

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS/ ÁREA
DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS BIOATIVOS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Milene Evelyn da Silva

**Avaliação da atividade antiviral do extrato de *Mikania glomerata* Sprengel
(guaco)**

Juiz de Fora

2015

Milene Evelyn da Silva

**Avaliação da atividade antiviral do extrato de *Mikania glomerata* Sprengel
(guaco)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/ área de concentração em produtos Naturais Bioativos, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria da Penha Henriques do Amaral

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Maria Pinto Vilela.

Juiz de Fora

2015

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Milene Evelyn da .
Avaliação da atividade antiviral do extrato de Mikania glomerata Sprengel (guaco) / Milene Evelyn da Silva. -- 2015.
68 f. : il.

Orientadora: Maria da Penha Henriques do Amaral
Coorientadora: Fernanda Maria Pinto Vilela
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2015.

1. Mikania glomerata. 2. Extrato seco. 3. Antiviral. I. Amaral, Maria da Penha Henriques do, orient. II. Vilela, Fernanda Maria Pinto , coorient. III. Título.

Milene Evelyn da Silva

**Avaliação da atividade antiviral do extrato de *Mikania glomerata* Sprengel
(guaco)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos.

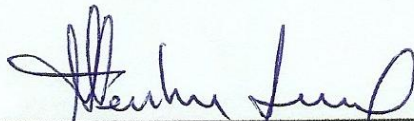
Aprovada em 31 / 02 / 2015



Prof^a. Dr^a. Yris Maria Fonseca Bazzo (Titular externo)



Prof^a. Dr^a. Magda Narciso Leite (Titular interno)



Prof^a. Dr^a. Maria da Penha Henriques do Amaral (Orientadora)

Dedico a minha família, pelo apoio, compreensão,
carinho e incentivo para vencer as dificuldades e
conquistar mais este objetivo.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me proporcionar viver e realizar meus objetivos;

À Professora Doutora e orientadora Maria da Penha Henriques do Amaral pelo enorme profissionalismo, carinho, amizade e atenção;

À Professora Doutora e co-orientadora Fernanda Maria Pinto Vilela pela amizade, ajuda e orientações durante a realização deste projeto;

Aos Técnicos do Laboratório de Farmacologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Jéssus de Paula, Éder e Carolina Miranda por toda a atenção e ajuda na coleta do material botânico e produção de meu material de estudo;

Ao Farmacêutico e Técnico da Universidade Federal de Juiz de Fora, João Pablo Fortes, pela atenção e boa vontade em ajudar;

À Professora Doutora Maria Teresa Villela Romanos do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela atenção e colaboração em nossos experimentos;

À professora e amiga Fernanda Aparecida da Silva, por toda ajuda e profissionalismo no processo de revisão deste trabalho;

À minha cunhada Michelle e seu marido Jesemiel, por toda hospitalidade e ajuda durante o período de realização dos experimentos;

Aos meus pais e companheiros, Cida e Juscelino, e meu irmão, Filipe, por todo amor, dedicação e constante apoio;

Ao meu noivo Amaro, pelo amor, companheirismo e incentivo para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo
que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)*

RESUMO

O herpes é uma doença infecciosa, transmitida pelo vírus *herpes simplex* tipo I (HSV-1) e tipo II (HSV-2). A doença é caracterizada pelo aparecimento de lesões labiais (HSV-1) e genitais (HSV-2). A espécie *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) é uma planta pertencente à família Asteraceae e muito utilizada na medicina popular. A cumarina, presente nas folhas de guaco, apresentam atividades biológicas decritas, tais como broncodilatadora, antiedematogênica e efeitos espasmolíticos. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito antiviral de extrato de *M. glomerata* contra o HSV-1 e HSV-2. Vale ressaltar o potencial promissor do uso do extrato seco de guaco e da cumarina 1,2-benzopirona no tratamento de infecções herpéticas, uma vez que não foi encontrado na literatura nenhum trabalho mostrando a atividade da *Mikania glomerata* Sprengel frente aos herpesvírus HSV-1 e HSV-2. As avaliações da citotoxicidade do extrato seco de guaco e do padrão cumarina (1,2-benzopirona) foram realizadas em culturas de células Vero (células de rim de macaco verde Africano) mediante a observação das alterações da morfologia e da viabilidade. A partir deste teste, determinou-se a concentração máxima não tóxica (CMNC). Foram utilizadas as concentrações subtóxicas do extrato seco de guaco e da cumarina 1,2-benzopirona para avaliar as atividades anti-HSV-1 e HSV-2 mediante observação da redução do título viral. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição (PI). O extrato seco de guaco apresentou atividade inibitória contra o vírus HSV-1 (PI= 87,7%) e HSV-2 (PI= 92,7%). O padrão cumarina 1,2-benzopirona foi inativo contra o vírus HSV-2, mas apresentou atividade antiviral frente ao vírus HSV-1 (PI= 68,4%). Esses resultados evidenciaram a presença de outros metabólitos presentes no extrato seco de guaco que, isoladamente ou em sinergismo, contribuíram para a maior atividade antiviral. Sugere-se a incorporação deste extrato em formulações tópicas com a finalidade de proporcionar um tratamento alternativo para as infecções herpéticas.

Palavras-chave: *Mikania glomerata*. Extrato seco. Antiviral.

ABSTRACT

Herpes is an infectious disease transmitted by type I (HSV-1) and type II (HSV-2) *herpes simplex* virus. The disease is characterized by the appearance of cold sores (HSV-1) and genital lesions (HSV-2). *Mikania glomerata* Sprengel (*guaco*) specie is a plant belonging to the Asteraceae family and is widely used in folk medicine. Coumarin, present in guaco leaves, have biological activity, such as decriptas, antiedematogênica and bronchodilator effects spasmolytics. This study aimed to evaluate the antiviral effect of *M. glomerata* extract against the HSV-1 and HSV-2. It is noteworthy the promising potential of using guaco extract in the treatment of herpesvirus infections, since no published reports showing the activity of *Mikania glomerata* Sprengel against HSV-1 and HSV-2 herpesviruses were found. Cytotoxicity assessments of guaco dry extract and coumarin (2*H*-1-benzopyran-2-one) standard were performed in Vero cells culture (African green monkey's kidney cells) by observing morphology and viability. Based on this test, the maximum non-toxic concentration (MNTC) was determined. Subtoxic concentrations of guaco dry extract and 2*H*-1-benzopyran-2-one coumarin were employed to assess the anti-HSV-1 and HSV-2 activity by observing the reduction of viral titer. The results were expressed as percentage inhibition (PI). Guaco dry extract showed inhibitory activity against HSV-1 (PI=87.7%) and HSV-2 (PI=92.7%) viruses. The 2*H*-1-benzopyran-2-one coumarin standard was inactive against HSV-2 virus, but showed antiviral activity against HSV-1 virus (PI=68.4%). These results demonstrated the presence of other metabolites in the guaco dry extract that, either alone or in synergism, contributed to the higher antiviral activity. It is suggested to incorporate this extract in topical formulations for the purpose of provide an alternative treatment for herpetic infections.

Keywords: *Mikania glomerata*. Dry extract. Antiviral.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1A -	Estruturas químicas das cumarinas sesquiterpênicas da espécie <i>Ferula assa-foetida</i> : badrakemin.....	18
Figura 1B -	Estruturas químicas das cumarinas sesquiterpênicas da espécie <i>Ferula assa-foetida</i> : kellerin.....	18
Figura 1C -	Estruturas químicas das cumarinas sesquiterpênicas da espécie <i>Ferula assa-foetida</i> : samarcandin diastereomer.....	18
Figura 2 -	Estrutura viral do <i>Herpes simplex</i>	21
Figura 3A -	Lesão labial decorrente de infecção por HSV-1.....	23
Figura 3B -	Lesão de gengiva decorrente de infecção por HSV-1.....	23
Figura 4 -	Mecanismos de ação dos fármacos anti-HSV.....	24
Figura 5 -	Espécie <i>Mikania glomerata</i> Sprengel.....	26
Figura 6A -	Estrutura química da cumarina	29
Figura 6B -	Estrutura química do ácido <i>o</i> -cumárico.....	29
Figura 6C -	Estrutura química do ácido caurenóico.....	29
Figura 6D -	Estrutura química do siringaldeído.....	29
Figura 6E -	Estrutura química da dihidrocumarina.....	29
Figura 7 -	Compostos sintetizados a partir de 3-fenilcumarina.....	30
Figura 8 -	Equipamento Liofilizador Terroni LS 3000 (São Carlos, Brasil).....	36
Figura 9 -	Representação esquemática do teste de triagem.....	42
Figura 10-	Extrato liofilizado de <i>Mikania glomerata</i>	46
Figura 11 -	Perfil cromatográfico do extrato liofilizado de <i>Mikania glomerata</i>	49
Figura 12 -	Efeito citotóxico do extrato seco de <i>Mikania glomerata</i> e da cumarina 1,2-benzopirona em cultura de células Vero.....	51
Figura 13A -	Células Vero: célula sem alteração morfológica.....	52
Figura 13B -	Célula Vero: célula com alteração da morfologia devido à infecção por HSV (efeito citopático).....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Detalhes da preparação, processos de extração e metabólitos encontrados em extratos de <i>M. glomerata</i> Sprengel.....	27
Tabela 2	Atividade antiviral expressos em Porcentagem de inibição (PI).....	54
Tabela 3	Valores da concentração capaz de inibir em 50% a replicação viral (EC_{50}) e o índice de seletividade ($IS = CC_{50}/EC_{50}$).....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CC ₅₀	Concentração citotóxica 50%
CE ₅₀	Concentração capaz de inibir em 50% a replicação viral
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
EC	Concentração efetiva
ECP	Efeito citopático
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV	Vírus <i>herpes simplex</i>
HSV-1	Vírus <i>herpes simplex</i> tipo 1
HSV-2	Vírus <i>herpes simplex</i> tipo 2
IS	Índice de seletividade
Kg	Quilograma
MEM	Meio mínimo essencial
Mg	Miligrama
mL	Mililitros
mmHg	Milímetro de mercúrio
MNTC	Concentração máxima não tóxica
Nm	Nanômetro
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PI	Percentual de inibição
RPM	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
TCID ₅₀	Dose infectante para 50% da cultura do tecido
UV-DAD	Detector ultravioleta acoplado a arranjo de diodo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PLANTAS MEDICINAIS E DE SEUS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	16
2.2	VÍRUS <i>HERPES SIMPLEX</i>	20
2.3	<i>Mikania glomerata</i> Sprengel.....	25
2.3.1	Estudos fitoquímicos de <i>Mikania glomerata</i> Sprengel	27
2.3.2	Propriedades farmacológicas da <i>Mikania glomerata</i> Sprengel	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	34
4.2	PREPARO DA AMOSTRA.....	34
4.3	PREPARO DO EXTRATO FLUIDO	35
4.4	OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO.....	35
4.5	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DO EXTRATO SECO.....	36
4.6	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CUMARINA POR ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS	37
4.7	DETERMINAÇÃO DO TEOR DA CUMARINA 1,2-BENZOPIRONA POR CLAE.....	37
4.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO EXTRATO SECO DE GUACO.....	38
4.8.1	Preparo das amostras	38
4.8.2	Cultura celular	39
4.8.3	Amostras virais	39
4.8.4	Ensaio de Citotoxicidade	39
4.8.4.1	<i>Morfologia celular</i>	40
4.8.4.2	<i>Viabilidade celular</i>	41
4.8.5	Ensaio de Atividade Antiviral	41

4.8.5.1	<i>Triagem</i>	41
4.8.5.2	<i>Titulação dos vírus</i>	43
4.8.5.3	<i>Redução do título viral</i>	43
4.8.6	Determinação da curva dose-resposta	44
4.8.7	Análise estatística	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO.....	46
5.2	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE.....	47
5.3	DETERMINAÇÃO DOS TEOR DE CUMARINA POR ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS	48
5.4	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CUMARINA POR CLAE.....	48
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	49
5.5.1	Ensaio de Citotoxicidade	49
5.5.2	Ensaio de Atividade Antiviral	52
5.5.2.1	<i>Triagem</i>	52
5.5.2.2	<i>Redução do título viral</i>	53
6	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

O herpes é uma doença infecciosa de etiologia viral, tendo o *herpes simplex virus* (HSV) como agente etiológico. As infecções causadas por este vírus estão entre as mais prevalentes no mundo, sendo portanto, relevantes em saúde pública (CLEMENS, FARHAT, 2010).

Os herpesvírus tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2) são os maiores causadores de infecções humanas e possuem características biológicas particulares. Tais vírus causam diferentes tipos de doenças, podem estabelecer infecções latentes ou persistentes por toda a vida dos hospedeiros e possuem a capacidade de reativação causando lesões que podem se localizar no sítio da infecção primária inicial ou próxima a ele (LAZARINI et al., 2006).

Tipicamente, o HSV-1 é contraído na infância e adolescência através de contato direto por via oral. Os sintomas da infecção viral caracterizam-se pelo aparecimento de pequenas vesículas amareladas na face, que são geralmente agrupadas e que se rompem rapidamente formando úlceras que podem coalescer (MERTZ, ROSENTHAL, STANBERRY, 2003; STANBERRY et al., 1999). A doença ocasionada por HSV-2 é quase sempre genital, ocorrendo em adolescentes e adultos sexualmente ativos (SCHOMOGYI, WALD, COREY, 1998).

O Aciclovir é a droga de primeira escolha para o tratamento das lesões herpéticas devido a sua ação efetiva contra os vírus, entretanto, há relatos de isolamento de estipes virais resistentes a esse medicamento (BACHE et al., 2014; TAGLIARI et al. 2012). Este fator complicador dificultou e redirecionou o tratamento para drogas alternativas como valaciclovir, ganciclovir, penciclovir e foscarnet, porém, problemas de toxicidade e desenvolvimento de resistência viral a estas drogas também já foram registrados (GERSHENGORN, BLOWER, 2000; SCHMIDT et al., 2015).

Atualmente, para o tratamento das lesões herpéticas há uma necessidade de novas terapias antivirais de baixo custo e toxicidade chamando atenção para a pesquisa de substâncias naturais provenientes de plantas com valor medicinal e que já são empregadas para o tratamento de infecções na farmacoterapia popular (ASTANI, NAVID, SCHNITZLER, 2014).

Muitas substâncias com propriedades antivirais têm sido identificadas e seus mecanismos de ação elucidados. No entanto, poucas têm sido utilizadas para

tratamentos de infecções virais devido à alta toxicidade, espectro de ação limitado ou falta de evidências para garantir sua aplicação específica (EFFERTH, 2009).

A espécie *Mikania glomerata* Sprengel, popularmente conhecida como guaco, é uma planta pertencente à família Asteraceae e amplamente utilizada na medicina popular brasileira no tratamento de afecções respiratórias devido às suas propriedades broncodilatadora e expectorante (NAPIMOGA, YATSUDA, 2010).

