2,5 \times 10^5$  células/cavidade) até a confluência (24 h) em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. Antes de iniciar o procedimento, as placas foram deixadas a temperatura de 4°C, por 30

---

\* Uma das cavidades contendo a suspensão viral (100 UFP) sem a amostra foi lavada com tampão citrato (pH=3) com o intuito de remover os vírus adsorvidos. Este controle serve para garantir que os vírus não tenham avançado para a próxima etapa, a penetração.

<sup>11</sup> Preparo da solução tampão citrato: 4,2 g de ácido cítrico (Carlo Erba®), 0,375 g de KCl (Sigma®) e 4,0 g de NaCl (Sigma®) foram dissolvidos em 500 ml de água ultra-pura e filtrados com auxílio de papel filtro. O pH foi ajustado para 3,0, a solução esterilizada por autoclavagem a 121°C e armazenada em geladeira a 4°C até o uso.

min. Após, o meio foi aspirado, o tapete celular lavado 2X com PBS gelado e infectado com 100 UFP do vírus (HSV-1 cepa KOS ou HSV-2 cepa 333) por 2 h a 4°C para ocorrer a adsorção. Em seguida, as cavidades foram lavadas com PBS gelado para remover partículas virais não adsorvidas, e a temperatura do experimento foi rapidamente elevada por incubação das placas em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 10 min para maximizar a penetração viral. Após, foram adicionados 400 µl de diferentes concentrações da amostra, da heparina e do aciclovir diluídos em meio MEM sem SFB (razão 1:2). Para cada ensaio, foram efetuados os controles virais, onde as células foram infectadas e não tratadas, e os controles celulares, onde as células não foram infectadas nem tratadas.

Em seguida, as placas foram recolocadas na estufa (tempo zero) e a amostra permaneceu em contato com as células durante todo o tempo de penetração (até 60 min). Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e com solução de tampão citrato (pH 3,0) a 37°C por 1 min, para inativar vírions que supostamente não penetraram nas células até este período. O pH foi normalizado através de uma lavagem subsequente com PBS pH 7,0. As células receberam, então, 500 µl da solução de CMC, e os procedimentos seguintes foram os mesmos descritos no item 4.8.1.

#### **4.9.6 Avaliação do efeito da amostra selecionada na propagação intercelular viral**

O método de redução do tamanho das placas de lise (NYBERG et al., 2004) foi utilizado para investigar o efeito dos compostos sobre dispersão radial dos vírus herpéticos célula à célula.

Foram empregadas as mesmas placas de 24 cavidades obtidas nos experimentos descritos no item 4.8.1 e o procedimento de leitura seguiu as orientações propostas por Nyberg et al. (2004) e Kratz et al. (2008).

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

#### 4.9.7 Avaliação do efeito do tempo de adição da amostra selecionada no ciclo de replicação viral

A atividade antiviral da amostra foi avaliada em vários períodos de tempo, de acordo com a técnica descrita por Carlucci et al. (1999). A escolha das duas concentrações utilizadas neste ensaio foi baseada nos resultados obtidos na avaliação da potencial atividade antiviral da amostra selecionada. Utilizou-se uma concentração que inibe aproximadamente 100% da replicação do HSV-1 (cepa KOS) e do HSV-2 (cepa 333) (10 e 15 µg/ml, respectivamente) e outra que inibe cerca de 50% da replicação (7,5 e 6 µg/ml, respectivamente). Como controle, foi empregado o aciclovir na concentração de 1 µg/ml.

Células VERO ou GMK AH1 foram cultivadas em placas de 24 cavidades com meio MEM, suplementado com 5% de SFB e 1% de PSA até atingirem confluência (24 h). Diferentes tratamentos foram então realizados:

- **Tratamento simultâneo:** tempo zero ( $T_0$ ): a amostra, diluída nas concentrações adequadas em meio MEM + 1 % de PSA, foi adicionada às monocamadas celulares concomitantemente com uma suspensão viral contendo 100 UFP de HSV-1 ou HSV-2. A placa foi incubada por 1 h a 37°C e 5 %  $CO_2$ , e após esse período, a mistura foi aspirada, as células foram lavadas com PBS e 500 µl da solução de CMC foram adicionados cuidadosamente. A placa foi incubada em estufa a 37°C e 5% de  $CO_2$ , por 72 ou 48 h para o HSV-1 ou HSV-2 respectivamente, e, após esse período, a mesma foi tratada conforme procedimento descrito no item 4.8.1.

- **Tratamento pós-infecção:** a monocamada celular foi infectada com 400 µl de uma suspensão viral contendo 100 UFP de HSV-1 ou HSV-2. Uma hora após a infecção ( $t_1$ ), a suspensão viral foi aspirada, as células foram lavadas com PBS e adicionou-se 500 µl de uma solução de CMC + amostra nas concentrações especificadas acima para o tempo 1 h ( $t_1$ ); após, a placa foi incubada em estufa de  $CO_2$ , a 37°C, até completar o período de 72 ou 48 h (HSV-1 ou HSV-2 respectivamente).

- **Demais tempos:** as células receberam apenas 500 µl da solução de CMC e a placa foi incubada em estufa de  $CO_2$ , a 37°C. Nos tempos subsequentes 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18 e 24 h após a infecção, essa solução foi aspirada e as células foram tratadas com a amostra diluída nas concentrações descritas acima em solução de CMC. A placa foi incubada em estufa de  $CO_2$ , a 37°C, até completar o período de 72 ou 48 h (HSV-1 ou HSV-2, respectivamente).

#### 4.9.8 Avaliação do efeito da amostra selecionada na expressão das proteínas virais

A avaliação da inibição da expressão das proteínas virais foi conduzida através do ensaio *Western blotting* segundo procedimento descrito por Kuo et al. (2001), com algumas modificações.

Células VERO foram cultivadas em placas de 6 cavidades ( $6 \times 10^5$  células/ml) em meio MEM suplementado com 5 % de SFB e 1 % de PSA até atingirem confluência. Após 24 h, as células foram incubadas ou não (controle celular) com 2 ml de uma suspensão viral do HSV-1 (cepa KOS) com MOI<sup>12</sup> de 0,1 por 1 h a 37°C. Após 1 h e 3 h da infecção viral, as células foram lavadas 3X com 1 ml de PBS e foram adicionados 2 ml do material-teste diluído em MEM nas concentrações adequadas, 2 ml do material-teste diluído em MEM na maior concentração para o controle celular e 2 ml de MEM para o controle viral. As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> durante 18 h (1 ciclo de replicação). Após este período, o meio foi retirado, as células foram lavadas 2X com 2 ml de PBS e foram adicionados 150 µl do tampão de lise<sup>13</sup> em presença de inibidores de proteases. As amostras foram transferidas para microtubos de 0,6 ml, fervidas durante 5 min a 95°C em termociclador (Eppendorf®) e centrifugadas a 10.000 Xg por 10 min (4°C). Após a centrifugação, as amostras foram transferidas para novos tubos e armazenadas a -20°C. A determinação da concentração protéica foi realizada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

O extrato protéico (~50 µg) foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % e SDS 0,1 % (SDS-PAGE). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (GE Healthcare®) em tampão de transferência<sup>14</sup> durante 12 h, a 3 V e a 4°C. Na sequência, as membranas foram bloqueadas por 1 h com 5 % de leite desnatado em solução de bloqueio<sup>15</sup>, lavadas 5 vezes (6 min) com solução de bloqueio e incubadas separadamente com

---

<sup>12</sup> MOI: significa multiplicidade de infecção (multiplicity of infection). É a razão entre o número de partículas virais infecciosas usadas para infectar um determinado número de células.

<sup>13</sup> Preparo do tampão de lise: 2 % de dodecil sulfato de sódio (SDS); 5% de β-mercaptoetanol; 0,125M Tris-HCl pH 6.8; 30% glicerol; 100 µg/ml de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF); água q.s.p. Armazenar a -20°C.

<sup>14</sup> Tampão de transferência: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol; qsp água Milli-Q. Armazenar a -4°C.

<sup>15</sup> Solução de bloqueio: 25 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,15M NaCl; 0,1% Tween 20. Armazenar a -4°C.

os anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio contendo 2% de leite desnatado a temperatura ambiente, durante 1 h e 30 min.

Os anticorpos primários utilizados foram:

- ICP 27: anticorpo policlonal de cabra contra a proteína ICP27 de fase  $\alpha$  do HSV-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) – diluição 1:1.000;
- ICP4: anticorpo policlonal de cabra contra a proteína ICP4 de fase  $\alpha$  do HSV-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) – diluição 1:1.000;
- gD: anticorpo monoclonal de camundongo contra a proteína gD de fase  $\gamma$  do HSV-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) – diluição 1:1.000;
- gE: anticorpo monoclonal de camundongo B1E6A5 (anti-gE) contra a proteína da fase  $\gamma$  do HSV-1 (SJOGREN-JANSSON; JEANSSON, 1985; 1990) – diluição 1:500;
- $\beta$ -actina: anticorpo policlonal de cabra contra a proteína  $\beta$ -actina para controle da expressão das proteínas constitutivas das células (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluição 1:2.000;

Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas 5 vezes (6 min) com o solução de bloqueio e incubadas, durante 1 h, a temperatura ambiente, com os anticorpos secundários IgG anti-cabra diluído 1:5.000 em solução de bloqueio contendo 2 % de leite em pó desnatado (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) para o anticorpo primário contra a ICP 27 e a  $\beta$ -actina, e anti-camundongo diluído 1:7.000 em solução de bloqueio contendo 2 % de leite em pó desnatado (Sigma, St. Louis, MO, USA) para o anticorpo primário contra ICP4, gD e gE. Os anticorpos secundários estavam conjugados à peroxidase. Após a incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas 5 vezes (6 min) com solução de bloqueio e as proteínas reveladas com o kit quimioluminescente ECL (*Enhanced chemiluminescence* - GE Healthcare®).

#### 4.10 Delineamento experimental e análise estatística

Um delineamento de blocos completos casualizados (BCC) e um arranjo fatorial dos tratamentos foram empregados, tanto na avaliação da citotoxicidade como na avaliação da potencial atividade antiviral (SOKAL; ROHLF, 1995), onde cada cavidade da placa constituiu uma unidade experimental e os tratamentos foram as diferentes concentrações das diferentes amostras testadas, frente aos vírus HSV-

1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333). Os tratamentos e os controles foram distribuídos aleatoriamente entre as cavidades da placa e as repetições ficaram em placas diferentes, pois foram realizadas em dias subsequentes, garantindo a casualização. Cada placa correspondeu a um bloco, permitindo uma melhor avaliação das possíveis variações entre as repetições.

O estudo de qualquer atividade farmacológica em cultura celular tem como vantagem, entre muitas outras, a homogeneidade das amostras. Um erro grave que normalmente é cometido quando se trata de experimentos realizados em placas de microtitulação, é acreditar que, colocando-se as mesmas concentrações de uma amostra em duas ou três colunas na placa, se estaria fazendo uma duplicata ou triplicata. Estatisticamente, este procedimento é considerado apenas uma réplica de um mesmo tratamento e não uma repetição, pois a variância devido a fatores externos (erro experimental) não estaria sendo levada em consideração (SOKAL; ROHLF, 1995). Por isso, foram realizados dois ou três experimentos independentes, em dias subsequentes, o que caracteriza uma duplicata ou triplicata, respectivamente.

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



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Preparo e fracionamento do extrato bruto

Extratos aquosos vegetais apresentam como vantagem, além do custo menor, a ausência de lipídios e clorofila. No entanto, como desvantagem deve ser considerada a possibilidade de ocorrer hidrólise durante o processo extrativo, ou hidrotermólise no caso de uma extração a quente, bem como sua baixa estabilidade. Por estas razões, de modo geral, são utilizados álcoois (etanol ou metanol) ou misturas hidroalcoólicas para a extração. No caso deste trabalho, partiu-se de um extrato bruto hidroetanólico (40 °GL). Após a eliminação do conteúdo alcoólico deste extrato, ele foi submetido a um processo de fracionamento, através da partição com um solvente menos polar, o *n*-butanol, com a finalidade de obter uma fração enriquecida em saponinas (GÜÇLÜ-ÜSTÜNDA; MAZZA, 2007; SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2007).

Vale ressaltar que o objeto de estudo desta dissertação (fração *n*-butanólica) foi selecionado após a realização da avaliação da atividade anti-HSV-1 dos compostos fenólicos presentes na fração acetato de etila desta espécie vegetal por Müller (2006). Os resultados obtidos demonstraram que outra(s) classe(s) de compostos poderia(m) estar relacionada(s) com a ação anti-herpética detectada, já que os compostos fenólicos não apresentaram potencial atividade anti-HSV, nas condições experimentais empregadas.

De modo geral, as saponinas ocorrem na forma de misturas complexas, com variações do número de açúcares presentes em uma aglicona específica e/ou abrangendo variações quanto às agliconas e aos açúcares presentes, o que torna o seu isolamento um processo bastante trabalhoso. Dentre os problemas mais frequentemente encontrados em trabalhos analíticos envolvendo saponinas estão a extração incompleta do material vegetal e a dificuldade de obtenção de uma fração livre de compostos interferentes para a sua quantificação (SCHENKEL; GOSMANN; ATHAYDE, 2007).

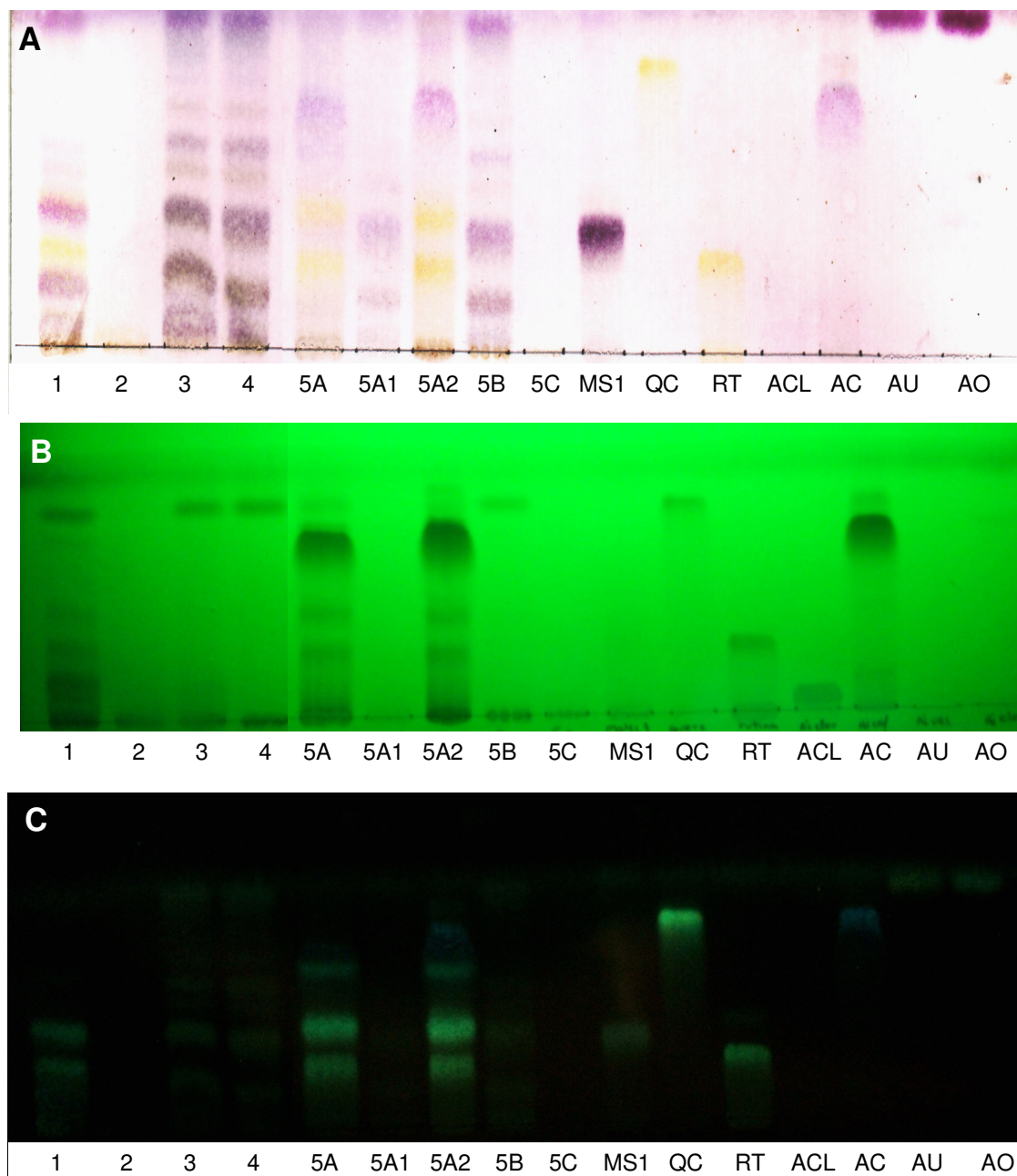
Dos processos descritos na literatura para a purificação de saponinas, os melhores resultados foram obtidos, no caso da erva-mate, através do fracionamento do extrato hidroetanólico com *n*-butanol e subsequente partição em meio alcalino. Como agente cromogênico foi utilizado o anisaldeído sulfúrico, pois as saponinas

quando reveladas com esta solução apresentam coloração característica azul-violácea, sob luz visível (GOSMANN, 1989; MONTANHA, 1990; TAKETA, 1997).

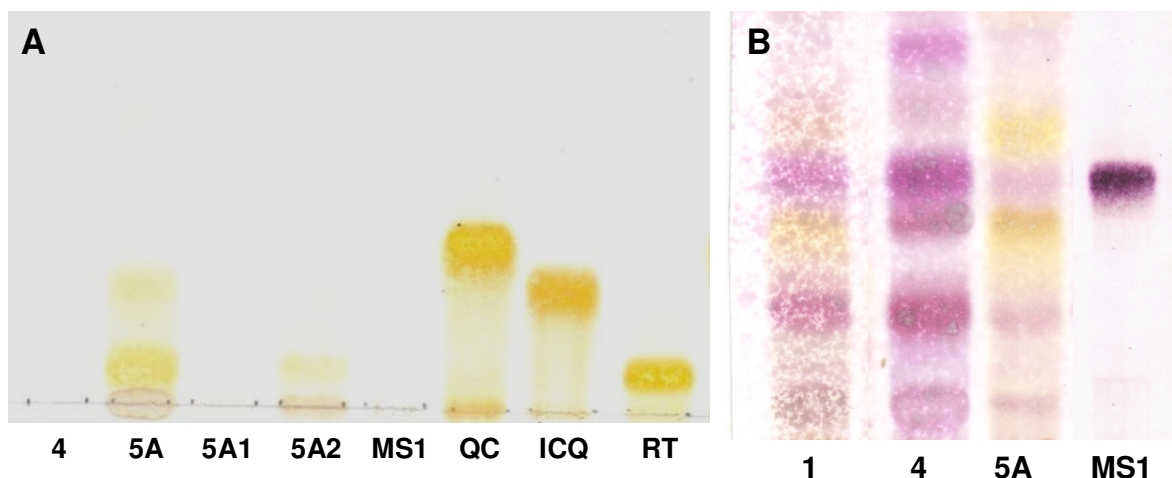
Conforme relatado no item 4.2 dos Materiais e Métodos, o processo de fracionamento do extrato bruto hidroetanólico das folhas de *Ilex paraguariensis* foi realizado pela mestranda Maria Izabel Goulart Moritz, orientada pelo Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel, e os dados fitoquímicos aqui apresentados foram gentilmente por eles cedidos.

Tal fracionamento foi monitorado através da realização de CCD e as Figuras 9 e 10 apresentam os perfis cromatográficos das amostras avaliadas, bem como o comportamento das amostras autênticas de matesaponina 1, quercetina, isoquercetina, rutina e ácidos clorogênico, caféico, ursólico e oleanólico.

Como pode ser verificado nos cromatogramas (Figuras 9 e 10), há a presença de saponinas, flavonoides e ácidos fenólicos nas amostras, com exceção da fração 2 e da subfração 5C (Figura 9). A presença destas substâncias nas amostras foi detectada como manchas de tamanho e intensidade de coloração semelhantes às das amostras autênticas. Os resultados estão expressos no Quadro 8, de acordo com a análise visual dos cromatogramas apresentados nas Figuras 9 e 10.



**Figura 9:** Perfil cromatográfico do extrato bruto, frações e subfrações das folhas de *Ilex paraguariensis*. (1) Extrato bruto (EtOH 40°GL); (2) Fração residual aquosa da extração com *n*-BuOH do extrato 1; (3) Fração *n*-butanólica (a partir do extrato 1); (4) Subfração *n*-BuOH após extração em meio alcalino; (5A) Subfração acetato de etila; (5A1) Subfração 1 resultante da separação por Sephadex (LH-20) da subfração 5A; (5A2) Subfração 2 resultante da separação por Sephadex (LH-20) da subfração 5A; (5B) Subfração *n*-BuOH após extração com acetato de etila e *n*-BuOH; (5C) subfração residual aquosa; (MS1) Matesaponina 1; (QC) Quercetina; (RT) Rutina; (ACL) Ácido clorogênico; (AC) Ácido caféico; (AU) Ácido ursólico; (AO) Ácido oleanólico. **Fase fixa:** gel de sílica GF<sub>254nm</sub>. **Fase móvel:** CHCl<sub>3</sub>:EtOH:H<sub>2</sub>O (80:40:5 v/v/v). (A) Cromatograma visualizado sob luz visível, após revelação com anisaldeído sulfúrico, (B) Cromatograma visualizado sob luz UV (254 nm), após revelação com anisaldeído sulfúrico, (C) Cromatograma visualizado sob luz UV (366 nm), após revelação com Reagente Natural A.



