

DANIELLE CRISTINA DOS SANTOS SILVA ALVIM

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DE EXTRATOS DE PLANTAS DO GÊNERO
CASEARIA SOBRE OS HERPESVÍRUS HUMANOS 1 E 2**



**Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RIO DE JANEIRO

DEZEMBRO/2016

Trabalho realizado no Departamento de Virologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Maria Teresa Villela Romanos e co-orientação da MSc Jéssica Figueiredo Cavalcanti

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

A475a Alvim, Danielle Cristina dos Santos Silva
Atividade Inibitória de Extratos de Plantas do
Gênero Casearia sobre os Herpesvirus Humanos 1 e 2
/ Danielle Cristina dos Santos Silva Alvim. --
Rio de Janeiro, 2016.
56 f.

Orientadora: Maria Teresa Villela Romanos.
Coorientadora: Jéssica Figueiredo Cavalcanti.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2016.

1. Casearia. 2. Plantas - toxicidade. 3.
Antivirais. 4. Herpesvirus humano 1. 5. Herpesvirus
humano 2. I. Romanos, Maria Teresa Villela,
orient. II. Cavalcanti, Jéssica Figueiredo,
coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Para ser bem sucedido no trabalho, a primeira coisa a fazer é apaixonar-se por ele.”

- Mary Laretta

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado força e sabedoria para chegar até aqui. Sem Ele nada disso seria possível.

Aos meus pais, Marcos e Tereza por terem me dado amor, carinho, dedicação e suprido minhas necessidades ao longo da minha vida.

Ao meu amor, Lucas por sua parceria e por estar ao meu lado tornando tudo mais prazeroso.

À minha orientadora Prof^a M^a Teresa por ter acreditado em mim, a me ensinar tudo para que eu pudesse desenvolver este projeto. Por ter me abraçado de uma forma indescritível.

À minha co-orientadora Jéssica por toda paciência, por estar junto e ter tirado minhas duvidas. Por toda amizade e companheirismo.

Aos meus colegas do LEDAC, Fábio e Yasmim pelos momentos de descontração que tornaram o ambiente de trabalho muito melhor.

Às amigas da Microbiologia, Bia, Gabi e Thaís por fazerem desses 4 anos de faculdade os melhores possíveis.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro.

RESUMO

DANIELLE CRISTINA DOS SANTOS SILVA ALVIM

ATIVIDADE INIBITÓRIA DE EXTRATOS DE PLANTAS DO GÊNERO *CASEARIA* SOBRE OS HERPESVÍRUS HUMANOS 1 E 2

Os herpesvírus humanos 1 (HHV-1) e 2 (HHV-2) estão entre os vírus mais intensamente estudados, pois causam um amplo espectro de doenças. Atualmente, não há tratamento que elimine esse vírus do organismo, porém medicamentos antivirais podem diminuir e prevenir os sintomas e as possíveis complicações. Apesar da disponibilidade de um agente antiviral eficaz (aciclovir), estirpes resistentes a este fármaco já têm sido isoladas, a maioria delas de pacientes imunocomprometidos. Dessa forma, existe uma necessidade urgente de encontrar substâncias que sejam eficazes para o tratamento da infecção por esses vírus, que apresentem atividade inibitória e que não sejam tóxicas para a célula hospedeira. Neste trabalho foi avaliado o potencial de inibição para o HHV-1 e HHV-2 de extratos brutos etanólicos das plantas *Casearia sylvestris* e *Casearia arborea*. O aciclovir foi empregado como composto padrão. Os experimentos foram realizados em cultura de células Vero. Inicialmente foi avaliada a citotoxicidade, para a obtenção da concentração máxima não tóxica (CMNT) e concentração citotóxica para 50% das culturas de células (CC₅₀). A CMNT foi de 31,2 µg/mL para o extrato de *C. arborea*, de 7,8 µg/mL para o extrato de *C. sylvestris* e maior ou igual a 200 µg/mL (maior concentração avaliada) para o aciclovir. A CC₅₀ foi de 144,08 µg/mL para o extrato de *C. arborea*, de 21,57 µg/mL para o extrato de *C. sylvestris* e superior a 200 µg/mL para o aciclovir. Para a avaliação da atividade anti-HHV-1 e -2, as células foram inoculadas com 100 TCID₅₀ das suspensões virais na presença dos extratos e aciclovir, na CMNT. Após incubação, os sobrenadantes foram titulados e a inibição calculada pela diferença dos títulos do grupo controle de vírus (sem extratos ou aciclovir) com os dos testes. O extrato de *C. sylvestris* foi capaz de inibir em 82,6 % a propagação do HHV-1 e em 99,9 % o HHV-2, enquanto que o extrato de *C. arborea* foi capaz de inibir em 48,7 % o HHV-1 e 94,4 % o HHV-2. O aciclovir apresentou inibição de 99,0% para os dois vírus. Na etapa seguinte os extratos foram testados em concentrações decrescentes para determinar a curva dose-resposta e obter a CE₅₀ (concentração capaz de inibir em 50% a propagação viral). O extrato de *C. sylvestris* apresentou uma CE₅₀ de 6,26 para o HHV-1 e 5,85 para o HHV-2. O aciclovir apresentou CE₅₀ de 0,8 para o HHV-1 e 1,38 para o HHV-2. Com o valor da CC₅₀ e da CE₅₀ foi possível calcular o IS (índice de seletividade), o extrato apresentou um índice de 3,4 e 3,68 para o HHV-1 e HHV-2, respectivamente, já o aciclovir, >250 para o HHV-1 e >145 para o HHV-2. Nos testes para determinação do mecanismo de ação do *C. sylvestris* foram observadas atividade virucida, interferência nos receptores celulares, inibição da penetração do vírus, além da atuação nos eventos pós-penetração para o HHV-1, com destaque para o seu efeito virucida. O extrato de *C. sylvestris* mostrou excelente atividade inibitória, tanto para o HHV-1 quanto para o HHV-2. Em relação ao HHV-2, foi interessante observar que a percentagem de inibição foi superior à observada pelo aciclovir. Este é o primeiro estudo mostrando a atividade anti-HHV de *C. arborea*.

Palavras-chave: Casearia, Plantas - toxicidade, Antivirais, Herpesvírus humano 1, Herpesvírus humano 2.

ABSTRACT

DANIELLE CRISTINA DOS SANTOS SILVA ALVIM

INHIBITORY ACTIVITY OF *CASEARIA* GENUS PLANT EXTRACTS ON HUMAN HERPESVIRUS 1 AND 2

Human herpesviruses 1 (HHV-1) and 2 (HHV-2) are among the most intensively studied viruses, as they cause a wide spectrum of diseases. Currently, there is no treatment to eliminate this virus from the body, but antiviral drugs can decrease and prevent symptoms and possible complications. Despite the availability of an effective antiviral agent (acyclovir), resistant strains for this drug have already been isolated, most of them from immunocompromised patients. Thus, there is an urgent need to find substances which are effective for the treatment of infection by those viruses, which exhibit inhibitory activity and which are not toxic to the host cell. In this work the potential of inhibition for HHV-1 and HHV-2 of crude ethanolic extracts of *Casearia sylvestris* and *Casearia arborea* plants was evaluated. Acyclovir was used as the standard compound. The experiments were performed on Vero cell culture. Initially, cytotoxicity was evaluated to obtain the maximum non-toxic concentration (MNCT) and cytotoxic concentration for 50% of cell cultures (CC₅₀). The CMNT was 31.2 µg/mL for *C. arborea* extract, 7.8 µg/mL for *C. sylvestris* extract and 200 µg/mL (highest concentration) for acyclovir. The CC₅₀ was 144.08 µg/mL for *C. arborea* extract, 21.57 µg/mL for *C. sylvestris* extract and 200 µg/mL for acyclovir. For the evaluation of the anti-HHV-1 and -2 activity, the cells were inoculated with 100 TCID₅₀ of the viral suspensions in the presence of the extracts and acyclovir in the CMNT. After incubation, the supernatants were titrated and the inhibition calculated by the difference of the virus control group titers (without extracts or acyclovir) with those of the tests. The extract of *C. sylvestris* was able to inhibit the HHV-1 propagation in 82.6% and HHV-2 in 99.9%, whereas the *C. arborea* extract was able to inhibit in 48.7% HHV-1 and 94.4% HHV-2. Acyclovir showed 99.0% inhibition for both viruses. In the next step, the extracts were tested at decreasing concentrations to determine the dose-response curve and to obtain the EC₅₀ (concentration able to inhibit 50% viral propagation). The *C. sylvestris* extract had an EC₅₀ of 6.26 for HHV-1 and 5.85 for HHV-2. Acyclovir had EC₅₀ of 0.8 for HHV-1 and 1.38 for HHV-2. With the value of CC₅₀ and EC₅₀ for determination of the SI (selective index), the extract had an index of 3.4 and 3.68 for HHV-1 and HHV-2, respectively, and acyclovir > 250 for HHV-1 and > 145 for HHV-2. In the tests to determine the mechanism of action of *C. sylvestris* were observed virucidal activity, interference in the cellular receptors, inhibition of virus penetration, besides the action in the post-penetration events for the HHV-1, with emphasis on its virucidal effect. *C. sylvestris* extract showed excellent inhibitory activity for both HHV-1 and HHV-2. Concerning HHV-2, it was interesting to note that the percentage of inhibition was higher than that observed for acyclovir. This is the first study showing the anti-HHV activity of *C. arborea*.

Key-words: Casearia, Plants - toxicity, Antivirals, Human herpesvirus 1, Human herpesvirus 2.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação da Estrutura dos HHV	04
Figura 2: Biossíntese dos Herpesvírus Humanos	06
Figura 3: Manifestações Clínicas de infecções por HHV	08
Figura 4: Sítios de ação dos antivirais eficazes contra as infecções pelos HHV-1 e HHV-2	10
Figura 5: <i>Casearia sylvestris</i>	12
Figura 6: <i>Casearia arborea</i>	13
Figura 7: Esquema da Avaliação da Atividade Inibitória dos Extratos	21
Figura 8: Esquema da Leitura em Microscópio Óptico da Placa	22
Figura 9: Esquema de Ensaio para Determinação do Efeito Virucida	24
Figura 10: Esquema de Ensaio para Determinação da Ação sobre os Receptores Celulares	25
Figura 11: Esquema de Ensaio para Determinação da Ação durante a Penetração Viral	26
Figura 12: Esquema de Ensaio para Determinação da Ação Pós-penetração	27

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos Herpesvírus Humanos	03
Tabela 2: Citotoxicidade dos Extratos	28
Tabela 3: Atividade Antiviral dos Extratos	29
Tabela 4: Curva Dose-Resposta	30
Tabela 5: Atividade Virucida do extrato <i>C. sylvestris</i>	30
Tabela 6: Atividade do extrato <i>C. sylvestris</i> sobre os receptores celulares	31
Tabela 7: Atividade do extrato <i>C. sylvestris</i> durante a penetração viral	31
Tabela 8: Atividade do extrato <i>C. sylvestris</i> após a penetração viral	32
Tabela 9: Ação do Extrato de <i>C. sylvestris</i> em Diferentes Etapas da Biossíntese Viral	32

ÍNDICE DE SIGLAS E SÍMBOLOS

°C: Grau Celsius

µg: Micrograma

µl: Microlitro

ACV: Aciclovir

CC₅₀: Concentração Tóxica para 50% das Células em Cultura

CE₅₀: Concentração Capaz de Inibir em 50% a Replicação Viral

CGEN – Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

CLUE – cromatografia em fase líquida de ultra eficiência, do Inglês *U-HPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography)*

CMNT: Concentração Máxima Não Tóxica

CPE: Efeito Citopatogênico, do Inglês *Cytopathic Effect*

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DNA: Ácido Desoxiribonucleico, do Inglês *Deoxyribonucleic Acid*

DO: Densidade Óptica

g (B, C, D, H, L): Glicoproteínas Virais

HCF: Fator de célula hospedeira, do Inglês *Host Cell Fator*

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana, do Inglês *Human Immunodeficiency Virus*

HHV-1: Herpesvírus Humano 1

HHV-2: Herpesvírus Humano 2

HVEM: Receptor Mediador de Entrada de Herpesvírus

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICP (0, 22, 27, 4, 47): Polipeptídeos de Célula Infectada, do Inglês *Infected Cell Polypeptide*

ICTV: Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, do Inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IDU: Iododeoxiuridina

IIV: Índice de Inibição Viral

IPJBRJ- Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro

IS: Índice de Seletividade

LAVIREO: Laboratório de Virose Respiratórias Entéricas e Oculares

LEDAC: Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas

MEM: Meio Mínimo Essencial de Eagle, do Inglês *Minimum Essential Medium Eagle*

mg: Miligrama

ml: Mililitro

mm: Milimolar

nm: Nanômetro

OBP: Proteína de Ligação a Origem, do Inglês *Origin Binding Protein*

OCT-1: Octâmero 1

OMS: Organização Mundial da Saúde, do Inglês *World Health Organization*

P.A. – Para Análise

PARNA- Parque Nacional da Tijuca

PBS: Tampão fosfato-salino, do Inglês *Phosphate Buffered Saline*

pH: Potencial Hidrogeniônico, do Inglês *Hydrogen Potential*

PI: Percentagem de Inibição

PVDF – difluoreto de polivinilideno, do Inglês *polyvinylidene difluoride*

RB – Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro

RFA – Herbário da Universidade Federal do Rio de Janeiro

RNA: Ácido ribonucleico, do Inglês *Ribonucleic Acid*

SFB: Soro Fetal Bovino

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

TCID₅₀: Dose capaz de Produzir CPE em 50% das Culturas de Células

Us1.5: Sequência curta única, do Inglês *Unique sequence short*

VHS: Desligamento do Hospedeiro Mediado pelo Vírião, do Inglês *Virion Host Shutoff*

α -TIF: Ator indutor de transcrição alfa, do Inglês *Trans Inducing Factor*

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Herpesvírus Humano (HHV)	02
1.1.1 Patogênese e Manifestações Clínicas	06
1.1.2 Epidemiologia	08
1.1.3 Tratamento	10
1.2.1.2 Gênero Casearia: <i>C. arborea</i> (Rich.) Urb. e <i>C. sylvestris</i> Sw	11
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1. Extrato Obtidos das Plantas do Gênero <i>Casearia</i>	17
4.2. Preparo do Material	17
4.3. Cultura de Células e Vírus	18
4.4. Ensaio de Citotoxicidade	19
4.4.1. Verificação da Alteração da Morfologia Celular	19
4.4.2. Verificação da Viabilidade Celular	19
4.5. Avaliação da Atividade Antiviral	20
4.5.1. Titulação Viral	21
4.5.2. Determinação da Curva Dose-Resposta	23
4.5.3. Estudo dos Mecanismos de Ação	23
4.5.3.1. Determinação da Inibição Extracelular do Vírus (Efeito Virucida)	23
4.5.3.2. Determinação da Ação dos Extratos sobre os Receptores Celulares	24
4.5.3.3. Determinação da Ação dos Extratos Durante a Penetração Viral	25

4.5.3.4. Determinação da Atividade nos Eventos Pós-Penetração	26
5. RESULTADOS	28
5.1 Citotoxicidade dos Extratos	28
5.2. Avaliação da Atividade Antiviral	28
5.2.1. Triagem	28
5.2.2. Curva Dose-Resposta	29
5.2.3. Ação do Extrato de <i>C. sylvestris</i> em Diferentes Etapas da Biossíntese Viral	30
5.2.3.1. Determinação da Inibição Extracelular do Vírus (efeito virucida)	30
5.2.3.2. Determinação da Ação sobre os Receptores Celulares	31
5.2.3.3. Determinação da Ação Durante a Penetração Viral	31
5.2.3.4. Determinação da Atividade nos Eventos Pós-Penetração	32
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÃO	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1 INTRODUÇÃO

Os herpesvírus humanos 1 (HHV-1) e 2 (HHV-2) apresentam características biológicas particulares que os tornam capazes de causar diferentes tipos de patologias, sendo que as lesões mais frequentes apresentam-se na pele e mucosas (Steiner, Kennedy e Pachner, 2007; Hadigal e Shukla, 2013; Wigg, 2015b). Além disso, estabelecem infecções persistentes latentes por toda vida do hospedeiro e podem ser reativados, causando novas lesões (Steiner, Kennedy e Pachner, 2007; Hadigal e Shukla, 2013; Wigg, 2015b). A prevalência do HHV-1 é maior quando comparada ao HHV-2. Em alguns países, até 90% das pessoas têm anticorpos contra o HHV-1, ainda que não apresentem sintomas clínicos (Steiner, Kennedy e Pachner, 2007; Hadigal e Shukla, 2013; Wigg, 2015b). Apesar de a maioria das pessoas imunocompetentes não apresentarem sintomas ou apresentarem lesões autolimitadas, em indivíduos imunocomprometidos são observadas complicações resultando no agravamento do quadro clínico.