Os extratos de *M. glomerata* apresentam uma composição química diversificada. Estudos fitoquímicos dessa espécie resultaram na identificação de diferentes metabólitos, destacando-se: cumarina, saponinas, taninos, esteróides e óleos essenciais. Outros constituintes químicos também foram identificados como, ácido caurenóico, ácido *o*-cumárico, lupeol, ácido cinamoilgrandiflórico e estigmasterol. Alguns destes compostos possuem comprovada atividade farmacológica: o lupeol apresenta propriedade anti-inflamatória; o ácido caurenóico é um potente antimicrobiano, hipotensor; e o estigmasterol possui atividade hipocolesterolêmica (GASPARETTO, 2013).

A cumarina 1,2-benzopirona é um dos principais constituintes químicos da *M. glomerata* e está relacionada com a atividade broncodilatadora da espécie (CELEGHINI et al., 2001).

Alguns estudos também relatam a atividade antiviral das cumarinas (GHANNADI et al., 2014; HWU et al., 2015; VENUGOPALA et al. 2013; YANG et al., 2015).

Apesar da presença de compostos com potencial atividade antiviral no extrato de guaco, ainda não foram encontrados na literatura relatos de atividade de *Mikania glomerata* contra os vírus HSV-1 e HSV-2.

Diante da necessidade de novos medicamentos de menor custo, baixa toxicidade e maior eficácia para o tratamento do herpes, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiviral do extrato seco de *Mikania glomerata* Sprengel contra os herpesvírus HSV-1 e HSV-2.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PLANTAS MEDICINAIS E DE SEUS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Há mais de 60 anos os virologistas travam uma luta incessante com o principal objetivo de desenvolver fármacos que possam parar a replicação viral sem danificar as células do hospedeiro (RINCÃO, 2012).

A toxicidade de muitos compostos antivirais é uma das principais barreiras para a realização de um tratamento efetivo, pois implica em sua utilização por períodos relativamente curtos. Uma alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos antivirais são os produtos de origem natural com baixa toxicidade (KAZIYAMA, FERNANDES, SIMONI, 2012).

Há milhares de anos produtos derivados de plantas medicinais são utilizados na medicina popular no tratamento de várias doenças, inclusive as infecciosas. Sua ampla diversidade estrutural e atividade biológica, além de serem reconhecidas pela indústria farmacêutica, caracterizam as plantas medicinais como fonte de moléculas ou modelos para o desenvolvimento de fármacos. Apesar de se caracterizarem como excelente fonte para biomoléculas com propriedades terapêuticas, inclusive para o tratamento de doenças infecciosas, uma ínfima parte de toda biodiversidade foi analisada com este fim até o momento (SIMÕES, 2010).

Produtos do metabolismo secundário das plantas como alcalóides, proteínas, saponinas, flavonóides, cumarinas têm sido descritos, na literatura, como compostos com potencial atividade antiviral (PADILLA, 2011; KAZIYAMA, FERNANDES, SIMONI, 2012).

Estudo realizado por Cecílio et al. (2012) avaliaram a atividade de plantas medicinais brasileiras, tradicionalmente utilizadas no tratamento da diarreia, contra o rotavírus símio SA11. As espécies estudadas (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville; *Psidium guajava* L.; *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) Engl; *Luehea paniculata* Mart; *Hymenaea courbaril* L.; *Eugenia uniflora* L.; *Eugenia dysenterica* DC.; *Curatella americana* L.; *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg.; *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC.; *Byrsonima coccolobifolia* Kunth; *Astronium fraxinifolium* Schott; *Annona crassiflora* Mart; *Anacardium humile* A. St. -Hil.) foram coletadas no cerrado mineiro. Os resultados dos estudos de avaliação da atividade antiviral

demonstraram que os extratos etanólicos das plantas *Byrsonima verbascifolia*, *Myracrodruon urundeuva*, com elevado teor de taninos, flavonóides, saponinas, cumarinas e terpenos, inibiram o rotavírus, em células MA-104. A espécie *Eugenia dysenterica* também apresentou atividade antiviral, porém não foi encontrada à presença de cumarinas em sua constituição, apenas taninos, flavonóides e saponinas.

Esquenazi et al. (2002) estudaram o extrato de *Cocos nucifera* L. (Palmae), uma espécie da região nordeste do Brasil, normalmente utilizada na medicina popular contra diarreia e artrite. O extrato aquoso bruto, obtido a partir da fibra da casca de coco, e uma fração metanólica do extrato, rica em catequinas, foram avaliados quanto à sua atividade contra o vírus HSV-1 resistente ao aciclovir (HSV-1-ACVr). Ambos apresentaram atividade contra o HSV-1-ACVr. A catequina e a epicatequina, em conjunto com os taninos condensados (procianidinas), demonstraram ser os componentes do extrato aquoso responsáveis pelo efeito inibitório.

Em estudo desenvolvido por Fritz (2006) as frações de n-hexano, diclorometano e metanol, os extratos bruto aquosos e hidroetanólico das partes aéreas e raízes da espécie *Hypericum connatum* (Guttiferae), assim como as substâncias isoladas dessas preparações, foram testadas frente ao vírus HSV-1 (cepas KOS e ATCC-VR733). A fração n-hexano e o extrato bruto das raízes inibiram a replicação viral das cepas KOS e ATCC-VR733. Os demais extratos testados não apresentaram atividade antiviral. Dentre as substâncias analisadas, hiperbrasilol B (fração n-hexano), amentoflavona (fração metanólica) e HCN₃ (um flavonol de estrutura ainda não definida isolado da fração metanólica) foram ativos frente às duas cepas. As demais substâncias isoladas da fração metanólica, os flavonóides hiperosídeo e guaijaverina, não apresentaram atividade anti-HSV-1.

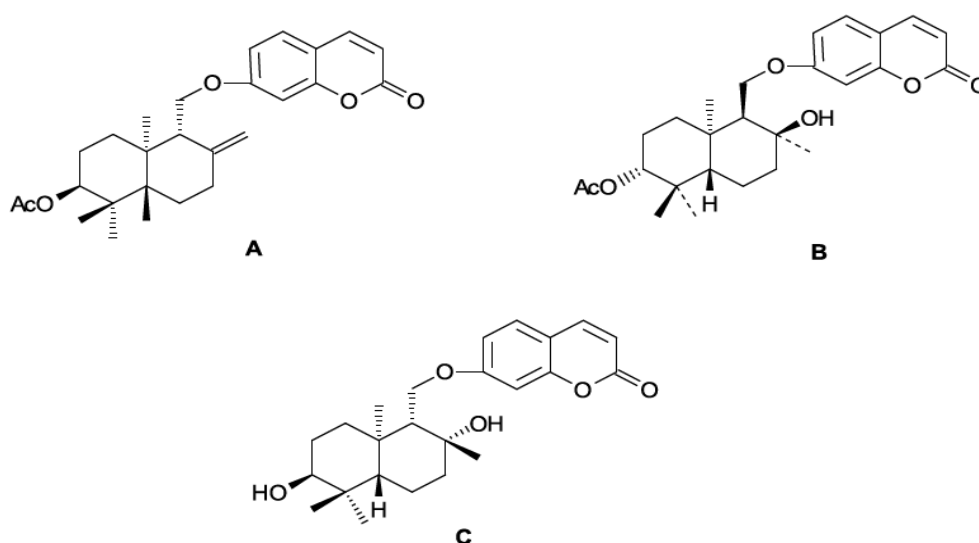
Gescher et al. (2011) analisaram o extrato acetônico obtido das partes aéreas de *Myrothamnus flabellifolia*, rico em proantocianidinas, taninos hidrolisáveis e flavonóides, contra a infecção de HSV-1 e mostraram a atividade virucida do extrato e a interferência na penetração do vírus em células Vero, supostamente, pela interação dos compostos polifenólicos com alguns aminoácidos das glicoproteínas virais, principalmente a glicoproteína gD, necessária para entrada do vírus na célula.

Silva et al. (2010) verificaram a atividade antiherpética da fração de n-butanol (n-BuOH) e da fração enriquecida de C-glicosilflavonóide (MeOH (AMB))

provenientes do extrato bruto aquoso das folhas de *Cecropia glaziovii*. As amostras foram testadas contra os vírus HSV-1 e HSV-2 por ensaio de redução de placas. Os resultados mostraram que a fração MeOH (AMB) apresentou atividade contra os dois vírus testados através da redução de infectividade viral (apenas contra o HSV-2); pela inibição da entrada do vírus nas células e através da redução dos níveis de glicoproteínas do envelope (para HSV-1). A fração n-BuOH não apresentou atividade. Os resultados sugeriram que composto C-glicosilflavonóide pode ser o responsável pela atividade anti- HSV.

Ghannadi et al. (2014) no estudo das cumarinas sesquiterpênicas, avaliou a atividade anti-HSV-1 da espécie *Ferula assa-foetida*, em cultura de células Vero. Três cumarinas sesquiterpênicas foram isoladas do extrato metanólico obtido a partir da goma resina de *Ferula assa-foetida*: as cumarinas badrakemin, kellerin e samarcandin diastereomer (Figuras 1A, 1B e 1C). Os compostos foram identificados através da técnica de RMN 1D e 2D e comparação com dados da literatura. A atividade antiviral dos compostos isolados foi determinada por ensaio de redução de placas. Os resultados mostraram que, nas concentrações testadas: 10; 5 e 2,5 µg/mL, o composto Kellerin inibiu a replicação de HSV-1 com uma taxa de inibição de $98 \pm 5,2\%$; $80 \pm 3,8\%$ e $65 \pm 2,2\%$, respectivamente. Kellerin apresentou uma EC_{50} de 38 µg/mL. As demais cumarinas isoladas não apresentaram atividade anti-HSV-1.

Figura 1 - Estruturas químicas das cumarinas sesquiterpênicas da espécie *Ferula assa-foetida*: badrakemin (A); kellerin (B) e samarcandin diastereomer (C).



Fonte: ADAPTADO DE GHANNADI et al.(2014).

Os extratos das espécies *Pterocaulon alopecuroides* (Lamark) e *Bidens segetum* Mart. ex Colla foram estudados por Silveira et al. (2009) quanto às suas propriedades citotóxica e antiviral. Diferentes partes da espécie *Bidens* (flores, folhas e caule) e as partes aéreas de *Pterocaulon alopecuroides*, foram submetidas a um processo de extração com solvente etanol, à temperatura ambiente. A partir do extrato etanólico bruto de *P. alopecuroides* foi possível isolar a cumarina 7-(2',3'-dihidroxi-3'-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina. Os ensaios de atividade antiviral foram determinados por redução dos títulos virais contra os vírus HSV-1 e HSV-2 resistentes ao aciclovir e os resultados expressos em percentual de inibição (PI) e índice de inibição viral (IIV). Todos os extratos analisados apresentaram citotoxicidade muito alta contra linhagens de células RBL-2H3. Nenhum dos extratos etanólicos totais de *B. segetum* mostraram atividade significativa contra os HSV-1 e HSV-2. O extrato etanólico de *P. alopecuroides* também foi inativo contra HSV-1-ACVr. Entretanto, este extrato apresentou atividade inibitória contra HSV-2-ACVr (PI = 77,6; IIV= 0,65). A cumarina isolada 7-(2',3'-dihidroxi-3'-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina, testada nas mesmas condições, demonstrou um índice de inibição superior (IIV=1,24 ; PI= 94,2) a da amostra de *P. alopecuroides* para HSV-2-ACVr. A cumarina também foi ativa contra HSV-1-ACVr (PI=84,1 ; IIV=0,8).

Kaziyama et al.(2012) pesquisou a atividade antiviral de plantas medicinais disponíveis comercialmente (*Mikania glomerata*, *Cymbopogon citratus*, *Equisetum arvense*, *Peumus boldus*, *Solanum paniculatum*, *Malva sylvestris*, *Piper umbellatum* e *Solidago microglossa*) sobre herpesvírus suíno (SuHV-1) e bovino (BoHV-1), em cultura de células MDBK. Foram preparados extratos aquosos (EA) de todas as espécies. Apenas para a planta *Peumus boldus* foi preparado também o extrato etanólico (EE). A atividade antiviral foi realizada com os extratos liofilizados em suas respectivas CMNT e determinada com base na redução do título viral. Os resultados foram expressos em percentual de inibição. A atividade contra o vírus SuHV-1 foi observada nas seguintes espécies: *Malva sylvestris* (PI= 86%), *Mikania glomerata* (PI= 68%), *Peumus boldus* (EA) (PI=98%), *Piper umbellatum* (PI=2%), *Solanum paniculatum* (PI= 98%) e *Solidago microglossa* (PI=44%). Já para o vírus BoHV-1, somente as plantas: *Cymbopogon citratus* (PI=43%), *Equisetum arvense* (PI= 82%), *Mikania glomerata* (PI= 43%), *Peumus boldus* (PI= 98%(EA); PI= 68% (E)), *Solanum paniculatum* (PI=90%), *Solidago microglossa* (PI=43%) apresentaram atividade antiviral.

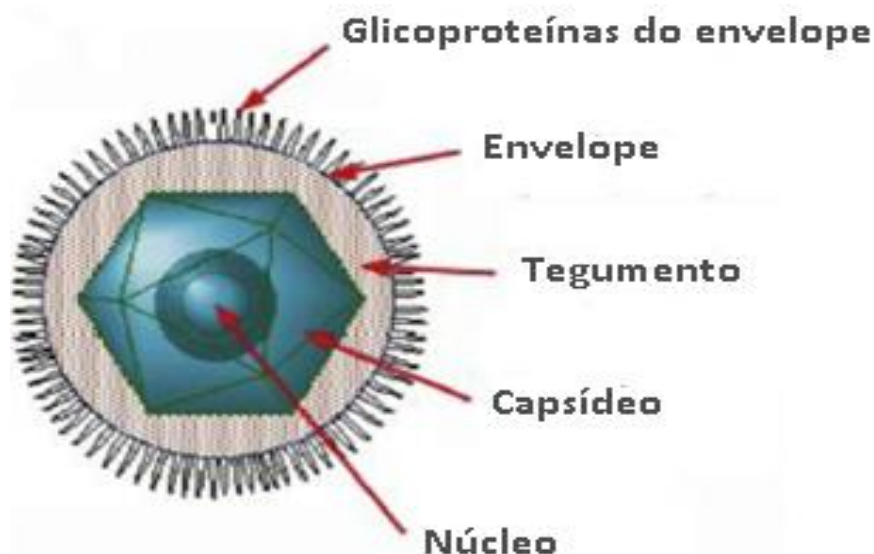
2.2 VÍRUS *HERPES SIMPLEX*

O vírus *herpes simplex* (HSV) foi o primeiro herpesvírus humano a ser descoberto e estudado. O HSV apresenta características peculiares importantes, tais como, a capacidade de causar uma variedade de infecções, estabelecer latência por toda a vida do hospedeiro e reativar-se causando lesões no local inicial da infecção ou próximas a este (LAZARINI et al., 2006).

Em humanos, as infecções herpéticas podem ser causadas por dois tipos de vírus: *herpes simplex* tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2). O HSV-1 está tipicamente associado às infecções não-genitais, acometendo face, lábios, boca e a pele da parte superior do corpo. O HSV-2 está relacionado com as lesões genitais. Atualmente sabe-se que tanto o tipo 1 como tipo 2 podem provocar infecções em ambas as localizações (AZAMBUJA, BERCINI, FURLANETTO, 2004; REGGIORI et al., 2008).