**Figura 10:** Perfil cromatográfico das amostras do extrato bruto e subfrações das folhas de *Ilex paraguariensis*. **(A)** Cromatograma após revelação com Reagente Natural A, visualizado sob luz visível; **(B)** Cromatograma após revelação com anisaldeído sulfúrico, visualizado sob luz visível. **Fase fixa:** gel de sílica GF<sub>254nm</sub>. **Fase móvel:** CHCl<sub>3</sub>:EtOH:H<sub>2</sub>O (80:40:5 v/v/v). **(1)** Extrato bruto (EtOH 40 °GL); **(4)** Subfração *n*-BuOH após extração em meio alcalino; **(5A)** Subfração acetato de etila; **(5A1)** Subfração 1 resultante da separação por Sephadex (LH-20) da subfração 5A; **(5A2)** Subfração 2 resultante da separação por Sephadex (LH-20) da subfração 5A; **(MS1)** Matesaponina 1; **(QC)** Quercetina; **(ICQ)** Isoquercetina; **(RT)** Rutina.

**Quadro 8:** Resultado da análise cromatográfica em camada delgada do extrato, fração e subfrações de *Ilex paraguariensis*.

Substâncias de referência	Amostras analisadas						
	1	3	4	5A	5A1	5A2	5B
Matesaponina 1	X	X	X	X	X		X
Quercetina							
Isoquercetina	X	X		X		X	
Rutina	X	X		X		X	
Ácido clorogênico	X	X		X		X	
Ácido caféico	X	X		X		X	

Nas condições cromatográficas empregadas, não foi possível visualizar os constituintes analisados na fração 2 e subfração 5C.

Não foi possível fazer a distinção entre o ácido oleanólico e o ácido ursólico, pois a separação desses ácidos por cromatografia em camada delgada é difícil devido à pequena diferença estrutural dos mesmos (GOSMANN, 1989).

Pode-se perceber que a principal diferença está entre as subfrações 4, 5A, 5A1 e 5A2. Na subfração 4 observa-se a presença de saponinas, caracterizadas

pela coloração azul-violácea, característica destas substâncias após revelação com anisaldeído sulfúrico (Figura 9A e Figura 10B).

Na subfração 5A, há a presença de saponinas, rutina, isoquercetina, ácido clorogênico e ácido caféico, enquanto que nas subfrações derivadas (5A1 e 5A2), há uma visível separação dos constituintes. Na subfração 5A1 visualiza-se, predominantemente, a matesaponina 1 e na subfração 5A2 encontram-se os demais constituintes citados anteriormente (Figura 9 e 10).

### 5.2 Determinação dos títulos virais

Os títulos infecciosos das suspensões-estoques virais foram determinados conforme as metodologias descritas no item 4.6.3. No decorrer do trabalho, foram utilizadas três suspensões-estoques do HSV-1 (cepa KOS) e duas do HSV-2 (cepa 333). Seus títulos constam no Quadro 9.

**Quadro 9:** Títulos infecciosos das suspensões-estoques virais.

Vírus	Suspensão-estoque viral	Título infeccioso (UFP/ml)
HSV-1 (cepa KOS)	1	$1,16 \times 10^7$
	2	$4,25 \times 10^7$
	3	$8,57 \times 10^6$
HSV-2 (cepa 333)	1	$2,16 \times 10^6$
	2	$9,02 \times 10^5$

### 5.3 Avaliação da citotoxicidade

Para a avaliação da potencial ação antiviral de uma amostra qualquer, é indispensável a avaliação prévia de sua toxicidade em relação às células permissivas ao vírus em estudo, em decorrência do fato de que um agente antiviral ideal deve inibir o ciclo de replicação viral, interferindo o mínimo na estrutura e metabolismo das células hospedeiras (VANDER BERGHE; VLIETINCK; VAN HOOFF, 1986; VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997).

A citotoxicidade foi definida por Nardone (1977) como sendo o conjunto de alterações da homeostase celular, que provoca uma série de modificações, que interfere na capacidade adaptativa das células, bem como na sua sobrevivência, multiplicação e realização de suas funções metabólicas. Desta forma, o

comportamento das células frente a uma amostra qualquer pode ser evidenciado pela desorganização da monocamada celular, acompanhada do aspecto granuloso e arredondado das células (SCHWÖBEL; STREISSLE, 1977). Estas alterações são capazes de prejudicar a avaliação da atividade antiviral, pois a formação das placas de lise viral depende da quantidade de vírions (número de unidades infecciosas), que é liberada das células infectadas para as células adjacentes, propagando a infecção viral. Portanto, é necessário que a amostra não interfira nas características celulares, mantendo o tapete celular íntegro para melhor avaliação desta atividade biológica (STREISSLE; SCHWOBE; HEWLETT, 1981; VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997).

A intensidade da lesão celular depende de vários fatores, tais como a concentração da amostra, o tempo de exposição, a linhagem celular, a capacidade da amostra em penetrar na célula, entre outras (HU; HSIUNG, 1989). Além disso, a citotoxicidade pode ser também evidenciada por alterações em suas funções, tais como síntese de proteínas, atividade lisossomal, atividade mitocondrial, entre outras (KORZENIEWSKI; CALLEWAERT, 1983).

O estudo do efeito citotóxico das amostras avaliadas neste trabalho, frente às células VERO e GMK AH1, foi realizado utilizando-se o ensaio colorimétrico do MTT e, para cada material avaliado, os valores de  $CC_{50}$ , após 72 h de incubação foram calculados através de análise de regressão. O sal de tetrazólio (MTT) é um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, que o reduzem em suas mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto formazana de coloração azul-escuro, não solúvel em água, que fica armazenado no citoplasma celular. O ensaio colorimétrico com MTT é um método sensível e quantitativo, pois mede a quantidade de formazana formada através de espectrofotometria, onde o valor da absorbância obtido é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

Este ensaio possui como vantagens a possibilidade de testar rapidamente um grande número de amostras, sua facilidade de execução e a objetividade com a qual os resultados são obtidos (SIEUWERTS et al., 1995).

Os valores de  $CC_{50}$  obtidos para as diferentes amostras avaliadas estão expressos na Tabela 1.

De modo geral, as amostras foram pouco citotóxicas para ambas as linhagens celulares, com exceção da subfração 4. Adicionalmente, a fração 3 foi a mais citotóxica, mas somente para as células VERO.

**Tabela 1:** Citotoxicidade do extrato bruto, fração e subfrações isoladas de *Ilex paraguariensis*, frente às células VERO e GMK AH1, através do ensaio colorimétrico do MTT.

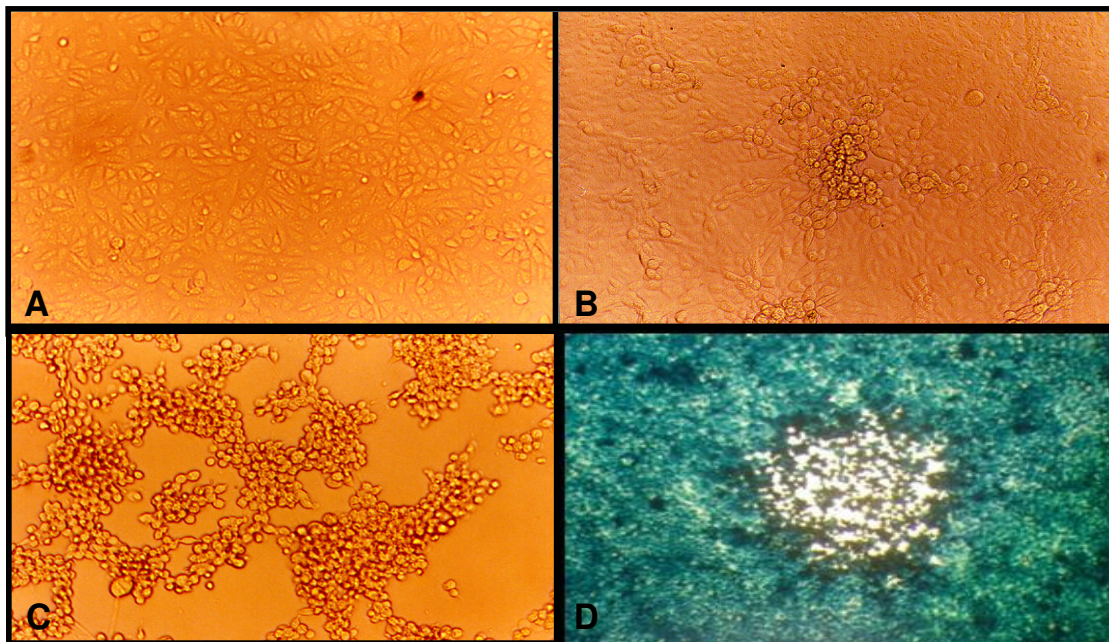
Amostras	CC <sub>50</sub> (µg/ml)	
	VERO	GMK AH1
1	1.530,12 ± 202,97	2.414,98 ± 129,18
3	152,69 ± 7,59	1.074,26 ± 226,00
4	398,78 ± 96,59	258,69 ± 28,22
5 A	1.245,77 ± 92,67	1.879,70 ± 170,13
5 A1	1.174,79 ± 53,70	1.553,90 ± 68,38
5 A2	795,32 ± 176,33	>2.000
5B	978,75 ± 37,45	1.636,29 ± 514,36
Aciclovir	> 1.000	> 1.000

Os valores representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão. As concentrações avaliadas estão expressas em µg/ml. Para definição das amostras, ver Materiais e Métodos, item 4.2.

#### 5.4 Avaliação da potencial atividade antiviral

A triagem da potencial atividade anti-herpética foi avaliada pelo ensaio de inibição da formação das placas de lise, em células VERO e GMK AH1, inoculadas com HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333), respectivamente. Após o período de incubação de 72 h para o HSV-1 e de 48 h para o HSV-2, foi possível observar seu efeito citopático viral típico, que se caracteriza pelo aparecimento de células de dimensões variáveis, arredondadas, bastante brilhantes, pouco refringentes, algumas vezes separadas e, mais frequentemente, ligadas umas às outras por prolongamentos citoplasmáticos formando os chamados “focos” com aspecto característico de “cachos de uva”, que se estendem rapidamente pela superfície do local da infecção (Figura 11). As lesões citoplasmáticas aparecem como formações policarióticas (sincícios e células gigantes) devido à fusão das membranas plasmáticas das células adjacentes infectadas (GIRARD; HIRTH, 1989).

O ensaio de inibição da formação das placas de lise utiliza um número constante de partículas virais e varia a concentração das amostras. O diferencial desta técnica é a adição de um meio semi-sólido (carboximetilcelulose - CMC), que impede a difusão dos vírus do seu lugar de origem para novos lugares e evita a formação de placas secundárias, assegurando que cada placa formada seja de uma única partícula viral infecciosa (Figura 11D) (BURLESON; CHAMBERS; WIEDBRAUK, 1992). Assim, a atividade antiviral de uma amostra pode ser avaliada através da diminuição do número de placas de lise viral, em relação aos controles virais.



**Figura 11:** Efeito citopático causado pelo HSV-1 em células VERO. **(A)** Células não infectadas; **(B)** Efeito citopático viral inicial (foco), após 18h de incubação; **(C)** Efeito citopático viral (aspecto característico de “cachos de uva”), após 48-72h da infecção; **(D)** Placa de lise viral. Aumento: 40X (microscópio invertido)

O uso de um controle positivo nos ensaios de detecção da atividade antiviral permite demonstrar se esses foram realizados corretamente, sendo considerado, ainda, um padrão com o qual a atividade da amostra pode ser comparada. Idealmente, o controle positivo deve ser um fármaco anti-herpético usado clinicamente (SIDWELL, 1986).

Neste trabalho, paralelamente aos experimentos, foram realizados controles positivos com o aciclovir, pois ele é o fármaco de escolha para o tratamento de várias infecções herpéticas. A proteção obtida foi em torno de 100%, de acordo com



o que é referenciado na literatura, atestando a eficiência da metodologia empregada (DE JALON et al., 2003).

A relação entre os efeitos farmacológicos e tóxicos de um composto é um importante requisito na previsão de sua aplicabilidade como agente terapêutico, quando da realização dos estudos pré-clínicos *in vitro*, e tal informação provém do cálculo do seu índice de seletividade ( $IS=CC_{50}/CI_{50}$ ) (HU; HSIUNG, 1989).

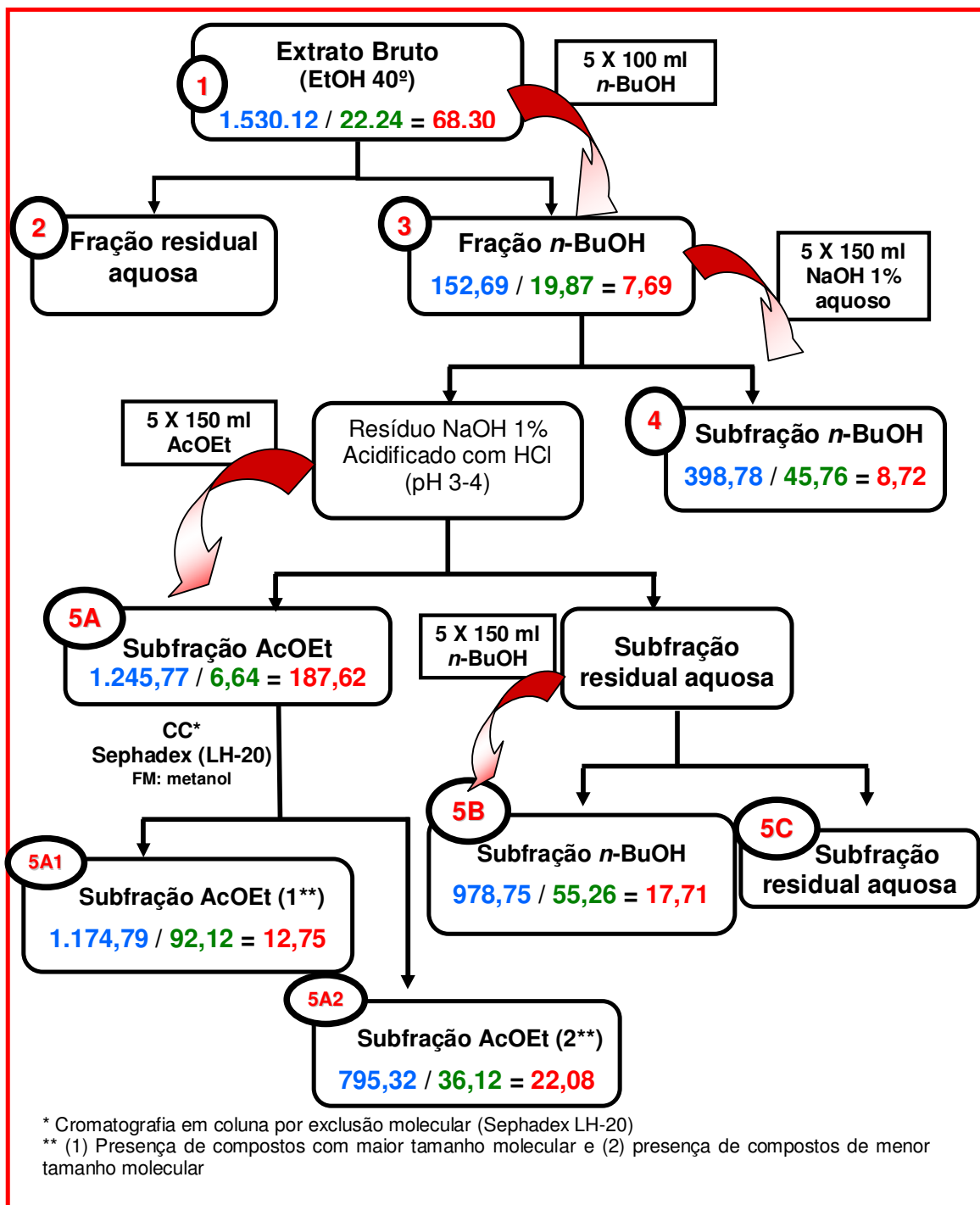
O extrato bruto (EtOH 40°GL) de *Ilex paraguariensis*, suas frações e subfrações foram investigados com relação à sua potencial atividade antiviral frente aos Herpes Simplex Virus tipo 1 (HSV-1, cepa KOS) e tipo 2 (HSV-2, cepa 333). Embora não existam evidências que esta planta seja usada popularmente para tratar distúrbios que indiquem uma provável ação anti-herpética, vários estudos têm relatado a atividade anti-herpética para algumas das classes dos constituintes químicos desta planta, especialmente flavonoides, ácidos fenólicos e saponinas triterpênicas, conforme consta na Revisão Bibliográfica (item 2.1)

Os resultados da triagem anti-herpética do extrato, frações e subfrações da erva-mate encontram-se na Tabela 2 e nas Figuras 12 e 13.

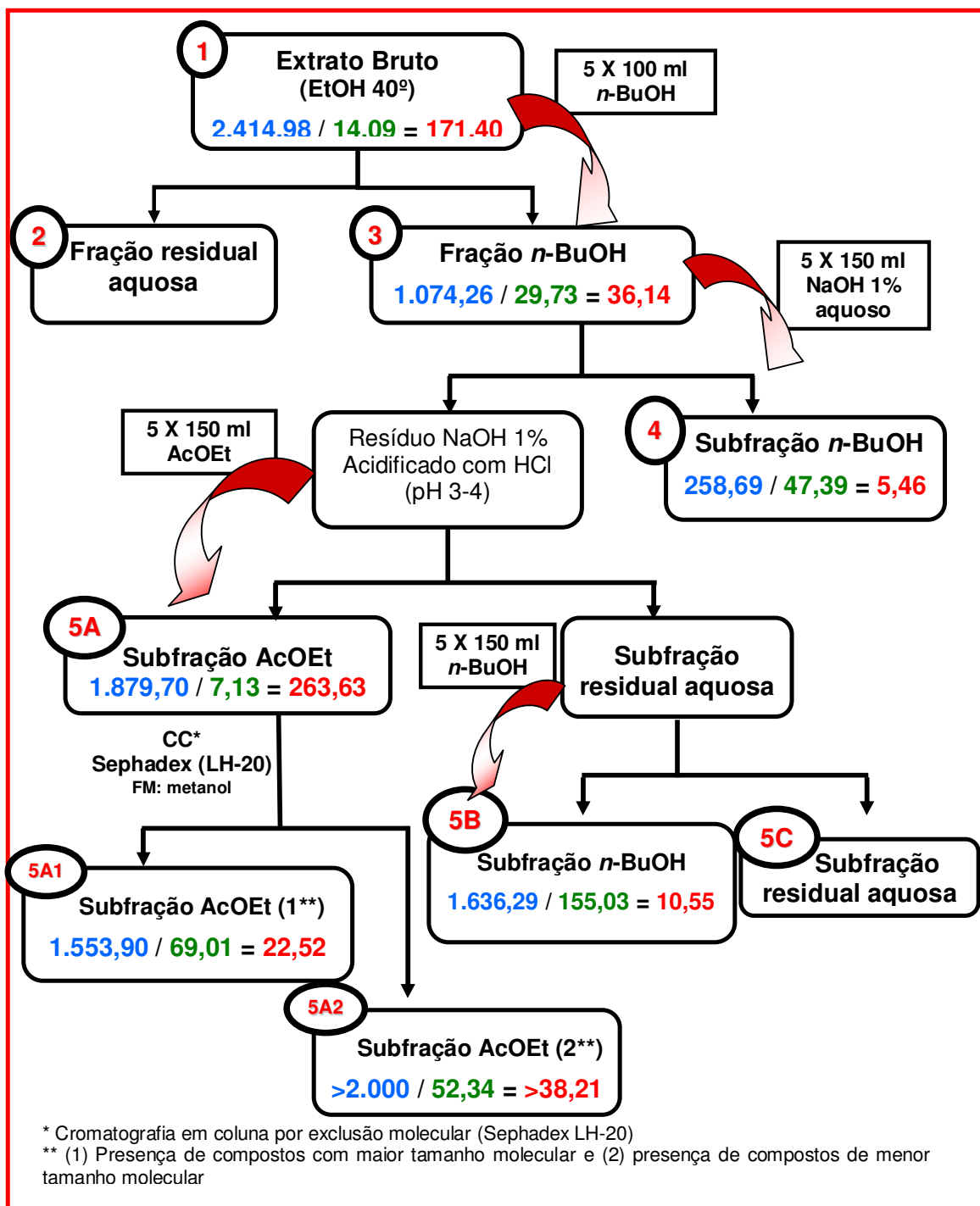
**Tabela 2:** Resultados obtidos da triagem anti-herpética (anti-HSV-1 e anti-HSV-2) do extrato bruto, fração e subfrações de *Ilex paraguariensis*, através do ensaio de inibição da formação das placas de lise.

Amostras	HSV-1 (cepa KOS)			HSV-2 (cepa 333)		
	CC <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>	IS	CC <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>	IS
1	1.530,12	22,24 ± 1,49	68,3	2.414,98	14,09 ± 0,98	171,40
3	152,69	19,87 ± 1,04	7,69	1.074,26	29,73 ± 1,62	36,14
4	398,78	45,76 ± 3,55	8,72	258,69	47,39 ± 2,40	5,46
5 A	1.245,77	6,64 ± 0,10	187,62	1.879,70	7,13 ± 0,24	263,63
5 A1	1.174,79	92,12 ± 8,11	12,75	1.553,90	69,01 ± 0,39	22,52
5 A2	795,32	36,12 ± 1,15	22,08	>2.000	52,34 ± 2,55	> 38,21
5B	978,75	55,26 ± 2,68	17,71	1.636,29	155,03 ± 22,10	10,55
Aciclovir	> 1.000	0,51 ± 0,02	> 1.960	> 1.000	1,18 ± 0,04	847,45

Os valores representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão; a concentrações avaliadas estão expressas em µg/ml; CC<sub>50</sub>: concentração citotóxica a 50%; CI<sub>50</sub>: concentração inibitória a 50%; IS = CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>.