O tratamento das infecções por herpesvírus é atualmente baseado no uso de diferentes fármacos seletivos e eficazes, tais como aciclovir, penciclovir, fanciclovir, cidofovir, valaciclovir. No entanto, já foram isoladas estirpes resistentes a estas drogas, principalmente devido ao uso intensivo de tais medicamentos (May *et al.*, 2000; Latief *et al.*, 2015). Estudos têm revelado resistência de herpesvírus humanos 1 e 2 ao aciclovir em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos, servindo de alerta para utilização de novas alternativas de tratamento (Lima, 2016).

Até os dias de hoje, a pesquisa de plantas com atividade medicinal tem sido de fundamental importância. A busca de novas fontes de drogas anti-herpéticas é um desafio para os virologistas, farmacologistas e químicos para superar problemas com estirpes resistentes às drogas. Portanto, a disponibilidade de novos agentes terapêuticos que atuam em diferentes sítios de ação faz-se uma questão urgente (Hassan, Masarčíková e Berchová, 2015).

Neste âmbito, o gênero *Casearia* pertencente à família *Salicaceae*, é atrativo por apresentar uma ampla distribuição geográfica em regiões tropicais e temperadas, ocorrendo

nas Antilhas, México, Paraguai, Uruguai, Argentina e Brasil, onde pode ser encontrado desde o estado do Amazonas até o Rio Grande do Sul, destacando-se como parte dos biomas da Mata Atlântica e Cerrado (Silva *et al.*, 1988; Carvalho, 2007; Thadeo *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011, Araújo *et al.*, 2014).

Além de ser bem representado na flora brasileira, este gênero destaca-se por sua importância econômica. Suas folhas são utilizadas como cicatrizantes, antissépticos, antimicrobianos, com ação hemostática e depurativa do sangue, também sendo empregadas no tratamento de aftas, herpes simples, úlceras gástricas, feridas, picadas de insetos entre outras (Marquete e Vaz, 2007; Revisado por Ferreira *et al.*, 2011).

Neste trabalho avaliamos o potencial de inibição de extratos brutos etanólicos das plantas *Casearia sylvestris* Swartz e *Casearia arborea* (L.C.Rich) Urban, pertencentes à família *Salicaceae*, sobre os herpesvírus humanos das espécies 1 (HHV-1) e 2 (HHV-2).

1.1 Herpesvírus Humano (HHV)

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), os herpesvírus humanos 1 (HHV-1) e 2 (HHV-2), também conhecidos como os vírus herpes simplex 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2), estão classificados na ordem *Herpesvirales*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Simplexvirus*, espécies 1 e 2 (ICTV, 2016) (**Tabela 1**).

Tabela 1: Classificação dos herpesvírus humanos.

Família	Subfamília	Gênero	Vírus/Sinônimos
<i>Herpesviridae</i>	<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	herpesvírus humanos 1 (HHV-1) e 2 (HHV-2)/Vírus herpes simplex 1(HSV-1) e 2 (HSV-2)
		<i>Varicellavirus</i>	herpesvírus humano 3 (HHV-3)/Vírus da varicela-zoster (VZV)
	<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Cytomagalovirus</i>	herpesvírus humano 5 (HHV-5)/Citomegalovírus (HCMV)
		<i>Roseolovirus</i>	herpesvírus humanos 6 (HHV-6) e 7 (HHV-7)/ <i>Roseolovirus</i>
	<i>Gammaherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	herpesvírus humano 4 (HHV-4)/Vírus Epstein-Barr (EBV)
		<i>Rhadinovirus</i>	herpesvírus humano 8 (HHV-8)/Vírus associado ao sarcoma de Kaposi

Fonte: Adaptado de Wigg, 2015b.

As partículas infecciosas dos HHV-1 e HHV-2 são esféricas e possuem 186 nm podendo chegar a 225 nm de diâmetro se consideradas as espículas do envelope. Esses vírus são morfológicamente semelhantes aos outros vírus da família *Herpesviridae*. Eles apresentam genoma de DNA dupla fita linear envolvido por um capsídeo icosaédrico formado por 160 capsômeros, sendo 150 hexaméricos e 12 pentaméricos. Contêm uma camada amorfa denominada tegumento, que é constituído de proteínas importantes para a regulação da biossíntese viral e ainda apresentam um envelope que consiste em uma bicamada lipídica contendo 11 proteínas das quais nove são glicosiladas e estão envolvidas nas etapas de reconhecimento e penetração celular (Kukhanova, Korovina e Kochetkov, 2014; Smith e Weller, 2015; Wigg, 2015b) (**Figura 1**).

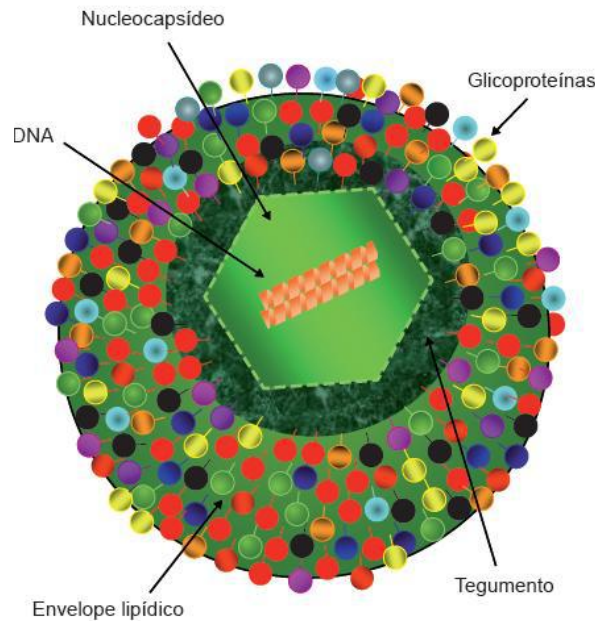


Figura 1: Representação da estrutura dos HHV. A partícula infecciosa dos HHV é esférica e possui 186 nm podendo chegar a 225 nm de diâmetro se consideradas as espículas do envelope. Apresenta genoma de DNA dupla fita linear envolvido por um capsídeo icosaédrico e contém tegumento que é constituído de proteínas importantes para a regulação da biossíntese. Fonte: Wigg, 2015b.

Os HHV-1 e HHV-2 infectam células como: fibroblastos, células do epitélio escamoso (queratinócitos) e mucoso, células polarizadas do epitélio cilíndrico, células gliais e terminações nervosas. Sua biossíntese, em relação ao ciclo lítico, é rápida quando comparada com os demais herpesvírus, ocorrendo entre 18 e 20 horas (Wigg, 2015b).

A biossíntese dos HHV-1 e -2 (Figura 2) inicia-se com a adsorção na superfície da célula hospedeira, onde as glicoproteínas virais C (gC) e B (gB) interagem de forma reversível com os receptores da celulares, as glicosaminoglicanas, sendo principalmente sulfato de heparana. Após essa etapa, a penetração pode ocorrer de duas maneiras, com a fusão direta do envelope com a membrana ou através da fusão do envelope com membranas de endossomas, após a endocitose. Essa etapa ocorre devido a interação irreversível da glicoproteína D (gD) com outros receptores celulares: mediador de entrada de herpesvírus (HVEM), nectinas e sulfato de heparana 3-O-sulfatado que leva a alteração conformacional da gD favorecendo a interação com o heterodímero formado por gH/gL,

expondo assim os domínios de fusão de gB e do heterodímero (Kukhanova, Korovina e Kochetkov, 2014; Wigg, 2015b).

Já dentro da célula, o nucleocapsídeo é liberado no citosol juntamente com 20 proteínas do tegumento, entre elas a VP16 ou α -TIF, que chegam ao poro nuclear sendo transportados por microtúbulos. O DNA viral e a proteína VP16 se associam com as proteínas citoplasmáticas do hospedeiro, HCF-1 (fator da célula hospedeira) e OCT-1 (octâmero1), que favorecem sua entrada ao núcleo. No núcleo ocorre a transcrição do genoma viral mediado pela RNA polimerase II e a síntese das proteínas correspondentes no citoplasma (Roizman, Knipe e Whitley, 2013; Wigg, 2015b).

O complexo VP16/proteínas celulares controla e ativa a expressão gênica. Esta ocorre em três níveis, os primeiros genes a serem expressos são os chamados iniciais imediatos (genes α) que após a transcrição, são traduzidos em seis proteínas α (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 e Us1.5) que estimulam a expressão dos genes iniciais (genes β) e ainda são regulatórias de toda a síntese proteica e genômica do vírus. Os genes β são transcritos e traduzidos em proteínas β (DNA polimerase, proteína de ligação ao DNA, proteína de ligação à origem (OBP) e complexo helicase/primase) que são responsáveis pela replicação do ácido nucleico viral (Lehman e Boehmer, 1999; Wigg, 2015b).

Com o acúmulo de proteínas α e β , a replicação viral é iniciada e os genes tardios (genes γ) são expressos, os quais codificam as proteínas estruturais dos vírus (proteínas do tegumento, proteína do capsídeo e espículas glicoproteicas) que são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e glicosiladas no complexo de Golgi (Lehman e Boehmer, 1999; Kukhanova, Korovina e Kochetkov, 2014; Wigg, 2015b).

Após a replicação viral, a formação do capsídeo se dá ao redor de proteínas “plataforma” (*scaffolding*) que foram transportadas para o núcleo, originando um pró-capsídeo. Este sofre maturação, se torna um capsídeo maduro e é preenchido com o DNA viral, sendo denominado nucleocapsídeo. Os nucleocapsídeos são levados até o citoplasma por um processo complexo e controverso que ainda não está estabelecido. A hipótese mais

aceita diz que ocorre um duplo envelopamento, onde o nucleocapsídeo adquire uma membrana interna do envoltório nuclear (1º envelopamento) e ao brotar do complexo de Golgi se associaria às proteínas do tegumento presentes em vesículas exocíticas (2º envelopamento) (Van Genderen *et al.*, 1994; Skepper *et al.*, 2001; Leuzinger *et al.*, 2005; Mettenleiter, Minson e Wild, 2006; Calistri *et al.*, 2007; Connolly *et al.*, 2011; Jhonson e Baines, 2011; Vadlapudi, Vadlapatla e Mitra, 2013; Wigg, 2015b).

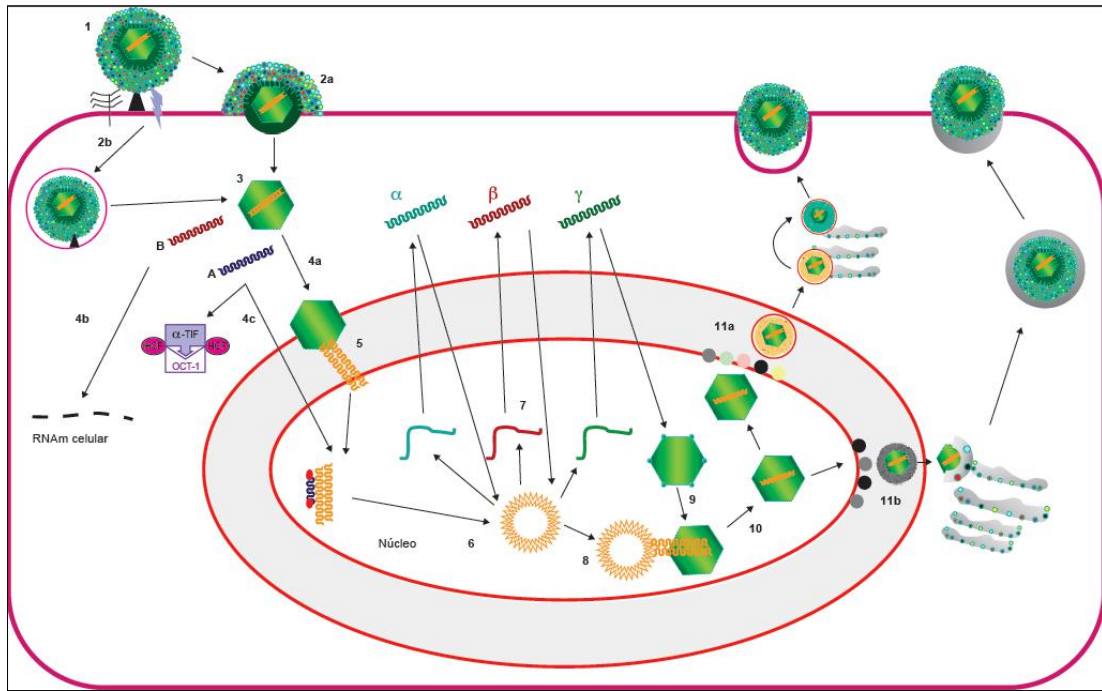


Figura 2: Biossíntese dos herpesvírus humanos 1 e 2. 1. Adsorção do vírion à membrana citoplasmática da célula hospedeira; 2a. Penetração do vírion por fusão direta do envelope viral com a membrana citoplasmática, ou 2b. Penetração por endocitose; 3. Liberação do nucleocapsídeo e das proteínas virais (A-VP16[α-TIF] e B-VHS) no citoplasma da célula; 4a. Migração do nucleocapsídeo para o núcleo da célula, por meio de microtúbulos do citoesqueleto; 4b. A proteína VHS degrada RNAm da célula hospedeira. 4c. VP16(α-TIF) forma complexo com as proteínas celulares HCF e OCT-1; no núcleo liga-se ao DNA viral para iniciar a transcrição pela RNA polimerase II celular. 5. Liberação do ácido nucleico no interior do núcleo celular e o capsídeo vazio deixado no citoplasma; 6. Circularização do DNA viral; 7. Transcrição dos genes em RNAm α , pela RNA polimerase II celular; tradução de proteínas α no citoplasma que são translocadas para o núcleo para ativar a expressão dos genes β e transcrição dos genes β , em RNAm β , tradução das proteínas β que voltam para o núcleo para ativar a expressão dos genes γ ; ativação dos genes γ pelas proteínas β e transcrição dos genes γ , em RNAm γ , tradução das proteínas γ que voltam para o núcleo para fazer parte da estrutura dos vírions; 8. Replicação do genoma viral pela DNA polimerase viral; 9. Montagem do capsídeo dos vírus; 10. Empacotamento do DNA viral; 11a. Saída dos vírus com apenas um envelopamento: o nucleocapsídeo adquire o envelope na membrana interna do envoltório nuclear e por brotamento da membrana externa é conduzido dentro das vesículas até a membrana citoplasmática onde o vírus é liberado; 11b. Saída dos vírus por duplo envelopamento: o nucleocapsídeo recebe um envelope na membrana interna do envoltório nuclear e perde esse envelope ao sair do núcleo. O envelope definitivo é adquirido em vesículas exocíticas derivadas do Golgi ou TGN (*trans-Golgi network*) que já contêm as glicoproteínas processadas e maduras inseridas na membrana. O vírus sai da célula por fusão da membrana da vesícula com a membrana citoplasmática, sendo liberado da célula no meio extracelular. Fonte: WIGG, 2015b.