Os vírus HSV-1 e HSV-2 pertencem à família *Hesperviridae*, subfamília *alpha-Herpesvirinae* e gênero *Simplexvirus*. Apesar de serem estruturalmente semelhantes e possuírem um considerável grau de neutralização cruzada, eles podem ser distinguidos sorologicamente pela diferença antigênica das glicoproteínas do envelope (FATAHZADEH, SCHWARTZ, 2007; HATTORI, 2011; ROIZMAN, KNIPE, WHITLEY, 2007).

O *herpes simplex* é um vírus DNA fita dupla linear, transcrito e replicado no núcleo da célula hospedeira. O material genético viral fica protegido no interior de uma capa protéica chamada capsídeo, este é composto por 162 capsômeros arranjados em simetria icosaédrica. O espaço entre a superfície do capsídeo e a superfície interna do envelope é designado como tegumento, o qual é em grande parte não-estruturado, e composto por proteínas virais (ROIZMAN, KNIPE, WHITLEY, 2007) (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura viral do *Herpes simplex*

Fonte: ADAPTADO DE HATTORI, 2011.

O princípio fundamental da patogênese da doença causada por HSV é a capacidade desse vírus estabelecer infecção lítica na superfície das mucosas ou da pele e se tornar latente em células neuronais sensoriais. Durante a infecção lítica todos os seus genes virais são expressos e o genoma é replicado. Já a infecção latente é caracterizada por um desligamento das funções de replicação e pela incapacidade de detectar o vírus infeccioso (MUYLEAERT, TANG, ELIAS, 2011).

Após estabelecerem infecção lítica nas células do sítio da primeira infecção, os vírus penetram pelas terminações nervosas e são transportados pelos axônios, em um sentido retrógrado ao estímulo nervoso, para os gânglios onde a latência pode ser estabelecida. Uma vez latente, o HSV pode ser reativado, periodicamente, com migração dos vírus dos gânglios sensoriais para ocasionar a lesão oral ou genital recorrente (LOPES, 2012).

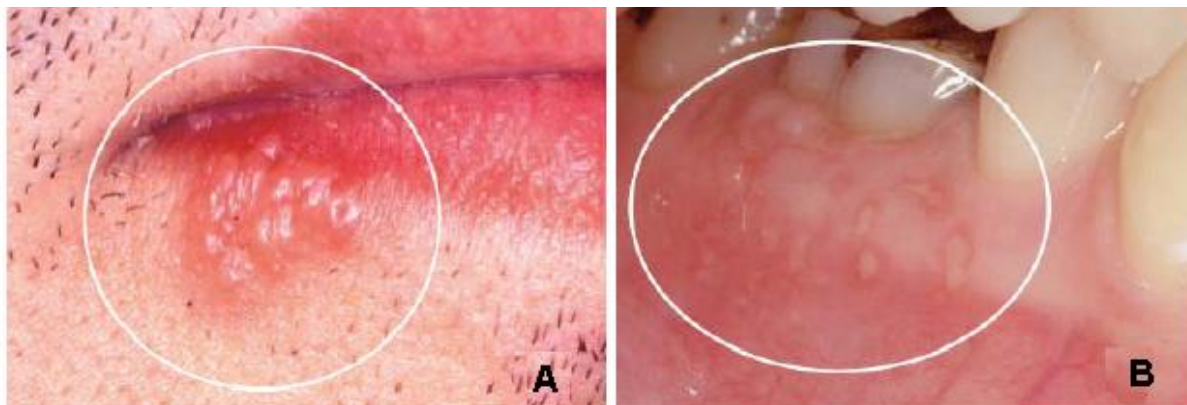
O processo de reativação da latência é desencadeado por um estímulo local, tal como injúria ao tecido enervado por neurônios infectados pelo vírus ou por estímulo sistêmico como estresse físico ou emocional, febre, exposição à luz ultravioleta, menstruação, desequilíbrio hormonal, assim como por outros sinais que possam reativar o vírus simultaneamente em neurônios de diversos gânglios. A reativação periódica da infecção permite a posterior transmissão a outros hospedeiros (SANTOS, ROMANOS, WIGG, 2008).

A transmissão do HSV depende do contato íntimo entre um indivíduo suscetível e o infectado que esteja excretando o vírus. Após a infecção oral, geralmente causada pelo HSV-1, o gânglio trigêmeo se torna colonizado, sendo o local de manutenção do vírus em estado de latência. A infecção pelo HSV-2 é geralmente consequência da transmissão pelo contato genital e o vírus estabelece latência nos gânglios sacrais. O HSV também pode ser transmitido por gotículas de secreções respiratórias ou exposição às secreções mucocutâneas de uma pessoa com infecção assintomática (FATAHZADEH, SCHWARTZ, 2007).

O herpesvírus determina quadros clínicos de intensidade variável, dependendo do estado imunológico do hospedeiro. A primoinfecção herpética, primeiro contato infeccioso com HSV-1 ou HSV-2, pode ser subclínica, passar despercebida e o indivíduo tornar-se portador do vírus sem apresentar sintomas. Em outros indivíduos, a infecção pode ser grave e prolongada perdurando por algumas semanas. Quando sintomática, geralmente o primeiro ataque caracteriza-se pelo desenvolvimento de febre, irritabilidade, artralgia, mal-estar, cefaléia e linfadenopatia cervical. Em poucos dias iniciam-se as manifestações bucais ou gengivostomatite herpética primária (REGGIORI et al., 2008)

O quadro de lesões oral e labial é o mais comum caracterizando-se por pequenas vesículas (1 mm ou menos de diâmetro) agrupadas, que podem romper deixando pequena ulceração vermelha com ligeiro halo eritematoso que tem duração de sete a quatorze dias (AZAMBUJA, BERCINI, FURLANETTO, 2004; SHAFER, HINE, LEVY, 1987). Em pacientes imunocompetentes, o herpes simples recorrente ocorre principalmente no dorso lingual, lábios e gengiva (Figuras 3A e 3B). Os pacientes referem dor durante a higienização oral, devido à sensibilidade local que a lesão herpética provoca nos tecidos bucais (NERI et al., 2014).

Figura 3 - Lesões causadas por HSV: A: Lesão labial decorrente de infecção por HSV-1; B: Lesão de gengiva decorrente de infecção por HSV-1.



Fonte: RICÃO, 2012.

O HSV-2 é o principal responsável pelo herpes genital sendo transmitido predominantemente por contato sexual ou no momento do parto (PENELLO et al., 2010). As lesões herpéticas genitais são precedidas por um período prodromico de dor localizada, formigamento ou sensação de queimação, com duração de até 24 horas. Após alguns dias do ato sexual, aparecem vesículas de tamanhos variados nos órgãos genitais, que se rompem formando ulcerações com crosta (FATAHZADEH, SCHWARTZ, 2007)

As lesões herpéticas orolabiais e genitais podem ser contaminadas, secundariamente, por bactérias estafilococos e estreptococos advindos do ar, da saliva ou das mãos. Nesses casos, as vesículas e bolhas transformam-se em pústulas, ou seja, seu conteúdo seroso transforma-se em exsudato purulento. No caso do herpes genital, podem ocorrer casos de fimose ou parafimose nos homens. Essas transformações alteram a forma de tratamento (NERI et al, 2014; PENELLO et al., 2010).

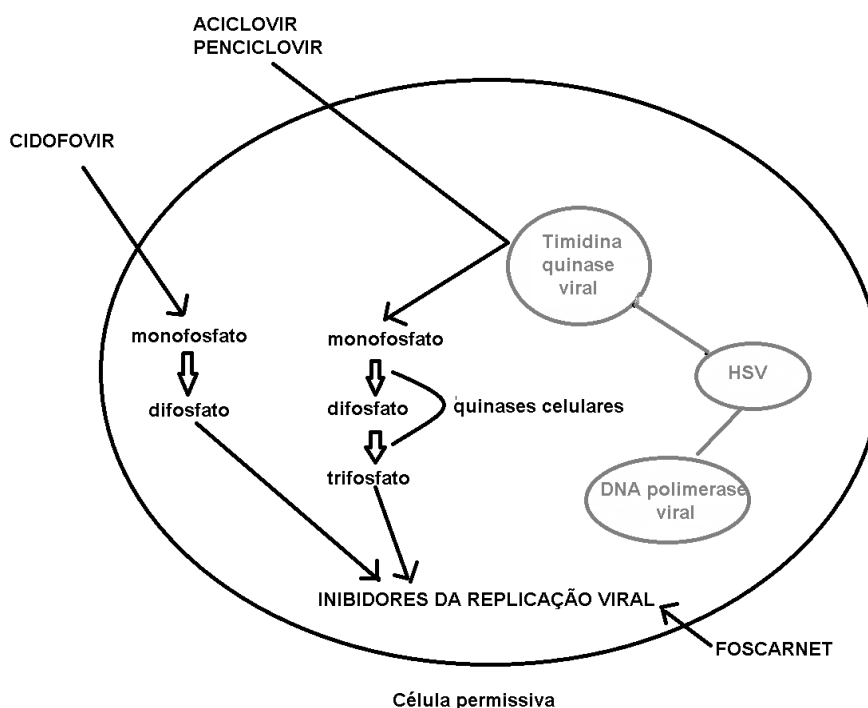
A fim de reduzir a carga viral, fármacos antivirais como o aciclovir, valaciclovir, penciclovir, famciclovir, ganciclovir, valganciclovir, foscarnet e cidofovir são utilizados. Os fármacos penciclovir e docosanol são utilizados no tratamento tópico (TAGLIARI, KELMANN, DIEFENTHALER, 2012). O fármaco aciclovir pode ser administrado de forma tópica ou sistêmica, conforme a gravidade da infecção. Quando as lesões são acometidas de invasão bacteriana, a antibioticoterapia deve ser instituída (CONSOLARO, CONSOLARO, 2009; MILAGRES et al., 2007).

O aciclovir, desenvolvido na década de 70, é atualmente o fármaco de primeira escolha para o tratamento das infecções causadas por HSV. Seu mecanismo de ação está relacionado à inibição da enzima DNA-polimerase viral (DADALTI et al., 2004).

No interior da célula infectada pelo HSV-1 ou HSV-2, o aciclovir é fosforilado por uma enzima viral chamada timidina quinase, o que o torna uma substância com toxicidade seletiva. A segunda e a terceira fosforilação são feitas por timidinas quinases celulares (BILLAUD et al., 2003). Após as etapas de fosforilação, o aciclovir interferirá na polimerização do DNA viral por competir com o nucleotídeo trifosfatado endógeno, 2-deoxiguanosina trifosfatada (SCHLEISS, 2009). Com a incorporação do aciclovir na cadeia de DNA recém sintetizada a síntese fica interrompida e a cadeia não pode ser terminada (GOLANKIEWICZ, OSTROWSKI 2006; SUZUKI et al., 2006). Mutações na timidina quinase ou DNA polimerase virais podem selecionar cepas mutantes resistentes ao aciclovir, o que pode ser observado, principalmente, em pacientes imunocomprometidos que fazem uso constante da droga.

Além do aciclovir, outros fármacos são utilizados para o tratamento das infecções herpéticas. A figura 4 ilustra os diferentes tipos de mecanismos de ação dos fármacos antivirais.

Figura 4 - Mecanismos de ação dos fármacos anti-HSV.



Devido à ampla distribuição das infecções herpéticas, facilidade de transmissão e o aumento do número de cepas virais resistentes às drogas comercialmente disponíveis para o controle da doença, grandes esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de estratégias para a identificação de novos compostos com atividade antiviral (MILAGRES et al., 2007).

A cumarina 1,2-benzopirona é um dos principais constituintes químicos da *M. glomerata* e estudos já relataram a atividade antiviral de cumarinas. Diante disso, a proposta deste trabalho foi investigar a atividade antiviral do extrato seco de *M. glomerata* contra os vírus HSV-1 e HSV-2, uma vez que ainda não foram encontrados na literatura dados de atividade desta planta contra esses vírus.

2.3 *Mikania glomerata* Sprengel

A *Mikania glomerata* Sprengel é uma espécie vegetal pertencente à família Asteraceae e conhecida vulgarmente por “guaco”, “coração-de-jesus”, “guacoliso”, “cipó-caatinga” e “erva-de-cobra”. É uma planta nativa da América do Sul e facilmente encontrada no Brasil (SANTANA et al., 2014).

O guaco é cultivado em quase todo o território brasileiro, ocorre desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul e na Argentina, Uruguai e Paraguai (TALEB-CONTINI et al., 2006). Na época da floração torna-se uma planta muito procurada pelas abelhas melíferas. Reproduz-se por sementes ou pelo plantio de estacas do caule, de preferência em terrenos arenosos e úmidos, adaptando-se bem ao cultivo doméstico (CZELUSNIAK et al., 2012).

A planta possui porte subarborescente trepador provido de caule cilíndrico, bastante ramificado de superfície glabra. As partes jovens caulinares apresentam coloração verde clara que se torna arroxeadada ao cinza escuro nas partes suberificadas (DOS SANTOS, 2006). As folhas são pecioladas, cordiforme-deltoides, oval-lanceoladas, tri ou pentanervadas e agudas no ápice (Figura 5) (SIMÕES et al., 1988).

Figura 5 - Espécie *Mikania glomerata* Sprengel.



Fonte: A AUTORA.

Foi identificada por Sprengel em 1826 e oficializada na 1ª edição da Farmacopéia Brasileira (AMARAL et al., 2009; BRASIL, 1926). As demais edições da Farmacopéia Brasileira não possuem atualizações da monografia do guaco, porém, a 1ª edição do Formulário Nacional de Plantas Medicinais atualiza com a adição de uma formulação oral extemporânea (BRASIL, 2011).

Preparações farmacêuticas tais como o xarope, solução oral, tintura e cápsulas obtidas a partir das partes aéreas de *M. glomerata* foram incluídas no elenco de referência de medicamentos e insumos complementares para a assistência farmacêutica na atenção básica em saúde, conforme anexo II da Portaria nº. 3.237 de 24 de dezembro de 2007 (BRASIL, 2007). Dessa forma, os medicamentos fitoterápicos a base de guaco vem sendo utilizados em larga escala na rede de saúde pública, através da implantação de programas de fitoterapia em vários municípios de alguns estados brasileiros, tais como, Rio de Janeiro, São Paulo, Goiás, Alagoas, Amapá, Ceará, Pernambuco, Espírito Santo, Distrito Federal, Pará, Paraíba, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (BRASIL, 2006; BRASIL, 2008).

Vale ressaltar também que a espécie *M. glomerata* está citada na lista de registro simplificado de fitoterápicos, publicada pela ANVISA (BRASIL. ANVISA. RE nº 89, de 16 de março de 2004), o que significa que medicamentos obtidos a

partir do guaco não requerem estudos de segurança e eficácia, uma vez que o uso terapêutico seguro dessa planta já foi amplamente descrito em diversas bases de dados como COCHRANE, PUBMED, BVS-Medline, BVS-Lilacs, e CAPES. Portanto, a obtenção de produtos fitoterápicos a partir dessa espécie se torna um processo mais rápido devido à isenção de testes clínicos e pré-clínicos.