**Figura 12:** Resultados obtidos da avaliação da citotoxicidade frente às células VERO (CC<sub>50</sub>, µg/ml) e da atividade anti-HSV-1 (CI<sub>50</sub>, µg/ml) *in vitro* do extrato bruto, frações e subfrações de *Ilex paraguariensis*, através do ensaio colorimétrico do MTT e do ensaio de inibição da formação das placas de lise, respectivamente. IS = CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>.



**Figura 13:** Resultados obtidos da avaliação da citotoxicidade frente às células GMK AH1 (CC<sub>50</sub>, µg/ml) e da atividade anti-HSV-2 (CI<sub>50</sub>, µg/ml) *in vitro* do extrato bruto, frações e subfrações de *Ilex paraguariensis*, através do ensaio colorimétrico do MTT e do ensaio de inibição da formação das placas de lise, respectivamente. IS = CC<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>.

Os valores obtidos permitiram verificar que as amostras testadas de *I. paraguariensis* apresentaram atividade antiviral promissora para ambas as cepas virais testadas. Ao se comparar os resultados obtidos com os dois tipos de vírus, verificou-se que o HSV-2 apresentou IS maiores do que o HSV-1.

A partir do fracionamento do extrato bruto (1), obtiveram-se duas frações: *n*-butanólica (3) e a residual aquosa (2), sendo que apenas a fração 3 foi avaliada quanto à citotoxicidade e atividade antiviral. O valor de IS obtido pode ser visualizado na Tabela 2 e também nas Figuras 12 e 13, para os vírus HSV-1 e HSV-2, respectivamente. Em seguida, a fração 3 foi fracionada utilizando-se uma solução aquosa de NaOH 1%, obtendo-se a subfração 4 e um resíduo, que foi acidificado e fracionado com acetato de etila, obtendo-se a subfração 5A. Com relação à atividade anti-HSV-1, observou-se que a subfração 5A possui IS mais promissor (187,62) em relação às outras duas amostras (fração 3 e subfração 4, IS=7,69 e 8,72, respectivamente). Assim, optou-se por dar continuidade ao fracionamento da subfração 5A, pois sabe-se que é nesta fração que se concentram os metabólitos secundários de interesse (saponinas triterpênicas, flavonoides e ácidos fenólicos) (Quadro 8). Para o HSV-2, foi observado o mesmo comportamento e seguiu-se o mesmo raciocínio.

Portanto, a subfração 5A foi submetida a uma cromatografia em coluna por exclusão molecular (Sephadex LH-20), fornecendo duas subfrações enriquecidas, uma em saponinas (5A1) e outra em compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) (5A2). Estas duas subfrações (5A1 e 5A2) demonstraram menor atividade anti-HSV frente às cepas virais avaliadas (IS= 12,75 e 22,08/HSV-1 e IS=22,52 e 38,21/HSV-2, respectivamente) (Tabela 2 e Figuras 12 e 13) do que a subfração 5A (IS=187,62/HSV-1 e 263,63/HSV-2).

O resíduo aquoso resultante da extração com acetato de etila, após extração com *n*-butanol (5B), também foi avaliado e apresentou IS=17,71 e 10,55 para o HSV-1 e HSV-2, respectivamente.

No estudo realizado por Müller e colaboradores (2007), o extrato bruto aquoso das folhas de *Ilex paraguariensis* demonstrou atividade antiviral frente ao HSV-1 cepa KOS (sensível ao aciclovir) e cepa 29R (resistente ao aciclovir), apresentando valores de IS=15,8 e IS=12,6; respectivamente. Comparando estes resultados com os obtidos no presente trabalho, verificou-se que o extrato hidroetanólico possui valor de IS aproximadamente 4X maior para o HSV-1 cepa KOS (IS=68,30) (Tabela

2). Este aumento da atividade anti-HSV-1 pode estar relacionada com o tipo do extrato bruto avaliado; possivelmente, a utilização da mistura etanol-água (40:60 v/v) foi mais eficiente na extração dos compostos bioativos.

Até o presente momento, não foi encontrado relato da atividade antiviral frente ao HSV-2 de extratos de folhas de *Ilex paraguariensis*. Neste trabalho, para o extrato bruto hidroetanólico obtido desta espécie vegetal, foi detectada uma relevante ação anti-HSV-2 (IS=171,40), cerca de 2,5X maior do que sua ação anti-HSV-1 (Tabela 2).

Observando-se as Figuras 12 e 13, percebe-se praticamente o mesmo comportamento em relação à atividade antiviral da subfração 5A, ou seja, ela possui índices de seletividade maiores do que as outras amostras avaliadas. O fracionamento da subfração 5A em 5A1 e 5A2 fez com que houvesse perda da atividade, indicando um possível sinergismo entre os componentes presentes nestas subfrações (5A1 e 5A2).

A presença concomitante de saponinas, flavonoides e ácidos fenólicos na subfração 5A parece ser responsável pela ação anti-herpética detectada, tanto para o HSV-1 quanto para o HSV-2.

As saponinas, flavonoides e ácidos fenólicos, de forma geral, apresentam um amplo espectro de atividade contra vírus RNA e DNA, incluindo neste último grupo os HSV, atuando através da redução da infecciosidade viral e/ou da inibição da replicação viral (HUDSON, 1990; SIMÕES et al., 1990; VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997; SIMÕES; AMOROS; GIRRE, 1999; JASSIM; NAJI, 2003; CHATTOPADHYAY; NAIK, 2007; XIANG; PEI; WANG, 2008).

Tendo em vista que a triagem antiviral mostrou os maiores valores de IS para a subfração 5A, optou-se por dar continuidade ao estudo do provável mecanismo da ação anti-herpética detectada para esta subfração.

É importante ressaltar que vários estudos farmacológicos realizados com extratos de plantas medicinais têm demonstrado que a ação sinérgica de seus metabólitos (primários e secundários) é, na verdade, a responsável pelas ações detectadas. Um exemplo clássico, muito conhecido e bastante relatado na literatura, é o do extrato EGb 761, elaborado com folhas de *Ginkgo biloba* (DEFEUDIS, 1991).

Com relação à atividade antiviral, nosso grupo de pesquisa vem comprovando tal afirmativa, ao demonstrar que o isolamento dos compostos bioativos faz com que a atividade antiviral detectada previamente para extratos e frações purificadas

diminua ou mesmo desapareça, tal qual ocorreu com *Achyrocline satureioides* (BETTEGA et al., 2004), *Araucaria angustifolia* (FREITAS, 2001) e *Cecropia glaziovii* (SILVA, 2009).

Tais fatos demonstram a necessidade de ponderar o enfoque tradicional do trabalho conjunto farmacologia/química de produtos naturais, onde o objetivo do fracionamento biomonitorado é o isolamento de substâncias bioativas, passando pela purificação das frações ou subfrações bioativas. Em determinadas situações, como a que aqui ocorreu, a ênfase deve ser dada às subfrações bioativas, já que a sua purificação resultou em diminuição considerável da atividade. O próximo passo seria, então, padronizar quimicamente tais subfrações para garantir a reprodutibilidade dos seus resultados farmacológicos.

### **5.5 Avaliação do provável mecanismo da ação anti-herpética detectada**

A replicação dos HSV é caracterizada por uma sequência complexa de etapas, que são potenciais alvos de um agente antiviral (CHATTOPADHYAY; NAIK, 2007; SCHNITZLER et al., 2008). Alguns compostos podem exercer atividade antiviral através da modificação dos componentes da membrana das células-alvo (KAWAMOTO et al., 2003), diretamente nas partículas virais (CHENG et al., 2004; TOME et al., 2005; TAO et al., 2007; KRATZ et al., 2008) ou nos diferentes estágios da replicação viral (SIMÕES; AMOROS; GIRRE, 1999; BOULWARE et al., 2001; KUO et al., 2001; BETTEGA et al., 2004; SU et al., 2008).

Com o objetivo de identificar o(s) sítio(s)-alvo de ação, algumas amostras e, mais especificamente a subfração 5A, foram adicionadas em diferentes estágios da infecção viral.

#### **5.5.1 Avaliação da ação virucida**

O primeiro passo para o estudo do mecanismo da ação anti-HSV foi avaliar a interferência direta da subfração 5A sobre as partículas virais dos HSV-1 e HSV-2, pois sabe-se que, como qualquer outro fármaco antiviral, um produto de origem natural pode atuar diretamente nas mesmas, através da sua inativação, exercendo ação virucida (HUDSON, 1990). A inativação direta dos vírions pode ser causada pela sua desintegração completa, solubilização do envelope viral, ou através de modificações químicas ou degradação de algumas glicoproteínas essenciais de envelope. A ligação da amostra às glicoproteínas do envelope pode desencadear

prematuramente alterações conformacionais, que comprometem a montagem do complexo requerido para a fusão do envelope viral à membrana da célula (gB e o heterodímero gH-gL) ou ainda, através do bloqueio de interações proteína-proteína, essenciais para o estabelecimento do estado fusiogênico (BULTMANN; TEUTON; BRANDT, 2007).

Há um grande interesse nos compostos que possuem ação virucida, visto que eles podem ser utilizados como agentes tópicos para inativar os vírus, antes mesmo deles entrarem em contato com as células, podendo atuar em combinação com outros fármacos antivirais (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997).

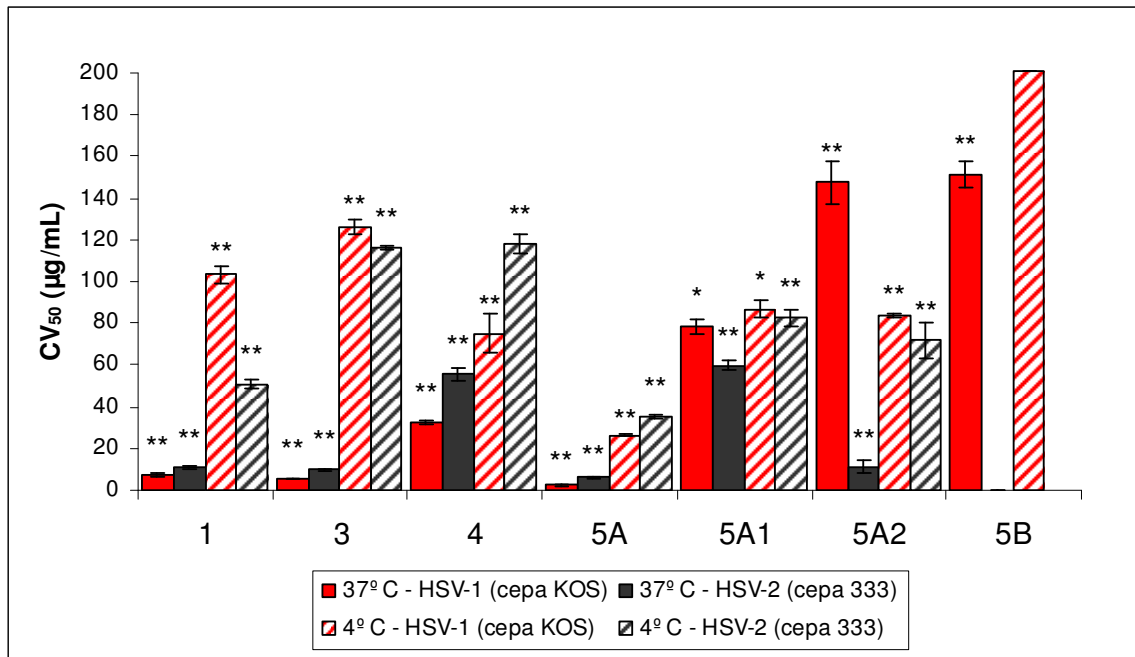
A avaliação da potencial inativação viral direta foi realizada com a subfração 5A e também com o extrato bruto (1), fração *n*-butanólica (3) e algumas subfrações (3, 4, 5A1, 5A2, 5B). Para isso, cada amostra, em diferentes concentrações, foi misturada ao fluído viral (HSV-1 ou HSV-2) e incubada a 4°C ou 37°C. Após o período de incubação, as misturas foram diluídas (1:100), a fim de se obter as concentrações não inibitórias das amostras e, então, as misturas foram tituladas. A temperatura de 37°C foi avaliada por ser aquela da maioria dos experimentos comumente realizados, e a temperatura de 4°C por ser empregada nos ensaios de adsorção e penetração viral.

Os resultados podem ser visualizados na Tabela 3 e no Gráfico 1.

**Tabela 3:** Resultados da avaliação do efeito virucida a 37°C e a 4°C (HSV-1 e HSV-2) do extrato bruto (1), fração *n*-butanólica (3) e subfrações (4, 5A, 5A1, 5A2, 5B) de *Ilex paraguariensis*.

Amostras	CV <sub>50</sub> (µg/mL)			
	HSV-1 (cepa KOS)		HSV-2 (cepa 333)	
	37°C	4°C	37°C	4°C
1	7,21 ± 0,74	103,23 ± 3,83	11,00 ± 0,66	50,49 ± 2,23
3	5,27 ± 0,25	126,24 ± 3,93	9,67 ± 0,35	116,27 ± 1,01
4	32,18 ± 0,80	75,11 ± 9,24	55,72 ± 3,04	117,93 ± 4,19
5A	2,43 ± 0,33	26,39 ± 0,59	5,96 ± 0,59	35,27 ± 0,70
5A1	78,06 ± 3,51	86,73 ± 4,29	59,79 ± 2,18	82,54 ± 4,03
5A2	147,63 ± 10,47	83,95 ± 1,12	11,05 ± 3,03	71,91 ± 8,55
5B	151,32 ± 6,19	> 250	NR	NR

Os resultados representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão; CV<sub>50</sub> = concentração virucida a 50%.



**Gráfico 1:** Resultados da avaliação do efeito virucida a 37° C e a 4° C (HSV-1 e HSV-2) do extrato bruto (1), fração *n*-butanólica (3) e subfrações (4, 5A, 5A1, 5A2 e 5B) de *Ilex paraguariensis*, obtidos através da técnica de inibição da formação das placas de lise, expressos em valores de CV<sub>50</sub> (µg/ml). Os resultados representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão. (\*) diferença significativa entre as temperaturas avaliadas ( $p < 0,05$ ) e (\*\*)  $p < 0,001$ , teste SNK.

Os resultados obtidos permitiram constatar que, de forma geral, as amostras exerceram ação virucida (CV<sub>50</sub>) em concentrações menores que suas CI<sub>50</sub> (com exceção da subfração 5A2/HSV-1 que, apresentou valores de CI<sub>50</sub>=36,12 µg/ml e CV<sub>50</sub>=147,63 µg/ml), demonstrando que há, pelo menos em parte, ação direta das amostras sobre as partículas virais. Um efeito virucida similar foi descrito recentemente para óleos voláteis extraídos de seis diferentes plantas avaliados frente ao HSV-2 (KOCH et al., 2008)

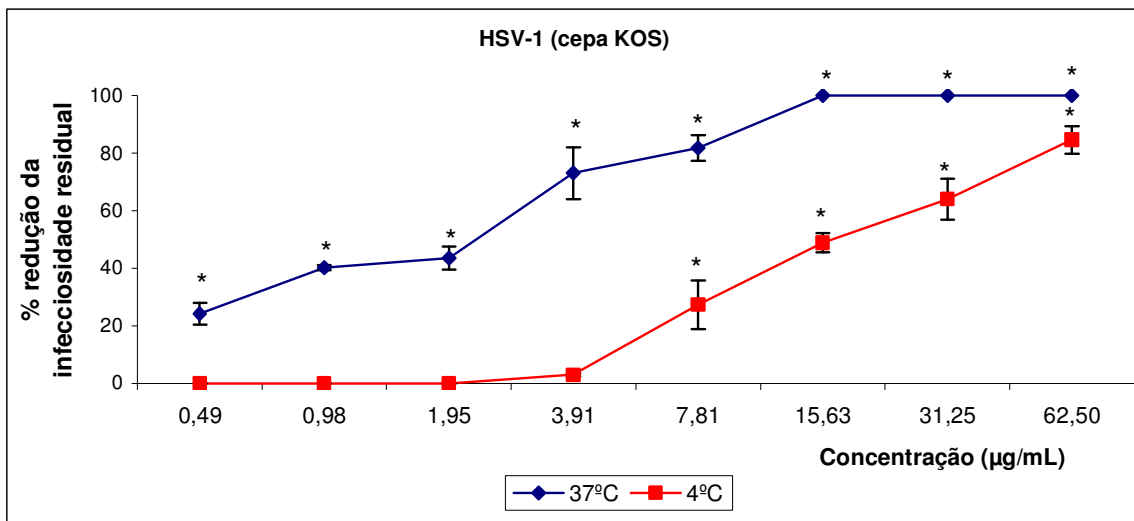
A análise estatística dos dados obtidos mostrou que as concentrações de todas as amostras, que reduziram a infecciosidade viral em 50% (CV<sub>50</sub>), foram estatisticamente diferentes com relação às temperaturas de incubação (4°C ou 37°C), tanto para o HSV-1 quanto para o HSV-2 [teste SNK ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ )]. Para os resultados obtidos nos ensaios realizados a 4° C, observou-se, de maneira geral, a necessidade de concentrações maiores de todas as amostras para neutralizar o vírus, sugerindo que a temperatura é um fator interferente na atividade virucida dos compostos.

Com base nos resultados antivirais mais promissores apresentados pela subfração 5A, através do ensaio de inibição da formação das placas de lise e do



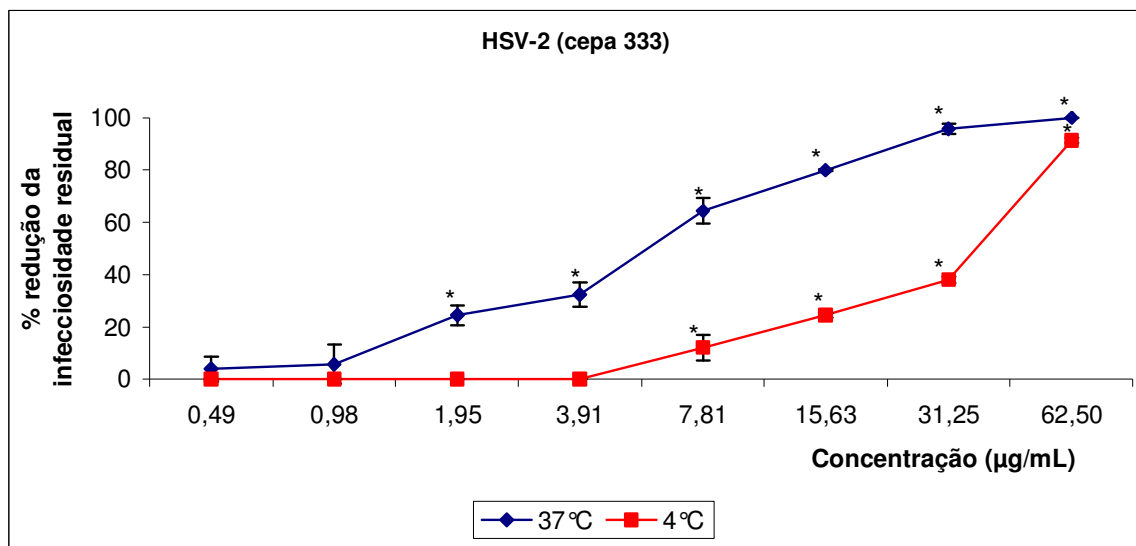
ensaio virucida direto, foi realizada uma avaliação mais detalhada referente à esta ação virucida e aos demais delineamentos experimentais, que serão descritos nos itens a seguir (5.5.2 a 5.5.7).

O Gráfico 2 mostra que houve redução significativa de 24,11% da infecciosidade do HSV-1, a partir de 0,49  $\mu\text{g/ml}$  da subfração 5A, a 37°C. De fato, a concentração que inativou diretamente 50% das partículas virais nesta temperatura foi 2,43  $\mu\text{g/ml}$ , conforme Tabela 3. Porém, a 4°C, somente houve redução estatisticamente significativa da infecciosidade residual (27,22%), a partir de 7,81  $\mu\text{g/ml}$ , sendo que a  $CV_{50}$  nesta temperatura foi de 26,39  $\mu\text{g/ml}$ . A comparação destes dados com a  $CI_{50}$  desta subfração (6,64  $\mu\text{g/ml}$ ), obtida através do ensaio de inibição da formação das placas de lise, mostrou que a concentração requerida para inativar extracelularmente 50% do HSV-1 é cerca de 3X menor a 37°C e 4 vezes maior a 4°C. Portanto, a inativação do HSV-1 pela subfração 5A poderia estar relacionada à ligação dos componentes desta subfração às glicoproteínas virais, inibindo desta forma, os estágios iniciais da replicação viral (adsorção e penetração). Porém, como será discutido nos itens 5.5.3 e 5.5.4, a subfração 5A inibiu a adsorção e a penetração do HSV-1 em concentrações não virucidas.



**Gráfico 2:** Resultados da avaliação da ação virucida a 4°C e 37°C frente ao HSV-1 de diferentes concentrações (0,49 a 62,5  $\mu\text{g/ml}$ ) da subfração 5A. Os resultados estão representados como porcentagens de redução da infecciosidade residual em relação ao controle viral, sem tratamento. Os valores obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. (\*) diferença significativa ( $p < 0,01$ ), teste de Dunett.