1.1.1 Patogênese e Manifestações Clínicas

Os HHV-1 e HHV-2 assim como os demais vírus da família *Herpesviridae*, apresentam características que os tornam capazes de causar diferentes tipos de patologias, podendo infectar as células de forma lítica causando lesão nos epitélios ou ainda de forma latente por toda vida do hospedeiro sendo reativados por inúmeros fatores (estresse, tensão emocional, febre, uso de imunossupressores, exposição à luz ultravioleta ou ao frio, por lesão tecidual). Esses vírus causam lesões que se localizam tanto no sítio da infecção primária inicial ou próximas a ele (Gorbach, Bartlett e Blacklow, 1998; Wigg, 2015b).

A característica principal dos integrantes da subfamília *Alphaherpesvirinae* é o estabelecimento do mecanismo de latência nos nervos sensoriais; tanto o HHV-1 como o HHV-2 são dermatrópicos e causam lesões mucocutâneas orofaciais e genitais, além de infecção ocular, encefalite, meningite e meningoencefalite (Gorbach, Bartlett e Blacklow, 1998; Wigg, 2015b).

Sua transmissão depende do contato íntimo e pessoal entre um indivíduo susceptível e outro que esteja excretando ativamente os HHV-1 ou HHV-2 na pele lesionada, mucosas da boca ou genitália. Os vírus podem ser transmitidos, se presentes, por fluidos corporais como saliva, sêmen, secreções cervicais ou pelo líquido de vesículas (maior risco). É importante ressaltar que durante a fase de latência não há transmissão, entretanto nem sempre a reativação é sintomática, aumentando a possibilidade de disseminação, já que cerca de 1/3 das infecções acontece nesta fase (Whitley, 2001; Steiner, Kennedy e Pachner, 2007; Wigg, 2015b).

Quando a infecção não é assintomática, se manifesta clinicamente como lesões de pele e mucosas, além de estar associada a infecções em pacientes imunocomprometidos, infecções congênitas e causar alterações no sistema nervoso central levando à encefalite herpética e a meningite associada principalmente ao HHV-2 (**Figura 3**) (Steiner, Kennedy e Pachner, 2007; Hadigal e Shukla, 2013; Wigg, 2015b).

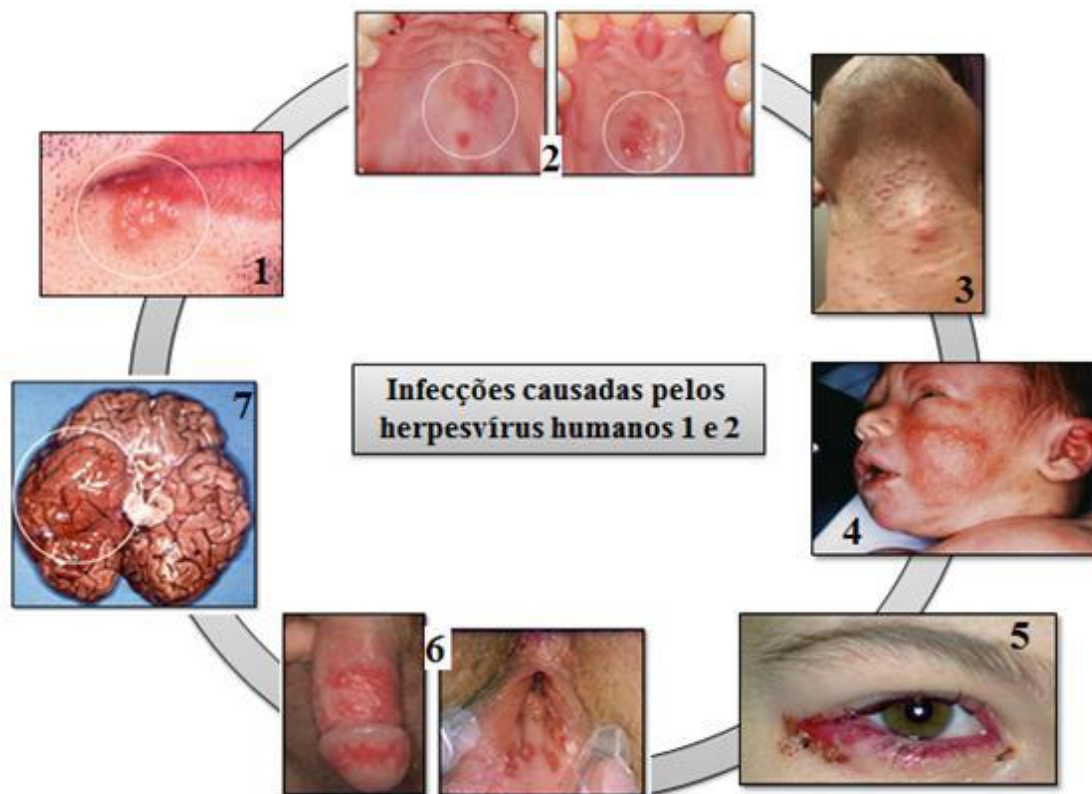


Figura 3: Manifestações Clínicas de infecções por HHV. 1- Herpes labial (Consolaro e Consolaro, 2009); 2- Infecção da orofaringe (Consolaro e Consolaro, 2009); 3- Eczema herpético (<https://lauzuricaderma.com/2016/04/07/erupcion-variceliforme-de-kaposi-tambien-eczema-herpetico-palabras-mayores/>) Acessado em: 04/11/2016; 4- Infecção neonatal (<http://pediatravirtual.net/herpes-neonatal-simplex/>) Acessado em: 04/11/2016; 5- Ceratoconjutivite herpética (<http://www.medicodeolhos.com.br/2010/06/herpes-no-olho-herpes-ocular.html>) Acessado em: 04/11/2016; 6- Infecção genital masculina (www.microbes-edu.org) e feminina (www.medicinaurgente.blogspot.com) Acessado em: 04/11/2016; 7- Encefalite herpética (<http://anatpat.unicamp.br/bineuviroses.html>) Acessado em: 04/11/2016.

1.1.2 Epidemiologia

Os HHV-1 e HHV-2 foram os primeiros herpesvírus a serem descritos e estão entre os mais intensamente estudados. Além disso, são os responsáveis pelas infecções mais prevalentes no mundo e no Brasil. No país, 640 mil novos casos de herpes genital são diagnosticados anualmente. Em algumas regiões, cerca de 90% das pessoas têm anticorpos contra o HHV-1, ainda que não apresentem sintomas clínicos (Clemens e Farhat, 2010; Revisado por Wigg, 2015b).

O HHV-1 e o HHV-2 têm distribuição mundial, porém a epidemiologia do HHV-1 é diferente do HHV-2. Em países em desenvolvimento, a infecção por HHV-1 geralmente

ocorre nos primeiros três anos de vida por contato direto com saliva infectada, podendo ser assintomática ou sintomática, e geralmente está associada com doença orofacial e orofaríngea (Brooks *et al.*, 2014; Wigg, 2015b). Já nos países desenvolvidos, os indivíduos entram em contato com o vírus mais tarde, durante a adolescência (Brooks *et al.*, 2014; Wigg, 2015b). O HHV-2 está associado em geral com infecções genitais adquiridas pelo contato sexual, apresentando alta prevalência em indivíduos sexualmente ativos, principalmente os que possuem múltiplos parceiros. Também já foi descrito que há maior prevalência em mulheres, cerca de 22% contra 18% de risco de infecção em homens (Brooks *et al.*, 2014; Wigg, 2015b).

Um estudo realizado por Masel e colaboradores (2015) nos Estados Unidos apontou que ao fim de quatro anos (2006- 2010), a prevalência da infecção por HHV-1, HHV-2 e por ambos os vírus em militares do gênero masculino foi de 42,5%, 6% e 3%, respectivamente. Entre militares do gênero feminino, a prevalência correspondente foi de 57,5%, 16,5% e 8%. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre raça, escolaridade e estado civil em relação à soroprevalência ou soroincidência das infecções herpéticas.

Em um estudo de 2010 no Brasil, Clemens e Farhat relataram que a prevalência dos anticorpos para HHV-1 foi de 67,2%, sem diferença quanto ao gênero, mas aumentando com a idade. A soroprevalência de HHV-1 não é homogênea no Brasil, variando de 47,0% em Fortaleza a 73,3% em Manaus. Em todo território, a taxa de infecção pelo HHV-2, foi de 11,3%. A idade foi o fator de correlação mais significativo na análise de regressão logística quanto à aquisição de anticorpos para HHV-2. As adolescentes do gênero feminino apresentaram tendência a adquirir infecções por HHV-2 em idade mais baixa e, em comparação com homens, mais do que o dobro delas tornou-se positiva para HHV-2 (10,7% contra 4,6%) aos 18 anos. A alta taxa de aquisição das infecções por HHV-2 em mulheres na idade fértil aumenta também o risco de herpes neonatal (Clemens e Farhat, 2010).

As infecções genitais facilitam a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV- do inglês, human immunodeficiency virus) devido às lesões ulcerativas na superfície

das mucosas e por deflagrar um processo de inflamação que recruta células linfocitárias efetoras susceptíveis ao HIV. Ambas as situações facilitam tanto a entrada do vírus como sua disseminação e proliferação no indivíduo (Brooks *et al.*, 2014; Wigg, 2015b).

1.1.3 Tratamento

As infecções causadas por esses vírus não possuem cura e os antivirais disponíveis apenas diminuem os sintomas e o tempo da manifestação clínica. Ainda assim, o indivíduo pode ter recorrências e transmitir o vírus mesmo sob tratamento (Astani, Navid e Schnitzler, 2014; Brooks *et al.*, 2014; Priengprom *et al.*, 2015; Wigg, 2015a).

Vários antivirais mostraram-se eficazes contra as infecções pelos HHV-1 e HHV-2 (**Figura 4**), como, por exemplo: aciclovir, valaciclovir e foscarnet. Todos são inibidores da síntese de DNA viral. Além desses, o foscarnet, um análogo de pirofosfato, também é licenciado para a utilização. Dentre eles, o aciclovir (ACV) é o mais utilizado devido a sua alta seletividade e baixa toxicidade atuando de forma específica nas células infectadas (Astani, Navid e Schnitzler, 2014; Brooks *et al.*, 2014; Priengprom *et al.*, 2015; Wigg, 2015a).

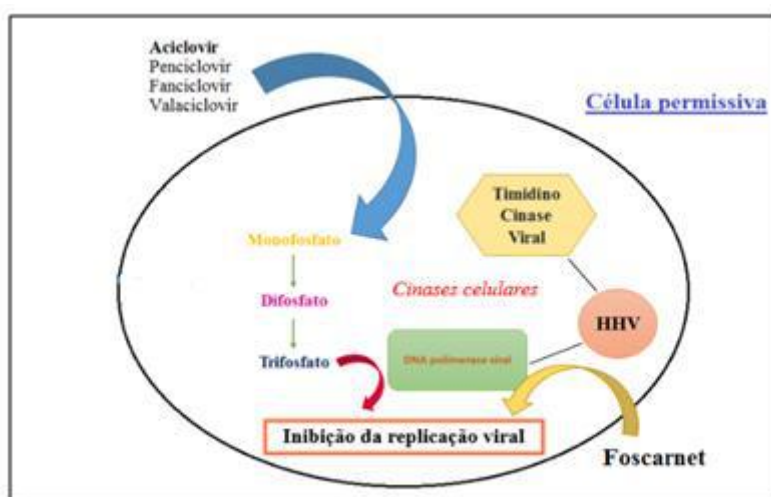


Figura 4: Sítios de ação dos antivirais eficazes contra as infecções pelos HHV-1 e HHV-2. Fonte: adaptado de Lima, 2016.

O uso repetido do aciclovir em longo prazo pode levar ao desenvolvimento de herpesvírus humanos resistentes a essa droga. A resistência do HHV-1 e HHV-2 ao ACV é primariamente uma preocupação para pacientes imunocomprometidos, enquanto a prevalência permanece baixa em pacientes imunocompetentes (Christophers *et al.*, 1998, Nugier *et al.*, 1992, Frobert *et al.*, 2014). Desde o início da comercialização do ACV na década de 1980, a resistência a este fármaco em pacientes imunocompetentes foi estimada em 0,5% (Christophers *et al.*, 1998, Nugier *et al.*, 1992, Frobert *et al.*, 2014). Após vinte anos de uso, a prevalência não aumentou (Danve-Szatanek *et al.*, 2004, Stranska *et al.*, 2005, Frobert *et al.*, 2014). No entanto, o uso recorrente e generalizado de ACV e seu pró-fármaco o valaciclovir (Val-ACV), incluindo regimes de doses curtas e doses altas aprovadas pela FDA para tratar a recorrência do HHV, pode ser um fator contribuinte para o surgimento da resistência (Cunningham *et al.*, 2012, Frobert *et al.*, 2014).

Cerca de 95% dos casos de resistência são atribuídos a mutações no gene UL23 que codifica a timidina cinase e 5% são atribuídas a mutações no gene UL30 que codifica a DNA polimerase viral (Piret e Boivin, 2011, 2014, Frobert *et al.*, 2014).

O aciclovir, um análogo de nucleosídeo, é monofosforilado pela timina cinase do HHV-1 e HHV-2, sendo convertido na forma trifosfato pelas cinases celulares. O aciclovir trifosfatado é incorporado de maneira eficiente ao DNA viral pela polimerase viral, bloqueando a extensão da cadeia do DNA (Astani, Navid e Schnitzler, 2014; Brooks *et al.*, 2014; Wigg, 2015a).

1.2 Gênero *Casearia*: *C. arborea* (Rich.) Urb. e *C. sylvestris* Sw.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o uso da medicina tradicional se espalhou não só nos países em desenvolvimento, mas também nos industrializados, como uma forma complementar de tratar e prevenir doenças (WHO, 2003, Yamashita *et al.*, 2005).

O território brasileiro abrange a maior diversidade de espécies de plantas no mundo, porém, menos de 10% foram avaliadas quanto às suas características biológicas,

assim como menos de 5% foram submetidas a estudos fitoquímicos detalhados (Luna *et al.*, 2005, Ferreira *et al.*, 2011).

A família Salicaceae é encontrada em todas as regiões tropicais e temperadas do mundo. Nesta família, compreende-se o gênero *Casearia* que possui cerca de 45 espécies das quais podemos destacar *C. arborea* (Rich.) Urb. e *C. sylvestris* Sw., alvos desse estudo (Mosaddik *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2015).

As espécies do gênero *Casearia* possuem propriedades medicinais, como ação hemostática, diurética, diaforética, anestesiante e cicatrizante de lesões na pele e mucosa e boa atividade contra peçonhas de animais. (Capobiango, Vestena e Bittencourt, 2009; Werle *et al.*, 2009; Bou *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2015) Basile e colaboradores (1990) demonstraram a ação preventiva destas plantas contra úlcera gástrica, herpes, sífilis e depurativo do sangue.