2.3.1 Estudos fitoquímicos de *Mikania glomerata* Sprengel

O aumento do interesse da população por fitoterápicos, a maior preocupação com a segurança e eficácia dos mesmos, além da busca por novos protótipos, têm-se constituído os pilares do estudo fitoquímico de plantas medicinais nos últimos anos. Entre as plantas estudadas quimicamente, as espécies do gênero *Mikania* têm um grande destaque, principalmente por apresentarem uma composição química diversificada (OSORIO, 2002).

Muitos estudos têm sido realizados para avaliar a composição química de *Mikania glomerata* (Tabela 1). Através de diferentes procedimentos de extração, uma variedade de compostos tem sido encontrados em partes distintas desta planta. Os detalhes dos procedimentos de extração e metabólitos encontrados nos extratos de guaco são mostrados na tabela 1.

Tabela 1 - Detalhes da preparação, processos de extração e metabólitos encontrados em extratos de *M. glomerata* Sprengel.

Tipo de Extrato	Proporção Droga: solvente	Procedimento extrativo	Método analítico	Componentes	Referências
Extrato aquoso	1:12	Maceração de partes aéreas frescas com água ou NaOH 1%	HPLC-DAD	Cumarina	CABRAL et al., (2001)
Extrato aquoso	1:10	Infusão de folhas secas	HPLC-DAD	Cumarina	CELEGHINI et al. (2001)
Extrato aquoso	1:100	Infusão de folhas	HPLC-DAD	Cumarina e ácido o-cumárico	SANTOS (2005)
Extrato hidroalcoólico	1:1	Processo de percolação das folhas. Obtenção das seguintes frações: hexânica, etanólica, clorofórmio e de ac. etila	TLC	Ácido caurenóico, ácido cinamoilgrandiflorico, sigmasterol e cumarina	OLIVEIRA et al. (1993)

Tabela 1 - Continuação

Extrato hidroalcoólico	1:10	Maceração por sonicação de secas folhas e caules	HPLC-DAD	Cumarina	PEREIRA et al. (1998)
Extrato hidroalcoólico	Não especificado	Maceração das folhas frescas. O extrato bruto foi fracionado em diclorometano, e as duas fases (aquosa e orgânica) foram avaliadas.	GC-MS	Cumarina, ácido <i>o</i> -cumárico, dihidrocumarina, fitol, ácido hexanóico, hexadecanoato de etila, dimetoxibenzaldeído, caurenol e ácido caurenóico	MOURA et al. (2002)
Extrato hidroalcoólico	1:5	Maceração das folhas secas. O extrato foi concentrado sob pressão reduzida e liofilizado. Frações de hexano foram obtidas e o resíduo foi utilizado para preparar fração de acetato de etila.	CCD e CG-MS	Cumarina, dihidrocumarina, espatulenol, ácido hexadecanóico, ácido caurenóico, ácido isopropiloxigrandiflórico, 2-5-ciclohexadieno-1,4-diona, 2,6-bis9	YATSUDA et al. (2005)
Extrato etanólico	1:12	Refluxo das partes aéreas (frescas e secas)	HPLC-DAD	Cumarina	CABRAL et al. (2001)
Extrato etanólico	0,1:25	Percolação e refluxo das folhas secas.	CCD e HPLC	Cumarina, esteróides, triterpenos e flavonóides	BOLINA et al. (2008)
Extrato metanólico	Não especificado	Maceração das folhas	HPLC-DAD	Cumarina	RADUNZ (2004)
Extrato Hexânico	1:10 e 5:200	Maceração; maceração com sonicação; soxhlet; fuido supercrítico de folhas secas	CG-FID e CG-MS	CG-FID: ácido caurenóico e cumarina; CG-MS: cumarina, lupeol, ácido caurenóico, sesquiterpenos, acetato de lupeol, ácido 11-metilbutanóico e germacreno	VILEGAS et al. (1997)
Extrato diclorometânico	Não especificado	Maceração com sonicação e posterior liofilização	CCD, HPLC e CG-FID	Campesterol, sigmasterol, β -sitosterol e cumarina.	SANTOS et al. (1999)

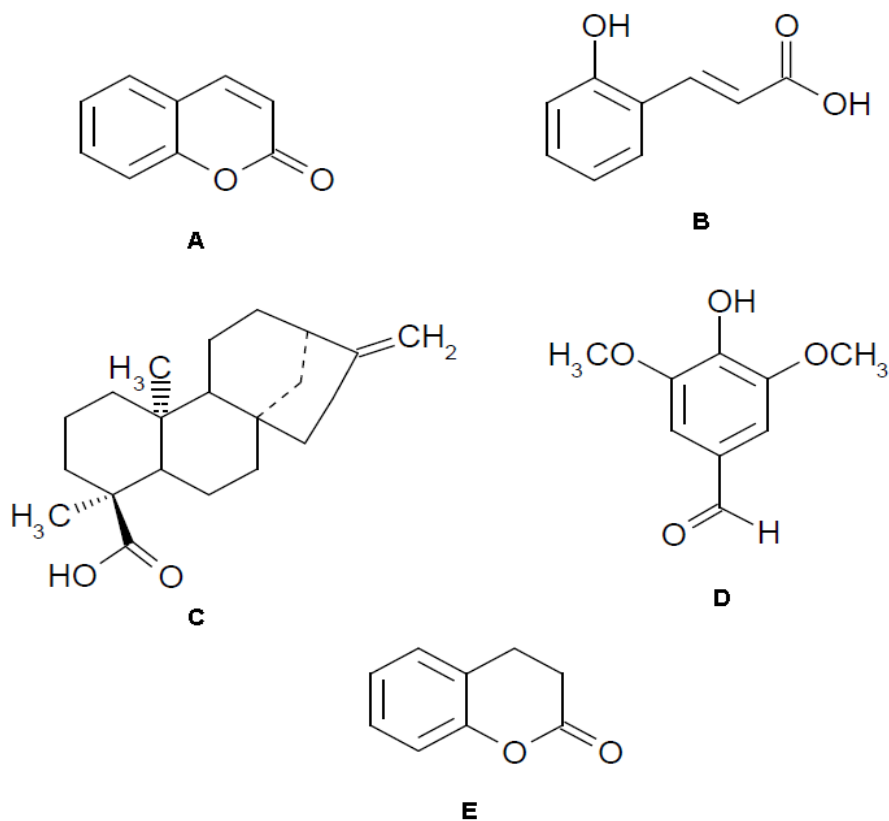
Fonte: ADAPTADO DE GASPARETTO et al., 2013.

No óleo essencial de guaco, é observada a presença de muitos compostos, incluindo α -cadinol, α -copaeno, α -humuleno, α -muurolol, α -pineno, α -terpinol, β -pineno, β -farneseno, β -bourboneno, β -cubebeno, β -cariofileno, β -elemeno, (E)- β -ocimene, (E)-nerolidol, *p*-cimeno e TAU-caudinol, epi- α -bisabolol, epi- α -muurolol, aromadendreno, biciclogermacreno, óxido de cariofileno, acetato de

citronelal, cubebeno, elemol, germacreno-B, germacreno-D, globulol, limoneno, linalol, mirceno, nonanal, sabineno, espatulenol, terpinen 4-ol, *trans*-ocimene, *trans*-cariofileno e 1,4-dimetoxibenzeno (CAPPELARO, YARIWAKE, 2015; SILVA JUNIOR, 2015; REHDER et al., 2006).

Os extratos hidroalcoólicos são as preparações à base de guaco comumente utilizadas em estudos fitoquímicos e comercializadas para fins terapêuticos (GASPARETTO et al., 2013). Baseados em estudos quantitativos utilizando extratos hidroalcoólicos, os metabólitos mais prevalentes nessas preparações são: a cumarina 1,2-benzopirona (SILVA et al., 2008; BUENO, BASTOS, 2009) (Figura 6A), o ácido *o*-cumárico (SANTOS, 2005) (Figura 6B), o ácido caurenóico (YATSUDA et al., 2005; BERTOLUCCI et al., 2009) (Figura 6C), o siringaldeído (AMARAL et al., 2009) (Figura 6D) e a dihidrocumarina (MOURA et al., 2002) (Figura 6E).

Figura 6 – Estruturas químicas: (A) cumarina; (B) ácido *o*-cumárico; (C) ácido caurenóico; (D) siringaldeído e (E) dihidrocumarina.



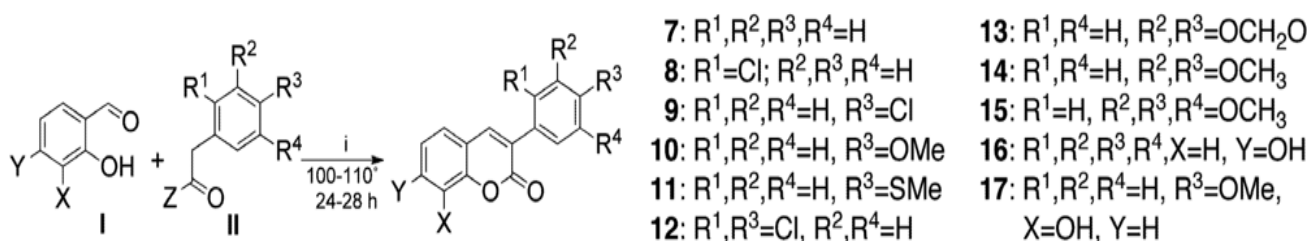
Fonte: ADAPTADO DE GASPARETTO et al., 2013.

A cumarina simples 1,2-benzopirona ocorre em abundância nas folhas da espécie, sendo considerada o principal marcador químico para controle de qualidade de formulações à base de guaco, conforme a Lista de Registros Simplificado de Fitoterápicos da ANVISA, Resolução RE nº 89, de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2004; SILVA et al., 2008).

Diversos trabalhos têm citado as cumarinas como responsáveis por muitas atividades terapêuticas importantes, tais como, anti-inflamatória (BRONIKOWSKA et al., 2012; KONTOGIORGIS et al., 2015), citotóxica e antitumoral (MONTAGNER, 2007; VIANNA, 2011), inibição da replicação do vírus HIV-1 (KOSTOVA, 2006), propriedades antifúngica (MARCONDES et al., 2015), antibacteriana (KOUSAR, ARSHAD, 2015), antioxidante (YU et al., 2005) e atividade contra os herpesvírus HSV-1 e HSV-2 (GHANNADI et al., 2014; SILVEIRA et al., 2009; ZAVRŠNIK et al., 2011).

Olmedo et al. (2012) sintetizaram 14 estruturas químicas derivadas do composto 3-fenilcumarina e avaliaram suas atividades contra dois alvos moleculares do vírus HIV-1. Para a realização dos procedimentos, foram avaliadas as ações das cumarinas sintetizadas sobre as funções da proteína de transcrição Tat e NF-κB (fator nuclear kappa B), em cultura de células transfectadas. Foi observado que as cumarinas de número 10, 11, 13, 15, 16 e 17 mostraram atividade anti-HIV no teste de NF-κB. As cumarinas 10, 11 e 17 mostraram atividade anti-Tat (Figura 7).

Figura 7 – Compostos sintetizados a partir de 3-fenilcumarina.



Para os compostos 7- 15: X,Y=H, Z=OH; (i) dicitohexilcarbodiimida (DCC) em DMSO a 100-110° C por 24- 28h.
Para os compostos 16-17: Z=Cl; (i) acetona, K₂CO₃, refluxo.

Autor: ADAPTADO DE OLMEDO et al.(2012)

Algumas cumarinas com atividade anti-HIV foram identificadas a partir de fontes vegetais. Como exemplo citam-se os calanolídeos A e B, isolados das folhas

de uma árvore de floresta tropical, *Calophyllum lanigenum* Miq. var. *austrororiaceum*, família Guttiferae, encontrada na Malásia. Essas substâncias inibiram a replicação *in vitro* do HIV-1, provavelmente por inibição da atividade enzimática da DNA-polimerase dependente de DNA e da DNA-polimerase dependente de RNA presentes no vírus (VLIETINCK et al., 1998).

2.3.2 Propriedades farmacológicas da *Mikania glomerata* Sprengel

O guaco é utilizado na cultura popular há séculos devido às suas propriedades terapêuticas, que incluem ação tônica, depurativa, antipirética e broncodilatadora, além de estimulante do apetite e antigripal (LORENZI, MATOS, 2008). É ainda empregada no tratamento da asma, bronquite e adjuvante no combate à tosse (AGRA et al., 2008; SILVA et al., 2006; SOARES et al., 2006; TESKE, TRENTINI, 1997).

Apesar de possuir várias indicações terapêuticas populares, somente a ação expectorante sobre as vias respiratórias foi indicada na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 1926). Outros estudos mostraram potencial atividade antialérgica (FIERRO et al., 1999), antimicrobiana (PESSINI et al., 2003), analgésica (RUPPELT et al., 1991), anti-inflamatória (FALCÃO et al., 2005), antioxidante (VICENTINO, MENEZES, 2007) e antidiarréica (SALGADO et al., 2005).

As propriedades terapêuticas do guaco são atribuídas a alguns dos seus principais metabólitos secundários, tais como o ácido *o*-cumárico, ácido caurenóico e a cumarina (CHOI et al., 2011; DOS SANTOS et al. 2006). Embora os resultados obtidos com os ácidos *o*-cumárico e caurenóico sejam promissores, a maioria dos trabalhos disponíveis na literatura atribui os efeitos benéficos do guaco à cumarina (CZELUSNIAK et al., 2012; GASPARETTO, 2013; SANTOS, 2005).

Estudos realizados por Yatsuda et al. (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos etanólico, e das frações hexânicas e de acetato de etila obtidos das folhas de *Mikania glomerata*. As frações do extrato foram testadas contra a cepa de *Streptococcus mutans*. A atividade antibacteriana foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e a inibição da aderência celular a uma

superfície de vidro. Observou-se que a fração hexânica foi eficaz na inibição do crescimento bacteriano e na aderência dos microrganismos a uma superfície de vidro. Os dados indicam que os compostos biologicamente ativos estão presentes principalmente na fração hexânica de extratos obtidos da espécie de *Mikania glomerata* Sprengel.

O tratamento com guaco também está indicado em casos de infecções fúngicas. Freitas et al. (2014) ao avaliar a atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico de *Mikania glomerata* contra isolados clínicos de *Candida albicans* constatou que não houve crescimento fúngico nas concentrações testadas. Portanto, o extrato bruto de guaco apresentou atividade contra 80% dos isolados de *C. albicans*, sugerindo a presença de compostos ativos e a possibilidade de desenvolvimento de um agente antifúngico.

Kaziyama et al. (2012), na pesquisa de fitoterápicos com potencial antiviral, avaliaram a atividade de *M. glomerata* e das espécies *Cymbopogon citratus*, *Equisetum arvense*, *Peumus boldus*, *Solanum paniculatum*, *Malva sylvestris*, *Piper umbellatum* e *Solidago microglossa* contra os herpesvírus bovino (BoHV-1) e suíno (SuHV-1). Os testes foram realizados com base na redução do título viral e os resultados expressos em porcentagem de inibição. O extrato aquoso de guaco apresentou um baixo percentual de inibição para SuHV-1 (PI = 68%) e BoHV-1 (PI = 43%) quando comparado às demais espécies testadas.