De forma muito similar ao HSV-1, pode-se verificar no Gráfico 3 que houve redução significativa de 24,43% da infecciosidade do HSV-2, a partir de 1,95 µg/ml da subfração 5A, a 37° C. A concentração que inativou 50% das partículas virais nesta temperatura foi de 5,96 µg/ml, conforme Tabela 3. Porém, a 4° C, somente houve redução estatisticamente significativa da infecciosidade residual (12,04%), a partir de 7,81 µg/ml, sendo que a  $CV_{50}$  nesta temperatura foi de 35,27 µg/ml. A comparação destes dados com a  $CI_{50}$  desta subfração (7,13 µg/ml), obtida através do ensaio de inibição da formação das placas de lise, mostrou que a concentração requerida para inativar extracelularmente 50% do HSV-2 é cerca de 1X menor a 37°C e 5X maior a 4°C. No entanto, assim como para o HSV-1, a subfração 5A inibiu a adsorção do HSV-2 em concentrações não virucidas, como será discutido no item 5.5.3.



**Gráfico 3:** Resultados da avaliação da ação virucida a 4°C e 37°C frente ao HSV-2 de diferentes concentrações (0,49 a 62,5 µg/ml) da subfração 5A. Os resultados estão representados como porcentagens de redução da infecciosidade residual em relação ao controle viral, sem tratamento. Os valores obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. (\*) diferença significativa ( $p < 0,01$ ), teste de Dunett.

Com base nos resultados obtidos, observou-se o mesmo comportamento de ambas as cepas virais testadas frente ao tratamento com a subfração 5A nesta estratégia metodológica empregada. Nas maiores concentrações, foi constatado um efeito virucida extracelular. Porém em baixas concentrações, a subfração 5A não foi capaz de inativar os vírions, demonstrando haver uma ação virucida concentração-dependente.

Tendo em vista que o HSV-2 é o principal agente etiológico das infecções herpéticas genitais e como a atividade virucida de alguns compostos é diminuída na presença de soluções ricas em proteínas ou de secreções cervicais humanas (PIRET et al., 2002; ISAACS; JIA; XU, 2004), decidiu-se verificar se o mesmo comportamento ocorreria com a subfração 5A, na presença de soluções ricas em SFB (soro fetal bovino) e BSA (albumina sérica bovina) e do HSV-2. Para este procedimento, utilizou-se a  $CV_{50}$  da subfração 5A a 37° C como concentração final ( $CV_{50} = 5,96 \mu\text{g/ml}$  - HSV-2), que foi co-incubada com tais soluções protéicas, antes da adição do vírus. Logo após, as misturas foram novamente incubadas por 15 min a 37° C e, então, diluídas a concentrações não inibitórias (1:100) e tituladas. A Tabela 4 mostra os percentuais de redução da infecciosidade do HSV-2, na presença de diferentes concentrações de SFB e BSA e de  $5,96 \mu\text{g/ml}$  ( $CV_{50}$ ) da subfração 5A.

**Tabela 4:** Resultados da atividade virucida frente ao HSV-2 da subfração 5A na presença de soluções ricas em proteínas.

<b>Solução Protéica</b>	<b>% Redução da infecciosidade</b>
<b>BSA (%)</b>	
0,5	27,69 ± 8,49
0,05	53,85 ± 1,09*
0,005	68,08 ± 7,07**
0,0005	63,84 ± 7,41**
<b>SFB (%)</b>	
5	22,69 ± 9,25
0,5	55,00 ± 2,72**
0,05	60,00 ± 6,53**
0,005	58,46 ± 3,26**

Os resultados foram expressos como porcentagem de redução da infecciosidade residual detectada após incubação do vírus com a subfração 5A e soro fetal bovino (SFB) ou albumina (BSA). Os resultados foram analisados em relação aos controles virais (0% de redução da infecciosidade residual) e expressos como média ± desvio padrão de dois experimentos independentes. (\*)  $p < 0,05$  e (\*\*)  $p < 0,01$  pelo teste de Dunnett.

Analisando os resultados expostos na Tabela 4, concluiu-se que a atividade virucida da subfração 5A foi diminuída na presença das soluções protéicas mais concentradas [BSA (0,5%) e SFB (5%)], sugerindo que concentrações mais elevadas são necessárias para evitar o efeito de neutralização exercido pelas proteínas. Tal atividade parece estar associada à fraca e reversível interação dos

componentes desta subfração 5A com as partículas virais, requerendo a presença contínua da amostra em estudo, tal como a atividade relatada para polissacarídeos sulfatados de alto peso molecular (EKBLAD et al., 2006).

Na presença das demais concentrações das soluções protéicas (SFB – 0,5; 0,05; 0,005% e BSA – 0,05; 0,005; 0,0005%), a subfração 5A reduziu de forma significativa ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , teste de Dunett) a infecciosidade viral, com relação aos controles virais (0% de redução da infecciosidade residual), demonstrando que esta amostra manteve a sua atividade virucida na presença de SFB e BSA. Este fato, aliado à significativa capacidade de reduzir a infecciosidade do HSV-2 em concentrações menores do que sua  $CI_{50}$  a 37°C, demonstrou que a subfração 5A extraída de *Ilex paraguariensis* parece ser um candidato promissor para aplicação tópica como agente virucida.

Considerando a potencial aplicação tópica da subfração 5A, estudos relacionados à modulação da sua atividade virucida na presença de secreções cervicais e sêmen humanos são necessários. É de fundamental importância o desenvolvimento de fármacos virucidas contra HSV, particularmente em combinação com fármacos virucidas anti-HIV para prevenção da transmissão genital destes dois vírus (BOURNE et al., 1999; SHOGAN et al., 2006), uma vez que o herpes genital encontra-se intimamente relacionado à dinâmica de aquisição, infecção e transmissão do HIV, aumentando em até 3X o risco de contrair este vírus sexualmente (CELUM et al., 2008). Além disso, os lactobacilos são os componentes predominantes da flora vaginal, desempenhando um importante papel na manutenção da saúde deste local e, portanto, a avaliação da segurança destes microbicidas frente aos lactobacilos desta flora também se faz necessária.

Como dito anteriormente, os compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) e as saponinas triterpênicas, de forma geral, apresentam um amplo espectro de atividade contra vírus RNA e DNA, incluindo os HSV, atuando através da redução da infecciosidade e/ou da inibição da replicação viral (SYDISKIS et al., 1991; HAYASHI et al., 1997; HUDSON; TOWERS, 1999; SIMÕES; AMOROS; GIRRE, 1999; LYU; RHIM; PARK, 2005; VELJKOVIC et al., 2007; CHATTOPADHYAY; KHAN, 2008).

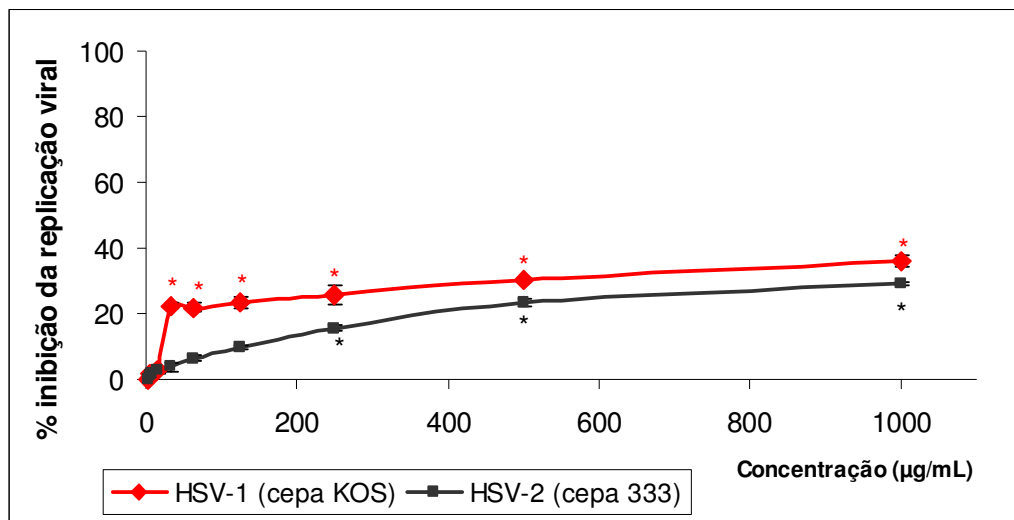
Nesta etapa inicial, de interação vírus-amostra (atividade virucida direta), a presença concomitante das saponinas com os compostos fenólicos e flavonoides na subfração 5A de *I. paraguariensis* parece estar relacionada com a atividade

demonstrada frente aos HSV. Comparando-se os valores de  $CV_{50}$  desta amostra com os das subfrações 4 (enriquecida em saponinas triterpênicas), 5A1 (saponinas triterpênicas) e 5A2 (compostos fenólicos) (Tabela 3), observa-se que há diferenças em relação à atividade virucida direta, ou seja, a ação demonstrada pela subfração 5A é superior àquela das demais amostras citadas. Adicionalmente, há relatos do efeito virucida direto de flavonoides (HAYASHI et al., 1997; JASSIM; NAJI, 2003; TAO et al., 2007; SCHNITZLER et al., 2008), compostos fenólicos (SCHNITZLER et al., 2008) e saponinas (HAYASHI et al., 1997).

Os agentes antivirais que interferem em uma ou mais etapas da replicação viral são candidatos a fármacos antivirais; entretanto, substâncias virucidas são fortes candidatas como antissépticos (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997).

### 5.5.2 Avaliação do efeito do pré-tratamento com a amostra selecionada

Quando as culturas celulares foram pré-tratadas com diferentes concentrações da subfração 5A, os percentuais máximos de inibição da replicação viral (35,78% para o HSV-1 e 29,36% para o HSV-2) ocorrem com a maior concentração avaliada (1.000  $\mu\text{g/ml}$ ), em relação aos controles virais, indicando que os componentes desta subfração não exercem influência direta nos receptores celulares envolvidos na adsorção e penetração viral (Gráfico 4).

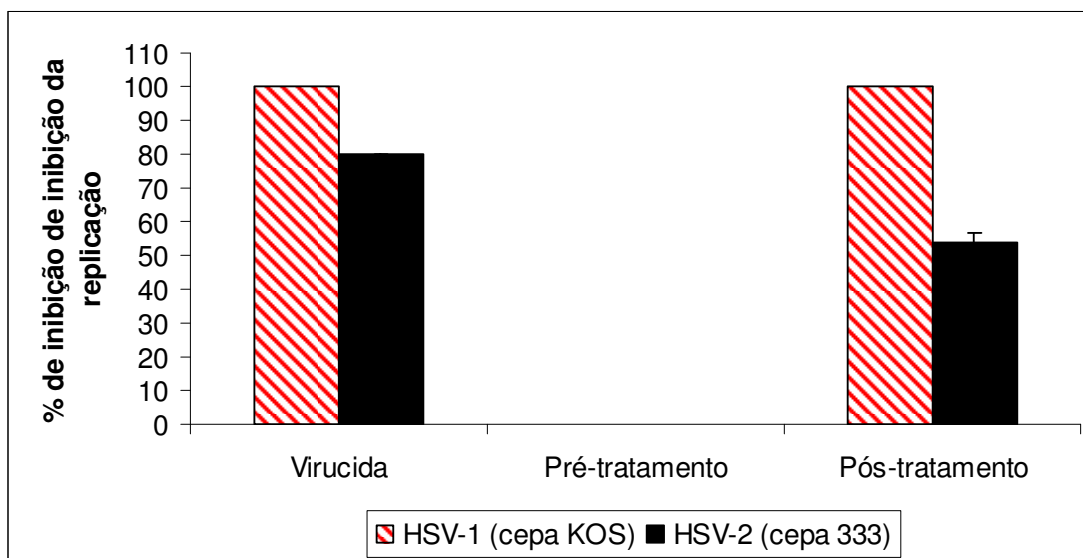


**Gráfico 4:** Resultados da avaliação do efeito do pré-tratamento com a subfração 5A, obtidos através da técnica de inibição da formação das placas de lise e expressos em percentuais de inibição em relação aos controles virais. Os resultados representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. (\*)  $p < 0,01$  pelo teste de Dunnett.

Com o intuito de expor de forma mais clara a ação da subfração 5A sobre a replicação dos HSV, escolheu-se uma concentração (15,62 µg/ml) que fosse inibitória a no mínimo 50% a replicação viral de ambos os vírus avaliados, nos três tratamentos abordados (virucida, pré-tratamento e pós-tratamento).

Os resultados obtidos demonstraram que a subfração 5A inativou as partículas virais quando foi incubada com os vírus antes da sua adição às células (ensaio virucida – item 5.5.1) ou quando foi adicionada após a infecção viral (pós-tratamento – item 5.4). No entanto, quando a subfração 5A foi adicionada às células antes da infecção viral, tanto com o HSV-1 quanto com o HSV-2, não houve inibição da replicação viral. Os resultados sugerem que os alvos de ação desta subfração não são as células e sim as partículas virais.

Portanto, a subfração 5A não tem efeito profilático *in vitro* contra a infecção pelos HSV avaliados, conforme demonstrado no Gráfico 5.



**Gráfico 5:** Atividade da subfração 5A (15,62 µg/ml) sobre as partículas virais. Ação Virucida: a amostra foi incubada com  $4 \times 10^4$  PFU dos HSV tipo 1 ou 2 por 15 min a 37 °C antes de adicionar a mistura às células. Pré-tratamento: as células foram incubadas com a amostra 2 h antes da infecção viral. Pós-tratamento: as células e os vírus foram incubados por 1 h antes da adição da amostra.

O mesmo comportamento, em relação ao HSV-2, foi verificado por Kratz e colaboradores (2008), para o ácido gálico (AG) e o galato de pentila (GP). Estes autores demonstraram que ambos os compostos foram virucidas, de modo concentração-dependente, quando os compostos foram adicionados simultaneamente com o HSV-2 e após a infecção das células com o mesmo. Em

contraste, o pré-tratamento das células com esses compostos não reduziu a infecciosidade do HSV-2, sugerindo que as partículas virais ou as células já infectadas são os sítios-alvos de ambos os compostos.

### **5.5.3 Avaliação do efeito das amostras na adsorção viral**

A replicação viral requer que o vírus adsorva na membrana celular e, subsequentemente, penetre na célula. Isto envolve uma interação inicialmente reversível do vírus, via glicoproteínas do envelope (gB e/ou gC), com um receptor da membrana celular hospedeira, a qual, rapidamente, sofre modificações tais para que o vírus possa ser depois dissociado da célula por processos específicos. A natureza da conversão da ligação reversível para irreversível não é clara, mas pode envolver um aumento da fluidez da membrana celular, a qual permite outro lugar para a ligação do vírion com moléculas receptoras celulares adicionais. Aparentemente, a interação inicial é eletrostática e serve para orientar a associação vírus-célula para uma subsequente penetração ou transporte através da membrana celular para dentro do citoplasma (DALES, 1973; DIMMOCK, 1982; TRYBALA; LILJEQVIST; BERGSTRÖM, 2000).

A entrada dos vírus nas células hospedeiras é dividida em dois eventos: (1) ligação dos vírus aos receptores da superfície celular (adsorção) e (2) penetração na membrana plasmática ou entrada propriamente dita (ROIZMAN; KNIFE, 2001). A penetração dos vírus nas células tem sido esquematicamente separada da adsorção, pois evidências experimentais indicam processos distintos com diferentes energias iônicas requeridas. Além disso, alguns antivirais agem claramente em um nível e não em outro. Este processo pode envolver a fusão de membranas (para os vírus que possuem envelope), ou alguma forma de “citose” ativa ou englobamento pela célula (HUDSON, 1990).

A adsorção dos vírus às células ocorre pela interação das glicoproteínas virais B e C (gB e gC) ao receptor sulfato de heparana da superfície celular, que é considerado o principal receptor de ligação dos HSV (HEROLD et al., 1991; 1994). A gC inicia o processo de adsorção, porém essa glicoproteína não é essencial para a entrada dos vírus, já que na sua ausência, a gB pode mediar a adsorção ligando-se aos receptores celulares (HEROLD et al., 1994; TRYBALA; LILJEQVIST; BERGSTRÖM, 2000). Após a adsorção, a gD irá se ligar aos receptores celulares da família das nectinas para promover a penetração do nucleocapsídeo viral. Outro

receptor envolvido na penetração é o sulfato de heparana modificado pela 3-*O*-sulfotransferase (KRUMMENACHER et al., 2004).

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

A avaliação do efeito do extrato bruto, das frações e subfrações de *Ilex paraguariensis* na adsorção viral foi realizada através de duas estratégias metodológicas, conforme descritas no item 4.9.4, e os resultados estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5:** Resultados da avaliação do efeito das diferentes amostras avaliadas de *Ilex paraguariensis* na adsorção do HSV-1 e do HSV-2.

Amostras	Adsorção tradicional		Pós-adsorção	
	CI <sub>50</sub> (µg/ml)		CI <sub>50</sub> (µg/ml)	
	HSV-1	HSV-2	HSV-1	HSV-2
1	2,73 ± 0,23	0,45 ± 0,02	NR	NR
3	4,69 ± 0,13	1,19 ± 0,21	NR	NR
4	53,38 ± 2,56	18,23 ± 1,36	NR	NR
5A	0,45 ± 0,04	0,45 ± 0,04	18,40 ± 1,48	231,62 ± 10,45
5A1	50,64 ± 3,61	14,94 ± 0,18	NR	NR
5A2	19,58 ± 4,34	< 0,24	NR	NR
5B	7,53 ± 0,19	3,68 ± 0,14	NR	NR
Heparina	0,33 ± 0,05	0,07 ± 0,01	>10,00	>10,00
Aciclovir	SA	SA	SA	SA

SA: sem atividade; NR: Não realizado; Os valores representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

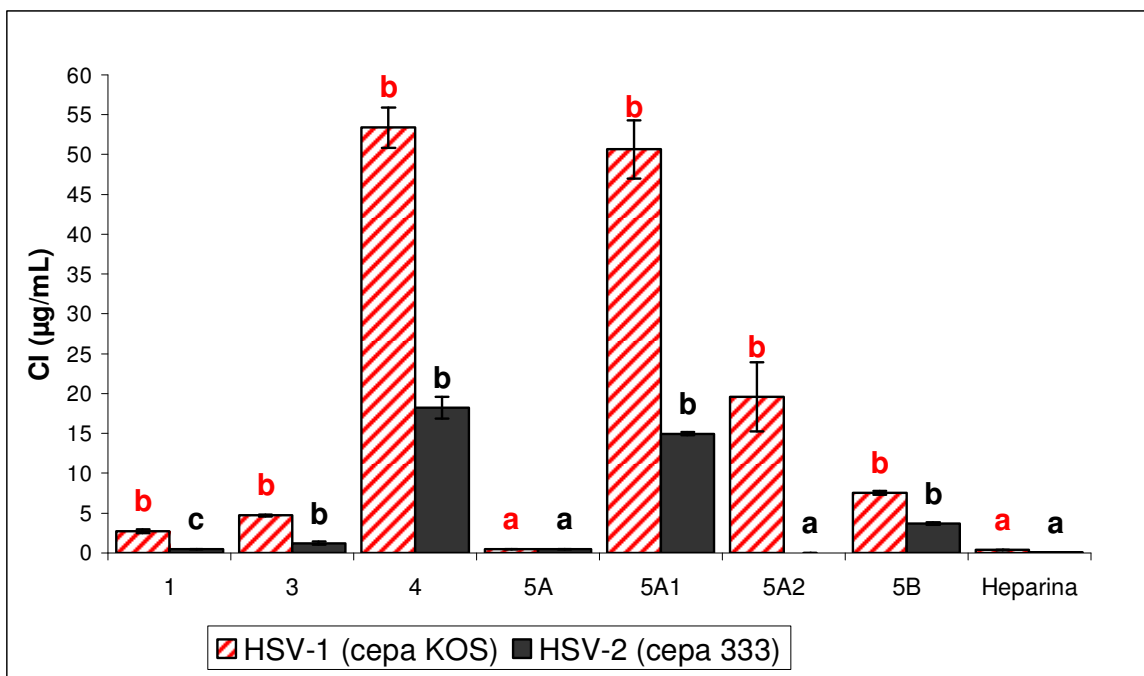
O aciclovir, fármaco de escolha para o tratamento das infecções herpéticas, foi utilizado como controle negativo nos ensaios de adsorção e penetração viral por não atuar nestas etapas da replicação viral (ELION et al., 1977; ROTTINGHAUS;



WHITLEY, 2007). A heparina, um polissacarídeo sulfatado, foi utilizado como controle positivo no ensaio de adsorção, pois possui ação anti-herpética comprovada por sua interação com as glicoproteínas gC e gB do HSV durante a etapa de adsorção (EKBLAD et al., 2006).

Analisando-se os dados referentes ao ensaio de inibição da adsorção tradicional do HSV-1 (Gráfico 6) constatou-se que a somente subfração 5A não apresentou diferenças estatísticas em relação à ação da heparina ( $p>0,05$ , teste de Dunett), indicando que o efeito desta amostra na adsorção viral se compara ao deste fármaco, que reconhecidamente inibe a adsorção viral.

Em relação ao HSV-2 (Gráfico 6), o extrato bruto e as subfrações 5A e 5A2 possuem atividade estatisticamente comparável à ação da heparina ( $p>0,05$ , teste de Dunett), indicando que as mesmas também exercem efeito sobre a adsorção do HSV-2 às células GMK AH1.



**Gráfico 6:** Resultados da avaliação do efeito do extrato bruto, frações e subfrações de *Ilex paraguariensis* no ensaio de adsorção tradicional do HSV-1 e do HSV-2, obtidos através da técnica de inibição da formação das placas de lise. Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre cada amostra e o controle positivo (heparina), avaliadas através do teste de Dunett (a,b ( $p<0,01$ ) e c ( $p<0,05$ )).