Casearia sylvestris Sw. (**Figura 5**) é uma espécie encontrada nas Américas Central e do Sul e, sobretudo ocorre em florestas do sul do Brasil. É uma planta conhecida popularmente como "guaçatonga", e este termo possui origem tupi-guarani (língua nativa indígena brasileira não escrita), que sinaliza a utilização milenar de *C. sylvestris* por comunidades indígenas brasileiras. De acordo com outros levantamentos, outros nomes tradicionais são "chá arebugre", "cafeiro-do-mato", "cafezinho-do-mato" e "erva bugre" (Felipe *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2015).



Figura 5: *Casearia sylvestris*.

Fonte: <http://ibflorestas.org.br/loja/sementes/semente-cambroe.html>. Acessado em 26/11/2016.

Com relação ao estudo fitoquímico de suas folhas, o extrato hidroalcoólico contém, entre os constituintes químicos, vários diterpenos e triterpenos, do mesmo modo que os ácidos hexanóico e capróico (Campos *et al.*, 2015). Relatos de literatura sugerem que as folhas e outras partes da planta têm sido utilizadas por populações indígenas da América do Sul principalmente como macerações ou decocções aquosas ou hidroetanólicas, e na maioria das vezes ingeridas para o tratamento primário de várias doenças. Todavia, fora também descrito notável capacidade de diminuir o comportamento nociceptivo em modelos de dor inflamatória (Ferreira *et al.*, 2011; Albano *et al.*, 2013; Prieto *et al.*, 2013; Felipe *et al.*, 2014).

Sobretudo, há ocorrência de substâncias de interesse como: cumarinas, flavonóides, lignanas e diversos diterpenos. Estudos mostraram que os diterpenos clerodânicos (casearinas), apresentam atividade antitumoral e citotóxica (Capobiango, Vestena e Bittencourt, 2009; Werle *et al.*, 2009; Bou *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2015).

Por outro lado, a espécie *Casearia arborea* (Rich.) Urb. (**Figura 6**) é pouco estudada, inclusive pouco se conhece sobre seus constituintes químicos e sua atividade. Na literatura existe apenas um estudo realizado em 2000, por Beutler e colaboradores que detectaram cinco novos dipertenos a partir do extrato das raízes da planta, o qual mostrou toxicidade em NCI 60-cell human tumor screen (Beutler *et al.*, 2000). Desta forma, este trabalho com a espécie *C. arborea* (Rich.) Urb. é pioneiro demonstrando sua toxicidade e atividade antiviral.



Figura 6: *Casearia arborea*. Fonte: <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=CAAR8>. Acessado em 26/11/2016.

2 JUSTIFICATIVA

As infecções causadas pelos herpesvírus humanos 1 e 2 não possuem cura e os antivirais disponíveis apenas tornam os sintomas mais brandos. O HHV-1 é o mais prevalente na população, e geralmente está associado a infecções orolabiais e orofaciais que podem levar a uma baixa estima do paciente, além das complicações mais sérias como ceratoconjuntivite herpética, que pode resultar em cegueira (Brooks *et al.*, 2014; Wigg, 2015b).

Já o HHV-2 geralmente está associado a infecções genitais e favorece a infecção pelo HIV agravando o estado do indivíduo, além de ser considerada uma infecção sexualmente transmissível (IST) (Brooks *et al.*, 2014; Wigg, 2015b).

Com o uso prolongado e indiscriminado do aciclovir surgiram estirpes virais resistentes em indivíduos imunocompetentes e, principalmente, em imunocomprometidos, tornando ainda mais necessária a introdução de novos antivirais que possuam um baixo custo e serem eficazes, além de não apresentar efeitos tóxicos às células (May *et al.*, 2000; Latief *et al.*, 2015; Lima, 2016).

Além de serem bem representadas na flora brasileira, as plantas do gênero *Casearia* já foram descritas com atividade antibacteriana, utilizadas como cicatrizantes, antisséptica, antiofídica sendo empregadas no tratamento de aftas, lesões herpéticas, úlceras gástricas, feridas, picadas de insetos entre outras aplicações (Marquete e Vaz, 2007, Ferreira *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, a *C. sylvestris* tem sido explorada no desenvolvimento de cremes contra os herpesvírus e comercializado em formulações misturadas com outras plantas para preparar chás e infusões com finalidades terapêuticas (Camargo *et al.*, 1993, Alves, 2000, Simões, Amoros e Girre, 1999, Ferreira *et al.*, 2011) .

A espécie *Casearia arborea* é pouco estudada, inclusive pouco se conhece sobre seus constituintes químicos e sua atividade. Na literatura existe apenas um estudo realizado em 2000, por Beutler e colaboradores que detectaram cinco novos diprtenos a partir do extrato das raízes da planta, o qual mostrou toxicidade em NCI 60-cell human tumor screen (Beutler *et al*, 2000). Desta forma, este trabalho com a espécie *C. arborea* (Rich.) Urb. é pioneiro demonstrando sua toxicidade e atividade antiviral.

Diante deste cenário, este estudo pretende colaborar com o meio científico e com a sociedade apresentando uma alternativa de potencial terapêutico contra o HHV-1 e o HHV-2 principalmente para o grupo de risco, os imunocomprometidos.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a atividade inibitória dos extratos etanólicos das plantas *Casearia sylvestris* e *Casearia arborea* sobre os herpesvírus humanos 1 e 2, *in vitro*.

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a toxicidade dos extratos etanólicos das plantas *C. sylvestris* e *C. arborea* para células Vero, *in vitro*;
- ✓ Determinar a atividade inibitória dos extratos etanólicos das plantas sobre os HHV-1 e HHV-2;
- ✓ Determinar, através da construção de uma curva dose-resposta, a concentração dos extratos capaz de inibir em 50% a replicação do HHV-1 e do HHV-2;
- ✓ Determinar a atividade inibitória dos extratos em diferentes etapas da biossíntese dos vírus, *in vitro*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Extratos Obtidos das Plantas do Gênero *Casearia*

Todo o processo para a obtenção dos extratos das plantas empregados neste trabalho foi realizado pela colaboradora Dr^a Flaviane Gomes Pereira (Biotecnologia Vegetal & Bioprocessos (PBV&B), UFRJ).

Foram coletadas folhas de *C. arborea*, em junho de 2014, de um exemplar localizado no Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (IPJBRJ) (S22°58'01.00" W43°14'48.30") com comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico (SISBIO, número: 24057-2), RB 586916 no Estado do Rio de Janeiro, onde ocorre naturalmente. Para a realização dos estudos químicos de *C. sylvestris* foram coletadas folhas de exemplar localizado no Parque Nacional da Tijuca (PARNA Tijuca) (S22°57'05.04" W43°17'10.09"), com autorização para atividades com finalidade científica (SISBIO, número: 38765-1), RB 570651. Exsiccatas dos materiais vegetais foram confeccionadas e a identificação dessas espécies foi feita em colaboração com o Dr. Ronaldo Marquete, pesquisador e taxonomista do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Os materiais testemunhos foram depositados nos seguintes herbários: Herbário do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (RFA) e Herbário do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico (RB). Esse projeto de pesquisa foi aprovado e registrado para obtenção de Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético (Licença de Pesquisa/CGEN) sob o número 010105/2014-0.

4.2 Preparo do Material

Foram coletadas folhas frescas das duas espécies para o preparo de extrato etanólico. Foi realizada secagem em estufa a 50 °C, até peso constante. Em seguida, as folhas foram trituradas em moinho de facas e transferidas (*C. sylvestris* = 84,5 g; *C. arborea* = 80,5 g) para frasco de vidro para se proceder com a maceração. A esse frasco foram adicionados 850 mL de álcool etílico P.A. 95% (etanol) (VETEC, Valença, RJ, Brasil). Em seguida, o frasco contendo a planta seca e o solvente foi acondicionado ao "shaker" (ShakerOrbit Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Foram feitas quatro trocas de solvente,

em período de 24h ou 48h. O extrato foi filtrado, reunido e concentrado em evaporador rotatório (Fisatom, modelo 450-0, série 1271094). Os extratos etanólicos obtidos foram secos e pesados (*C. sylvestris* = 10,6g, 12.5%; *C. arborea* = 5,0g, 6,2%).

Os extratos foram solubilizados em dimetil sulfóxido- DMSO (Sigma-Aldrich, St.Louis, EUA)), preparados em água destilada para uma concentração final de 1000 µg/mL, esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm (Merck Millipore, Massachusetts, EUA) e estocados a – 20 °C até o momento do uso.

4.3 Cultura de Células e Vírus

Neste estudo foi empregada a cultura de células Vero (células epiteliais aderentes provenientes de rins de primatas da espécie *Cercopithecus aethiops*), escolhida por sua susceptibilidade e permissividade aos vírus, pertencente à coleção de células do Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas (LEDAC).

As células foram mantidas em Meio Mínimo Essencial de Eagle- MEM (Vitrocell, Campinas, Brasil) acrescido de 0,03% de glutamina - 2mM (Sigma-Aldrich), 200 U/mL de penicilina e estreptomicina (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), 2,5 mg/mL de anfotericina B (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), solução de bicarbonato de sódio a 0,25% (Sigma-Aldrich), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico-HEPES (Alamar Tecno Científica, São Paulo, Brasil) 10mM e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), e incubadas a 37 °C.

As estirpes virais foram isoladas a partir do fluido de vesículas orais e genitais com características de herpes oral e genital, respectivamente. A caracterização foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), empregando iniciadores específicos para a identificação de HHV-1 e HHV-2 (Lima, 2016), pelo Laboratório de Vírus Respiratórias, Entéricas e Oculares (LAVIREO), da UFRJ.

4.4 Ensaios de Citotoxicidade

4.4.1 Verificação da Alteração da Morfologia Celular

Em uma placa de 96 poços previamente preparada com células da linhagem Vero, cada extrato teste foi submetido a diluições seriadas na razão dois, utilizando-se MEM como diluente (meio de manutenção celular) e 100 µL/poço foram colocados em contato com a monocamada de células Vero confluentes em placa de 96 poços previamente preparada (em quadruplicata). As culturas foram incubadas a 37 °C durante 48 horas em ambiente contendo 5% de CO₂. Após esse período, foram examinadas ao microscópio óptico invertido e comparadas ao controle de células (na presença apenas do meio de cultura). A maior concentração dos extratos na qual não foi observada alteração morfológica das células foi denominada concentração máxima não tóxica (CMNT) (De Clercq *et al.*, 1980).

4.4.2 Verificação da Viabilidade Celular

Após a leitura da alteração da morfologia, na mesma placa, foi determinada a viabilidade celular através da técnica denominada *dye-uptake* (Borenfreund e Puerner, 1985), com pequenas modificações. A técnica consiste na incorporação do corante vital vermelho neutro (Sigma-Aldrich) pelas células vivas (e seu aprisionamento no interior dos lisossomas) e sua posterior quantificação por leitura em espectrofotômetro. Cem µL/poço de vermelho neutro a 0,01% (em meio de manutenção) foram adicionados e as células incubadas por três horas a 37 °C em ambiente contendo 5% de CO₂. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e a monocamada lavada com 200 µL/poço tampão fosfato-salino (PBS, pH=7,2). Em seguida, 100 µL/poço de formaldeído a 4% em PBS foram adicionados e a placa incubada por cinco minutos a 4 °C, para a fixação das células. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL/poço de uma solução de 1% de ácido acético e 50% de metanol para que houvesse o rompimento das células, liberação e solubilização do corante. A leitura em espectrofotômetro foi realizada em comprimento de onda de 492 nm. A percentagem de células viáveis foi obtida pela média aritmética da densidade óptica (DO) de cada concentração dos extratos, inclusive do controle de células. A média do controle de células foi equivalente a 100% de células viáveis e foi comparada com a média de cada diluição. A partir destes cálculos, foi possível a obtenção da

concentração dos extratos que proporcionou a viabilidade de 50% das células (denominado CC_{50} ou concentração tóxica para 50% das células em cultura).

Para se determinar a maior concentração dos extratos que poderia ser utilizada nos ensaios subsequentes, foi necessária a observação tanto da CMNT como da concentração dos extratos em que pelo menos 80% das células estavam viáveis (CC_{20}).

4.5 Avaliação da Atividade Antiviral

Inicialmente foi feita uma triagem dos extratos quanto à sua atividade antiviral, empregando-se a maior concentração onde não foi observada alteração morfológica das células e onde, pelo menos, 80% de células permaneciam viáveis, pelo método realizado por Brito e colaboradores (1981), com modificações (Brito, Lagrota e Machado, 1981).

Monocamadas confluentes em tubos contendo células Vero foram incubadas com os extratos e aciclovir, na CMNT, na presença de HHV-1 ou HHV-2 (100 $TCID_{50}$ - 100 vezes a dose mínima necessária para produzir efeito citopatogênico [CPE, do inglês *cytopathogenic effect*] em 50% das culturas de células). Além do tubo teste, dois tubos serviram como controle do experimento: um deles, recebendo apenas meio de manutenção (controle de células) e o outro, meio de manutenção e inóculo viral (controle de vírus). Após a incubação por 48h, as células foram rompidas pelo método do congelamento-descongelamento, a fim de liberar as partículas virais no sobrenadante. Os sobrenadantes dos testes e do controle de vírus foram titulados com base no método estatístico estabelecido por Reed e Muench, 1938, (**Figura 7**), método dos totais cumulativos, amplamente utilizado na virologia (Reed e Muench, 1938).

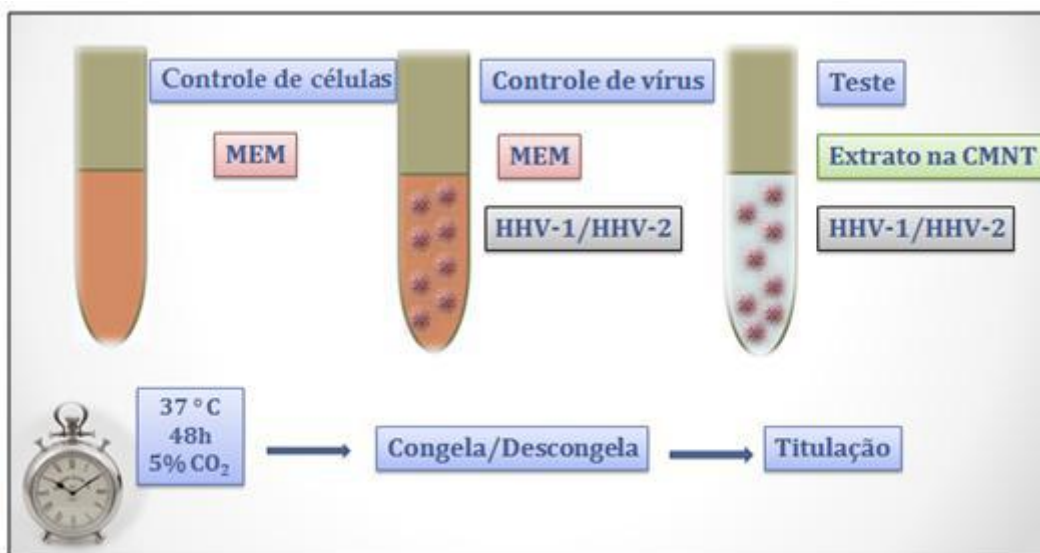


Figura 7: Esquema da Avaliação da Atividade Inibitória dos Extratos. Monocamadas confluentes em tubos contendo células Vero foram incubadas com os extratos, na CMNT, na presença de HHV-1 ou HHV-2. Além do tubo teste, dois tubos serviram como controle do experimento: um deles, recebendo apenas meio de manutenção (controle de células) e o outro, meio de manutenção e inóculo viral (controle de vírus). Após a incubação, as células foram rompidas pelo método do congelamento-descongelamento. Os sobrenadantes dos testes e do controle de vírus foram titulados (Reed e Muench, 1938). *CMNT: concentração máxima não tóxica.