Embora a espécie *Mikania glomerata* Sprengel possua muitas propriedades farmacológicas descritas ainda não foi encontrado na literatura relato de atividade desta espécie contra os vírus HSV-1 e HSV-2, sendo este estudo inovador.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiviral do extrato seco de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) frente aos herpesvírus HSV-1 e HSV-2.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato fluido de *Mikania glomerata* Sprengel;
- Obter o extrato seco liofilizado de *Mikania glomerata* Sprengel;
- Caracterizar o extrato seco liofilizado de *M. glomerata* Sprengel quanto ao teor de cumarina por espectrofotometria em ultravioleta-visível e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Determinar o teor de umidade do extrato seco;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato seco em cultura celular da linhagem Vero e avaliar a atividade antiviral frente aos herpesvírus HSV-1 e HSV-2.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) foram coletadas no Horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) no mês de janeiro de 2014 no período da manhã relacionados com uma maior incidência da radiação UV. Uma exsicata de número 42054 está depositada no Herbário Leopoldo Krieger na Universidade Federal de Juiz de Fora.

A escolha do mês de janeiro para a realização da coleta baseou-se em estudos anteriores que demonstraram o efeito da sazonalidade nos teores de cumarina em *M. glomerata*.

Há uma relação entre a intensidade luminosa e a produção de metabólitos secundários tais como a cumarina, uma vez que todas as substâncias produzidas pela planta estão envolvidas, direta ou indiretamente, com a fotossíntese. Já foi demonstrado que maiores teores de cumarina em *Mikania glomerata* foram encontrados em folhas de plantas jovens cultivadas em locais com maior incidência solar (CASTRO et al., 2006).

As cumarinas são derivadas do ácido chiquímico, via orto-hidroxilação catalisada pela enzima trans-cinamato 4- hidroxilase, isomerização cis-trans da dupla ligação da cadeia lateral e lactonização do ácido cinâmico. A isomerização cis trans da dupla ligação da cadeia lateral é catalisada pela luz UV ocasionando a lactonização espontânea. Portanto, maiores teores de cumarina são encontrados em plantas coletadas no período de maior incidência da radiação UV (DEWICK, 2009).

4.2 PREPARO DA AMOSTRA

As folhas frescas, após processo de triagem, foram submetidas à pré-secagem sob temperatura de 22 ± 3 °C por 48 h. Posteriormente, foram transferidas para a estufa de ar circulante para a desidratação, mantidas em temperatura controlada de 35 ± 1 °C até que as folhas estivessem secas e quebradiças. Em seguida, efetuou-se a trituração utilizando máquina tipo picadeiro e moinho de martelo (marca Junqueira - modelo 10 JC6), obtendo-se um pó passado no tamis malha 20

(AMARAL et al., 2009). Esse pó, após resfriamento em temperatura ambiente, foi devidamente embalado em sacos plásticos e envolvido em papel craft.

4.3 PREPARO DO EXTRATO FLUIDO

O extrato fluido de guaco foi obtido empregando-se as técnicas de maceração e percolação, conforme o método de preparação A preconizado na Farmacopéia Brasileira 1ª edição (BRASIL, 1926). Foram utilizados 1 kg de folhas trituradas da planta e solvente etanol/água (70:30 v/v) na proporção de 1:1.

A escolha do solvente etanol/água (70:30 v/v) foi feita baseada em estudos realizados por Rocha et al. (2008) que avaliou diferentes proporções do solvente no processo extrativo de *M. glomerata* para a preparação de tinturas. Foram preparadas tinturas utilizando misturas etanol: água nas seguintes proporções: 0:100, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20 e 94:6. Após determinação do teor de cumarina das amostras por CLAE, os resultados mostraram que uma mistura hidroalcoólica a 70% é capaz de produzir tintura com maior teor em cumarina.

4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO

O método de secagem escolhido foi a liofilização. Esse processo possui a vantagem de não provocar o rompimento das estruturas moleculares e a perda das propriedades organolépticas originais do material vegetal (TSINONTIDES et al., 2004).

O solvente alcoólico foi evaporado em estufa antes de ser submetido ao processo de liofilização. O processo de remoção do solvente alcoólico procedeu-se vertendo 50 mL do extrato fluído de *Mikania glomerata Sprengel* em béquer graduado de 100 mL. Levou-se o béquer em estufa (Estufa de Cultura Fanem 002CB) mantendo a temperatura controlada entre 45°C e 50 °C, durante o período de 48 h. Optou-se pelo processo de secagem em estufa, uma vez que o processo de rotaevaporação resultou em perdas do extrato, que fica aderido ao balão e o processamento de evaporação de cada porção foi lento (SILVA et al., 2012).

O extrato seco liofilizado foi preparado adicionado de 5% de Aerosil[®] como adjuvante para reduzir a higroscopicidade e o efeito de caramelização (SILVA et al., 2012).

A liofilização foi realizada no Laboratório de Análise Instrumental da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Juiz de Fora utilizando-se o equipamento Liofilizador Terroni LS 3000 (São Carlos, Brasil) (Figura 8). As amostras foram pré-congeladas à -80 °C e o tempo total do processo foi de aproximadamente 50 horas, sob pressão inicial de -475 mmHg e temperaturas entre -52 °C e -49 °C (SILVA et al., 2012).

O extrato seco foi utilizado nos ensaios de atividade antiviral, uma vez que o extrato fluido possui etanol em sua composição, que provavelmente interferiria na viabilidade celular das células Vero, podendo comprometer os resultados.

Figura 8 - Equipamento Liofilizador Terroni LS 3000 (São Carlos, Brasil).



Fonte: A AUTORA.

4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DO EXTRATO SECO

O teor de umidade no extrato seco foi determinado em balança de infravermelho (GEHARA, modelo IV2000) do Laboratório de Análises de Alimentos e Águas da Faculdade de Farmácia da UFJF.

Amostras de 1,0 g do extrato seco foram submetidas ao aquecimento máximo de 108 °C em balança de infravermelho pelo período de 2 minutos. A análise foi realizada em duplicata (BORGES et al., 2005).

4.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CUMARINA POR ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS

Primeiramente, foi construída uma curva de calibração a partir do padrão da cumarina 1,2-benzopirona (Fluka, Sigma - Aldrich, São Paulo, Brasil, potência de 99,9%) diluído em metanol/água (80:20 v/v) obtendo-se sete concentrações: 4,8; 5,76; 6,72; 7,68; 8,64; 9,6 e 10,56 µg/mL. As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Modelo Biochoron Libra S12) no comprimento de onda de 275 nm (AMARAL et al., 2009).

A determinação do teor de cumarina presente no extrato seco de guaco consistiu em diluir a amostra em metanol/água (80:20 v/v) obtendo-se a concentração final do extrato de 156,16 µg/mL. A leitura foi realizada em comprimento de onda igual a 275 nm e os teor de cumarina foram calculados a partir da curva de calibração. Os procedimentos foram realizados em triplicata.

4.7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DA CUMARINA 1,2-BENZOPIRONA POR CLAE

As análises cromatográficas para determinação da concentração da cumarina 1,2- benzopirona no extrato seco de guaco foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Foi utilizado cromatógrafo Shimadzu equipado com controlador SCL-10Avp, três bombas LCF-10AD, detector de UV-DAD modelo SPD-M10Avp, *software Shimadzu Class-VP* versão 5.02 e coluna cromatográfica Zorbax SB-C18 (250 x 4.6 mm) (Agilent).

As separações cromatográficas foram realizadas a temperatura de 25 °C, sob eluição isocrática usando como fase móvel os solventes acetonitrila/água (40:60 v/v) sob o fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL e a detecção realizada em comprimento de onda de 274 nm. O tempo de corrida para cada análise foi de 15 min (CELEGHINI et al. 2001; SILVA et al., 2012).

A determinação da cumarina 1,2-benzopirona presente no extrato seco de guaco consistiu em diluir a amostra em acetonitrila/água (40:60 v/v) obtendo-se a concentração final do extrato de 500 µg/mL. O teor de 1,2-benzopirona foi calculado a partir da curva de calibração construída com cinco concentrações (20, 40, 60, 80 e 100 µg/mL) do padrão primário 1,2-benzopirona (Fluka, Sigma-Aldrich). O padrão foi diluído em acetonitrila/água (40:60 v/v). Todas as soluções foram previamente filtradas em filtro Millex[®] antes da injeção no equipamento.

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO EXTRATO SECO DE GUACO

Para a avaliação da atividade antiviral do extrato seco de guaco os testes foram divididos em duas etapas. A primeira etapa consistiu na realização do ensaio de citotoxicidade e teve os seguintes parâmetros analisados: alterações da morfologia celular, análise e cálculo da viabilidade celular e o cálculo da Concentração Citotóxica para 50% das células (CC₅₀). Posteriormente, na segunda etapa realizou-se o ensaio de atividade antiviral, composto por avaliação preliminar da atividade antiviral, teste de titulação e avaliação da redução do título viral.

Os ensaios de citotoxicidade e de atividade antiviral foram realizados no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.8.1 Preparo das amostras

Foram preparadas soluções estoque do padrão de cumarina 1,2-benzopirona e do extrato seco de *M. glomerata* a fim de se obter concentrações de 1000 µg/mL. A solução estoque do padrão de cumarina foi obtida a partir da diluição de 20 mg em 400µL de DMSO e posteriormente o volume foi completado para 20 mL com água destilada. Para o preparo da solução estoque do extrato seco na concentração de 1000 µg/mL de 1,2-benzopirona, foram pesados 291,54 mg do extrato, adicionou-se 400µL de DMSO e posteriormente o volume foi completado para 20 mL com água destilada. O preparo da solução estoque utilizando o extrato seco foi baseado no teor de cumarina encontrado na análise espectrofotométrica (68,6 mg de cumarina/g extrato seco), que está relacionado com a cumarina e o precursor ácido o-cumárico. As soluções foram filtradas em membrana Millipore (0,22 µm), divididos em

pequenos volumes e armazenados a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de utilização.

4.8.2 Cultura celular

Para a realização dos estudos de citotoxicidade e avaliação da atividade antiviral foi utilizada cultura de células Vero (fibroblastos de rim de macaco *Cercopitheccus aethiops*) fornecidas pelo Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas (LEDAC) da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM-Eagle) (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil) acrescido de 0,03 mg/mL de L- glutamina (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), 50 $\mu\text{g/mL}$ de gamicina, 2,5 mg/mL de fungizona (Bristol-Myers-Squibb, New York, USA), solução de bicarbonato de sódio a 0,25% (Merck, Darmstadt, Germany) tampão HEPES 10 mM (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (meio de crescimento) ou sem soro fetal bovino (meio de manutenção) (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil) e incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em ambiente com 5% de CO_2 .

4.8.3 Amostras virais

As amostras de vírus *herpes simplex* humano tipos 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2) utilizadas neste trabalho, fazem parte da coleção do Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas (LEDAC) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Estas cepas virais foram isoladas a partir do fluido de vesículas orais e genitais humanas com características de herpes oral e genital, respectivamente. A caracterização destes vírus foi realizada no Laboratório de Virose Respiratórias, Entéricas e Oculares (LAVIREO), da UFRJ, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), empregando *primers* específicos para a identificação de HSV-1 e HSV-2 (MARKOULATOS et al., 2001).

4.8.4 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado com o objetivo avaliar a toxidez do extrato em células Vero e estabelecer as concentrações a serem utilizadas no

ensaio de avaliação da atividade antiviral. A análise da citotoxicidade foi realizada a partir da observação de alterações morfológicas das células (DE CLERCQ et al., 1980), assim como da viabilidade das mesmas após o tratamento com soluções contendo diferentes concentrações do extrato seco e do padrão de cumarina 1,2-benzopirona (BORENFREUND, PUERNER, 1985).

4.8.4.1 *Morfologia celular*

Foram realizadas diluições seriadas das soluções estoque do extrato seco e do padrão de cumarina a fim de se obter soluções nas seguintes concentrações de cumarina: 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6; 7,8 µg/mL. O diluente utilizado nessas diluições foi o MEM-Eagle sem adição do SFB.

Em uma microplaca de 96 poços, as Células Vero foram distribuídas em meio MEM suplementado e incubadas em estufa a 37 °C até a formação de monocamada confluenta. Após a formação da monocamada confluenta, o meio MEM suplementado com SFB foi removido e foram adicionadas 100 µL das soluções de diferentes concentrações do extrato e do padrão diluídos em MEM sem adição do SFB. Cada concentração das soluções foi testada em quadruplicata.

Nas células utilizadas como controle foram adicionadas 100 µL de meio MEM sem SFB. As células foram incubadas por 48 h a 37 °C, em ambiente com 5% de CO₂. Após o tempo de incubação, a morfologia celular foi examinada em microscópio óptico invertido (Leitz-Germany 633456) e as células tratadas foram comparadas ao grupo controle (células tratadas apenas com MEM, sem a presença do extrato ou do padrão) e células tratadas com o composto antiviral padrão Aciclovir (Sigma Chemical 212 Company, EUA).

A maior concentração observada de cada amostra, que não provocou alteração morfológica das células, foi denominada Concentração Máxima Não Tóxica (CMNT). Os resultados obtidos na avaliação da morfologia celular, juntamente com os resultados obtidos no ensaio de viabilidade celular foram avaliados para determinar as concentrações a serem utilizadas nos estudos de atividade antiviral.

4.8.4.2 Viabilidade celular

A observação da morfologia celular permite avaliar as células que sofreram alterações morfológicas, porém não é possível determinar a quantidade de células que permaneceram verdadeiramente viáveis.

O efeito do extrato seco de guaco e do padrão da cumarina 1,2-benzopirona na viabilidade celular foi determinado através da técnica *dye-uptake* com pequenas modificações (BORENFREUND, PUERNER, 1985). A técnica consiste na incorporação do corante vermelho neutro pelas células vivas e sua posterior quantificação espectrofotométrica em aparelho Leitor de Elisa (ELx 800 Bio-Tek) no comprimento de onda 490 nm.

A porcentagem de células viáveis foi obtida pela fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(\text{DO do grupo controle}) - (\text{DO do grupo tratado})}{(\text{DO do grupo controle})} \times 100$$

Onde, DO corresponde à densidade óptica medida em espectrofotômetro.

Foram consideradas concentrações não tóxicas aquelas que mantiveram no mínimo 80% das células viáveis. A partir dos resultados obtidos, foi possível calcular a concentração citotóxica 50% (CC₅₀) do extrato seco e do padrão de cumarina, que é definido como a concentração que causa uma redução de 50% no número de células viáveis.