Ao contrário dos resultados encontrados por Logu e colaboradores (2000), a atividade da subfração 5A no ensaio de adsorção tradicional foi maior do que a ação

virucida, ou seja, ela apresentou valores de  $CI_{50}$  e  $CV_{50}$ , 0,45 e 2,43  $\mu\text{g/ml}$  (HSV-1) e 0,45 e 5,96  $\mu\text{g/ml}$  (HSV-2), respectivamente, indicando que esta subfração está atuando em mais de um momento do processo da infecção herpética.

Devido aos resultados promissores apresentados pela subfração 5A no ensaio de inibição da adsorção tradicional, foi realizado o ensaio de pós-adsorção com esta fração.

O ensaio de pós-adsorção teve por objetivo determinar se a amostra foi capaz de atuar sobre os vírions estavelmente adsorvidos, diminuindo sua afinidade pelas células. Para isso, as células foram previamente infectadas com as suspensões virais (HSV-1 ou HSV-2), e mantidas a 4° C por 2 h para permitir a adsorção, e só então, as amostras foram adicionadas e incubadas por mais 2 h a 4°C, atuando ou não sobre os vírions já ligados às células.

Os resultados obtidos no ensaio de pós-adsorção indicam que a subfração 5A atuou de forma mais efetiva nos vírions do HSV-1 estavelmente adsorvidos ( $CI_{50}$  = 18,4  $\mu\text{g/ml}$ ) do que nos vírions do HSV-2 ( $CI_{50}$  = 231,62  $\mu\text{g/ml}$ ). No entanto, tal ação foi muito menor que a apresentada nos ensaios de adsorção tradicional, ou seja, 40X menor no caso do HSV-1 e 515X menor no caso do HSV-2, significando que a inibição da formação das placas de lise neste ensaio requereu concentrações maiores da amostra, quando comparadas àquelas requeridas no ensaio de adsorção tradicional.

Adicionalmente, observou-se que os valores de  $CI_{50}$  no ensaio de pós-adsorção para os HSV-1 e HSV-2 (18,40 e 231,62  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente) são maiores que os valores de  $CI_{50}$  obtidos quando da avaliação da atividade anti-HSV-1 e anti-HSV-2 desta subfração (6,64 e 7,13  $\mu\text{g/ml}$ ), respectivamente, indicando que sua ação anti-herpética ocorre mais pronunciadamente em outras etapas do processo replicativo dos HSV avaliados do que no desligamento dos vírions estavelmente adsorvidos.

Os diferentes estágios da entrada dos HSV nas células hospedeiras são potenciais alvos para atuação de fármacos antivirais, e a adsorção dos HSV às células-alvo envolve dois estágios de interação vírus-célula. Após a adsorção inicial dos vírus às moléculas do sulfato de heparana, que envolve as glicoproteínas gC e gB, ocorrem interações mais estáveis dos vírions aos receptores celulares, através da glicoproteína gD e, possivelmente, também das gH e gL (MCCLAIN; FULLER, 1994; PIRET et al., 2002).

Uma explicação para os resultados obtidos através deste ensaio seria de que os componentes da subfração 5A poderiam apresentar maior afinidade pelos vírions previamente adsorvidos, desligando-os das células hospedeiras, ou até mesmo, impedindo a interação da gD com as gH e gL, bloqueando a ligação estável dos vírions às células e, conseqüentemente, a fusão do envelope viral com a membrana plasmática celular.

#### 5.5.4 Avaliação do efeito da amostra selecionada na penetração viral

Após a ligação inicial dos vírions à superfície celular (adsorção), múltiplas interações envolvendo glicoproteínas e componentes da superfície celular são requeridas para iniciar a fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira. Pelo menos três tipos de glicoproteínas (gB, gD e gH) estão envolvidas no processo de penetração do HSV (SPEAR, 1993). Para que ocorra a penetração por fusão, após a adsorção das partículas virais à superfície celular, é necessário que a gD interaja com um dos seus diversos receptores, sofrendo alterações conformacionais. Além disso, é preciso que também ocorra interação com a gB ou com o dímero gH-gL, resultando na fusão do envelope viral com a membrana da célula, e subsequente entrada do nucleocapsídeo e do tegumento no citoplasma celular (METTENLEITER, 2002; SPEAR, 2004). A associação da gL com a gH parece desempenhar papel essencial no processo de penetração (SPEAR, 1993).

A inibição da penetração viral pela subfração 5A foi investigada conforme descrito no item 4.9.5, e os resultados encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 6:** Resultados do efeito da subfração 5A de *Ilex paraguariensis* na penetração do HSV-1 e do HSV-2, obtidos através da técnica de inibição da formação das placas de lise.

Amostras	CI <sub>50</sub> (µg/ml)	
	HSV-1	HSV-2
Subfração 5A	3,05 ± 0,28 <sup>a</sup>	9,86 ± 1,05 <sup>c</sup>
Heparina	>10,00 <sup>b</sup>	6,47 ± 0,21 <sup>d</sup>
Aciclovir	SA	SA

SA: Sem atividade; os resultados obtidos representam a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas, avaliadas pelo teste SNK. <sup>a,b</sup>( $p < 0,001$ ) e <sup>c,d</sup>( $p < 0,01$ ).

Analisando-se os resultados obtidos, verificou-se que a subfração 5A foi estatisticamente mais ativa do que a heparina ( $p < 0,001$ ) frente ao HSV-1 apresentando valor de  $CI_{50} = 3,05 \mu\text{g/ml}$ , e o HSV-2 foi significativamente menos sensível à subfração 5A do que à heparina ( $p < 0,01$ ). Adicionalmente, houve diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre os dois tipos de HSV. Possivelmente, há diferenças de interação entre os receptores envolvidos nestes dois tipos virais, que determinaram os resultados obtidos, porém para melhor entendimento, análises mais aprofundadas, utilizando cepas virais mutantes, são necessárias.

#### **5.5.5 Avaliação do efeito da amostra selecionada na propagação intercelular viral**

Os HSV infectam as células do epitélio estratificado escamoso, que forma a epiderme e a mucosa em diferentes sítios anatômicos, incluindo as regiões oral e genital. A rápida dispersão dos HSV célula a célula é de vital importância para o estabelecimento de infecções primárias ou recorrentes produtivas no homem (NYBERG et al., 2004), sendo portanto, um alvo atrativo para a intervenção antiviral. Assim, uma amostra com potencial de reduzir ou mesmo impedir a dispersão dos vírus célula-célula poderia ser considerada candidata para o desenvolvimento de fármacos a serem usados no tratamento de lesões herpéticas.

A dispersão célula-a-célula dos vírus pode ser determinada e mensurada pela morfologia e tamanho das placas formadas nas culturas de células infectadas (DINGWELL et al., 1994).

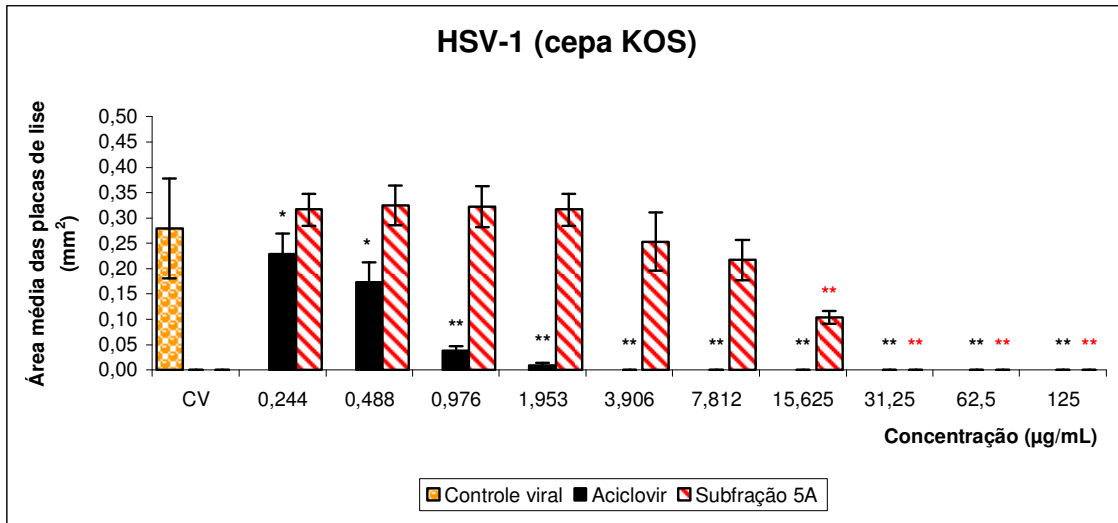
As mesmas glicoproteínas virais (gB, gD, gH/gL) e os mesmos receptores celulares envolvidos na adsorção e penetração dos HSV, via superfície celular apical, são capazes de promover a propagação viral célula à célula, que ocorre através dos espaços intercelulares de células infectadas e células adjacentes não infectadas (SHIEH; SPEAR, 1994; COCCHI et al., 2000). Um estudo da propagação célula à célula do HSV-1 sugeriu que a interação das glicoproteínas virais e dos receptores, tal como o sulfato de heparana presentes na superfície celular, permite a fusão da membrana com os vírions, facilitando a propagação, sendo que os fatores celulares e ambientais podem também interferir nesta dispersão (SHIEH; SPEAR, 1994). Além disso, Weeks e colaboradores (1997) descreveram que as junções intercelulares formam regiões extremamente estáveis entre as membranas

plasmáticas, reduzindo a área de circulação fluída dos vírus e, conseqüentemente, sua propagação intercelular, pois prejudicam a interação dos vírus com os receptores celulares. Assim, a fluidez da membrana, regulada pela quantidade de junções intercelulares, é importante no mecanismo de propagação viral, já que quanto maior for o número de junções, maior será a redução da dispersão do HSV-1. Nyberg et al. (2004), ao avaliarem um polissacarídeo (PI-88), de estrutura similar à do sulfato de heparana, demonstraram que o mesmo reduziu a propagação célula a célula dos HSV (tipos 1 e 2) em cultura de células, provavelmente pela capacidade deste composto de permear entre as junções intercelulares, devido ao seu baixo peso molecular.

O efeito da subfração 5A na dispersão célula-célula (*cell-to-cell spread*) dos HSV foi determinada através da avaliação do tamanho das placas de lise formadas na presença de diferentes concentrações desta subfração, conforme metodologia descrita no item 4.9.6. Como mostram os Gráficos 7 e 8, a subfração 5A reduziu a dispersão célula-célula do HSV-2 de forma mais eficiente do que o HSV-1.

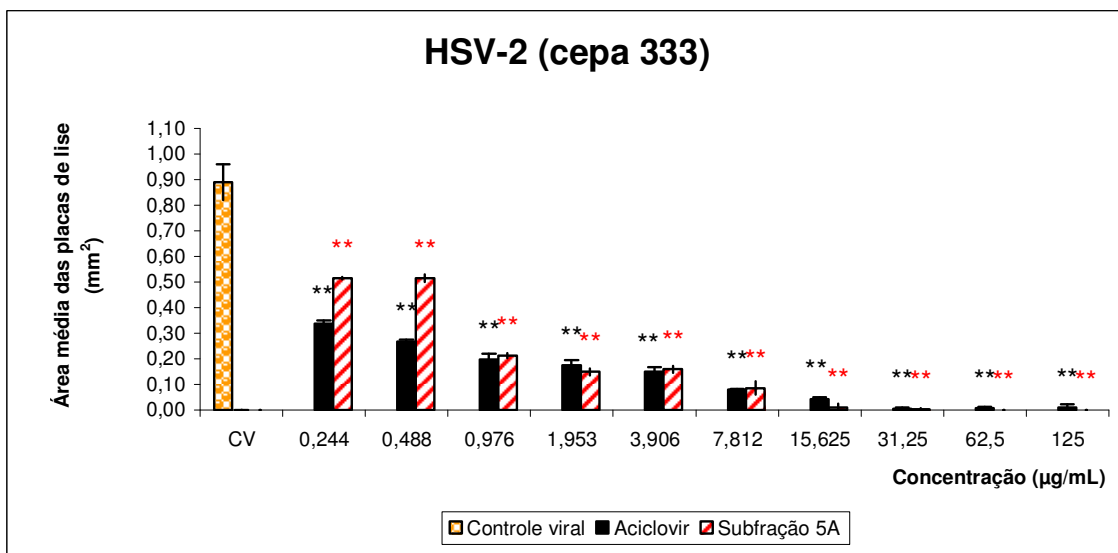
Além de ter inibido a formação das placas de lise, a subfração 5A reduziu pronunciadamente a dispersão radial dos vírus herpéticos avaliados, o que foi verificado através da redução da área das placas de lise formadas pelo HSV-1 e pelo HSV-2.

A subfração 5A reduziu significativamente ( $p < 0,001$ ) a área das placas de lise formadas pelo HSV-1, a partir da concentração de 15,625  $\mu\text{g/ml}$ . O aciclovir inibiu totalmente a formação das placas de lise nas concentrações de 3,90 a 125  $\mu\text{g/ml}$ ; nas menores concentrações (0,244 a 1,953  $\mu\text{g/ml}$ ), este fármaco inibiu significativamente, em diferentes níveis, a dispersão célula-a-célula do HSV-1 ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  (Gráfico 7).



**Gráfico 7:** Resultados da inibição da propagação intercelular do vírus HSV-1 (cepa KOS). Foram medidas 20 placas de lise formadas no tratamento com a subfração 5A e aciclovir (ACV), nas concentrações de 0,244 a 125 µg/ml. Os resultados foram analisados com relação ao controle viral (0,27 ± 0,09 mm<sup>2</sup>) pelo teste de Dunett e expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. (\*)  $p < 0,01$ , (\*\*)  $p < 0,001$ .

Com relação ao HSV-2, também houve uma diminuição significativa ( $p < 0,001$ ) da área das placas de lise pela subfração 5A, em todas as concentrações avaliadas (0,244 a 125 µg/ml). Da mesma maneira, o aciclovir foi efetivo em reduzir a dispersão do HSV-2 célula-célula (Gráfico 8), mas em menor intensidade que em relação ao HSV-1.



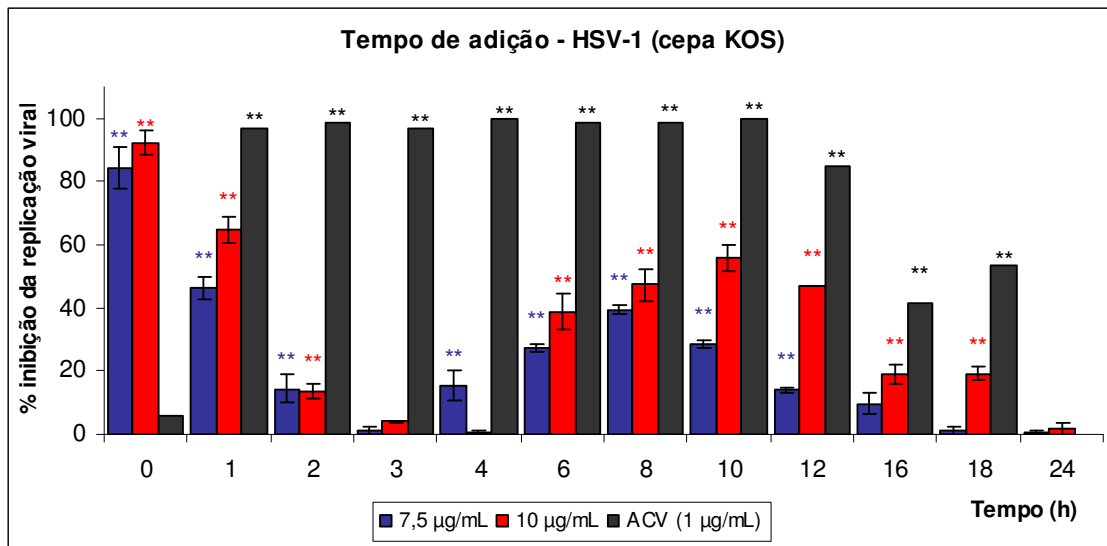
**Gráfico 8:** Resultados da inibição da propagação intercelular do vírus HSV-2 (cepa 333). Foram medidas 20 placas de lise formadas no tratamento com a subfração 5A e aciclovir (ACV) nas concentrações de 0,244 a 125 µg/ml. Os resultados foram analisados com relação ao controle viral (0,89 ± 0,07 mm<sup>2</sup>) pelo teste de Dunett e expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. (\*\*)  $p < 0,001$ .

Portanto, pode-se sugerir que o mecanismo da atividade anti-herpética da subfração 5A parece ser mediado, pelo menos em parte, pela inibição da dispersão célula-a-célula do HSV-1 e, mais pronunciadamente, do HSV-2. Assim, a subfração 5A, além de inibir a entrada dos vírions nas células (adsorção e penetração), parece também prevenir a disseminação da infecção às células vizinhas não infectadas.

### 5.5.6 Avaliação do efeito do tempo de adição da amostra selecionada no ciclo de replicação viral

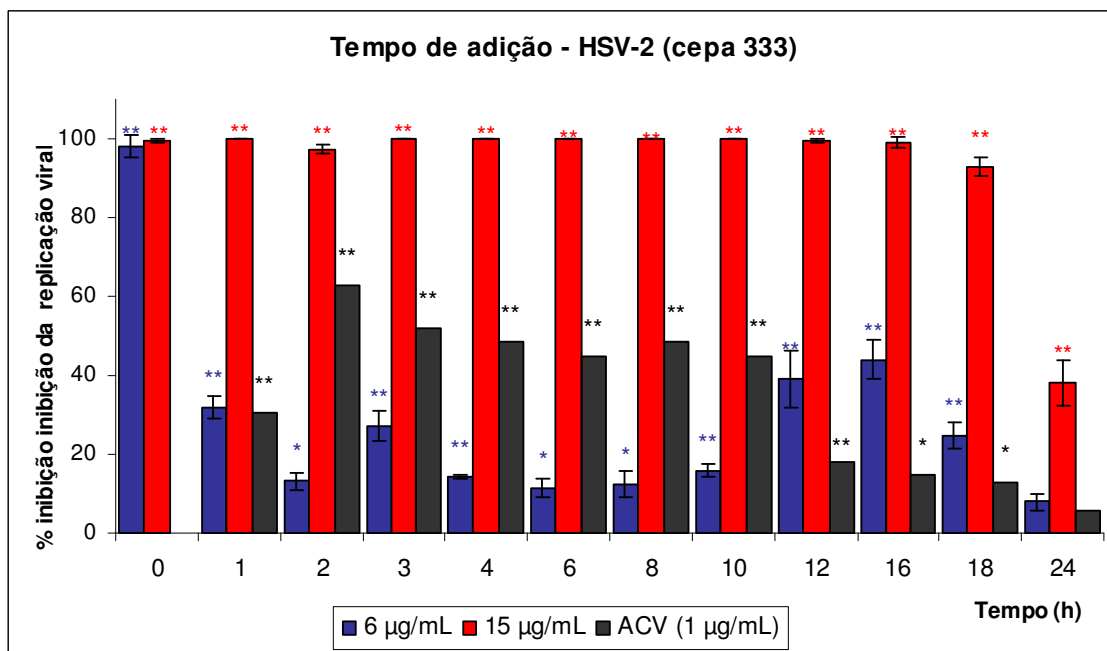
Os experimentos do efeito do tempo de adição foram realizados para determinar o(s) estágio(s) da replicação do HSV-1 e do HSV-2, no(s) qual(is) a subfração 5A exerce sua atividade antiviral. A escolha das três concentrações utilizadas foi baseada nos resultados obtidos na avaliação preliminar da atividade antiviral desta subfração. Utilizou-se concentrações que inibem aproximadamente 100% da replicação do HSV-1 e do HSV-2 (10 e 15 µg/ml, respectivamente) e outras que inibem cerca de 50% da replicação (7,5 e 6 µg/ml, respectivamente). Como controle do experimento, foi utilizado o aciclovir (ACV) a 1 µg/ml. Todas as concentrações foram adicionadas às células simultaneamente com o vírus ( $T_0$ ) ou em intervalos de 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18 e 24 h pós-infecção (P.I.).

Os resultados estão expressos nos Gráficos 9 e 10, referentes ao HSV-1 e ao HSV-2, respectivamente.



**Gráficos 9:** Efeito do tempo de adição da subfração 5A e do aciclovir no ciclo de replicação do HSV-1 em células VERO. Os resultados estão representados como % de inibição da replicação viral em relação aos controles virais, sem tratamento. Os valores obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes. (\*)  $p < 0,05$  e (\*\*)  $p < 0,01$  indicam diferenças estatisticamente significativas, teste de Dunnett.

A subfração 5A, nas duas concentrações avaliadas (7,5 e 10  $\mu\text{g/ml}$ ), inibiu significativamente a infecção pelo HSV-1 ao ser adicionada no  $t_0$ , após 1, 2, 4 (exceto 10  $\mu\text{g/ml}$ ), 6, 8, 10, 12, 16 (exceto 7,5  $\mu\text{g/ml}$ ) e 18h (exceto 7,5  $\mu\text{g/ml}$ ) P.I. Estas observações indicam, que esta subfração atua nos estágios iniciais da infecção pelo HSV-1, incluindo a adsorção dos vírus aos receptores e sua penetração no citoplasma celular, conforme já demonstrado em experimentos realizados em condições específicas, bem como em alguns momentos da replicação viral, que ocorrem intracelularmente. Vale ressaltar que, em determinadas etapas, esta ação foi concentração-dependente.



**Gráfico 10:** Efeito do tempo de adição da subfração 5A e do aciclovir no ciclo de replicação do HSV-2 em células GMK AH1. Os resultados estão representados como % de inibição da replicação viral em relação aos controles virais, sem tratamento. Os valores obtidos representam a média  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes. (\*)  $p < 0,05$  e (\*\*)  $p < 0,01$  indicam diferenças estatisticamente significativas, teste de Dunnett.