4.5.1 Titulação Viral

Foram feitas diluições logarítmicas decimais (10^{-1} a 10^{-7}) do sobrenadante de cada tubo (teste e controle de vírus), utilizando-se meio de manutenção como diluente. Cada diluição foi inoculada em monocamadas de células Vero confluentes previamente preparadas em placa com 96 poços, após a substituição do meio de crescimento (com soro fetal bovino) pelo meio de manutenção. As células inoculadas foram incubadas a 37 °C por 48 horas em ambiente contendo 5% de CO_2 .

A leitura da titulação foi realizada considerando-se positivos aqueles poços da placa que apresentaram CPE e negativos os que não apresentaram CPE.

Utilizando-se o método estatístico de Reed e Muench, 1938, foi determinado o título viral do controle de vírus e dos testes. A partir desses títulos, foi inferido o índice de inibição viral (IIV).

O IIV foi obtido pela fórmula proposta por Lagrota, 1978:

$$IIV = C - T,$$

onde “C” é o logaritmo do título da suspensão viral na ausência de extrato (controle) e “T”, o logaritmo do título da suspensão viral na presença dos extratos (testes).

O grau de atividade antiviral foi expresso em percentagem de inibição (PI), que foi calculada de acordo com a fórmula proposta por Nishimura, Toku e Fukuyashu, 1977:

$$PI = [1 - (T' / C')] \times 100,$$

onde “T’ ” é o título (TCID₅₀) do teste e “C’ ” o título do controle (Wigg, 1991).

Dessa maneira, a atividade antiviral foi determinada pela redução do título da suspensão viral na presença dos extratos, em relação ao controle (**Figura 8**).

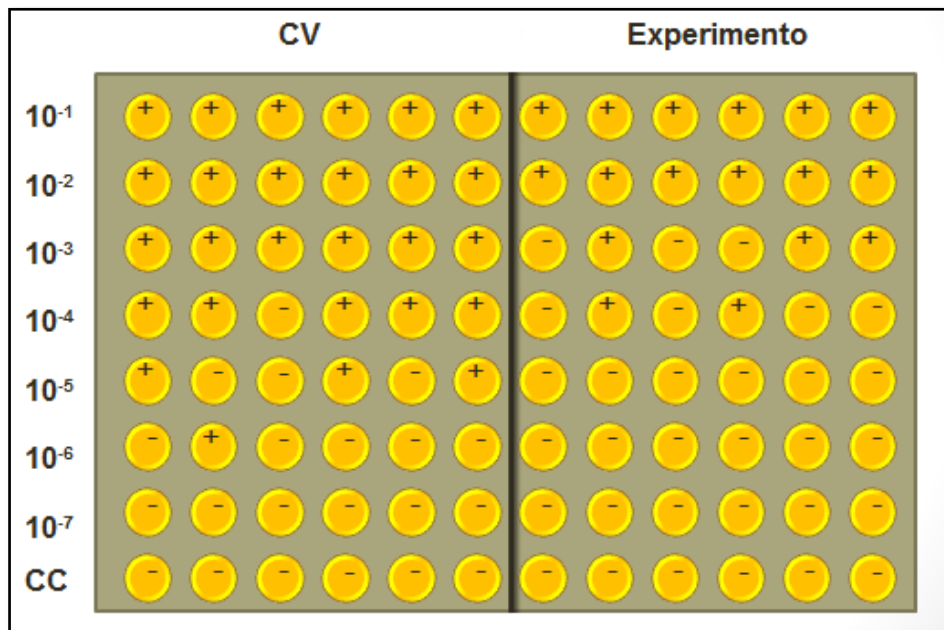


Figura 8: Esquema da Leitura em Microscópio Óptico da Placa. A leitura da titulação foi realizada considerando-se positivos aqueles poços da placa que apresentaram CPE e negativos os que não apresentaram CPE. *CV: controle de vírus; *Experimento: extrato ou aciclovir.

Os experimentos a seguir foram realizados apenas para avaliar a atividade do extrato de *Casearia sylvestris* sobre os herpesvírus humanos 1 e 2.

4.5.2 Determinação da Curva Dose-resposta

Uma vez que o extrato de *C. sylvestris* apresentou excelente atividade, tanto para o HHV-1 quanto para o HHV-2, com mais de 50% de inibição na CMNT, como descrito anteriormente, foram realizadas diluições a partir da CMNT e, novamente, reavaliados segundo a metodologia descrita anteriormente (redução do título viral). Os títulos dos vírus em cada concentração do extrato foram determinados e plotados em um gráfico dose/resposta para determinar a concentração capaz de inibir em 50% a replicação viral (CE_{50}). Com o resultado da CC_{50} e CE_{50} , foi determinado o índice de seletividade ($IS = CC_{50}/CE_{50}$) (Santos, 1997).

4.5.3 Estudo dos Mecanismos de Ação

Estudos foram realizados para determinar em que etapa(s) da biossíntese viral o extrato estava atuando (Wu *et al.*, 2011).

4.5.3.1 Determinação da Inibição Extracelular do Vírus (Efeito Virucida)

Nesta etapa foi utilizado o método empregado por Wigg e colaboradores (1996), com modificações, para verificar se o extrato era capaz de inativar os vírus extracelularmente. Em resumo, a um volume de 900 μ L do extrato na CMNT foram adicionados 100 μ L das suspensões virais (aproximadamente 10^5 TCID₅₀). A mistura foi incubada a 37 °C por duas horas. Como controle de vírus, 100 μ L das suspensões virais foram adicionados a 900 μ L de meio de manutenção. Em seguida, foram determinados os títulos virais dos tubos teste e controle e a atividade antiviral foi calculada, conforme o item 4.5.1. (**Figura 9**).

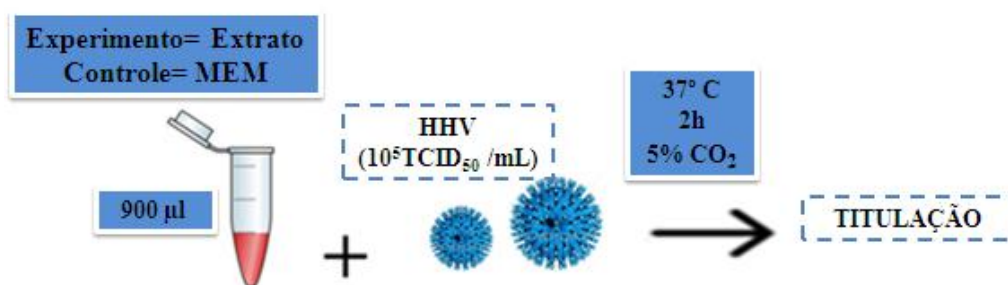


Figura 9: Esquema de Ensaio para Determinação do Efeito Virucida. As suspensões virais (aproximadamente 10^5 TCID₅₀) foram incubadas na presença do extrato na CMNT, por 2 h a 37 °C, e na presença de MEM (controle de vírus). Após incubação, as suspensões virais foram tituladas e os títulos dos testes comparados com os títulos dos controles de vírus.

4.5.3.2 Determinação da Ação dos Extratos sobre os Receptores Celulares

Nesta etapa foi utilizado o método empregado por Santos (1997), com modificações. Células da linhagem Vero foram cultivadas em tubos por 48 horas. Posteriormente, foram tratadas com 1 mL do extrato em sua CMNT ou meio de cultura (controles de vírus e células) e incubadas a 4 °C por uma hora. Após esse período, o sobrenadante das células foi descartado e as monocamadas foram lavadas com 1 mL de meio de manutenção. Foi adicionado 1 mL de meio de manutenção e foram inoculados 100 µL das suspensões virais (100 TCID₅₀) nos tubos testes e nos controles de vírus. Após incubação por 48 horas a 37 °C (5% CO₂), as células foram rompidas pelo método do congelamento-descongelamento liberando partículas virais nos sobrenadantes. Os títulos virais dos sobrenadantes dos tubos testes e controles de vírus foram determinados e a atividade antiviral foi calculada de acordo com o item 4.5.1 (**Figura 10**).

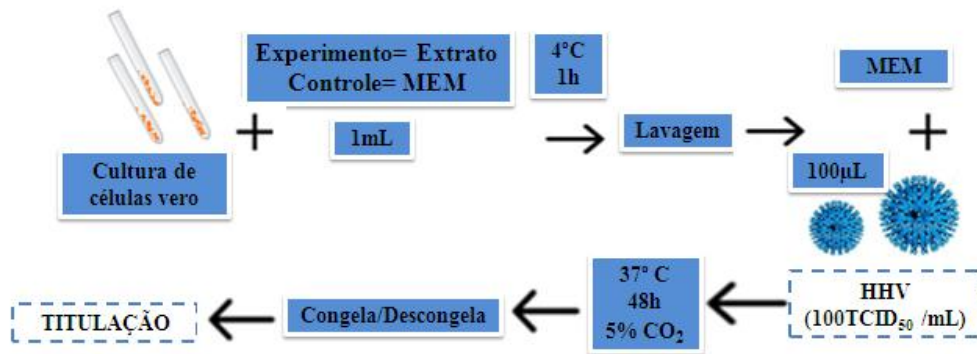


Figura 10: Esquema de Ensaio para Determinação da Ação sobre os Receptores Celulares. Monocamadas de células foram tratadas com o extrato na CMNT e com MEM (controle de vírus), e mantidas por 1 h a 4 °C. Após o tratamento, as monocamadas de células foram lavadas, inoculadas com 100 TCID₅₀ das suspensões virais e incubadas por 48 h a 37 °C, em ambiente com 5% de CO₂. Após a incubação, os sobrenadantes dos experimentos, incluindo os sobrenadantes dos controles (sem a presença do extrato), foram congelados e descongelados, titulados e os títulos dos testes comparados com os títulos dos controles de vírus.

4.5.3.3 Determinação da Ação dos Extratos Durante a Penetração Viral

Nesta etapa foi utilizado o método empregado por Santos, 1997, com modificações. Células da linhagem Vero foram cultivadas em tubos por 48 horas. Posteriormente, 100µL das suspensões virais (100 TCID₅₀) foram adicionados a 900 µL de meio de manutenção aos tubos testes assim como àqueles correspondentes aos controles de vírus. As células foram incubadas durante uma hora a 4 °C, para que houvesse a adsorção dos vírus. Após este período, o sobrenadante das células foi descartado e as monocamadas foram lavadas com 1 mL de meio de manutenção, para a retirada das partículas virais não adsorvidas. A seguir, os tubos testes foram tratados com 1 mL do extrato em sua CMNT ou meio de cultura (controles de vírus e células) e os tubos foram incubados a 37 °C por uma hora (5% CO₂). Terminada a incubação, o sobrenadante foi novamente desprezado, as células lavadas e foi adicionado 1 mL de meio de manutenção, seguindo-se nova incubação a 37 °C por 48 horas (5% CO₂). Após esse período, as células foram rompidas pelo método do congelamento-descongelamento, liberando partículas virais nos sobrenadantes. Os títulos virais dos sobrenadantes dos tubos testes e controle de vírus foram determinados e a atividade antiviral foi calculada de acordo com o item 4.5.1 (**Figura 11**).

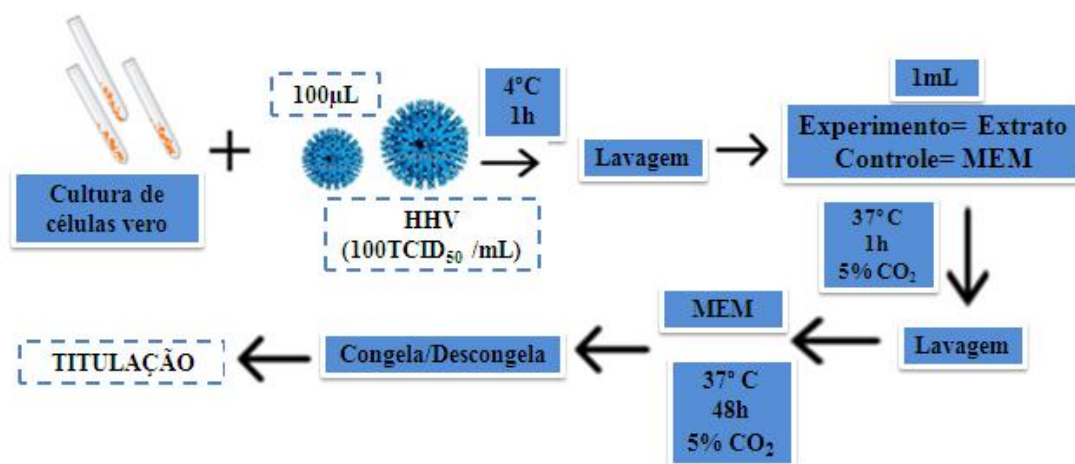


Figura 11: Esquema de Ensaio para Determinação da Ação durante a Penetração Viral. Monocamadas de células foram inoculadas com as suspensões virais (100 TCID₅₀) e mantidas por 1h a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas, adicionadas de meio na presença do extrato na CMNT ou de MEM (controle de vírus) e incubadas por 1 h a 37 °C. Ao término da incubação, as células foram lavadas, adicionadas de MEM e incubadas por 48h a 37 °C. Após incubação, os sobrenadantes dos experimentos, incluindo os sobrenadantes dos controles (sem a presença do extrato), foram congelados e descongelados, titulados e os títulos dos testes comparados com os títulos dos controles de vírus.

4.5.3.4 Determinação da Atividade dos Extratos nos Eventos Pós-Penetração

Nesta etapa foi utilizado o método empregado por Gonçalves (1998), com modificações. Células da linhagem Vero foram cultivadas em tubos por 48 horas. Posteriormente, 100µL das suspensões virais (100 TCID₅₀) foram adicionados a 900 µL de meio de manutenção aos tubos testes assim como àqueles correspondentes aos controles de vírus. As células foram incubadas durante uma hora a 37 °C, para que os vírus penetrassem nas células. Após este período, o sobrenadante das células foi descartado e as monocamadas foram lavadas com 1 mL de meio de manutenção, para a retirada das partículas virais que não penetraram nas células. A seguir, os tubos testes foram tratados com 1 mL do extrato em sua CMNT ou meio de cultura (controles de vírus e células) e foram novamente incubados a 37 °C por mais 17 horas (5% CO₂). Após as 17 horas de incubação, as culturas tiveram seus sobrenadantes desprezados e lavados. Foi adicionado 1 mL de meio de manutenção e os tubos foram incubados a 37 °C (5% CO₂) por mais 30 horas (até que se completassem 48 horas). Após esse período, as células foram rompidas pelo método do congelamento-descongelamento, liberando partículas virais nos sobrenadantes. Os títulos virais dos sobrenadantes dos tubos testes e controles de vírus foram determinados e a atividade antiviral foi calculada de acordo com o item 4.5.1 (**Figura 12**).