4.8.5 Ensaio de Atividade antiviral

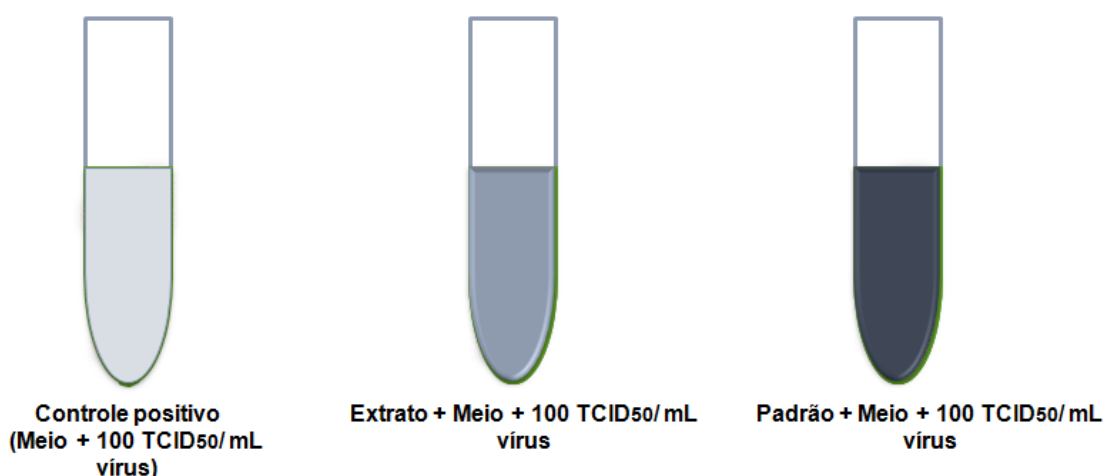
4.8.5.1 Triagem

O processo de triagem consistiu na avaliação preliminar da atividade antiviral a fim de avaliar a ocorrência de inibição da replicação viral na CMNT do extrato de guaco e do padrão cumarina.

Em tubos, as Células Vero foram distribuídas em meio MEM suplementado e incubadas em estufa a 37 °C até a formação de monocamada confluenta. Após este período, o meio MEM suplementado com SFB foi removido. Em tubos utilizados como controle positivo (infecção viral) as células foram adicionadas de 100

TCID₅₀/mL de HSV-1 ou HSV-2. Para avaliar se as amostras exerciam alguma atividade de inibição viral em concentrações não tóxicas para as células Vero, as monocamadas de células adicionadas da suspensão viral (100 TCID₅₀/mL) foram tratadas com soluções do extrato ou da cumarina padrão em suas respectivas CMNT (Figura 9).

Figura 9 – Representação esquemática do teste de triagem



Fonte: A AUTORA.

Os tubos foram incubados por 48 h a 37 °C, em ambiente com 5% de CO₂. Após período de infecção, a morfologia celular foi examinada em microscópio óptico invertido e as células tratadas foram comparadas ao grupo controle (células tratadas apenas com MEM e vírus, sem a presença do extrato ou do padrão) buscando-se identificar o efeito citopático (CPE).

As células infectadas foram lisadas através de ciclos de congelamento e descongelamento e os sobrenadantes obtidos foram separados para posterior ensaio de determinação do título viral.

O processo de triagem apresenta-se como um ensaio qualitativo, não sendo possível mensurar o percentual de inibição viral proporcionado pelas amostras. Como forma de quantificá-lo foram realizados os ensaios de titulação e redução de título viral.

4.8.5.2 Titulação dos vírus

O processo de titulação de uma determinada alíquota de vírus consiste em quantificar o número de partículas virais presentes no meio celular que são capazes de infectar um determinado organismo (FREITAS, 2001).

Para a determinação do título viral, as suspensões virais (HSV-1 e HSV-2), obtidas no teste de triagem, foram submetidas a diluições logarítmicas decimais (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}) utilizando-se o meio de manutenção celular (MEM sem SFB) como diluente. Cada diluição foi inoculada em monocamadas de células confluentes (microplaca com 96 poços) após a substituição do meio de crescimento pelo de manutenção. As células inoculadas foram incubadas por 48 h a 37 °C, em ambiente com 5% de CO₂.

Ao término do período de incubação, as células foram examinadas em microscópio óptico invertido e comparadas ao grupo controle (células tratadas apenas com MEM, sem vírus).

Os resultados possibilitaram a determinação das concentrações virais capazes de produzir o efeito citopático (CPE) em 50% das culturas de células (TCID₅₀) por mL, de acordo com o cálculo estabelecido por Reed e Muench (1938). Nos experimentos para a avaliação da atividade antiviral, foram empregadas concentrações 100 TCID₅₀/mL da suspensão viral.

4.8.5.3 Redução do título viral

O ensaio de redução do título infeccioso viral foi utilizado para avaliar quantitativamente a inibição viral provocada pelos materiais-teste (extrato seco de *M. glomerata* e cumarina 1,2-benzopirona). Esta técnica foi realizada de acordo com a metodologia de Reed e Muench (1938).

Inicialmente, em microplacas de 96 poços, monocamadas de células Vero foram tratadas com soluções do extrato seco de *Mikania glomerata*, em diferentes concentrações (razão 1:2), a partir da concentração máxima não-tóxica estimada nos experimentos anteriores. As células tratadas foram infectadas com 100 TCID₅₀/mL das suspensões virais (HSV-1 ou HSV-2). O mesmo procedimento foi realizado para o padrão cumarina 1,2-benzopirona.

As células foram incubadas a 37 °C por 48 h em ambiente com 5% de CO₂. O

grupo controle positivo consistiu em tratar as células com o fármaco antiviral aciclovir na CMNT de 200 µg/mL.

Ao término do tempo de incubação, as culturas de células foram submetidas ao processo de congelamento e descongelamento, e os sobrenadantes obtidos nos poços das microplacas, incluindo os dos controles (culturas de células incubadas com os vírus sem as amostras) foram removidos e reservados.

Foram realizadas diluições logarítmicas decimais (10^{-1} - 10^{-7}) desses sobrenadantes utilizando o meio MEM sem SFB como diluente. Essas soluções diluídas foram colocadas em contato com monocamadas confluentes de células Vero sendo em seguida incubadas a 37 °C por 48 h em ambiente com 5% de CO₂.

Concluído o segundo período de incubação, as células foram examinadas em microscópio óptico invertido e comparadas aos controles possibilitando observar a presença ou a ausência de focos infecciosos causados pelos vírus.

Com base no método estatístico de Reed e Muench (1938), foi possível determinar os títulos virais, após inoculação em presença das amostras, expressos em TCID₅₀/mL. O grau de atividade antiviral de cada amostra foi expresso em Porcentagem de Inibição (PI), de acordo com a fórmula proposta por Nishimura e colaboradores (1977):

$$PI = [1 - (\text{antilog } T / \text{antilog } C)] \times 100$$

Onde T representa as unidades infecciosas na cultura de células na presença das amostras, e C representa as unidades infecciosas na cultura de células na ausência das amostras (controle).

4.8.6 Determinação da curva dose-resposta

A partir dos valores de percentuais de inibição viral encontrados para cada uma das concentrações de soluções de extrato seco de guaco e padrão cumarina, foi construído um gráfico: concentração da amostra x porcentagem de inibição. Com a análise do gráfico, que expressa uma curva dose-resposta, foi possível determinar a concentração capaz de inibir em 50% a replicação viral (CE₅₀) e o índice de seletividade (IS = CC₅₀/CE₅₀).

4.8.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa *GraphPad Prism* 6. Os valores obtidos no ensaio da citotoxicidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Bonferroni. Utilizou-se um intervalo de confiança de 95%; logo, valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO

O extrato seco obtido por liofilização foi um pó fino de coloração bege claro (Figura 10). A partir de 50 mL do extrato fluido foi obtido após o processo de liofilização $9,9 \pm 0,63$ g do extrato seco, o que corresponde a um rendimento de aproximadamente 19,8%.

Figura 10 - Extrato liofilizado de *Mikania glomerata*



Fonte: A AUTORA

O Aerosil[®] (dióxido de silício coloidal), adjuvante adicionado ao extrato na concentração de 5% antes do processo de liofilização, mostrou-se como um excipiente adequado para a redução da higroscopicidade e do efeito de caramelização.

Silva et al. (2012), em estudos conduzidos para a obtenção de extratos secos de *Mikania glomerata* Sprengel por liofilização e *spray-dryer* utilizaram dois adjuvantes: o Aerosil[®] e a Maltodextrina. Os estudos concluíram que os extratos secos obtidos por liofilização adicionados de Aerosil[®] resultaram em uma forma farmacêutica estável. O Aerosil[®] propiciou, em ambas as técnicas, a obtenção de um extrato seco com maior índice de rendimento de cumarina quando comparado ao adjuvante maltodextrina. Em relação aos processos de secagem utilizados neste trabalho, a técnica de liofilização possibilitou um maior rendimento no teor de cumarina na presença dos adjuvantes Aerosil e Maltodextrina, em comparação a técnica de atomização em *spray-dryer*.

Estudos realizados por De Souza et al. (2000) compararam extratos secos de *Passiflora edulis Sims*, adicionados de Aerosil[®], hidrolisado de gelatina (Gelita-Sol P) e a mistura dos dois excipientes em diferentes proporções, e concluíram que os extratos adicionados de Aerosil[®] apresentaram melhores características tecnológicas.

De Paula et al. (1998) avaliaram a influência da composição qualitativa na secagem de soluções extrativas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. A substituição do dióxido de silício coloidal por β -ciclodextrina ou por celulose microcristalina teve efeito negativo sobre a estabilidade dos produtos obtidos frente à umidade residual.

No Brasil encontram-se registrados mais de 500 medicamentos fitoterápicos, dos quais mais de 70% apresentam-se como formas farmacêuticas sólidas (CARVALHO et al., 2008). A matéria-prima para estes produtos é constituída, majoritariamente, por extratos secos, os quais dentre as suas vantagens incluem a maior estabilidade química, físico-química e microbiológica, mais fácil padronização, maior concentração de compostos ativos e mais elevada capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas (OLIVEIRA, PETROVICK, 2010). Neste contexto, sugere-se a utilização do extrato seco de guaco obtido por processo de liofilização e adicionado de adjuvante Aerosil, para a obtenção de formas farmacêuticas.

5.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE

O excesso de água em matérias-primas vegetais possibilita a ação de enzimas e o desenvolvimento de fungos e bactérias (BARNI, 2009; FARIAS, 2003). No presente estudo, o extrato seco de guaco apresentou o teor de umidade de 7,25%. Portanto, o processo de liofilização com a adição do Aerosil[®] 5% contribuiu positivamente para a obtenção de uma matéria prima vegetal.

A influência da concentração de Aerosil[®] foi analisada por Oliveira e Petrovick (2010) na secagem de soluções extrativas de *Maytenus ilicifolia Martius ex Reissek*. A adição deste adjuvante a 10% e a 20%, em relação ao teor de sólidos na solução extrativa, causou redução significativa na higroscopicidade dos produtos secos evitando a formação de aglomerados.

5.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CUMARINA POR ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS

Utilizando-se a equação da curva do padrão primário da cumarina 1,2-benzopirona obtido pela média das absorbâncias ($y = 0,0658x + 0,0186$; $R^2=0,9879$), verificou-se que a concentração de cumarina presente no extrato seco de guaco foi de 68,6 mg/g de extrato.

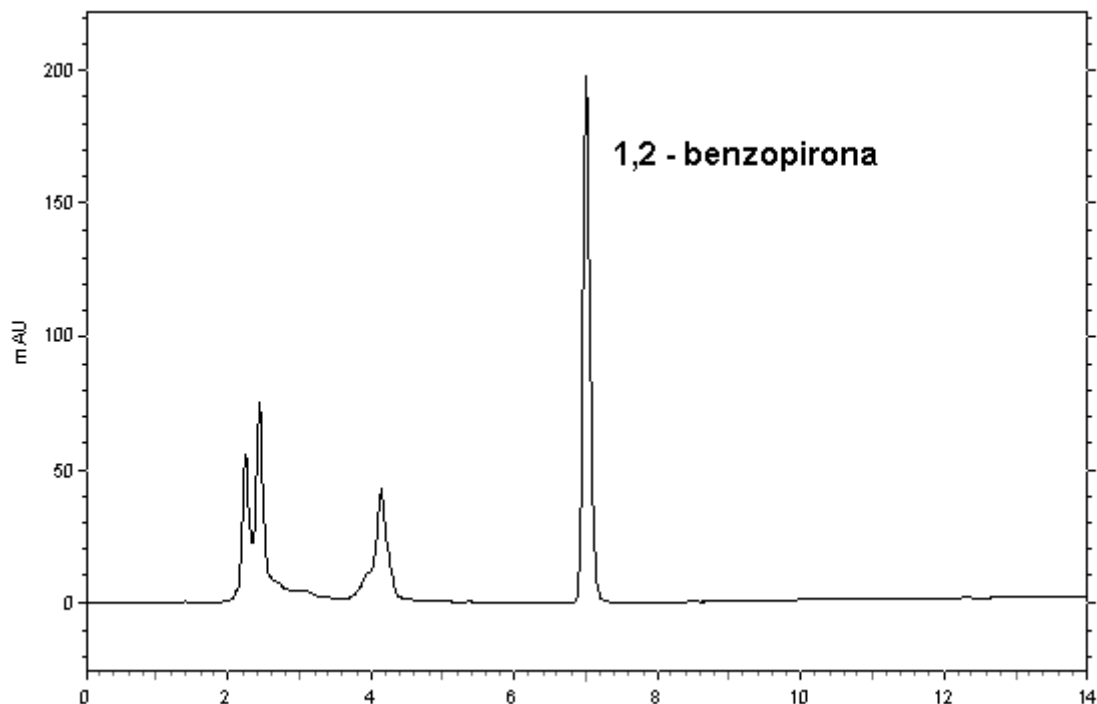
O resultado do teor de cumarina encontrado assemelha-se aos resultados obtidos por Silva et al. (2012) que obtiveram 47,91 mg/g de cumarina no extrato seco de guaco também obtido por liofilização e adicionado de Aerosil®.

A cumarina, principal constituinte químico da espécie *M. glomerata*, é biossintetizado a partir do ácido *o*-cumárico, o seu precursor natural (SIMÕES et al., 2002). Este composto já foi identificado em extratos hidroalcoólicos de *M. glomerata* (MOURA et al. 2002; PEREGRINO, LEITÃO, 2005; SANTOS, 2005) e quantificados em comprimentos de onda variando entre 254-275 nm. De acordo com a metodologia adotada e os resultados apresentados neste trabalho, sugere-se que o ácido *o*-cumárico seja um interferente na quantificação do teor de cumarina por espectrofotometria UV/VIS, justificando um maior teor de cumarina encontrada por espectrofotometria (68,6 mg/g) quando comparado ao valor encontrado por CLAE (24,6 mg/g).

5.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CUMARINA POR CLAE

A equação da reta obtida por regressão linear para a curva padrão da cumarina 1,2-benzopirona (20-100 µg/mL) foi $y = 86375x + 342989$. O coeficiente de correlação (r) obtido foi de 0,9984, denotando o comportamento linear na faixa de concentração avaliada.

A partir dos cálculos utilizando a curva padrão obteve-se o resultado do teor da cumarina 1,2-benzopirona de 24,6 mg/g de extrato seco. A figura 11 apresenta o perfil cromatográfico do extrato liofilizado de *M. glomerata* e o pico correspondente a cumarina 1,2-benzopirona pode ser observado no tempo de retenção de aproximadamente 7 minutos.

Figura 11 - Perfil cromatográfico do extrato liofilizado de *Mikania glomerata*.