Em relação ao HSV-2, a subfração 5A, na concentração de 6  $\mu\text{g/ml}$  inibiu significativamente a infecção pelo HSV-1 ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ ), ao ser adicionada concomitantemente ao vírus ( $t_0$ ), 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16 e 18h P.I. Na concentração de 15  $\mu\text{g/ml}$ , houve uma inibição significativa quando a subfração 5A foi adicionada no  $t_0$ , e em todos os períodos P.I. avaliados, confirmando ação virucida e, também, ação sobre as novas progêneses virais liberadas pelas células infectadas. Estas observações indicam, que esta subfração também atua nos estágios iniciais da



infecção pelo HSV-2, incluindo a adsorção dos vírus aos receptores e sua penetração no citoplasma celular, bem como nas etapas posteriores da replicação viral, que ocorrem intracelularmente, de forma muito mais contundente.

### **5.5.7 Avaliação do efeito da amostra selecionada na expressão das proteínas virais**

Foi investigado, através da técnica *Western blotting*, se a inibição da replicação do HSV-1 (cepa KOS) pela subfração 5A estaria relacionada com o bloqueio da síntese de algumas proteínas virais (ICP27, ICP4, gD, gE), bem como se a amostra exerceria interferência na expressão de proteínas constitutivas celulares (tal como a  $\beta$ -actina). A  $\beta$ -actina foi utilizada como controle positivo do ensaio.

A inibição da síntese de proteínas nas células GMK AH1 relacionadas ao HSV-2 não foi verificada neste trabalho, pois o LVA não possuía os anticorpos específicos para este sorotipo.

Na fase imediata ( $\alpha$ ) da infecção produtiva dos HSV são expressas as proteínas que regulam a replicação viral e são sintetizadas em torno de 3 a 4 h P.I. Como exemplo, podem-se citar as ICP4, ICP27 e ICP47. Na fase seguinte, a fase precoce ( $\beta$ ), são expressas as proteínas que promovem a replicação do DNA viral e a expressão das proteínas  $\gamma$ , o que ocorre entre 5 a 7 horas P.I., como por exemplo a timidina quinase viral e a DNA polimerase viral. Na fase tardia ( $\gamma$ ), são expressas as proteínas estruturais do nucleocapsídeo e outras proteínas que formarão os vírions e que são sintetizadas até 12 h P.I. (ex. gB, gC, gD, gE) (COLBERE, 1975; BOEHMER; LEHMAN, 1997; SU et al., 2008)

A ICP27 é uma proteína regulatória multifuncional essencial para a replicação do HSV-1. Esta fosfoproteína de 63 kDa é expressa durante a fase imediata, é requerida para a expressão apropriada dos genes virais das fases precoce e tardia (WHITLEY; ROIZMAN, 2001; DAI-JU et al., 2006) e bloqueia o processamento do mRNA, o que acarreta uma diminuição da produção de proteínas celulares (SMITH; MALIK; CLEMENTS, 2005). Também foi demonstrado que a ICP27 atua pós-transcricionalmente no processamento e na exportação do RNA (SCIABICA; DAI; SANDRI-GOLDIN, 2003) e evidências sugerem sua participação no início da translação (ELLISON et al., 2005). Além disso, a ICP27 parece contribuir com a regulação transcricional dos genes precoces e tardios (JEAN et al., 2001). Assim, a

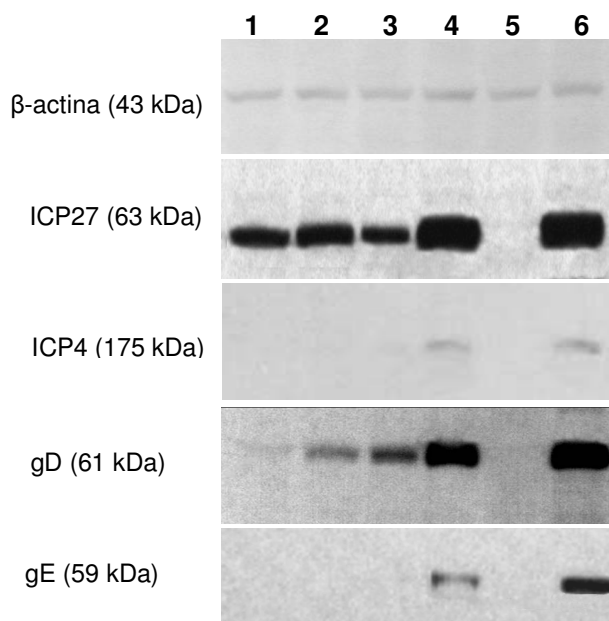
ICP27 parece atuar em todos os estágios da expressão dos genes virais, desde a transcrição até a tradução (DAI-JU et al., 2006), podendo ser considerada um alvo importante para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antivirais.

Assim como a ICP27, a ICP4 é uma proteína regulatória sintetizada imediatamente após a infecção da célula hospedeira, sendo essencial durante todo o ciclo lítico do vírus (SU et al., 2006). Há evidências de que esta proteína esteja envolvida no estágio inicial da replicação do DNA viral (TAYLOR; KNIPE, 2004) e que desempenhe importante função na manutenção da circularização do genoma viral. O estado físico do genoma viral é uma característica importante para a manutenção da infecciosidade, replicação, latência ou encapsulação (SU et al., 2006). Desta forma, a ICP4 parece desempenhar um papel importante durante a replicação viral, desde a fase imediata até a fase tardia.

A glicoproteína D (gD) é específica dos  $\alpha$ -herpesvírus e é essencial para a entrada dos mesmos nas células-alvo. A ligação dos receptores da superfície celular à gD é um passo necessário para a entrada, tanto do HSV-1 quanto do HSV-2. O receptor comumente utilizado por este tipo de glicoproteína é o da família das nectinas, em especial o receptor nectina-1 (HELDWEIN; KRUMMENACHER, 2008). Sabe-se também que a gD atua durante a disseminação célula-a-célula dos HSV, interagindo com receptores específicos.

Durante o processo de dispersão célula-a-célula dos HSV, a glicoproteína E (gE) é relatada como uma das peças fundamentais, mesmo não estando envolvida no processo de entrada apical da partícula viral livre (DINGWELL et al., 1994; HELDWEIN; KRUMMENACHER, 2008). Ela está diretamente envolvida no deslocamento dos vírions do citoplasma à superfície basolateral das células ao invés da superfície apical (POLCICOVA et al., 2005).

Conforme mostrado na Figura 14, as células não infectadas não expressaram as proteínas virais (coluna 5) e todas elas foram detectadas nas células infectadas com o HSV-1 e não tratadas com a subfração 5A (coluna 6). A proteína  $\beta$ -actina foi expressa em todos os tratamentos avaliados, indicando que esta subfração não interferiu na síntese de proteínas constitutivas, que são necessárias ao funcionamento das células (colunas 1 a 5).



**Figura 14:** Efeito da subfração 5A sobre a expressão da proteína  $\beta$ -actina (constitutiva) e sobre as proteínas ICP27, ICP4, gD e gE do HSV-1 em células VERO, detectado por *Western blotting*. **Coluna 1:** células infectadas e tratadas com 13,28  $\mu\text{g/ml}$  adicionados 1 h P.I. **Coluna 2:** células infectadas e tratadas com 6,64  $\mu\text{g/ml}$  adicionados 1 h P.I. **Coluna 3:** células infectadas e tratadas com 13,28  $\mu\text{g/ml}$  adicionados 3 h P.I. **Coluna 4:** células infectadas e tratadas com 6,64  $\mu\text{g/ml}$  adicionados 3 h P.I. **Coluna 5:** Células não infectadas tratadas com 13,28  $\mu\text{g/ml}$  (controle celular). **Coluna 6:** Células infectadas com HSV-1 (controle viral).

O tratamento com a subfração 5A suprimiu fracamente a expressão da proteína ICP27 1 h P.I., nas duas concentrações avaliadas (13,28 e 6,64  $\mu\text{g/ml}$  – colunas 1 e 2), e na concentração de 13,28  $\mu\text{g/ml}$  3 h P.I. (coluna 3). Não foram observadas alterações na expressão da proteína ICP27 na concentração de 6,64  $\mu\text{g/ml}$  3 h P.I. (coluna 4).

A expressão da proteína ICP4 1 h P.I., nas duas concentrações avaliadas, e 3h P.I., na concentração de 13,28  $\mu\text{g/ml}$ , foi totalmente suprimida (colunas 1, 2, 3). A subfração 5A, na concentração de 6,64  $\mu\text{g/ml}$ , adicionada 3 h P.I., não foi capaz de inibir a expressão da ICP4 (coluna 4).

Observou-se, também, a interferência exercida pela subfração 5A na síntese das glicoproteínas D e E. A gD teve sua expressão diminuída quando as duas concentrações da subfração foram adicionadas na 1h P.I. (coluna 1 e 2). Uma leve inibição ocorreu no tratamento com a maior concentração (13,28  $\mu\text{g/ml}$  – coluna 3) e inibição alguma foi detectada, na menor concentração 3h P.I. (coluna 4).

Verificou-se, ainda, que a subfração 5A inibiu totalmente a expressão da gE 1h P.I., em ambas as concentrações (colunas 1 e 2), e na concentração de 13,28

$\mu\text{g/ml}$ , 3h P.I. (coluna 3). A concentração de 6,64  $\mu\text{g/ml}$  foi capaz de inibir fracamente a produção desta glicoproteína, quando adicionada 3h P.I. (coluna 4).

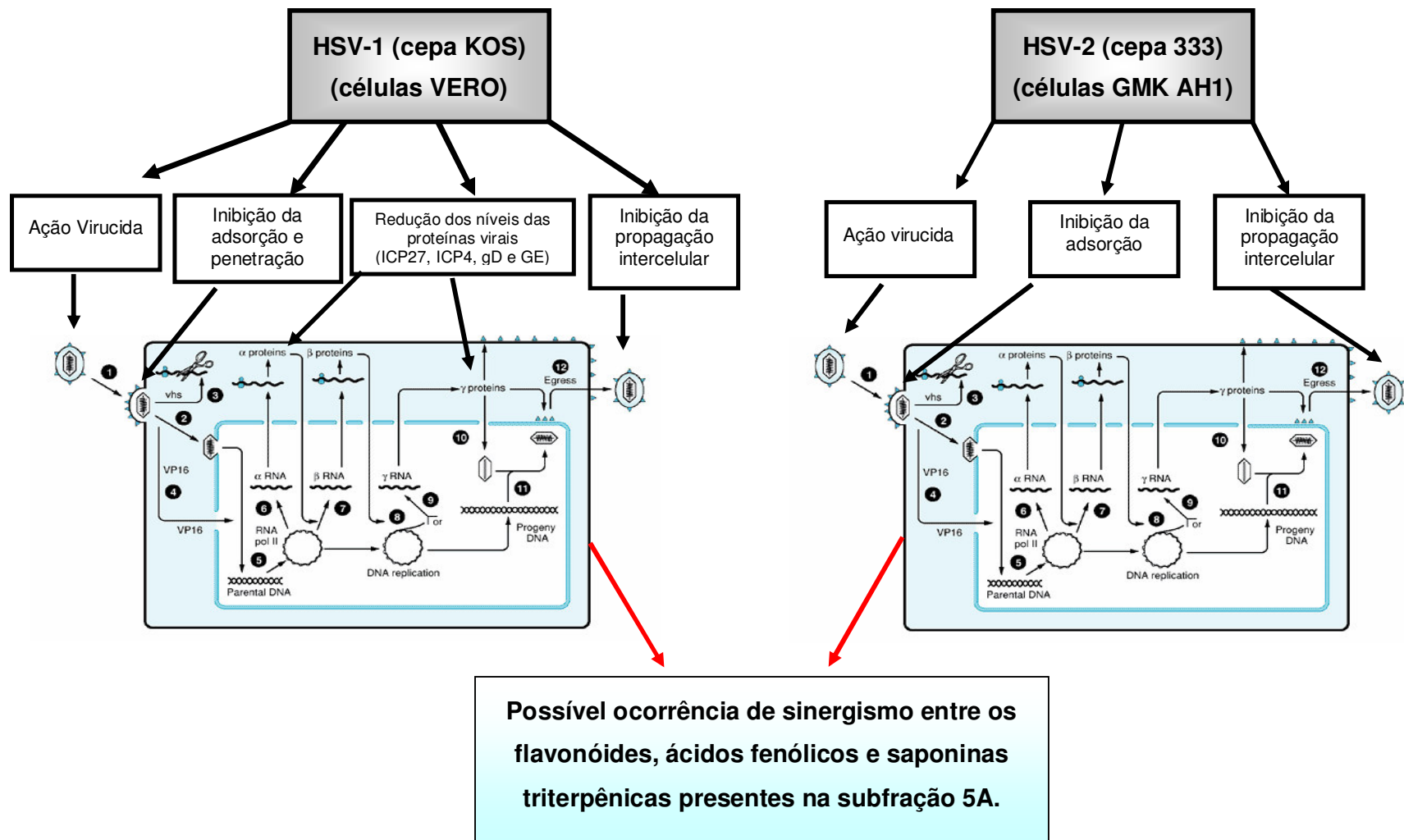
Assim, esses resultados sugerem que a subfração 5A inibiu a replicação do HSV-1 (cepa KOS), em parte, através do bloqueio da síntese da proteína  $\alpha$  ICP27 e da proteína  $\alpha$  ICP4, confirmando que esta amostra interfere com os eventos imediatos da replicação deste vírus. Com a inibição da expressão das proteínas ICP27 e ICP4, provavelmente ocorrerá inibição das proteínas sintetizadas nas fases precoce e tardia, fato este observado através dos resultados obtidos na avaliação da expressão das glicoproteínas D e E.

Estes resultados sugerem que a atividade antiviral da subfração 5A poderia estar relacionada aos baixos níveis das proteínas virais das fases imediata ( $\alpha$ ) e tardia ( $\gamma$ ) do ciclo replicativo do HSV-1. A interferência nos níveis protéicos da fase imediata ( $\alpha$ ) promovem uma alteração em praticamente todo o restante do ciclo replicativo, visto que as proteínas desta fase são essenciais na indução e regulação da replicação viral. Os baixos níveis de proteínas de fase tardia ( $\gamma$ ) mostraram que houve inibição da síntese do nucleocapsídeo e de todas as outras proteínas estruturais, impedindo a montagem de novos vírions e a infecção de células adjacentes.

Os constituintes químicos desta subfração 5A (flavonoides, saponinas triterpênicas e ácidos fenólicos) apresentam amplo espectro de atividade antiviral, incluindo os HSV, podendo atuar durante o ciclo replicativo viral, através da inibição das proteínas virais envolvidas, conforme citado na revisão bibliográfica.

## **5.6 Proposta preliminar do mecanismo da ação anti-herpética da amostra selecionada**

A partir dos resultados obtidos, formulou-se a hipótese do mecanismo da ação anti-herpética da subfração 5A, frente ao HSV-1 (cepa KOS) e ao HSV-2 (cepa 333), como pode ser visualizado na Figura 15.



**Figura 15:** Proposta do mecanismo da ação anti-HSV-1 e anti-HSV-2 da subfração 5A.

## 6 CONCLUSÕES

- As concentrações citotóxicas a 50% ( $CC_{50}$ ) das 10 amostras avaliadas, obtidas através do ensaio do MTT, para as células VERO e GMK AH1 variaram de 1.530,12 a 152,69  $\mu\text{g/ml}$  e 2.000 a 258,69  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Apenas a subfração 4 apresentou maior toxicidade para as células VERO e GMK AH1, nas concentrações avaliadas;
- A subfração 5A apresentou atividade antiviral superior a das demais amostras durante a triagem da atividade anti-HSV-1 ( $IS=187,62$ ) e anti-HSV-2 ( $IS=263,63$ ) pelo ensaio de inibição da formação das placas de lise, tendo sido selecionada para a realização do estudo do mecanismo da ação anti-herpética detectada;
- Na avaliação da atividade virucida, a subfração 5A mostrou-se mais ativa, sendo seus valores de  $CV_{50}$  (2,43  $\mu\text{g/ml}$ , HSV-1 e 5,96  $\mu\text{g/ml}$ , HSV-2) próximo aos seus valores de  $CI_{50}$  (6,64  $\mu\text{g/ml}$ , HSV-1 e 7,13  $\mu\text{g/ml}$ , HSV-2), sugerindo inativação viral extracelular;
- A subfração 5A causou menor inativação do HSV-1 e do HSV-2 a 4°C (26,39 e 35,27  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente) do que a 37°C (2,43 e 5,96  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente), indicando uma atividade virucida temperatura-dependente;
- A atividade virucida da subfração 5A foi diminuída somente na presença de soluções protéicas mais concentradas [BSA (0,5%) e SFB (5%)], sugerindo que concentrações mais elevadas são necessárias para evitar o efeito de neutralização exercido pelas proteínas;
- O pré-tratamento das células com a subfração 5A não as protegeu da infecção viral, indicando que os componentes desta subfração não exercem efeito profilático;
- A subfração 5A inibiu significativamente a adsorção e a penetração do HSV-1 (cepa KOS) e do HSV-2 (cepa 333) nas células VERO e GMK AH1, respectivamente;

- Os resultados obtidos no ensaio de pós-adsorção indicam que a subfração 5A atuou de forma mais efetiva nos HSV-1 estavelmente adsorvidos ( $CI_{50} = 18,4 \mu\text{g/ml}$ ), do que nos HSV-2 ( $CI_{50} = 231,62 \mu\text{g/ml}$ ), e que a ação nesta etapa foi menor que a apresentada nos ensaios de adsorção;
- A difusão intercelular dos vírus HSV-1 (cepa KOS) e HSV-2 (cepa 333) também foi significativamente inibida pela subfração 5A;
- Na avaliação da atividade anti-herpética em função do tempo, a subfração 5A inibiu significativamente os estágios iniciais da infecção pelo HSV-1 e HSV-2, bem como nas etapas imediata e tardia da replicação viral, que ocorrem intracelularmente.
- A subfração 5A inibiu a replicação do HSV-1 (cepa KOS), em parte, através do bloqueio da síntese das proteínas  $\alpha$  ICP27,  $\alpha$  ICP4,  $\gamma$  gD e  $\gamma$  gE, confirmando que esta amostra interfere com os eventos imediatos e tardios da replicação viral, sem interferir na síntese da proteína constitutiva  $\beta$ -actina.
- O efeito anti-herpético da subfração 5A obtida das folhas de *Ilex paraguariensis* parece estar, principalmente, relacionado à ação sinérgica dos compostos bioativos nela existentes (flavonoides, saponinas triterpênicas e ácidos fenólicos).

## 7 PERSPECTIVAS

- Testar a atividade anti-herpética do extrato, frações e subfrações obtidas de *Ilex paraguariensis*, frente a cepas virais resistentes ao aciclovir.
- Realizar experimentos com as cepas mutantes (gC negativas) do HSV-1 (gC-39) e do HSV-2 (gC-neg1).
- Avaliar a possível interferência da subfração 5A na expressão das proteínas virais durante o ciclo de replicação do HSV-2 (cepa 333), utilizando o ensaio do *Western blotting*;
- Avaliar se a subfração 5A possui citotoxicidade sobre lactobacilos da flora vaginal humana normal;
- Avaliar o efeito da subfração 5A na síntese do DNA viral em células VERO e GMK AH1, utilizando a reação em cadeia polimerase (PCR) e iniciadores específicos;
- Avaliar o efeito da subfração 5A na expressão gênica (mRNA) em células VERO e GMK AH1, verificando se há inibição da expressão gênica, que poderia causar interferência na produção das proteínas nas células tratadas, através da técnica do RT-PCR;
- Realizar estudos de atividade antiviral das saponinas (matesaponinas) e flavonoides isolados a partir do extrato bruto (EtOH 40°GL) e avaliar o possível sinergismo entre eles;
- Avaliar se a combinação da subfração 5A com o aciclovir possui efeito sinérgico de adição;
- Avaliar a atividade antiviral frente ao HSV-1 (cepas KOS e 29R) e ao HSV-2 (cepa 333) dos ácidos oleanólico e ursólico (agliconas das saponinas de *Ilex paraguariensis*).



## REFERÊNCIAS

AL-HABORI, M.; RAMAN, A. Antidiabetic and hypocholesterolaemic effects of fenugreek. **Phytotherapy Research**, v.12, n.4, p.233-242, 1998.

ALVES, H.D.M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Técnicos de Química Nova na Escola**, v. 3, p. 10-15, 2001.

AMOROS, M.; FAUCONNIER, B.; GIRRE, L. *In vitro* antiviral activity of a saponin from *Anagallis arvensis*, Primulaceae, against Herpes Simplex Virus and Poliovirus. **Antiviral Research**, v. 8, p. 13-25, 1987.

AMOROS, M.; SIMÕES, C.M.O.; GIRRE, L. Synergistic effect of flavones and flavonols against Herpes Simplex Virus type 1 in cell culture: comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 1732-1740, 1992.

ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. **Food Chemistry**, v. 97, p.459-464, 2006.

ARBISER, J.L.; LI, X.C.; HOSSAIN, C.F.; NAGLE, D.G.; SMITH, D.M.; MILLER, P.; GOVINDARAJAN, B.; DICARLO, J.; LANDIS-PIWOWAR, K.; DOU, Q.P. Naturally occurring proteasome inhibitors from Mate tea (*Ilex paraguayensis*) serve as models for topical proteasome inhibitors. **Journal of Investigative Dermatology**, v.125, p. 207-212, 2005.

ATHAYDE, M.L.; COELHO, G.C.; SCHENKEL, E.P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Phytochemistry**, v. 55, p. 853-857, 2000.