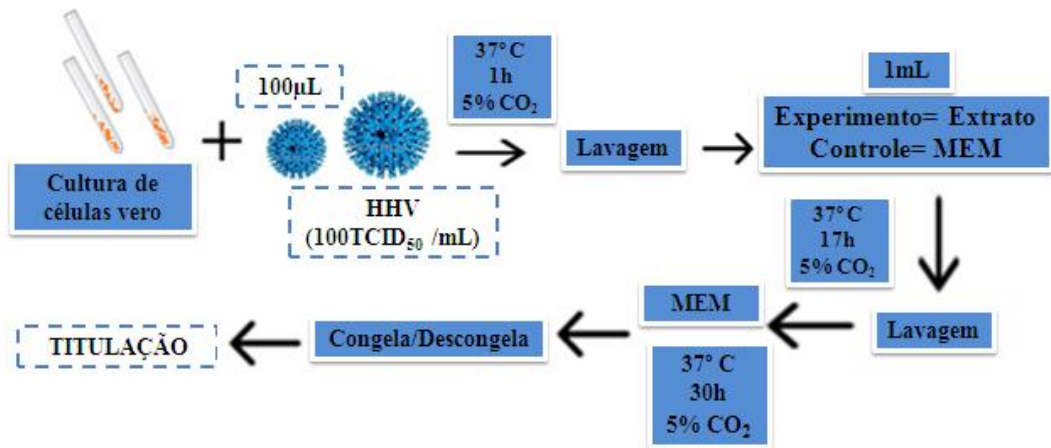


Figura 12: Esquema de Ensaio para Determinação da Ação Pós-penetração. Monocamadas de células foram inoculadas com as suspensões virais (100 TCID₅₀), incubadas por 1 h a 37 °C e lavadas com meio de cultura. Em seguida, as células foram tratadas com o extrato na CMNT, e incubadas por 17 h a 37 °C. Após a incubação, as células foram lavadas, adicionadas de MEM e incubadas por 30 h a 37 °C. Concluídas as 48h, os sobrenadantes dos experimentos, incluindo os sobrenadantes dos controles (sem a presença dos extratos), foram congelados e descongelados, titulados e os títulos dos testes comparados com os títulos dos controles de vírus.

5 RESULTADOS

5.1 Citotoxicidade dos Extratos

Em relação aos extratos, considerando a alteração morfológica das células, associada à concentração em que pelo menos 80% das células permaneciam viáveis, foi possível observar que os extratos foram ligeiramente tóxicos, com essa toxicidade sendo mais evidente para o extrato de *C. sylvestris* (Tabela 2).

Como já era esperado, o aciclovir não apresentou toxicidade para as células Vero na maior concentração empregada.

Tabela 2: Citotoxicidade dos Extratos

Extrato Bruto Etanólico	CC₅₀ (µg/mL)	CMNT* (µg/mL)	Concentração Empregada (µg/mL)
<i>Casearia sylvestris</i>	21,57	7,8	7,80
<i>Casearia arborea</i>	144,08	31,20	31,20
Aciclovir	> 200	≥200	200

CC₅₀ = concentração citotóxica para 50% das células em cultura; CMNT = concentração máxima não tóxica; HHV-1 = herpesvírus humano 1; HHV-2= herpesvírus humano 2; ; Aciclovir = composto padrão. *Na CMNT, mais de 80% das células permaneceram viáveis.

5.2 Avaliação da Atividade Antiviral

5.2.1 Triagem

Para a avaliação da atividade antiviral, foram empregadas concentrações em que as células não apresentavam alteração morfológica e na qual, pelo menos, 80% das células permaneciam viáveis.

Em relação aos extratos, podemos observar que ambos apresentaram excelente atividade para o herpesvírus humano 2, com 99,9% de inibição para a *C. sylvestris* e 94,4% para a *C. arborea*. Quanto ao herpesvírus humano 1, somente a *C. sylvestris* apresentou inibição significativa (82,6%) (**Tabela 3**).

Quando comparada ao aciclovir, antiviral de escolha para o tratamento das infecções por esses vírus, observamos que *C. sylvestris* apresentou melhor atividade para o HHV-2.

Tabela 3: Atividade Antiviral dos Extratos

Extrato Bruto Etanólico	Concentração Empregada (µg/mL)	HHV-1 PI	HHV-2 PI
<i>Casearia sylvestris</i>	7,80	82,6	99,9
<i>Casearia arborea</i>	31,20	48,7	94,4
Aciclovir	200	99,0	99,0

HHV-1 = herpesvírus humano 1; HHV-2= herpesvírus humano 2; PI = Percentagem de Inibição; Aciclovir = composto padrão.

5.2.2 Curva Dose-resposta

O extrato de *C. sylvestris* foi diluído, a partir de sua CMNT, e avaliado em concentrações menores para determinar a redução do título viral. Com os valores obtidos foi possível calcular o CE₅₀ (concentração que inibe em 50% a replicação viral), que foi de 6,26 para o HHV-1 e 5,85 para o HHV-2. O IS (índice de seletividade) para o HHV-1 foi de 3,4 e de 3,68 para o HHV-2 (**Tabela 4**).

Tabela 4: Curva Dose-Resposta

Extrato Bruto Etanólico	CC ₅₀ (µg/mL)	CE ₅₀ (µg/mL)		IS	
		HHV-1	HHV-2	HHV-1	HHV-2
<i>Casearia sylvestris</i>	21,57	6,26	5,85	3,4	3,68
Aciclovir	> 200	0,8	1,38	>250	>145

CC₅₀ = concentração citotóxica para 50% das células em cultura; HHV-1 = herpesvírus humano 1; HHV-2= herpesvírus humano 2; CE₅₀ = Concentração que inibe em 50% a replicação viral; IS = Índice de seletividade; Aciclovir = composto padrão.

5.2.3 Ação do Extrato de *C. sylvestris* em Diferentes Etapas da Biossíntese Viral

5.2.3.1. Determinação da Inibição Extracelular do Vírus (efeito virucida)

Neste teste foi demonstrada a ação direta do extrato *C. sylvestris* sobre as partículas virais livres. Os resultados foram surpreendentes apresentando uma porcentagem de inibição de 99,7% para o HHV-1 e 91,3% para o HHV-2 (Tabela 5).

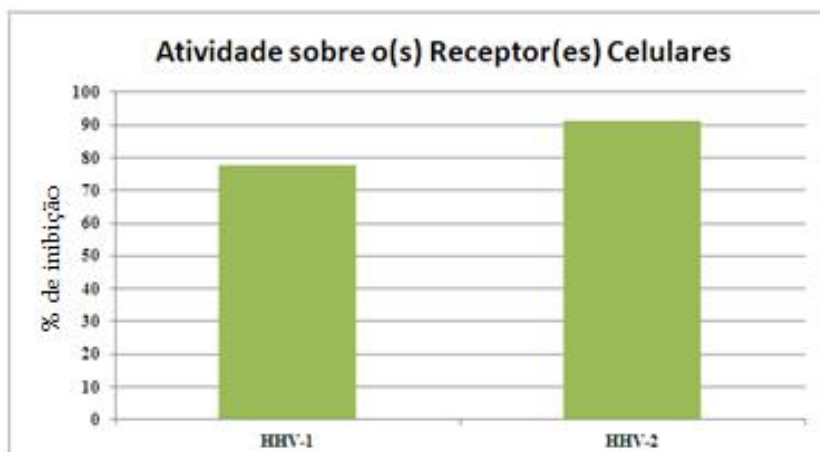
Tabela 5: Atividade Virucida do extrato *C. sylvestris*

HHV-1: herpesvírus humano 1 ; HHV-2: herpesvírus humano 2

5.2.3.2. Determinação da Ação sobre os Receptores Celulares

A atuação deste extrato sobre os receptores celulares foi maior para o HHV-2 apresentando uma porcentagem de inibição de 97,9%, enquanto que para o HHV-1 apresentou uma porcentagem de inibição de 77,6% (Tabela 6).

Tabela 6: Atividade do extrato *C. sylvestris* sobre os receptores celulares



5.2.3.3. Determinação da Ação Durante a Penetração Viral

A ação sobre a penetração do vírus também apresentou bons resultados, o extrato foi capaz de inibir a replicação do HHV-1 em 75,4% e do HHV-2 em 74,3 (Tabela 7).

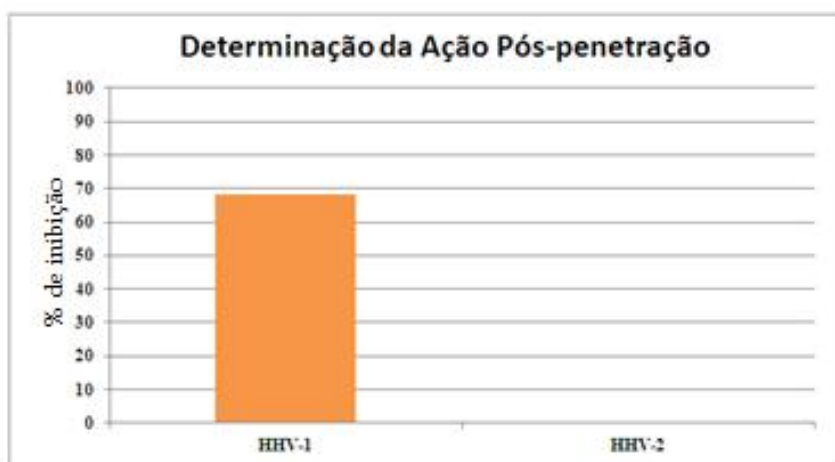
Tabela 7: Atividade do extrato *C. sylvestris* durante a penetração viral



5.2.3.4. Determinação da Atividade nos Eventos Pós-Penetração

A porcentagem de inibição após a penetração foi de 68,4% para o HHV-1, enquanto que para o HHV-2 não foi observada atividade inibitória (**Tabela 8**).

Tabela 8: Atividade do extrato *C. sylvestris* após a penetração viral



Todos os dados obtidos foram computados em uma tabela para comparação do resultado dos ensaios de atividades de ação e posterior discussão (**Tabela 9**).

Tabela 9: Ação do Extrato de *C. sylvestris* em Diferentes Etapas da Biossíntese Viral

Extrato Bruto Etanólico	% Inibição Virucida	% Inibição Receptor	% Inibição Penetração	% Inibição Pós-penetração
HHV-1	99,7	77,6	75,4	68,4
HHV-2	91,3	97,9	74,3	S/A

HHV-1 = herpesvírus humano 1; HHV-2= herpesvírus humano 2; S/A = sem atividade

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, têm crescido os esforços na busca para avaliar a atividade antiviral de uma vasta gama de produtos naturais, incluindo plantas, para isolar e caracterizar novos compostos que possam inibir a replicação de vírus e / ou tratar a infecções virais ou mesmo servir como modelos para novas moléculas (Hudson, 1990, Che, 1991, Vlietinck e Vanden Berghe, 1991, Chu e Cutler, 1992, Cardellina II *et al.*, 1993, Senior, 1996, Simões *et al.*, 1999).

Neste estudo foi avaliada a atividade inibitória de extratos etanólicos de folhas das plantas *Casearia arborea* e *Casearia sylvestris*.

Antes da realização dos experimentos, é necessário escolher um sistema hospedeiro que seja susceptível e permissível ao vírus a ser utilizado. O sistema hospedeiro mais empregado para estudo de substâncias antivirais é a cultura de células, por serem economicamente viáveis e por permitirem a triagem de um grande número de substâncias (Sidwell *et al.*, 1969; Brito, Lagrota e Machado, 1981; Hu e Hsiung, 1989). Neste trabalho foram utilizadas culturas de células Vero.

Os extratos etanólicos de *C. arborea* e *C. sylvestris* foram avaliados quanto à toxicidade para as células Vero. Inicialmente foi determinada a concentração máxima não tóxica (CMNT), em que não eram observadas alterações morfológicas das células. Essa etapa é crucial, pois a avaliação dos testes antivirais empregados nesse estudo baseia-se na leitura do efeito citopático (alteração na morfologia da célula), sendo assim, se os extratos forem usados em concentrações erradas pode acarretar em resultados falsos devido ao efeito lesivo sobre as células (Hu e Hsiung, 1989). Além de não apresentar alteração na morfologia das células, é necessário associar essa concentração àquela em que pelo menos 80% das células estejam viáveis.

Os extratos etanólicos de *C. arborea* e *C. sylvestris* apresentaram alguma toxicidade, sendo empregadas nos testes antivirais as concentrações de 31,2 µg/mL e 7,8 µg/mL, respectivamente. Simões e colaboradores (1999) avaliaram a toxicidade do extrato hidrometanólico de *C. sylvestris* para células Vero, através da alteração da morfologia e viabilidade, empregando o método de exclusão do azul de tripan, e observaram que a

CMNT e a CC_{50} foram de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e 2000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A CC_{50} do extrato etanólico de *C. sylvestris* empregada em nosso estudo foi de 21,57 $\mu\text{g/mL}$. Essa diferença pode estar associada ao método de preparo dos extratos, já que o extrato obtido neste estudo é etanólico e por Simões é hidrometanólico, ao local e época da coleta do material, as plantas utilizadas neste trabalho foram colhidas em julho no Rio de Janeiro e a de Simões foi obtido no inverno no sul do país.

No que diz respeito à atividade antiviral, o extrato de *C. arborea* mostrou excelente efeito inibitório para o HHV-2 (94,4%), sendo este o primeiro relato da atividade antiviral dessa planta. O extrato de *C. sylvestris*, além de inibir a replicação do HHV-1 e do HHV-2, mostrou uma inibição para o HHV-2 superior àquela observada para o aciclovir, em concentrações mais baixas. Simões e colaboradores, em 1999, mostraram que o extrato hidrometanólico foi capaz de inibir a replicação do HHV-1 e do HHV-2, com CE_{50} e IS de 500 $\mu\text{g/mL}$ e 4, respectivamente, para ambos os vírus (Simões *et al.*, 1999). O índice de seletividade foi semelhante ao encontrado em nosso trabalho.

Estudos fitoquímicos do gênero *Casearia*, revelam que o extrato hidroalcoólico contém, além dos constituintes químicos, vários diterpenos, triterpenos, ácido hexanóico e capróico (Campos *et al.*, 2015), cumarinas, flavonóides e lignanas. Foi descrito que os diterpenos clerodânicos (casearinas), apresentam atividade antitumoral e citotóxica (Capobiango, Vestena e Bittencourt, 2009; Werle *et al.*, 2009; Bou *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2015) e que as propriedades farmacológicas das plantas desse gênero são atribuídas principalmente a estes diterpenos encontrados nas folhas, com atividades cicatrizantes, anti-ofídicas, antibacterianas, antifúngicas, antiprotozoárias, antiinflamatória e antiulceras (Mosaddik *et al.*, 2004, Esteves *et al.*, 2005, Mesquita *et al.*, 2007, Cavalcante *et al.*, 2007, Araújo *et al.*, 2015).

Considerando a caracterização química das plantas do gênero *Casearia*, vários desses componentes têm sido associados a atividades anti-herpéticas. Em nossos experimentos, não foi possível determinar o(s) princípio(s) ativo, mas levando em conta a composição química presente nas plantas desse gênero, podemos associar essa inibição a diversos componentes, dando destaque aos diterpenos e aos flavonóides.

Os diterpenos, naturais ou sintéticos, têm sido associados a essa atividade (Dargan e Subak-Sharpe, 1986; Mucsi *et al.*, 2001; Barbosa *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2007; Bueno, Alché e Barquero, 2010; Aromdee *et al.*, 2011; Pei *et al.*, 2011; Seubsasana *et al.*, 2011; Resende, 2012).

No que diz respeito aos flavonóides, vários trabalhos têm mostrado o efeito desses metabólitos na inibição da replicação dos herpesvírus humanos 1 e 2 (Hayashi, Hayashi e Morita, 1992; Lin *et al.*, 1999; Gonçalves *et al.*, 2001; Huleihel e Isanu, 2002; Isaacs *et al.*, 2008; Schnitzler *et al.*, 2010; Gescher *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Sritularak *et al.*, 2013; Argenta *et al.*, 2015; Boff *et al.*, 2016; Ürményi *et al.*, 2016).

O extrato *C. sylvestris* apresentou melhores resultados para os dois vírus, HHV-1 e HHV-2, e por isso foi utilizado para a realização dos ensaios de avaliação do mecanismo de ação. É de grande interesse continuar os experimentos com o extrato *C. arborea*, além de identificar o princípio ativos dos dois extratos.