Condições cromatográficas: eluição isocrática com acetonitrila:água (40:60 v/v), fluxo 1 mL/min, temperatura do forno de 30 °C, detecção no comprimento de onda de 275 nm e volume de injeção de 20 µL.

Resultados semelhantes foram observados por Silva et al. (2012) que obtiveram o teor da cumarina 1,2-benzopirona de 17,7 mg/g no extrato seco de guaco obtido por processo de liofilização adicionado do adjuvante Aerosil®.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

5.5.1 Ensaio de Citotoxicidade

Para a avaliação da potencial ação antiviral de uma amostra qualquer, é indispensável a avaliação prévia de sua possível toxicidade em relação às células permissivas ao vírus em estudo, uma vez que, um agente antiviral ideal deve inibir o ciclo de replicação viral, interferindo o mínimo possível na estrutura e metabolismo das células hospedeiras (VANDEN- BERGHE, VLIETINCK, VAN-HOOF, 1986).

A citotoxicidade foi definida por Nardone, em 1977, como sendo o conjunto de alterações da homeostase celular, que provoca uma série de modificações,

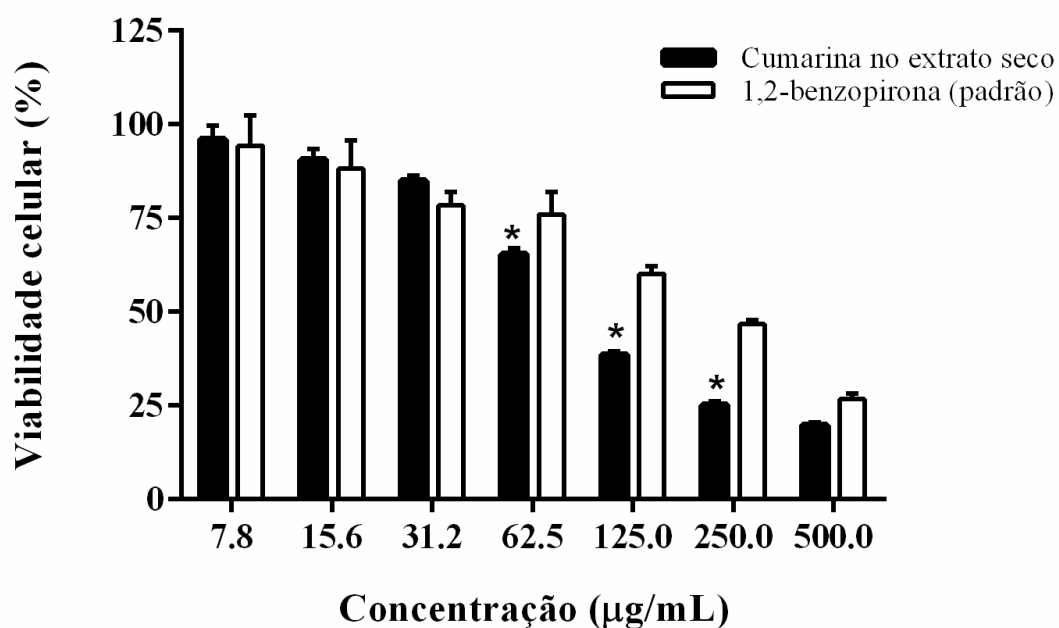
interferem na capacidade adaptativa das células, bem como na sua sobrevivência, multiplicação e realização de suas funções metabólicas. Desta forma, o comportamento das células frente a uma amostra qualquer pode ser evidenciado pela desorganização da monocamada celular acompanhada do aspecto granuloso e arredondado das células (STREISSLE, SCHWOBEL, HEWLETT, 1981).

Inicialmente, o estudo do efeito citotóxico do extrato seco de guaco e do padrão cumarina 1,2-benzopirona frente às células Vero foi realizado avaliando-se a concentração máxima da amostra que não causa alterações celulares visíveis ao microscópio de luz (DE CLERCQ et al., 1980). Esta etapa ocorre nos estágios iniciais da pesquisa (MELO et al., 2000).

Posteriormente, determinou-se a viabilidade celular através da técnica de *dye-uptake*, com pequenas modificações, utilizando o corante vital vermelho neutro (BORENFREUND, PUERNER, 1985). O procedimento de análise faz-se a partir de um ensaio de sobrevivência/viabilidade celular, baseado na capacidade de as células viáveis incorporarem e combinarem o corante dentro de seus lisossomos. O vermelho neutro é uma substância catiônica fraca que penetra na membrana celular e se acumula intracelularmente nos lisossomos (GRIFFON et al., 1995). As mudanças de superfície celular e/ou de membrana lisossômica sensível levam à fragilidade da célula e seu posterior rompimento com a utilização de solventes específicos. Assim, é possível distinguir células viáveis, danificadas ou mortas. A quantidade de corante incorporado às células é medida por espectrometria, e é diretamente proporcional ao número de células com membrana intacta (PITHON et al., 2009).

A avaliação das alterações morfológicas das células Vero assim como da viabilidade celular, após o tratamento com o extrato seco de guaco e com 1,2-benzopirona, possibilitaram a determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT) e da concentração citotóxica para 50% das células em cultura (CC₅₀) (Figura 12).

Figura 12 – Efeito citotóxico do extrato seco de *Mikania glomerata* e da cumarina 1,2-benzopirona em cultura de células Vero.



Os valores representam a média \pm DP de quatro experimentos.

* $p < 0.05$ diferença significativa entre os tratamentos, usando ANOVA de duas vias (Two-Way ANOVA), seguido do teste de comparação Bonferroni.

O extrato seco de *Mikania glomerata* e o padrão cumarina 1,2-benzopirona apresentaram valores de CMNT iguais a 31,2 $\mu\text{g/mL}$. Para o controle aciclovir observou-se valor de CMNT superior a 200 $\mu\text{g/mL}$.

Foram encontrados diferentes valores de CC_{50} para as amostras analisadas. O extrato seco de guaco apresentou valor de CC_{50} igual a 101 $\mu\text{g/mL}$ (referente ao teor de cumarina), enquanto para o padrão cumarina 1,2- benzopirona observou-se uma menor toxicidade ($\text{CC}_{50} = 220 \mu\text{g/mL}$). O controle aciclovir apresentou valor de CC_{50} superior a 250 $\mu\text{g/mL}$.

A partir dos resultados da citotoxicidade foi possível estabelecer que as concentrações superiores a 31,2 $\mu\text{g/mL}$ da solução de extrato seco de guaco e do padrão da cumarina resultaram em alterações na morfologia celular. Consideraram-se as CMNT onde pelo menos 80% das células permaneceram viáveis.

As amostras testadas apresentaram também valores CC_{50} que indicam uma maior citotoxicidade quando comparadas ao controle Aciclovir ($\text{CC}_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$), fármaco de referência para o tratamento das infecções por HSV-1 e HSV-2 (TAGLIARI, KELMANN, DIEFENTHALER, 2012).

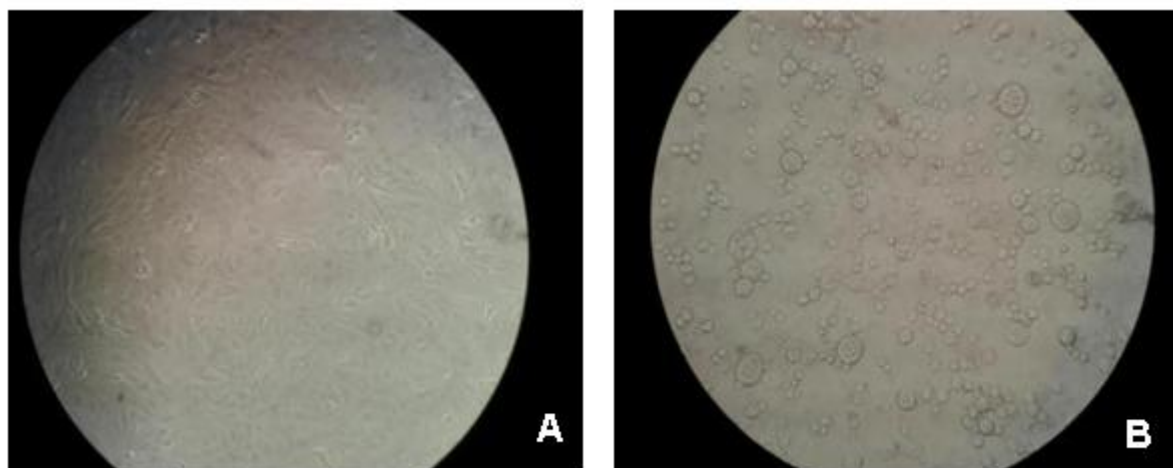
Apesar de ser considerado eficaz e seguro no tratamento das lesões herpéticas, o Aciclovir está relacionado ao surgimento de cepas virais resistentes, principalmente em pacientes com deficiência imunológica ou em uso de imunossupressores (DADALTI et al., 2004). Dessa forma, torna-se necessária a descoberta de novas terapias antivirais de baixo custo e toxicidade chamando atenção para a pesquisa de substâncias naturais provenientes de plantas medicinais (ASTANI, NAVID, SCHNITZLER, 2014).

5.5.2 Ensaio de Atividade Antiviral

5.5.2.1 *Triagem*

A triagem antiviral foi realizada a fim de avaliar se as substâncias testadas (solução de extrato seco de guaco e padrão cumarina) na CMNT possuíam propriedades antivirais, ou seja, inibiram o efeito citopático viral (REED, MUENCH, 1938). Por definição, efeito citopático (ECP) é um conjunto de modificações provocadas pelas partículas virais nas células hospedeiras. No caso do herpesvírus, o efeito citopático se expressa pelo aparecimento de células arredondadas, brilhantes, frequentemente ligadas umas as outras por prolongamentos citoplasmáticos formando focos de infecção. Esses focos têm aspecto característico de cacho de uva, que se estendem pelo tapete celular, desorganizando-o (GIRARD, HIRTH, 1989) (Figuras 13A e 13B).

Figura 13 - Células Vero: A: célula sem alteração morfológica; B: célula com alteração da morfologia devido à infecção por HSV (efeito citopático).



Fonte: Imagens cedidas pelo Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas – UFRJ.

Os resultados do teste de triagem mostraram um potencial de inibição viral do extrato testado contra HSV-1 e HSV-2. A cumarina isolada apresentou atividade somente para HSV-1.

Por ser um ensaio qualitativo, a triagem não possibilita a quantificação do percentual de inibição das substâncias analisadas, sendo necessária a realização do ensaio de titulação.

5.5.2.2 Redução do título viral

O extrato seco de *M. glomerata* e a 1,2-benzopirona foram testados *in vitro* para atividade antiviral contra HSV-1 e contra o HSV-2 através da observação da redução do título viral. O título viral foi calculado pelo método estatístico de Reed e Muench (1938) e expresso como dose infectante para 50% dos cultivos celulares (TCID₅₀) por mL. A partir desses valores, foi realizado o cálculo do percentual de inibição (PI).

Inicialmente, o extrato e o padrão de cumarina foram submetidos a diluições seriadas, a partir da concentração em que pelo menos 80% das células permaneceram viáveis conforme observado no teste de citotoxicidade. Foram testadas quatro concentrações: 31,2; 15,6; 7,8 e 3,9 µg/mL. O grupo controle positivo consistiu no tratamento das células com o aciclovir na CMNT de 200 µg/mL.

O extrato seco de guaco apresentou capacidade de inibição viral contra os dois vírus analisados. A cumarina isolada não exibiu atividade antiviral (PI = 0%) para o HSV-2 em nenhuma das diluições testadas, mostrando-se ativo apenas contra HSV-1 (PI = 68,4%) na concentração de 31,2 µg/mL. O extrato seco de guaco apresentou atividade contra HSV-1 na concentração de 15,6 µg/mL (PI = 87,7%) e contra HSV-2 na máxima concentração testada de 31,2 µg/mL (PI= 92,7%) (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade antiviral expressos em Porcentagem de inibição (PI).

Amostras	% de inibição (PI)	
	HSV-1	HSV-2
Extrato de <i>M. glomerata</i>	87,7	92,7
Cumarina 1,2-benzopirona	68,4	0
Aciclovir	99,9	99,9

É importante ressaltar que o extrato de guaco e a cumarina, empregada nos testes como padrão de referência, apresentaram diferentes níveis de citotoxicidade e de atividade antiviral. O extrato apresentou melhor atividade antiviral, quando comparado com o padrão. Pode-se atribuir a este fato que a atividade antiviral do extrato de guaco contra o HSV-1 e HSV-2 não seja devido somente à presença da cumarina 1,2 - benzopirona, na planta em estudo, visto que o padrão por si só não apresentou um resultado satisfatório, mas também pelo efeito sinérgico deste composto com os demais constituintes químicos tais como os ácidos caurenóico, o-cumárico e cinamoilgrandiflórico.

A espécie *Mikania glomerata* possui muitos compostos químicos identificados, tais como, cumarina, ácidos e ésteres diterpênicos, terpenos, saponinas, taninos (GASPARETO, 2013). Apesar de alguns desses compostos possuírem atividade antiviral descrita na literatura (AMOROS, SIMÕES, GIRRE, 1992; FERREIRA et al., 2010; LÜCKEMEYER, 2009; SIMÕES et al., 2010), ainda são necessárias avaliações mais específicas para poder atribuir a atividade antiherpética observada no extrato bruto de guaco a esses compostos.

Os valores dos percentuais de inibição viral encontrados para cada uma das diferentes concentrações das amostras permitiram o cálculo do CE₅₀, concentração do capaz de inibir em 50% a replicação viral (Tabela 2).

Com o CC₅₀ e CE₅₀ foi possível determinar o índice de seletividade (IS = CC₅₀/CE₅₀), que expressa o indicativo de segurança da substância testada, e dessa forma possibilita a realização de estudos posteriores mais detalhados tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (COEN, RICHMAN, 2007; DEZENGRINI et al., 2009). Valores de IS superiores a 4 são considerados positivos e quanto maior for esse valor, mais promissor é considerado o extrato avaliado (AMOROS, SIMÕES, GIRRE, 1992).

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram os valores de CE_{50} e índices de seletividade do extrato seco tanto para o HSV-1 quanto para o HSV-2, significando que o extrato de guaco estudado é promissor e apresenta indicativos de segurança.

Tabela 3 - Valores da concentração capaz de inibir em 50% a replicação viral (EC_{50}) e o índice de seletividade ($IS = CC_{50}/EC_{50}$)

Amostras	HSV-1		HSV-2	
	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IS	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IS
Extrato de <i>M. glomerata</i>	7,4	13,6	24,0	3,7
1,2-benzopirona	27,0	8,1	-	-
Aciclovir	0,8	> 250,0	1,38	> 144,9

Estudos conduzidos por Ghannadi et al. (2014) avaliaram a atividade antiviral de cumarinas sesquiterpênicas de *Ferula assa-foetida* contra HSV-1. As avaliações da citotoxicidade e atividade antiviral mostraram que a cumarina sesquiterpênica identificada como Kellerin inibiu os efeitos citopáticos e reduziu o título viral do vírus HSV-1.