BELHOUCHE, Z.; SAUTOUR, M.; MIYAMOTO, T.; LACAILLE-DUBOIS, M.-A. Steroidal Saponins from the Roots of *Smilax aspera* subsp. *mauritanica*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.56, n.9, p.1324-1327, 2008.

BETTEGA, J.M.R.; TEIXEIRA, H.; BASSANI, V.L.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Evaluation of the antiherpetic activity os standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 819-823, 2004.

BIENZ, K.A. General virology. In: KAYSER, F. H.; BIENZ, K. A., et al (Eds.). **Medical Microbiology**. Berlin: Georg Thieme Verlag, 2005.

BIXBY, M.; SPIELER, L.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Science**, v. 77, p. 345-358, 2005.

BLUMENTHAL, M.; DGOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. **Herbal medicine: expanded comission and monographs**. USA: American Botanical Council, 2000, p.249-252.

BOEHMER, P.E.; LEHMAN, I.R. Herpes Simplex Virus DNA replication. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 66, p. 347-384, 1997.

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

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

BRACESCO, N.; DELL, M.; ROCHA, A.; BEHTASH, S.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A.; NUNES, E. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 9, p. 379-387, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.

BRADY, R.C.; BERNSTEIN, D.I. Treatment of herpes simplex virus infection. **Antiviral Research**, v. 61, n. 2, p. 73-81, 2004.

BRASIL, Lei nº 7.439 de 8 de dezembro de 1980. Institui a Erva-Mate "*Ilex paraguariensis*" como árvore símbolo do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, dez 1980.

BRASIL, Lei nº 11.929, de 20 de junho de 2003. Institui o churrasco como "prato típico" e o chimarrão como "bebida símbolo" do Estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. Porto Alegre, jun 2003.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393-405, 2007.

BULTMANN, H.; TEUTON, J.; BRANDT, C.R. Addition of a C-terminal cysteine improves the anti-Herpes Simplex Virus activity of a peptide containing the Human Immunodeficiency Virus type 1 TAT protein transduction domain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 1596-1607, 2007.

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

CAI, J.; LIU, M.; WANG, Z.; JU, Y. Apoptosis induced by dioscin in Hela cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 2, p. 193-196, 2002.

CAMPBELL, J.B.; PEERBAYE, Y.A. Saponin. **Immunology Research**, v. 143, n. 5, p. 526-530, 1992.

CARDOSO JR, E.L.; FERRARESE-FILHO, O.; CARDOZO FILHO, L.; FERRARESE, M.L.L.; DONADIZZI, C.M.; STURION, J.A. Methylxantines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 533-558, 2007.

CARDUCCI, C.N.; DABAS, P.C.; MUSE, J.O. Determination of inorganic cations by capillary ion electrophoresis in *Ilex paraguariensis* (St. H.), a plant used to prepare tea in South America. **Journal of AOAC international**, v. 83, p. 1167-1173, 2000.

CARINI, M.; FACINO, R.M.; ALDINI, G.; GALLONI, M.; COLOMBO, L. Characterization of phenolic antioxidants from Mate (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 12, p. 1813-1819, 1998.

CARLUCCI, M.J.; CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.C.; CERESO, A.S.; DAMONTE, E.B. Antitherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. **Antiviral Research**, v. 43, n. 2, p. 93-102, 1999.

CARPANEZZI, A.A. Cultura da erva-mate no Brasil: conflitos e lacunas. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G., et al (Eds.). **Erva-mate: Biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre Universidade UFRGS, 1995, p.356.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., et al (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC/Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007, p. 519-536.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: CNPF/ EMBRAPA, 1994, p.280-287.

CASSADY, K.A.; WHITLEY, R.J. New therapeutic approach to the alphaherpesvirus infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 39, p. 119-128, 1997.

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

CHANDRA, S.; DE MEJIA, E.G. Phenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardinisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3590, 2004.

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

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

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

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

CLIFFORD, M.N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. Chlorogenic acids and purine contents of Mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, v. 35, p. 13-21, 1990.

COCCHI, F.; MENOTTI, L.; DUBREUIL, P.; LOPEZ, M.; CAMPADELLI-FIUME, G. Cell-to-cell spread of wild-type herpes simplex virus type 1, but not of syncytial strains, is mediated by the immunoglobulin-like receptors that mediate virion entry, nectin 1 (PRR1/HveC/HlgR) and nectin 2 (PRR2/HveB). **Journal of Virology**, v. 74, p. 3909-3917, 2000.

COELHO, G.C.; ATHAYDE, M.L.; SCHENKEL, E.P. Methylxanthines of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *vestita* Loes. and var. *paraguariensis*. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 2, p. 153-158, 2001.

COELHO, G.C.; RACHWAL, M.F.G.; DEDECEK, R.A.; CURCIO, G.R.; NIETSCHKE, K.; SCHENKEL, E.P. Effect of light intensity on methylxanthine contents of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 2, p.75-80, 2007.

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

DA SILVA, A.G. Propriedades gerais dos herpesvírus. In: LUPI, O.; SILVA, A. G. D., et al (Eds.). **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000, p.1-14.

DAI-JU, J.Q.; LI, L.; JOHNSON, L.A.; SANDRI-GOLDIN, R.M. ICP27 interacts with the C-terminal domain of RNA polymerase II and facilitates its recruitment to herpes simplex virus 1 transcription sites, where it undergoes proteasomal degradation during infection. **Journal of Virology**, v. 80, n. 7, p. 3567-3581, 2006.

DALES, S. Early events in cell animal virus interactions. **Bacteriological Reviews**, v. 37, n. 2, p. 103-135, 1973.

DALSGAARD, K. Saponin adjuvants. 3. Isolation of a substance from *Quillaja saponaria* Molina with adjuvant activity in food-and-mouth disease vaccines. **Arch Gesamte Virusforsch**, v. 44, n. 3, p. 243-254, 1974.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of Clinical Virology**, v.30, n.2, p.115-133, 2004.

DE CLERCQ, E. Antiviral drug discovery and development: where chemistry meets with biomedicine. **Antiviral Research**, v. 67, n. 56-75, 2005a.

DE CLERCQ, E. Recent highlights in the development of new antiviral drugs. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, n.5, p.552-560, 2005b.

DE JALON, E.G.; BLANCO-PRIETO, M.J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. Increased efficacy of acyclovir-loaded microparticles against Herpes Simplex Virus type 1 in cell culture. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 183-187, 2003.

DEFEUDIS, F.V. **Ginkgo biloba extract (EGb 761): Pharmacological activities and clinical applications**. Paris: Elsevier, 1991.

DENG, D.; LAUREN, D.R.; COONEY, J.M.; JENSEN, D.J.; WURMS, K.V.; UPRITCHARD, J.E.; CANNON, R.D.; WANG, M.Z.; LI, M.Z. Antifungal Saponins from *Paris polyphylla* Smith. **Planta Medica**, v.74 p.1397-1402, 2008.

DERMARDEROSIAN, A. **The Review of Natural products**. St Louis: Facts & Comparisons, 2001, p. 396-397.

DICKEL, M.L.; RATES, S.M.; RITTER, M.R. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 60-71, 2007.

DIMMOCK, N.J. Review article initial stages in infection with animal viruses. **Journal of General Virology**, v. 59, p. 1-22, 1982.

DINGWELL, K.S.; BRUNETTI, C.R.; HENDRICKS, R.L.; TANG, Q.; TANG, M.; RAINBOW, A.J.; JOHNSON, D.C. Herpes Simplex Virus glycoproteins E and I facilitate cell-to-cell spread in vivo and across junctions of cultured cells. **Journal of Virology**, v. 68, n. 2, p. 834-845, 1994.

DIRK, D.D.; WEBB, S.R. The next 15 years: Taking plant vaccines beyond proof of concept. **Immunology & Cell Biology**, v. 83, p. 248-256, 2005.

DIXON, N.; WONG, S.L.; GEERLINGS, T.H.; MICKLEFIELD, J. Celular targets of natural products. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 1288-1310, 2007.

DUCAT, G.; QUINÁIA, S.P. Avaliação do teor de minerais da *Ilex paraguariensis* da região Centro-Oeste do Estado do Paraná. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 6, n. 1, p. 31-42, 2004.

EKBLAD, M.; BERGSTRÖM, T.; BANWELL, M.G.; BONNET, M.; RENNER, J.; FERRO, V.; TRYBALA, E. Anti-Herpes Simplex Virus activities of two novel disulphated cyclitols. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v. 17, n. 2, p. 97-106, 2006.

ELION, G.B.; FURMAN, P.A.; FYFE, J.A.; MIRANDA, P.D.; BEAUCHAMP, L.; SHAEFFER, H.J. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 74, n. 12, p. 5716-5720, 1977.

ELLERMANN-ERIKSEN, S. Macrophages and cytokines in the early defence against Herpes Simplex Virus. **Virology Journal**, v. 2, n. , p.1-30, 2005.

ELLISON, K.S.; MARANCHUK, R.A.; MOTTET, K.L.; SMILEY, J.R. Control of VP16 translation by the Herpes Simplex Type 1 immediate-early protein ICP27. **Journal of Virology**, v. 79, n. 7, p. 4120-4131, 2005.

ESMELINDRO, M.C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D.D. Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.2, p.193-204, 2002.

FATAHZADEH, M.; SCHATZ, R.A. Human Herpes Simplex Virus infections: epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 57, n. 5, p. 737-763, 2007.

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

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774-778, 2001.

FILIP, R.; LOTITO, S.B.; FERRARO, G.; FRAGA, C.G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, p. 1437-1436, 2000.

FILIP, R.; SEBASTIAN, T.; FERRARO, G.; ANESINI, C. Effect of *Ilex* extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibular glands. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 649-655, 2007.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v.88, p.587-605, 2002.

FREITAS, A.M.D. **Avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral de extratos de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, Araucariaceae.** 2001. 84p.

(Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2001.

GERMONPREZ, N.; MAES, L.; VAN PUYVELDE, L.; VAN TRI, M.; TUAN, D.A.; DE KIMPE, N. *In Vitro* and *in vivo* anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from *Maesa balansae* and some chemical derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.48, n.1, p.32-37, 2005.

GERRISH, D.; KIM, I.C.; KUMAR, D.V.; AUSTIN, H.; GARRUS, J.E.; BAICHWAL, V.; SAUNDERS, M.; MCKINNON, R.S.; ANDERSON, M.B.; CARLSON, R.; ARRANZ-PLAZA, E.; YAGER, K.M. Triterpene based compounds with potent anti-maturation activity against HIV-1. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18, n.24, p.6377-6380, 2008.

GESSER, R.M. The role of latency in herpesvirus infections. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 128-135, 1997.

GIBSON, M.R. Glycyrrhiza in old and new perspectives. **Lloydia**, v. 41, p. 348-354, 1978.

GIRARD, M.; HIRTH, L. **Virologie Moleculaire**. Paris: Doin, 1989.

GIULIAN, R.; SANTOS, C.E.L.D.; SHHUBEITA, S.D.M.; SILVA, L.M.D.; YONEAMA, M.L.; FERRAZ-DIAS, J. The study of the influence of industrial processing on the elemental composition of mate tealeaves (*Ilex paraguariensis*) using the PIXE technique. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 74-80, 2009.

GNOATTO, S.C.B.; SCHENKEL, E.P.; BASSANI, V.L. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 723-726, 2005.

GOMES DA COSTA, A.M.; NOGAMI, E.M.; VISENTAINER, J.V.; DE SOUZA, N.E.; GARCIA, E.E. Fractionation of aluminum in commercial green and roasted yerba mate samples (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) and in their infusions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 196-200, 2009.

GONÇALVES DE MEJIA, E.; SONG, Y.S.; RAMIREZ-MARES, M.V.; KOBAYASHI, H. Effect of Yerba-mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1966-1973, 2005.

GORGEN, M.; TURATTI, K.; MEDEIROS, A.R.; BUFFON, A.; BONAN, C.D.; SARKIS, J.J.; PEREIRA, G.S. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* decreases nucleotide hydrolysis in rat blood serum. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 73-77, 2005.

GOSMANN, G. **Saponinas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate)**. 1989. 108p. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Análise, Síntese e Controle de Medicamentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre. 1989.

GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; TAKETA, A.T.; SCHENKEL, E.P. Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 3, p. 438-441, 1995.

GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P.; SELIGMANN, O. A new saponin from mate, *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 6, p. 1367-1370, 1989.

GRUNEWALD, K.; DESAI, P.; WINKLER, D.C.; HEYMANN, J.B.; BELNAP, D.M.; BAUMEISTER, W.; STEVEN, A.C. Three-dimensional structure of Herpes Simplex Virus from cryo-electron tomography. **Science**, v. 302, n. 5649, p. 1396-1398, 2003.

GÜÇLÜ-ÜSTÜNDA, Ö.; MAZZA, G. Saponins: properties, applications and processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, p. 231-258, 2007.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL *in vivo*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, p. 338-344, 1996.

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A.J.C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemistry & Molecular Biology International**, v. 35, n. 1, p. 47-56, 1995.

GUNALP, A. Growth and cytopathic effect of rubella virus in a line of Green Monkey kidney cells. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 118, p. 185-190, 1965.

GUPTA, M.P. **270 Plantas Medicinales Iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: CYTED, 1995, p. 46-47.

GUPTA, R.; WARREN, T.; WALD, A. Genital herpes. **Lancet**, v. 22, n. 370, p. 2127-2137, 2007.

HAYASHI, H.; HAYASHI, T.; OTSUKA, H.; TAKEDA, Y. Antiviral activity of 5,6,7-trimethoxyflavone and its potentiation of the antiherpes activity of acyclovir. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 39, p. 821-824, 1997.

HAYASHI, K.; HAYASHI, H.; HIRAOKA, N.; IKESHIRO, Y. Inhibitory activity of soyasaponin II on virus replication *in vitro*. **Planta Medica**, v. 63, n. 2, p. 102-105, 1997.

HECK, C.I.; DE MEJIA, E.G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review and chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. 138-151, 2007.

HELDWEIN, E.E.; KRUMMENACHER, C. Entry of herpesviruses into mammalian cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 1653-1668, 2008.



HEROLD, B.C.; WUDUNN, D.; SOLTYS, N.; SPEAR, P.G. Glycoprotein C of Herpes Simplex Virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. **Journal of Virology**, v. 65, p. 1090-1098, 1991.

HEROLD, B.C.; WUDUNN, D.; VISALLI, R.J.; SUMARSKI, N.; BRANDT, C.; SPEAR, P.G. Glycoprotein C-independent binding of Herpes Simplex Virus to cells requires cell surface heparan sulfate and glycoprotein B. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 1211-1222, 1994.

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

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

HUDSON, J.B. **Antiviral compounds from plants**. Florida: CRC Press, 1990,

HUNT, R. Herpesvirus. In: HUNT, R. C. (Ed.). **Microbiology and Immunology Online**. Carolina: University of South Carolina School of Medicine, 2007.

IBGE - Banco de dados. **IBGE – Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA 2007**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 dez 2008.

IKEDA, T.; YOKOMIZO, K.; OKAWA, M.; TSUCHIHASHI, R.; KINJO, J.; NOHARA, T.; UYEDA, M. Anti-herpes virus type 1 activity of oleanane-type triterpenoids. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 9, p. 1779-1781, 2005.

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

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

JEAN, S.; LEVAN, K.M.; SONG, B.; LEVINE, M.; KNIPE, D.M. Herpes Simplex Virus-1 ICP27 is required for transcription of two viral late ( $\gamma_2$ ) genes in infected cells. **Virology**, v. 283, p.273-284, 2001.

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

KAWAMOTO, S.; ORITANI, K.; ASADA, H.; TAKAHASHI, I.; ISHIKAWA, J.; YOSHIDA, H.; YAMADA, M.; ISHIDA, N.; UJIIE, H.; MASAIE, H.; TOMIYAMA, Y.; MATSUZAWA, Y. Antiviral activity of limitin against Encephalomyocarditis Virus, Herpes Simplex Virus, and Mouse Hepatitis Virus: diverse requirements by limitin and alpha interferon for interferon regulatory factor 1. **Journal of Virology**, v. 77, p. 9622-9631, 2003.

KHAN, M.T.H.; ATHER, A.; THOMPSON, K.D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral Research**, v.67, n.2, p.107-119, 2005.

KNIPE, D.M.; CLIFFE, A. Chromatin control of herpes simplex virus lytic and latent infection. **Nature**, v. 6, p. 211-221, 2008.

KOCH, C.; REICHLING, J.; SCHNEELE, J.; SCHITZLER, P. Inhibitory effect of essential oils against Herpes Simplex Virus type 2. **Phytochemistry**, v. 15, p. 71-78, 2008.

KORZENIEWSKI, C.; CALLEWAERT, D.M. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v.64, n.3, p.313-320, 1983.

KRAEMER, K.H.; TAKETA, A.T.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; GUILLAUME, D. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemistry**, v.42, n.4, p.1119-1122, 1996.

KRATZ, J.M.; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; LEAL, P.C.; NUNES, R.J.; YUNES, R.A.; TRYBALA, E.; BERGSTRÖM, T.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 5, p. 903-907, 2008.

KRUMMENACHER, C.; BLAIKLOCK, P.; SHWORAK, N.W.; BAI, X.; ESKO, J.D.; COHEN, G.H.; EISENBERG, R.J.; ROSENBERG, R.D.; SPEAR, P.G. Comparative usage of herpesvirus entry mediator A and nectin 1 by laboratory strains and clinical isolates of Herpes Simplex Virus. **Virology**, v. 322, p. 286-299, 2004.

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

LINDAHL, U.; KUSCHE-GULLBERG, M.; KJELLÉN, L. Regulated diversity of heparan sulfate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 24979-24982, 1998.

LOGU, A.D.; LOY, G.; PELLERANO, M.L.; BONSIGNORE, L.; SCHIVO, M.L. Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell spread by *Santolina insularis* essential oil. **Antiviral Research**, v. 48, p. 177-185, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008, p.90-91.

LUPI, O. Terapêutica anti-herpética. In: LUPI, O.; DA SILVA, A. G., et al (Eds.). **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000, p. 233-254.

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

LYU, S.-Y.; RHIM, J.-Y.; PARK, W.-B. Antiherpetic activities of flavonoids against Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) *in vitro*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 11, p. 1293-1301, 2005.

MARKOWICZ BASTOS, D.H.; FORNARI, A.C.; QUEIROZ, Y.S.; TORRES, E.A.F.S. Bioactive compounds content of Chimarrão infusions related to the moisture of Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 399-404, 2006.

MARKOWICZ BASTOS, D.H.; SALDANHA, L.A.; CATHARINO, R.R.; C., A.; SAWAYA, H.F.; CUNHA, I.B.S.; CARVALHO, P.O.; EBERLIN, M.N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, v. 12, p. 423-432, 2007.

MAROZIN, S.; PRANK, U.; SODEIK, B. Herpes Simplex Virus type 1 infection of polarized epithelial cells requires microtubules and access to receptors present at cell-cell contact sites. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 775-786, 2004.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1370-1376, 2009.

MARSH, M.; PELCHEN-MATTHEWS, A. Endocytosis in viral replication. **Traffic**, v. 1, p. 525-532, 2000.

MARTINET, A.; HOSTETTMANN, K.; SCHUTZ, Y. Thermogenic effects of commercially available plant preparations aimed at treating human obesity. **Phytomedicine**, v. 6, p. 231-238, 1999.

MARTINET, A.; NDJOKO, K.; TERREAUX, C.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; SCHUTZ, Y. NMR and LC-MSn characterisation of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemical analysis**, v. 12, n. 1, p. 48-52, 2001.

MARTÍNEZ, M.A.D.P.; PELOTTO, J.P.; BASUALDO, N. Distribution of flavonoid aglycones in *Ilex* species (Aquifoliaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n. 7, p. 619-622, 1997.

MATSUURA, H. Saponins in garlic as modifiers of the risk of cardiovascular disease. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 3, p. 1000S-1005S, 2001.

MAZZAFERA, P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. **Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 67-71, 1997.

MAZZANTI, G.; BATTINELLI, L.; POMPEO, C.; SERRILLI, A.M.; ROSSI, R.; SAUZULLO, I.; MENGONI, F.; VULLO, V. Inhibitory activity of *Melissa officinalis* L. extract on Herpes Simplex Virus type 2 replication. **Natural Product Research**, v. 22, n. 16, p. 1433-1440, 2008.

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

MELANCON, J.M.; FOSTER, T.P.; KOUSOULAS, K.G. Genetic analysis of the Herpes Simplex Virus type 1 UL 20 protein domains involved in cytoplasmic virion envelopment and virus-induced cell fusion. **Journal of Virology**, v. 78, n. 14, p. 7329-7343, 2004.

MENGONI, F.; LICHTNER, M.; BATTINELLI, L.; MARZI, M.; MASTROIANNI, C.M.; VULLO, V.; MAZZANTI, G. *In vitro* anti-HIV activity of oleanolic acid on infected human mononuclear cells. **Planta Medica**, v.68, n.2, p.111-114, 2002.

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

MILGATE, J.; ROBERTS, D.C.K. The nutritional & biological significance of saponins. **Nutrition Research**, v. 15, n. 8, p. 1223-1249, 1995.

MILIOLI, E.M.; COLOGNI, P.; SANTOS, C.C.; MARCOS, T.D.; YUNES, V.M.; FERNANDES, M.S.; SCHOENFELDER, T.; COSTA-CAMPOS, L. Effect of acute administration of hydroalcohol extract of *Ilex paraguariensis* St Hilaire (Aquifoliaceae) in animal models of Parkinson's disease. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 771-776, 2007.

MITRA, S.; DUNGAN, S. Micellar properties of *Quillaja saponin*. 1. Effects of temperature, salt and pH on solution properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p.1587-1595, 1997.