Ao avaliar em que etapa da biossíntese viral o extrato de *C. sylvestris* atuava, observamos que este apresentou melhor atividade nas etapas iniciais da infecção. O efeito mais notável para os dois vírus foi diretamente sobre as partículas virais (virucida), com inibição de 99,7% para o HHV-1 e de 91,3% para o HHV-2. Schnitzler e colaboradores (2010) observaram que o extrato etanólico de própolis foi capaz de reduzir significativamente a infecciosidade da partícula de HHV-1, após uma hora de tratamento. Entre os componentes isolados, os flavonóides apresentaram as melhores atividades. (Schnitzler *et al.*, 2010). Resende (2012) mostrou que o ácido rosmarínico apresentou atividade virucida, tanto para HHV-1 quanto para o HHV-2, com acima de 97% de inibição após uma hora de tratamento (Resende, 2012).

Em relação ao HHV-2, foi observada uma excelente ação sobre o(s) receptor (es) celular, com inibição de 97,9%. Gonçalves e colaboradores (2001) mostraram que uma fração do extrato de *Vitex polygama*, rica em flavonoides, foi capaz de inibir a propagação de uma estirpe de HHV-1, resistente ao aciclovir, por bloquear os receptores celulares para o vírus, empregando cultura de células HEp-2 (Gonçalves e colaboradores, 2001). Huleihel e Isanu (2002) mostraram que o extrato aquoso de própolis também era capaz de inibir a adsorção do HHV-1 quando células Vero eram pré-tratadas com o extrato. (Huleihel e Isanu, 2002).

Essa atividade observada em nosso trabalho pode estar relacionada à presença de flavonoides no extrato de *C. sylvestris*, capazes de bloquear a adsorção das partículas virais.

Ainda relacionando a atividade do extrato de *C. sylvestris* com as etapas iniciais da infecção, foi observado um efeito inibitório na etapa de penetração, tanto para o HHV-1 quanto para o HHV-2. Essa atividade pode estar relacionada à presença de flavonoides ou terpenos no extrato, uma vez que já foi demonstrada a atividade inibitória desses metabólitos na etapa de penetração do HHV-1 (Gescher *et al.*, 2011; Pei *et al.*, 2011).

Finalizando as etapas da biossíntese avaliadas, observamos que o extrato de *C. sylvestris* apresentou atividade inibitória somente para o HHV-1, quando adicionado após a penetração viral. A atividade pós-penetração já foi observada tanto para os terpenos (Dargan e Subak-Sharpe, 1986; Bueno, Alché e Barquero, 2010) quanto para os flavonoides (Hayashi, Hayashi e Morita, 1992; Boff *et al.*, 2016).

Apesar de associarmos a atividade anti-HHV aos terpenos e flavonoides, o trabalho foi realizado com um extrato etanólico, onde outros metabólitos podem ter participado dessa atividade.

Os resultados apresentados neste estudo mostram pela primeira vez a atividade anti-HHV de *C. arborea* e os possíveis mecanismos de ação de *C. sylvestris*.

O fato de *C. sylvestris* ter apresentado atividade inibitória, principalmente, nas etapas iniciais da infecção, fortalece o seu emprego em combinação com o aciclovir, conhecidamente inibindo a etapa pós-penetração.

6 CONCLUSÃO

- Os extratos estudados apresentaram ligeira toxicidade para a cultura de células Vero;
- O extrato de *C. arborea* apresentou excelente atividade para o HHV-2, com 94,4% de inibição, sendo o primeiro relato de atividade antiviral;
- O extrato de *C. sylvestris* foi capaz de inibir tanto o HHV-1 quanto o HHV-2, com inibição de 82,6 e 99,9, respectivamente.
- O extrato de *C. sylvestris* mostrou uma inibição para o HHV-2 superior àquela observada para o aciclovir,
- O extrato de *C. sylvestris* foi mais ativo quando exposto diretamente às partículas virais;
- O extrato de *C. sylvestris* foi capaz de atuar nos receptores celulares e no processo de penetração das partículas virais.
- O extrato de *C. sylvestris* apresentou atividade inibitória para o HHV-1 nos eventos pós-penetração.
- Os extratos estudados mostraram potencial ação antiviral sendo uma fonte promissora para futuros fármacos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albano, M. N.; Silveira, M. R.; Danielski, L. G. D.; Florentino, D.; Petronilho, F.; Piovezan, A. P. (2013). Anti-inflammatory and antioxidant properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 147, 612–617.
- Alves, T. (2000). Biological screening of brazilian medicinal plants. *Mem Inst Osw Cruz* 95: 363-373.
- Araújo, E. J. F.; Araújo, D. Y. M. L.; Freitas, R. M. ; Ferreira, P. M. F. (2014). Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* ,35(3), 355-361.
- Araújo É. J.; Oliveira, G. A.; Sousa, L. Q.; Bolzani, V. S.; Cavalheiro, A. J.; Tome, A. R.; Peron, A. P.; Santos, A. G.; Citó. A. M.; Pessoa, C.; Freitas, R. M.; Ferreira, P. M.(2015). Counteracting effects on free radicals and histological alterations induced by a fraction with casearins. *Acad Bras Cienc*, 87(3):1791-807.
- Argenta, D.F.; Silva, I.T.; Bassani, V.L.; Koester, L.S.; Teixeira, H.F. e Simões, C.M. (2015). Antiherpes evaluation of soybean isoflavonoids. *Arch Virol*. 160(9):2335-2342.
- Aromdee, C.; Suebsasana, S.; Ekalaksananan, T.; Pientong, C. e Thongchai, S. (2011). Stage of action of naturally occurring andrographolides and their semisynthetic analogues against herpes simplex virus type 1 in vitro. *Planta Med*. 77(9):915-921.
- Astani, A.; Navid, M. H. ; Schnitzler, P. (2014). Attachment and penetration of acyclovir-resistant herpes simplex virus are inhibited by *Melissa officinalis* extract. *Phytother Res*. 28(10):1547-1552.
- Barbosa, J. P.; Pereira, R. C.; Abrantes, J. L.; Cirne dos Santos, C. C.; Rebello, M. A.; Frugulhetti, I. C.; Teixeira, V. L. (2004). In vitro antiviral diterpenes from the Brazilian brown alga *Dictyota pfaflfii*. *Planta Med*. 70(9):856-60.
- Basile, A.C.; Sertiè, J.A.A.; Pannizza, S.; Oshiro, T.T.; Azzolini, C.A. (1990). Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. *J Ethnopharmacol*, 30(2),185-97.
- Beutler J. A.; McCall K. L.; Herbert K.; Herald D. L.; Pettit G. R.; Johnson T.; Shoemaker R. H.; Boyd M. R. (2000). Novel Cytotoxic Diterpenes from *Casearia arborea*. *J. Nat. Prod*. 63, 657-661.
- Boff, L.; Silva, I.T.; Argenta, D.F.; Farias, L.M.; Alvarenga, L.F.; Pádua, R.M.; Braga, F.C.; Leite, J.P.; Kratz, J.M. e Simões, C.M. (2016). *Strychnos pseudoquina* A. St. Hil.: a Brazilian medicinal plant with promising in vitro antiherpes activity. *J Appl Microbiol*. 121(6):1519-1529.
- Borenfreund, E. e Puerner, J. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*, 24(2-3), 119–124.
- Bou, D. D.; Tempone, A.G.; Pinto, E.G.; Lago, J.H.G.L.; Sartorelli, P. (2014) Antiparasitic activity and effect of casearins isolated from *Casearia sylvestris* on *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* plasma membrane. *Phytomedicine*, 21, 676–681.
- Brito, M.A.V.P.; Lagrota, M.H.C. e Machado, R.D. (1981). Emprego de microtécnica na triagem de substâncias antivirais. *Revista de Microbiologia*, v.12, n.3, p.65-69.
- Brooks, G. F.; Carroll, K.C.; Butel, J.S.; Morse, S.A. e Mietzner, T.A. (2014). *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg*. 26 ed. (Porto Alegre: McGraw-Hill), p 872. (Lange).
- Bueno, C.A.; Alché, L.E. e Barquero, A.A. (2010). 1-Cinnamoyl-3,11-dihydroxymeliacarpin delays glycoprotein transport restraining virus multiplication without cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 393(1):32-37.

- Calistri, A.; Sette, P.; Salata, C.; Cancellotti, E.; Forghieri, C.; Comin, A.; Gottlinger, H.; Campadelli-Fiume, G.; Palú, G. e Parolini, C. (2007). Intracellular trafficking and maturation of herpes simplex virus type 1 gb and virus egress require functional biogenesis of multivesicular bodies. *J. Virol.*, 81(20), 11468-11478.
- Camargo, F.G.; Gomes, E.; Pannunzio e Bueno, V.S. (1993). Uso tópico do extrato fluido de folha de guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz) topicamente em lesões de estomatite herpética. *Brag Pta 1*: 121-127.
- Campos, E.P.; Trombini, L.N.; Rodrigues, R.; Portella, D.L.; Werner, A.C.; Ferraz, M.C.; Oliveira, R.V.; Cogo, J.C.; Oshima-franco, Y.; Aranha, N. e Gerenutti, M. (2015) Healing activity of *Casearia sylvestris* Sw. in second-degree scald burns in rodents. *BMC Res Notes*, 8, 269.
- Capobianco, R. A.; Vestena, S.; Bittencourt, A. H. C. (2009). Alelopatia de *Joanesia princeps* Vell. e *Casearia sylvestris* Sw. sobre espécies cultivadas. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(4), 924-930.
- Cardellina II, J. H., Munro, M. H. G., Fuller, R. W., Manfredi, K. P., McKee, T c., Tischler, M., Bokeesch, H. R., Gustafson, K. R., Beutler, J. A., Boyd, M. R. (1993). A chemical screening strategy for the dereplication and prioritization of HIV-inhibitory aqueous natural product extracts. *Nat. Prod.* 56: 1123-1129.
- Carvalho, P. E. R. (2007). Cafezeiro-do-Mato: *Casearia sylvestris*. Colombo: EMBRAPA-CNPF, (Circular Técnica nº 138).
- Cavalcante W. L. G.; Camposa, T. O.; Pai-Silva M. D.; Pereira, O. S.; Oliveira, C. Z.; Soares A. M. e Gallacci, M. (2007). Neutralization of snake venom phospholipase A2 toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. *J Ethnopharmacol* 112: 490-497
- Che, C. T. (1991). Marine products as a source of antiviral drug leads. *Drug Dev. Res.* 23: 201-218.
- Chen, S.D.; Gao, H.; Zhu, Q.C.; Wang, Y.Q.; Li, T.; Mu, Z.Q.; Wu, H.L.; Peng, T. e Yao, X.S. (2012). Houttuynoids A-E, anti-herpes simplex virus active flavonoids with novel skeletons from *Houttuynia cordata*. *Org Lett.* 14(7):1772-1775.
- Christophers, J.; Clayton, J.; Craske, J.; Ward, R.; Collins, P.; Trowbridge, M.; Darby, G. (1998). Survey of resistance of herpes simplex virus to acyclovir in northwest England. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 868–872.
- Chu, C. K.. e Cutler, H. G. (1992). Natural products as antiviral agents. Plenum Press, New York.
- Clemens, S. A. C. e Farhat, C. K. (2010). Seroprevalence of herpes simplex 1-2 antibodies in Brazil. *Rev Saúde Pública*, 44(4), 726-34.
- Connolly, S. A.; Jackson, J.O.; Jardetzky, T. e Longnecker, R. (2011). Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat Rev Microbiol.*, 9(5), 369–381.
- Consolaro, A. e Consolaro, M. F. M. (2009). Diagnóstico e tratamento do herpes simples recorrente peribucal e intrabucal na prática ortodôntica. *Rev. Dent. Press Ortodon. Ortop. Facial* vol.14 no.3.
- Cunningham, A.; Griffiths, P.; Leone, P.; Mindel, A.; Patel, R.; Stanberry, L. e Whitley, R. (2012). Current management and recommendations for access to antiviral therapy of herpes labialis. *J. Clin. Virol.* 53, 6–11.
- Danve-Szatanek, C., Aymard, M., Thouvenot, D., Morfin, F., Agius, G., Bertin, I., Billaudel, S., Chanzy, B., Coste-Burel, M., Finkielsztejn, L., Fleury, H., Hadou, T., Henquell, C., Lafeuille, H., Lafon, M.E., Le Faou, A., Legrand, M.C., Maille, L., Mengelle, C., Morand, P., Morinet, F., Nicand, E., Omar, S., Picard, B., Pozzetto, B., Puel, J., Raoult, D., Scieux, C., Segondy, M., Seigneurin, J.M., Teyssou, R., Zandotti, C. (2004). Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up. *J. Clin. Microbiol.* 42, 242–249.
- Dargan, D.J.; Galt, C.B. e Subak-Sharpe, J.H. (1992). The effect of ciclohexolone sodium on the replication in cultured cells of adenovirus type 5, reovirus type 3, poliovirus type 1, two bunyaviruses and Semliki Forest virus. *J Gen Virol.* 73 (Pt 2):407-411.

- De Clercq, E., Descamps, J.; Verhest, G., Walker, R.T., Jones, A.S., Torrence, P.F. e Shugar, D. (1980). Comparative efficacy of antiherpes drugs against different strains of herpes simplex virus. *J. Infect. Dis.*, 141(5), 563-574.
- Esteves, I.; Souza, I. R.; Rodrigues, M.; Cardoso, L. G.; Santos, L. S.; Sertie, J. A.; Perazzo, F. F.; Lima, L. M.; Schneedorf, J. M.; Bastos, J. K. e Carvalho, J. C. (2005). Gastric anti-ulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. *J Ethnopharmacol* 101: 191-196.
- FCM-UNICAMP. Site Didático de Anatomia Patológica, Neuropatologia e Neuroimagem . Disponível em <<http://anatpat.unicamp.br/bineuviroses.html>> . Acessado em: 04/11/2016.
- Felipe K. B. ; Kwiecinski M. R.; Silva F. O. ; Bücker N. F. ; Farias M. S.; Castro L. S. E. P. W. ; Grinevicius V. M. A. S.; Motta N. S.; Correia J. F. G. ; Rossi M. H., Pedrosa R. C.. (2014). Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. Volume 155, Issue 3, 1492–1499.
- Ferreira PMP, Santos AG, Tininis AG, Costa PM, Cavalheiro AJ, Bolzani VS, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Montenegro RC, Pessoa C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. *Chem Biol Interact*. 2010;188(3):497-504.
- Ferreira, P.M.P.; Costa-Lotufo, L.V.; Moraes, M.O.; Barros, F.W.A., Martins, A.M.A.; Cavalheiro, A.J.; Bolzani, V.S.; Santos, A.G.; Pessoa, C. (2011). Folkuses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 83(4), 1373–1384.
- Frobert E.; Burrel S.; Ducastelle-Lepretre S.; Billaud G.; Ader F.; Casalegno J.; Nave V.; Boutolleau D.; Michallet M.; Lina B. e Morfin F. (2014). Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: An update from a ten-year survey in France. *Antiviral Research*, 111, 36–41.
- Gescher, K.; Kühn, J.; Lorentzen, E.; Hafezi, W.; Derksen, A.; Deters, A. e Hensel, A. (2011). Proanthocyanidin-enriched extract from *Myrothamnus flabellifolia* Welw. exerts antiviral activity against herpes simplex virus type 1 by inhibition of viral adsorption and penetration. *J Ethnopharmacol*. 134(2):468-474
- Gonçalves, J.L.S. (1998). Efeito de flavonoides na propagação do vírus herpes simplex tipo 1 e vírus da diarreia viral bovina em células HEp-2. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia)- Instituto de Microbiologia Paulo Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Gonçalves, J.L.; Leitão, S.G.; Monache, F.D.; Miranda, M.M.; Santos, M.G.; Romanos, M.T. e Wigg, M.D. (2001). In vitro antiviral effect of flavonoid-rich extracts of *Vitex polygama* (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. *Phytomedicine*, 8(6):477-480
- Gorbach, S.L.; Bartlett, J.G.; Blacklow, N.R. (1998). *Infectious Diseases*, 2ª ED. Philadelphia: Saunders.
- Hadigal, S. e Shukla, D. (2013). Exploiting herpes simplex virus entry for novel therapeutics. *Viruses*, 5(6),1447-1465.
- Hassan S. T. ; Masarčíková R. ; Berchová K. (2015). Bioactive natural products with anti-herpes simplex virus properties. *J Pharm Pharmacol*. 67(10), 1325-36.
- Hayashi, K.; Hayashi, T. e Morita, N. (1992). Mechanism of action of the antiherpesvirus biflavone ginkgetin. *Antimicrob Agents Chemother*. 36(9):1890-1893.
- Hu, J. M. e Hsiung, G. D. (1989). Evaluation of new antiviral agentes: in vitro perspectives. *Antivir. Res*. 11:217-232.
- Hudson, J. B. (1990). *Antiviral compounds from plants*. CRC Press, Boca Raton, Florida
- Huleihel, M. e Isanu, V. (2002). Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. *Isr Med Assoc J*. 4(11 Suppl):923-927.

ICTV, *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/index.asp>. Acessado: 30/11/2016

Instituto brasileiro de Florestas. *Casearia sylvestris* – Semente. Disponível em <<http://ibflorestas.org.br/loja/sementes/semente-cambroe.html>>. Acessado em 26/11/2016.

Isaacs, C. E.; Wen, G. Y.; Xu, W.; Jia, J. H.; Rohan, L.; Corbo, C.; Di Maggio, V.; Jenkins, E. C. Jr. e Hillier, S. (2008). Epigallocatechin gallate inactivates clinical isolates of herpes simplex virus. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(3):962-970

Johnson, D.C. e Baines, J.D. (2011). Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat. Rev. Microbiol.*, 9(5), 382-394.

Kukhanova, M. K.; Korovina, A. N.; Kochetkov, S. N. (2014). Human Herpes Simplex Virus: Life Cycle and Development of Inhibitors. *Biochemistry (Mosc)*, 79(13), 1635-1652.

Lauzurica, E. (2016). Erupción variceliforme de Kaposi, también Eczema Herpético, palabras mayores. *Cuaderno en piel*. Disponível em <<https://lauzuricaderma.com/2016/04/07/erupcion-variceliforme-de-kaposi-tambien-eczema-herpetico-palabras-mayores/>> . Acessado em: 04/11/2016 .

Lagrotta, M.H.C. (1978). Atividade antiviral in vitro de substâncias sintéticas e naturais. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia)- Instituto de Microbiologia Paulo Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Latief, M.A.; Chikama, T.; Ko, J.A.; Kiuchi, Y.; Sakaguchi, T.; Obana, A. (2015). Inactivation of acyclovir-sensitive and -resistant strains of herpes simplex virus type 1 in vitro by photodynamic antimicrobial chemotherapy. *Mol Vis*; 21: 532-537.

Lehman, I. R. e Boehmer, P. E. (1999). Replication of Herpes Simplex Virus DNA. *J. Biol. Chem.* 40, 28059-28062.

Leuzinger, H.; Ziegler, U.; Schraner, E.M.; Fraefel, C.; Glauser, D.L.; Heid, I.; Ackermann, M.; Mueller, M. e Wild, P. (2005). Herpes simplex virus 1 envelopment follows two diverse pathways. *J. Virol.*, 79(20), 13047–13059.

Lima, D. P. Isolamento, identificação e caracterização da susceptibilidade de estirpes de herpesvírus humano pertencentes às espécies 1 e 2. (2016). Monografia (Graduação em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) - Instituto de Microbiologia Paulo Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Lin, Y.M.; Flavin, M.T.; Schure, R.; Chen, F.C.; Sidwell, R.; Barnard, D.L.; Huffman, J.H. e Kern, E.R. (1999). Antiviral activities of biflavonoids. *Planta Med.* 65(2):120-125.

Luna, J. S.; Santos, A. F.; Lima, M. R. F.; Omena, M. C.; Mendonça, F. A. C.; Bieber, L. W. e Santa'ana, A. E. G. (2005). A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from Northeast Brazil. *J Ethnopharmacol* 97: 199-206.

Lyu, S. Y.; Rhim, J. Y.; Park, W. B. (2005). Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1(HSV-1) and type 2(HSV-2) in vitro. *Archives of Pharmacal research*, 28(11): 1293-1301.

Marquete, R. e Vaz, A.M.S.F. (2007). O gênero casearia no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguésia* 58 (4), 705-738.

Masel J., Deiss R. G., Wang X., Sanchez J. L., Ganesan A., Macalino G. E., Gaydos J. C., Kortepeter M. G., Agan B. K. (2015). Seroprevalence and Seroincidence of Herpes Simplex Virus (2006–2010), Syphilis (2006–2010) and Vaccine-Preventable Human Papilloma Virus Subtypes (2000–2010) Among United States Military Personnel. *Sex Transm Dis.*, 42(5), 253–258.

May, J.; Chan, C H.; King, A.; Willians, L.; French, G.L. (2000). Time-Kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J Antim Chemorther*, 45, 639-643.

Mesquita, M. L.; Grellier, P.; Mambu. L.; De Paula, J. E. e Espíndola, L. S. (2007). In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. *J Ethnopharmacol* 110: 165-170.

- Mettenleiter, T.C.; Minson, T. e Wild, P. (2006). Egress of Alphaherpesviruses. *J. Virol.*, 80(3), 1610–1612.
- Mosaddik, M.A.; Banbury, L.; Forster, P.; Booth, R.; Markhamc, J.; Leacha, D.; Waterman, P.G. (2004). Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytomedicine*, 11, 461–466.
- Mucsi, I.; Molnár, J.; Hohmann, J.; Rédei, D. (2001). Cytotoxicities and anti-herpes simplex virus activities of diterpenes isolated from Euphorbia species. *Planta Med.* 67(7):672-674.
- Nishimura, T.; Toku, K. e Fukuyasu, H. (1977). Antiviral compounds. XII. Antiviral activity of aminohydrazones of alkoxyphenyl substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and mice. *Kitasato Arch. Exp. Med.*, 50(1-2), 39-46.
- Nugier, F.; Colin, J. .N.; Aymard, M.; e Langlois, M. (1992). Occurrence and characterization of acyclovir-resistant herpes simplex virus isolates: report on a two-year sensitivity screening survey. *J. Med. Virol.* 36, 1–12.
- Oliveira, R. S. (2010). Herpes no olho, Herpes Ocular. *Médico de Olhos*. Disponível em < <http://www.medicodeolhos.com.br/2010/06/herpes-no-olho-herpes-ocular.html>>. Acessado em: 04/11/2016.
- Pediatra Virtual (2012). POSSIVEIS CAUSAS DE HERPES NEONATAL SIMPLEX. *Pediatra Virtual*. <<http://pediatravirtual.net/herpes-neonatal-simplex/>>. Acessado em: 04/11/2016.
- Pei, Y.; Du, Q.; Liao, P.Y.; Chen, Z.P.; Wang, D.; Yang, C.R.; Kitazato, K.; Wang, Y.F. e Zhang, Y.J. (2011). Notoginsenoside ST-4 inhibits virus penetration of herpes simplex virus in vitro. *J Asian Nat Prod Res.* 13(6):498-504.
- Pothier, P. e Lambert, D. *Cours de Virologie Grands Syndromes: Dermatoses virales, Affections vésiculeuses*. Campus de Microbiologie Médicale. Disponível em < www.microbes-edu.org>. Acessado em: 04/11/2016.
- Piret, J. e Boivin, G. (2014). Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus. *Rev. Med. Virol.* 24, 186–218
- Priengprom T.; Ekalaksananan T.; Kongyingyoes B.; Suebsasana S.; Aromdee C. e Pientong C. (2015). Synergistic effects of acyclovir and 3, 19- isopropylideneandrographolide on herpes simplex virus wild types and drug-resistant strains Priengprom et al. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15:56.
- Prieto, A.M.; Santos, A.G.; Oliveira, A. P. S.; Cavalheiro, A. J. C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Varanda, E. A.; Soares, C. P. S. (2013). Assessment of the chemopreventive effect of casearin B, a clerodanoditerpene extracted from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). *Food and Chemical Toxicology*, 53, 153–159.
- Reed, L.J. e Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percents endpoints. *Am. J. Hyg.* 27, 493-497.
- Resende, F.P. (2012). Avaliação e caracterização da atividade antiherpética de extratos aquosos de plantas da flora portuguesa. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada. Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.
- Roizman, B.; Knipe, D. M.; Whitley, R. J. (2013). *Herpes Simplex Viruses*. In : *Fields Virology*, 6 ED. Editado by David M. Knipe and Peter M. Howley. Philadelphia, PA, USA. Lippincott Williams & Wikings.
- Santos, M.G.M. (1997). Atividade inibitória *in vitro* de extratos de algas marinhas do litoral do Rio de Janeiro para os vírus herpes simplex tipo 1 resistentes ao aciclovir. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia)- Instituto de Microbiologia Paulo Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Schnitzler, P.; Neuner, A.; Nolkemper, S.; Zundel, C.; Nowack, H.; Heinz Sensch, K. e Reichling, J. (2010). Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. *Phytother. Res.* 24: S20–S28.
- Senior, K. (1996). Pharmaceuticals from plants: promise and progress. *Mol. Med. Today* 2: 60-64.

- Seubsasana, S.; Pientong, C.; Ekalaksananan, T.; Thongchai, S. e Aromdee, C. (2011). A potential andrographolide analogue against the replication of herpes simplex virus type 1 in vero cells. *Med Chem.* 7(3):237-244.
- Sidwell, R. W.; Amett, G.; Dixon, G. J. e Schabel, F. M. (1969). Purine analogs as potential anticytomegalovirus agents. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 131: 1223-1230.
- Silva, F.A.; Baisch, A.L.M.; Oliveira, B.; Battastini, A.M.; Torres, F.; Racoski, G.; Silva, E.S.; Alam, M.F.; Apolinário, J.C.G. e Lapa, A.J. (1988). Estudos Farmacológicos Preliminares dos Extratos da *Casearia sylvestris* Swartz. *Acta Amaz.* 18(Suppl):219-229.
- Simões, C.M.O.; Falkenberg, M.; Auler Mentz, L.; Schenkel, E.P.; Amoros, M. e Girre, L. 1999. Antiviral activity of South Brazilian medicinal plant extracts. *Phytomed* 6: 205-214.
- Skepper, J.N.; Whiteley, A.; Browne, H. e Minson, A. (2001). Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment → deenvelopment → reenvelopment pathway. *J. Virol.*, 75(12), 5697-5702.
- Smith, S. e Weller, S. K. (2015). HSV-I and the cellular DNA damage response. *Future Virol.*, 10(4): 383–397.
- Soares, A.R.; Abrantes, J.L.; Lopes Souza, T.M.; Leite Fontes, C.F.; Pereira, R.C.; de Palmer Paixão Frugulhetti, I.C. e Teixeira, V.L. (2007). In vitro antiviral effect of meroditerpenes isolated from the Brazilian seaweed *Styopodium zonale* (Dictyotales). *Planta Med.* 73(11):1221-1224.
- Sritularak, B.; Tantrakarnsakul, K.; Lipipun, V. e Likhitwitayawuid, K. (2013). Flavonoids with anti-HSV activity from the root bark of *Artocarpus lakoocha*. *Nat Prod Commun.* 8(8):1079-1080.
- Steiner, I.; Kennedy, P.G. e Pachner, A.R. (2007). The neurotropic herpes viruses: Herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet Neurol.*, 6(11), 1015-1028.
- Stranska, R., Schuurman, R., Nienhuis, E., Goedegebuure, I.W., Polman, M., Weel, J.F., Wertheim-Van Dillen, P.M., Berkhout, R.J., van Loon, A.M., (2005). Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the Netherlands: prevalence and characterization. *J. Clin. Virol.* 32, 7–18.
- Thadeo, M.; Meira, R. M. S. A.; Azevedo, A. A. e Araújo, J. M. (2009). Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras da folha de *Casearia decandra* Jacq. (Salicaceae). *Rev Bras Bot*, 32(2):329-38.
- Ürményi, F.G.; Saraiva, G.D.; Casanova, L.M.; Matos, A.D.; de Magalhães Camargo, L.M.; Romanos, M.T. e Costa, S.S. (2016). Anti-HSV-1 and HSV-2 Flavonoids and a New Kaempferol Triglycoside from the Medicinal Plant *Kalanchoe daigremontiana*. *Chem Biodivers.* 2016 [Epub ahead of print]
- USDA. Natural resources Conservation Service. *Casearia arborea* (Rich.) Urb. Show All gia verde. Disponível em <<http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=CAAR8>>. Acessado em 26/11/2016
- Vadlapudi, A.D.; Vadlapatla, R.K. e Mitra, A.K. (2013). Update on emerging antivirals for the management of herpes simplex virus infections: a patenting perspective. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, 8(1), 55-67.
- Van Genderen, I. L.; Brandimarti, R.; Torrisi, M.R.; Campadelli, G. e Van Meer, G. (1994). The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. *Virology*, 200(2), 831-836.
- Vlietinck, A. J.; Van Hoof, L.; Totte, J.; Lasure, A.; Vanden Berghe, D.; Rwangabo, P. C. e Mvukiyumwami, J. (1995). Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. *J. Ethnopharmacol.* 46: 31-47,.
- Werle, A.L.B.; Zanetti, G.D.; Ceron, C.S.; Manfron, M. P. (2009). Avaliação da atividade de *Casearia sylvestris* Swartz (Flacourtiaceae) sobre os níveis séricos de triglicerídeos em ratos. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(2A): 400-402.

- Whitley, R. J. (2001). Herpes simplex viruses. In: Virology. 4ª ED. Philadelphia: Lippincott Williams & Wikings, 2461-2509.
- WHO—World Health Organization, 2003. Traditional Medicine, Fact sheet No. 134, May 2003. Available at: www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs134/en4 Access in: 07/08/2003.
- Wigg, M.D. (1991). Interferência de extratos de plantas na interação vírus/células: atividade do extrato de folhas de *Persea americana* (abacateiro). Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia)- Instituto de Microbiologia Paulo Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Wigg, M.D.; Al-Jabri, A.; Costa, S.S.; Race, E.; Bodo, B. e Oxford, J. (1996) *In vitro* virucidal and virustatic anti HIV-1 effects of extracts from *Persea americana* Mill. (avocado) leaves. *Antiviral Chem. Chemother.* 7(4), 179-183.
- Wigg, M.D. (2015a). Antivirais. In: *Virologia Humana*. Edited by Norma Suely de Oliveira Santos, Maria Teresa Villela Romanos e Marcia Dutra Wigg, 3ª ED, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 141-18.
- Wigg, M.D. (2015b). Viroses Dermatológicas. In: *Virologia Humana* Edited by Norma Suely de Oliveira Santos, Maria Teresa Villela Romanos e Marcia Dutra Wigg, 3ª ED, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 232-269.
- Wu, H.; Li, B.; Wang, X.; Jin, M. e Wang, G. (2011). Inhibitory effect and possible mechanism of action of patchouli alcohol against influenza A (H2N2) virus. *Molecules.*16(8), 6489-6501.
- Yamashita, C. I.; Saiki M.; Vasconcellos M. B. e Sertié J. A.(2005). Characterization of trace elements in *Casearia* medicinal plant by neutron activation analysis. *Appl Radiat Isot.* 63(5-6):841-6.