MONTANHA, J.A. **Estudo químico e biológico das saponinas de *Ilex paraguariensis* St. Hil Aquifoliaceae**. 1990. 92p. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Análise, Síntese e Controle de Medicamentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre. 1990.

MONTGOMERY, R.I.; WARNER, M.S.; LUM, B.J.; SPEAR, P.G. Herpes Simplex Virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/ NGF receptor family. **Cell**, v. 87, p. 427-436, 1996.

MOREIN, B.; HU, K.F.; ABUSUGRA, I. Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 10, p. 1367-1382, 2004.

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

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

MÜLLER, V.; CHÁVEZ, J.H.; REGINATTO, F.H.; ZUCOLOTTI, S.M.; NIERO, R.; NAVARRO, D.; YUNES, R.A.; SCHENKEL, E.P.; BARARDI, C.R.M.; ZANETTI, C.R.; SIMÕES, C.M.O. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against Herpes Simplex Virus type 1 and Rabies Virus. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 10, p. 970-974, 2007.

MÜLLER, V.D.M. **Triagem antiviral de extratos vegetais: Fracionamento biomonitorado de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. Aquifoliaceae (erva-mate)**. 2006. 105p. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, Florianópolis. 2006.

NAITHANI, R.; HUMA, L.C.; HOLLAND, L.E.; SHUKLA, D.; MCCORMICK, D.L.; MEHTA, R.G.; MORIARTY, R.M. Antiviral Activity of Phytochemicals: A Comprehensive Review. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 11, p. 1106-1133, 2008.

NARDONE, R.M. Toxicity testing *in vitro*. In: ROTBBLAT, G. H.; CRISTOFALO, V. J. (Eds.). **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York: Academic, 1977, p.471-495.

NEWMAN, D.J. Natural products as leads to potencial drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2589-2599, 2008.

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

NUÑEZ, J.C.; KÄNZIG, R.G. Secanza de Yerba mate. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G., et al (Eds.). **Erva-mate: Biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: Universidade UFRGS, 1995, p. 175-180.

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

ODA, K.; MATSUDA, H.; MURAKAMI, T.; KATAYAMA, S.; OHGITANI, T.; YOSHIKAWA, M. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. **Biological Chemistry**, v. 381, p. 67-74, 2000.

OLIVEIRA, D.M.; FREITAS, H.S.; SOUZA, M.F.F.; ARÇARI, D.P.; RIBEIRO, M.L.; CARVALHO, P.O.; BASTOS, D.H.M. Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) aqueous extract decreases intestinal SGLT1 gene expression but does not affect other biochemical parameters in alloxan-diabetic wistar rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p.10527-10532, 2008.

PAGANINI STEIN, F.L.; SCHMIDT, B.; FURLONG, E.B.; SOUZA-SOARES, L.A.; SOARES, M.C.; VAZ, M.R.; MUCCILLO BAISCH, A.L. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. **Biological Research For Nursing**, v. 7, p.146-156, 2005.

PANG, J.; CHOI, Y.; PARK, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, p. 178-185, 2008.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 4, 1978, p. 138-143.

PIRET, J.; ROY, S.; GAGNON, M.; LANDRY, S.; DESORMEAUX, A.; OMAR, R.F.; BERGERON, M.G. Comparative study of mechanisms of Herpes Simplex Virus inactivation by sodium lauryl sulfate and *n*-lauroylsarcosine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 9, p. 2933-2942, 2002.

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

POMILIO, A.B.; TRAJTEMBERG, S.; VITALE, A.A. High-performance capillary electrophoresis analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography. **Phytochemical analysis**, v.13, p.235-241, 2002.

QUENELLE, D.C.; COLLINS, D.J.; MARCIANI, D.J.; KERN, E.R. Effect of immunization with herpes simplex virus type-1 (HSV-1) glycoprotein D (gD) plus the immune enhancer GPI-0100 on infection with HSV-1 or HSV-2. **Vaccine**, v.24, n.10, p.1515-1522, 2006.

QUENELLE, D.C.; COLLINS, D.J.; RICE, T.L.; PRICHARD, M.N.; MARCIANI, D.J.; KERN, E.R. Effect of an immune enhancer, GPI-0100, on vaccination with live attenuated herpes simplex virus (HSV) type 2 or glycoprotein D on genital HSV-2 infections of guinea pigs. **Antiviral Research**, v.80, n.2, p.223-224, 2008.

RAGUPATHI, G.; GATHURU, J.; LIVINGSTON, P. Antibody inducing polyvalent cancer vaccines. **Cancer Treatment Research**, v. 123, n. 1, p. 157-180, 2005.

RAMIREZ-MARES, M.V.; CHANDRA, S.; GONÇALVES DE MEJIA, E. *In vitro* chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation Research**, v. 554, p.53-65, 2004.

REGINATTO, F.H.; ATHAYDE, M.L.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species - caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6, p. 443-446, 1999.

RIVELLI, D.P.; SILVA, V.V.; ROPKE, C.D.; MIRANDA, D.V.; ALMEIDA, R.L.; SAWADA, T.C.H.; BERLANGA, S.; BARROS, S.B.M. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hiroalcoholic and aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts

by DPPH reduction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, p. 215-222, 2007.

ROIZMAN, B. Herpesviridae. In: FIELDS, B. N.; KNIFE, D. M., et al (Eds.). **Fields Virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996, v.2, p.2221-2341.

ROIZMAN, B.; KNIFE, D.M. Herpes simplex viruses and their replication. In: KNIFE, D. M.; HOWLEY, P. M., et al (Eds.). **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001, p. 2399-2459.

ROIZMAN, B.; KNIFE, D.M.; WHITLEY, R.J. Herpes Simplex Viruses. In: KNIFE, D. M.; HOWLEY, P. M., et al (Eds.). **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p.2502-2601.

RONER, M.R.; SPRAYBERRY, J.; SPINKS, M.; DHANJI, S. Antiviral activity obtained from aqueous extracts of the Chilean soapbark tree (*Quillaja saponaria* Molina). **Journal of General Virology**, v. 88, p. 275-285, 2007.

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

SALDAÑA, M.D.A.; MOHAMED, R.S.; BAER, M.G.; MAZZAFERA, P. Extraction of purine alkaloids from maté (*Ilex paraguariensis*) using supercritical CO<sub>2</sub>. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3804-3808, 1999.

SANTOS, O.L.R.; SILVA, A.G.; PEREIRA JUNIOR, A.C. **Herpes - clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Medisi, 2000.

SANTOS, R.I.D. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., et al (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: Editora da UFSC/Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007, p.403-434.

SCHAEFFER, H.J.; BEAUCHAMP, L.; MIRANDA, P.D.; ELION, G.B. 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. **Nature**, v.272, n.13, p.583-586, 1978.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., et al (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: Editora da UFSC/Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007, p. 711-740.

SCHENKEL, E.P.; MONTANHA, J.A.; GOSMANN, G. Triterpene saponins from mate, *Ilex paraguariensis*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 405, p. 47-56, 1996.

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J.C.; MOSCA, S. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitricoxide-dependent mechanism. **Clinical Nutrition**, v. 24, p. 360-366, 2005.

SCHINELLA, G.R.; TROIANI, G.; DÁVILA, V.; DE BUSCHIAZZO, P.M.; TOURNIER, H.A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 269, n. 2, p. 357-360, 2000.

SCHMIDT, B.; RIBNICKY, D.M.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W.T.; RASKIN, I. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 57, n. Supplement 1, p. S3-S9, 2008.

SCHMIDTKE, M.; KARGER, A.; MEERBACH, A.; EGERER, R.; STELZNER, A.; MAKAROV, V. Binding of a N,N'-bisheteryl derivative of dispirotriperazine to heparan sulfate residues on the cell surface specifically prevents infection of viruses from different families. **Virology**, v.311, n.1, p.134-143, 2003.

SCHNITZLER, P.; NOLKEMPER, S.; STINTZING, F.C.; REICHLING, J. Comparative *in vitro* study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations. **Phytomedicine**, v. 15, p. 62-70, 2008.

SCHUBERT, A.; ZANIN, F.F.; PEREIRA, D.F.; ATHAYDE, M.L. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. ST. - HIL. (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1233-1236, 2006.

SCHWÖBEL, W.; STREISSLE, G. Evaluation of antiviral compounds: acute versus persistent infections in cell cultures. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.284, n.3, p.599 - 603, 1977.

SCIABICA, K.S.; DAI, Q.J.; SANDRI-GOLDIN, R.M. ICP27 interacts with SRPK1 to mediate HSV splicing inhibition by altering SR protein phosphorylation. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 7, p. 1608-1619, 2003.

SERRA, C.; LAMPIS, G.; POMPEI, R.; PINZA, M. Antiviral activity of new triterpenic derivatives. **Pharmacological Research**, v.29, n.4, p.359-366, 1994.

SHIEH, M.-T.; SPEAR, P.G. Herpesvirus-induced cell fusion that is dependent on cell surface heparan sulfate or soluble heparin. **Journal of Virology**, v. 68, n. 2, p. 1224-1228, 1994.

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

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

SIEUWERTS, A.; KLIJN, J.G.M.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.33, p.813-823, 1995.



SILVA, I.T.D. **TRIAGEM ANTI-HERPÉTICA DE ALGUNS TÁXONS DA BIODIVERSIDADE BRASILEIRA: fracionamento biomonitorado de *Cecropia glaziovii* Sneth., Urticaceae (embaúba)**. 2009. 133p. (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2009.

SIMÕES, C.M.O. **Étude de l'activité antivirale et des relations structure-activité de substances d'origine naturelle**. 1992. 542p. (PhD Thesis). U.F.R de Pharmacie, Université de Rennes I, Rennes, France. 1992.

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

SIMÕES, C.M.O.; AMOROS, M.; SCHENKEL, E.P.; SHIN-KIM, J.-S.; RÜCKER, G.; GUIRRE, L. Preliminary Studies os antiviral activity of triterpenoid saponins: relationships between their chemical structure ans antiviral activity. **Planta Medica**, v. 56, p. 652-553, 1990.

SIMÕES, C.M.O.; FALKENBERG, M.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Antiviral activity of South Brazilian medicinal plant extracts. **Phytomedicine**, v. 6, n. 3, p. 205-214, 1999.

SJOGREN-JANSSON, E.; JEANSSON, S. Large-scale production of monoclonal antibodies in dialysis tubing. **The Journal of Immunological Methods**, v.84, n.1-2, p.359-364, 1985.

SJOGREN-JANSSON, E.; JEANSSON, S. Growing hybridomas in dialysis tubing: optimization of the technique. In: ZOLA, H. (Ed.). **Laboratory Methods in Immunology**. Boca Raton: CRC, 1990, v. 1, p. 41-50.

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

SMOLINA, T.P.; SOLOVÉVA, T.F.; BESEDNOVA, N.N. Immunotropic activity of panaxansbioglycans isolated from ginseng. **Antibiot Khimioter**, v. 46, n. 7, p. 19-22, 2001.

SNOECK, R. Antiviral therapy of herpes simplex. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, n.2, p.157-159, 2000.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. 3 ed. New York: W. H. Freeman, 1995,

SOLTYSIK, S.; WU, J.Y.; RECCHIA, J.; WHEELER, D.A.; NEWMAN, M.J.; COUGHLIN, R.T.; KENSIL, C.R. Structure/function studies of QS-21 adjuvant: assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function. **Vaccine**, v. 13, n. 15, p. 1403-1410, 1995.

SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.219-243, 2004.

SPEAR, P.G. Entry of alphaherpesviruses into cells. **Seminars in Virology**, v. 4, p. 167-180, 1993.

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

SPEAR, P.G.; ELISENBERG, R.J.; COHEN, G.H. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. **Virology**, v. 275, p. 1-8, 2000.

SPEAR, P.G.; LONGNECKER, R. Herpesvirus entry: an update. **Journal of Virology**, v. 77, n. 19, p. 10179-10185, 2003.

SPEAR, P.G.; MANOJ, S.; YOON, M.; JOGGER, C.R.; ZAGO, A.; MYSCOFSKI, D. Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. **Virology**, v.344, n.1, p.17-24, 2006.

STRASSMANN, B.B.; VIEIRA, A.R.; PEDROTTI, E.L.; MORAIS, H.N.F.; DIAS, P.F.; MARASCHIN, M. Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in Mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8348-8353, 2008.

STREISSLE, G.; SCHWOBEL, W.; HEWLETT, G. Evaluation of antiviral compounds in cell cultures with acute or persistent virus infections. **Advanced Cell Culture**, v. 1, p. 67-90, 1881.

STREIT, N.M.; HECKTHEUER, L.H.R.; CANTO, M.W.; MALLMANN, C.A.; STRECK, L.; PARODI, T.V.; CANTERLE, L.P. Relation among taste-related compounds (phenolic and caffeine) and sensory profile of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Chemistry**, v. 102, p. 560-564, 2007.

SU, C.-T.; HSU, J.T.-A.; HSIEH, H.-P.; LIN, P.-H.; CHEN, T.-C.; KAO, C.-L.; LEE, C.-N.; CHANG, S.-Y. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. **Antiviral Research**, v. 79, p. 62-70, 2008.

SU, Y.-H.; ZHABG, X.; WANG, X.; FRASER, N.; BLOCK, T.M. Evidence that the immediate-early gene product ICP4 is necessary for the genome of the Herpes Simplex Virus type 1 ICP4 deletion mutant strain d120 to circularize in infected cells. **Journal of Virology**, v. 80, n. 23, p. 11589-11597, 2006.

SUBAK-SHARPE, J.H.; DARGAN, D.J. HSV Molecular Biology: General Aspects of Herpes Simplex Virus Molecular Biology. **Virus Genes**, v.16, n.3, p. 239-251, 1998.

SUGIMOTO, S.; NAKAMURA, S.; YAMAMOTO, S.; YAMASHITA, C.; ODA, Y.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Brazilian Natural Medicines. III. Structures of triterpene oligoglycosides and lipase inhibitors from Mate, leaves of *Ilex paraguariensis*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, n. 3, p. 257-261, 2009.

SUN, H.-X.; XIE, Y.; YE, Y.-P. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine**, v.27, n.12, p.1787-1796, 2009.

SUPERTI, F.; AMMENDOLIA, M.G.; MARCHETTI, M. New advances in anti-HSV chemotherapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 900-911, 2008.

SYDISKIS, R.J.; OWEN, D.G.; LOHR, J.L.; ROSLER, K.-H.A.; BLOMSTER, R.N. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 12, p.2463-2466, 1991.

TAKAHASHI, H.; TAKESHITA, T.; MOREIN, B.; PUTNEY, S.; GERMAIN, R.N.; BERZOFSKY, J.A. Induction of CD8+ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope proteins in ISCOMS. **Nature**, v. 344, n. 6269, p. 873-875, 1990.

TAKETA, A.T.C. **Saponinas de *Ilex brecicuspis* Reissek**. 1997. 149p. (Dissertação). Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1997.

TAKETA, A.T.C.; SCHENKEL, E.P. Saponins from *Ilex pseudobuxus*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.13, n.3, p.159-164, 1994.

TAKEUCHI, H.; BABA, M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **Journal of Virological Methods**, v.33, p.61-71, 1991.

TANAKA, O.; TAMURA, Y.; MASUDA, H.; MIZUTANI, K. Application of saponins in foods and cosmetics: saponins of *Mohave yucca* and *Sapindus mukurossi*. In: WALKER; YAMASAKI (Eds.). **Saponins used in Food and Agriculture**. New York: Plenum Press, 1996,

TAO, J.; HU, Q.; YANG, J.; LI, R.; LI, X.; LU, C.; CHEN, C.; WANG, L.; SHATTOCK, R.; BEN, K. *In vitro* anti-HIV and -HSV activity and safety of sodium rutin sulfate as a microbicide candidate. **Antiviral Research**, v. 75, p. 227-233, 2007.

TAYLOR, T.J.; KNIPE, D.M. Proteomics of herpes simplex virus replication compartments: association of cellular DNA replication, repair, recombination, and chromatin remodeling proteins with ICP8. **Journal of Virology**, v. 78, n. 11, p. 5856-5866, 2004.

TENORIO SANZ, M.D.; TORIJA ISASA, M.E. Mineral elements in Mate herb (*Ilex paraguariensis* St. H.). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 41, p. 441-454, 1991.

TIWARI, V.; OH, M.-J.; KOVACS, M.; SHUKLA, S.Y.; VALYI-NAGY, T.; SHUKLA, D. Role for nectin-1 in Herpes Simplex Virus 1 entry and spread in human retinal pigment epithelial cells. **FEBS Journal**, v. 275, p.5272-5285, 2008.

TOME, J.P.; NEVES, M.G.; TOME, A.C.; CAVALEIRO, J.A.; MENDONCA, A.F.; PEGADO, I.N.; DUARTE, R.; VALDEIRA, M.L. Synthesis of glycoporphyrin

derivatives and their antiviral activity against herpes simplex virus types 1 and 2. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 3878-3888, 2005.

TORMEN, M.J. Economia ervateira brasileira. In: WINGE, H.; FERREIRA, A. G., et al (Eds.). **Erva-mate: Biologia e cultura no Cone Sul**. Porto Alegre: Universidade UFRGS, 1995, p. 27-40.

TRYBALA, E.; LILJEQVIST, J.-Å.; BERGSTRÖM, B.S. Herpes Simplex Virus types 1 and 2 differ in their interaction with heparan sulfate. **Journal of Virology**, v. 74, n. 19, p. 9106-9114, 2000.

VANDER BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J.; VAN HOOF, L. Plant products as potential antiviral agents. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, v.84, n.2, p.101-147, 1986.

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

VERA GARCIA, R.; BASUALDO, I.; PERALTA, I.; DE HEREBIA, M.; CABALLERO, S. Minerals content of Paraguayan Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*, S. H.). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 47, p. 77-80, 1997.

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the New Millennium: Leadfinding and Biotechnology. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.52, n.3, p.253-262, 2000.

VISALLI, R.J.; VAN ZEIJL, M. DNA encapsidation as a target for anti-herpesvirus drug therapy. **Antiviral Research**, v. 59, n. 2, p. 73-87, 2003.

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

VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D.A. Leads for antivirals from tradicional medicines. In: PREBDERGASTM, H. D. V.; ETKIN, N. L., et al (Eds.). **Plants for Food and Medicine**. London: Royal Botanic Gardens, 1998, p.333-344.

VOYLES, B.A. **The biology of viruses**. St Louis: Mosby-Year Book, 1993.

WAGNER, E.K. Herpesviruses. **The Homepage of Dr. Edward K. Wagner**. Disponível em: <<http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/movieindex.html>>. Acesso em: 16 fev 2009.

WAINBERG, M.A. Perspectives on antiviral drug development. **Antiviral Research**, v. 81, p. 1-5, 2009.

WANG, J.R.; ZHOU, H.; JIANG, Z.H.; WONG, Y.F.; LIU, L. *In vivo* anti-inflammatory and analgesic activities of a purified saponin fraction derived from the root of *Ilex pubescens*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.4, p.643-650, 2008.

- WANG, Y. Needs for new plant-derived pharmaceuticals in the post-genome era: an industrial view in drug research and development. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, p. 395-406, 2008.
- WEEKS, B.S.; FRIEDMAN, H.M. Laminin reduces HSV-1 spread from cell to cell in human keratinocyte cultures. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.230, p.446-469, 1997.
- WHITE, D.O.; FENNER, F.J. **Medical Virology**. 4<sup>a</sup> ed. San Diego: Academic, 1994,
- WHITLEY, R.J. Herpes simplex viruses. In: FIELDS, B. N.; KNIFE, D. M., et al (Eds.). **Fields Virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996, p. 2297-2342.
- WHITLEY, R.J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **The Lancet**, v. 357, p. 1513-1518, 2001.
- WICHTL, M. **Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A handbook for practice on a scientific basis**. 3. ed. Boca Raton: CRC, 2003, p. 366-368.
- WROBEL, K.; URBINA, E.M. Determination of total aluminum, chromium, copper, iron, manganese, and nickel and their fractions leached to the infusions of black tea, green tea, *Hibiscus sabdariffa*, and *Ilex paraguariensis* (mate) by ETA-AAS. **Biol Trace Elem Research**, v. 78, p. 271-280, 2000.
- WU, S.; HUA, Z.J.; XIO, Y.L.; WANG, Y. Effect of ginseng polypeptide on the 3H-TdR integration of human blood lymphocyte. **Chinese Medical Journal**, v. 104, n. 5, p.399-401, 1991.
- WU, Z.J.; OUYANG, M.A.; WANG, C.Z.; ZHANG, Z.K.; SHEN, J.G. Anti-tobacco mosaic virus (TMV) triterpenoid saponins from the leaves of *Ilex oblonga*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 1712-1717, 2007.
- XIANG, Y.-F.; PEI, Y.; WANG, Y.-F. Current status of natural products from plants as anti-Herpes Simplex Virus-1 agents. **Virologica Sinica**, v. 23, n. 5, p. 305-314, 2008.
- XIAO, J.-X.; HUANG, G.-Q.; ZHANG, S.-H. Soyasaponins inhibit the proliferation of Hela cells by inducing apoptosis. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.59, n.1, p.35-42, 2007.
- YANG, G.; BAO, T.; FU, N.; GEN, P. A preliminary study on the immunomodulatory effects of ginseng saponins *in vitro* and *in vivo*. **Norman Bethune University of Medical Sciences**, v. 9, p. 1-7, 1983.
- YOON, M.; SPEAR, P.G. Disruption of adherens junctions liberates nectin-1 to serve as receptor for herpes simplex virus and pseudorabies virus entry. **Journal of Virology**, v. 76, n. 14, p. 7203 -7208, 2002.
- ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.B. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P., et al (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC/Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007, p. 577-614.