Silveira et al. (2009) avaliaram os efeitos citotóxico, antioxidante e antiviral *in vitro* de extratos etanólicos das plantas *Pterocaulon alopecuroides* e *Bidens segetum* ricos no metabólito secundário cumarina. O extrato etanólico de *P. alopecuroides* foi inativo contra o vírus *Herpes simplex* tipo 1, entretanto, apresentou atividade inibitória contra o vírus *Herpes simplex* tipo 2 resistente ao Aciclovir. A cumarina 7-(2',3'-dihidroxi-3'-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina, isolada de seu extrato bruto e testada sob as mesmas condições, demonstrou um índice de inibição viral quase duas vezes maior do que o da amostra de *P. alopecuroides* para HSV-2 resistente ao Aciclovir.

Vale ressaltar o potencial inovador do uso do extrato de guaco no tratamento de infecções por herpesvírus, uma vez que não foi encontrado, ainda, na literatura

nenhum trabalho mostrando a atividade da *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) frente aos herpesvírus HSV-1 e HSV-2.

O ensaio antiviral realizado neste trabalho possibilitou identificar a espécie *Mikania glomerata* como promissora, entretanto são necessários experimentos que associem os compostos químicos presentes nessa planta com a atividade encontrada, além dos mecanismos de ação envolvidos.

6 CONCLUSÃO

Apesar de o aciclovir ser a primeira escolha para o tratamento de infecções causadas pelos herpesvírus, percebe-se a necessidade do desenvolvimento farmacêutico de novos agentes antivirais com diferentes mecanismos de ação.

Os resultados do presente estudo mostraram a atividade antiviral do extrato de guaco contra o HSV-1 e, principalmente, contra o HSV-2, e que a atividade antiviral do extrato seco de guaco foi superior ao padrão primário de cumarina 1,2-benzopirona.

Esses resultados sugerem a presença de outros metabólitos no extrato seco de guaco, que pode atuar em sinergismo, contribuindo para a atividade deste extrato contra o vírus *herpes simplex*.

Diante dos resultados da atividade antiviral do extrato de guaco frente aos herpesvírus, principalmente ao HSV-2, sugere-se a incorporação desse extrato em formulações tópicas tais como sabonetes, cremes e pomadas com o objetivo de proporcionar um tratamento alternativo para as infecções por herpesvírus.

Embora o presente estudo esteja em seu estágio inicial, os resultados observados fornecem um apoio importantes para futuras pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novos agentes anti-HSV.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p. 472-508, 2008.
- AMARAL, M.P.H. et al. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, p. 607-611, abr.- jun. 2009.
- AMOROS, M.; SIMÕES, C.M.O.; GIRRE, L. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**, v.55, n.12, p. 1732-40, 1992.
- ASTANI, A.; NAVID, M.H.; SCHNITZLER, P. Attachment and Penetration of Acyclovir resistant Herpes Simplex Virus are Inhibited by *Melissa officinalis* Extract. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 10, p. 1547–1552, 2014.
- AZAMBUJA, T.W.F.; BERCINI, F.; FURLANETTO, T.W. Herpes simples: revisão da literatura. **Revista Faculdade Odontologia de Porto Alegre**, v. 45, n. 2, p. 43-46, dez. 2004.
- BACHE, M. et al. Antiviral drug-resistance typing reveals compartmentalization and dynamics of acyclovir-resistant herpes simplex virus type-2 (HSV-2) in a case of neonatal herpes. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 3, n. 2, p. 24-27, 2014.
- BARNI, S.T.; CECHINEL FILHO, V.; COUTO, A.G. Caracterização química e tecnológica das folhas, caules e planta inteira da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., Convolvulaceae, como matéria-prima farmacêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.4, out./dez. 2009.
- BERTOLUCCI, S. K. et al. Development and validation of an RP-HPLC method for quantification of cinnamic acid derivatives and kaurane-type diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Planta médica**, v. 75, n. 3, p. 280-285, 2009.
- BILLAUD, G.; THOUVENOT, D.; MORFIN, F. Drug targets in herpes simplex and Epstein Barr virus infections. **Infectious Disorders Drug Targets**, v. 9, p. 117-125, 2009.
- BOLINA, R.C., GARCIA, E.F., DUARTE, M.G.R. Estudo comparativo da composição química das espécies vegetais *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1, p. 294-298, 2009.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Letters**, v.24, n. 2-3, p.119-124, feb./mar.1985.

BORGES, D.B. et al. Comparação das metodologias da Farmacopéia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek e *Passiflora alata* Curtis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n. 3, p. 229-236, jul./set. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. 1ed. Brasília: Anvisa, 2011

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. Estados Unidos do Brasil: Companhia Editora Nacional, 1926.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 89, de 16 de março de 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

_____. Instrução Normativa nº. 5. Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos, Brasília-DF. 2008.

_____. Portaria nº. 3.237 de 24 de dezembro de 2007. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 dez. 2007.

_____. Portaria nº 533, de 28 de março de 2012. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 mar. 2012.

_____. Portaria nº. 2.982, de 26 de novembro de 2009. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1 dez. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ideal, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos. Brasília-DF, 2006.

BRONIKOWSKA, J. et al. The Coumarin Psoralidin Enhances Anticancer Effect of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL). **Molecules**, v.17, n.6, p. 6449-6464, mar. 2012.

BUENO, P.C.P.; BASTOS, J.K. A validated capillary gas chromatography method for guaco (*Mikania glomerata* S.) quality control and rastreability: from plant biomass to phytomedicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 218-223, 2009.

CABRAL, L.M.; DOS SANTOS, T.C.; ALHAIQUE, F. Development of a profitable procedure for the extraction of 2-H-1-benzopyran-2-one (coumarin) from *Mikania*

glomerata. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, n.1, p.103-106, 2001.

CAPPELARO, E. A.; YARIWAKE, J.H. HS-SPME-GC-MS analysis of volatile and semi-volatile compounds from dried leaves of *Mikania glomerata* Sprengel.

Química Nova, v. 38, n. 3, p. 427-430, 2015.

CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; MALTA, M. R.; CARDOSO, M. G.; SILVA, F. A. M. Coumarin Contents in young *Mikania glomerata* Plants (Guaco). under different Radiation Levels and Photoperiod. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 25, n. 3, p. 387-92, 2006.

CARVALHO, A.C.B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CECÍLIO, A.B. et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 975-981, 2012.

CELEGHINI, R.M.S.; VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F. M. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng: ('guaco') Leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.12, n.6, p.706–709, 2001.

CHOI, R. J. et al. Inhibitory effects of kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. **Phytomedicine**, v. 18, n. 8, p. 677-682, 2011.

CLEMENS, S.A.C.; FARHAT, C.K. Seroprevalence of *herpes simplex* 1-2 antibodies in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 4, p. 726-34, ago. 2010.

COEN, D.M.; RICHMAN, D.D. Antiviral agents. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 5 ed. Philadelphia: Williams and Wilkins, 2007. 5 v., p.447-485.

CONSOLARO, A.; CONSOLARO, M.F.M. Diagnóstico e tratamento do herpes simples recorrente peribucal e intrabucal na prática ortodôntica. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 14, n. 3, p. 16-24, maio/jun. 2009.

CZELUSNIAK, K.E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.

DADALTI, P. et al. Estudo comparativo entre a aplicação tópica de sulfadiazina de prata+ nitrato de cério e aciclovir no tratamento do herpes labial. **Revista Brasileira Medicina**, v. 61, p. 8, 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed. British: John Wiley & Sons, 2009.

DE CLERCQ, E. et al. Comparative efficacy of antiherpes drugs against different strains of herpes simplex virus. **Journal of Infectious Diseases**, v.141, n.5, p. 563-574, 1980.

DE PAULA, I. C.; ORTEGA, G. G.; BASSANI, V. L.; PETROVICK, P.R. Development of ointment formulations prepared with *Achyrocline satureioides* spray-dried extracts. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.24, p. 235-241, 1998.

DE SOUZA, K.C.B. et al. The Adjuvants Aerosil 200 and Gelita-Sol-P Influence on the Technological Characteristics of Spray-Dried Powders from *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n.3, p. 331-336, 2000.

DEZENGRINI, R. et al. Bovine herpesvirus 5 induces an overproduction of nitric oxide in the brain of rabbits that correlates with virus dissemination and precedes the development of neurological signs. **Journal of NeuroVirology**, v.15, n.2, p.153-163, 2009.

DOS SANTOS, S.C. LC characterisation of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *M. glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. **Planta Medica**, v. 72, n. 8, p. 679-684, 2006.

EFFERTH, T. Natural products pave their way in cancer therapy. **Cancer biology & therapy**, v. 8, n. 19, p. 1869-1870, 2009.

ESQUENAZI, D. et al. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn.(Palmae) husk fiber extract. **Research in microbiology**, v. 153, n. 10, p. 647-652, 2002.

FALCÃO, H.S. et al. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p.381-91, 2005.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O. et al (Org.) 2003. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: UFRGS, UFSC, 2003.

FATAHZADEH, M.; SCHWARTZ, R. A. Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 57, n. 5, p. 737-763, 2007.

FERREIRA, W. J. et al. Anti-herpetic activities of chemical components from the Brazilian red alga *Plocamium brasiliense*. **Natural product communications**, v. 5, n. 8, p. 1167-1170, 2010.

FIERRO, I.O. et al. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, n.1, p.19-24, 1999.

FRITZ, D. Análise química e avaliação da atividade antiviral de hypericum connatum lam. 2006. 123f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

FREITAS, A.M. **Avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral de extratos de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, Araucariaceae.** 2001. 94f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

FREITAS, R.F. et al. Estudo *in vitro* da atividade antifúngica do extrato de guaco (*Mikania glomerata*) contra *Candida albicans*. **Conexão ciência (Online)**, v.9, n.1, p.31-38, maio 2014.

GASPARETTO, J.C. **Avaliação da Biodisponibilidade dos principais metabólitos secundários do guaco a partir da forma farmacêutica xarope.** 2013. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

GERSHENGORN, H. B.; BLOWER, S. M. Impact of antivirals and emergence of drug resistance: HSV-2 epidemic control. **AIDS patient care and STDs**, v. 14, n. 3, p. 133-142, 2000.

GESCHER, K. et al. Proanthocyanidin-enriched extract from *Myrothamnus flabellifolia* Welw. exerts antiviral activity against herpes simplex virus type 1 by inhibition of viral adsorption and penetration. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n.2, p. 468–474, 2011.

GHANNADI, A. et al. Anti-Viral Evaluation of Sesquiterpene Coumarins from *Ferula assa-foetida* against HSV-1. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.13, n. 2, p. 523-530, 2014.

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

GOLANKIEWICZ, B.; OSTROWSKI, T. Tricyclic nucleoside analogues as antiherpes agents. **Antiviral Research**, v. 71, p. 134-140, 2006.

GRIFFON, G. et al. Radiosensitivity of multicellular tumour spheroids obtained from human ovarian cancers. **European Journal of Cancer**, v. 31, n. 1, p. 85-91, 1995.

HATTORI, L.Y. **Herpes simplex : isolamento, caracterização citopatológica e sensibilidade aos antivirais.** 2011. 69 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)- Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2011.

HWU, J.R. et al. Benzouracil–coumarin–arene conjugates as inhibiting agents for chikungunya virus. **Antiviral research**, v.118, [s.n.], p.103-109, 2015.

KAZIYAMA, V.M.; FERNANDES, M.J.B.; SIMONI, I.C. Atividade antiviral de extratos de plantas medicinais disponíveis comercialmente frente aos herpesvírus suíno e bovino. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 522-528, 2012.

KONTOGIORGIS, C. et al. Studies on the antiplatelet and antithrombotic profile of anti-inflammatory coumarin derivatives. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, n. 0, p. 1-9, 2015.

KOSTOVA, I. Coumarins as inhibitors of HIV reverse transcriptase. **Current HIV research**, v. 4, n. 3, p. 347-363, 2006.

KOUSAR, S.; ARSHAD, S. Potential antibacterial activity of coumarin and coumarin-3-acetic acid derivatives. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 3, p. 819-823, 2015.

LAZARINI, P.R. et al. Pesquisa do vírus herpes simples na saliva de pacientes com paralisia facial periférica de Bell. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**, v. 72, n.1, p. 7-11, jan./feb. 2006.

LOPES, N. **Avaliação da atividade antiviral de um Polissacarídeo sulfatado de *caesalpinia ferrea* e do flavonóide quercetina contra o vírus *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1) e poliovírus tipo 1 (PV-1)**. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

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

LÜCKEMEYER, D. D. **Avaliação da ação anti-herpética de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil., Aquifoliaceae (erva-mate)**. 2009. 130 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MARCONDES, H.C. et al. Antifungal Activity of Coumarin Mammeisin Isolated from Species of the *Kielmeyera* Genre (Family: Clusiaceae or Guttiferae). **Journal of Chemistry**, v. 2015, 2015.

MARKOULATOS, P. et al. Laboratory diagnosis of common herpesvirus infections of the central nervous system by a multiplex PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.12, p. 4426-4432, 2001.

MELO, P.S.; MARIA, S.S.; VIDAL, B.C.; HAUN, M.; DURAN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In vitro Cellular & Developmental Biology: Animal**, v.36, p. 639-543, 2000.

MERTZ, G.J.; ROSENTHAL, S.L.; STANBERRY, L.R. Is herpes simplex virus type 1 (HSV-1) now more common than HSV-2 in first episodes of genital herpes? **Sexually Transmitted Diseases**, v.30, p. 801-802, 2003.

MILAGRES, A. et al. Coexistência de pênfigo vulgar e infecção pelo vírus herpes simple na mucosa oral. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 451-4, 2007.

MONTAGNER, C. **Atividades antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas**. 2007. 125 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

MOURA, R.S.; COSTA, S.S.; JANSEN, J.M.; SILVA, C.A.; LOPES, C.S.; BERNARDO-FILHO, M.; NASCIMENTO-DA-SILVA, V.; CRIDDLE, D.N.; PORTELA, B.N.; RUBENICH, L.M.; ARAUJO, R.G.; CARVALHO, L.C. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, n. 2, p. 249-256, feb. 2002.

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

NAPIMOGA, M.H.; YATSUDA, R. Scientific evidence for *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* as a pharmacological tool. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v.62, n.7, p. 809–820, 2010.

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

NERI, R. et al. Tratamento de herpes labial recorrente associada à infecção. **Revista Bahiana de Odontologia**, v.5, n.1, p. 73-79, jan. 2014.

NISHIMURA, T.; TOKU, K.; FUKUYASU, H. Antiviral compounds. XII. Antiviral activity of aminohydrazones of alkoxyphenyl substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and mice. **Kitasato Archives of Experimental Medicine**, v.50, p.39-46, 1977.

OLIVEIRA, O.W.; PETROVICK, P.R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.4, p.641-650, ago./set. 2010.

OLIVEIRA, F.; SAITO, M.L.; GARCIA, L.O. Caracterização cromatográfica em camada delgada do extrato fluído de guaco - *Mikania glomerata* Sprengel. **Lecta-USF**, v.11, n.1, p.43-55, 1993.

OLMEDO, Dionisio et al. 3-Phenylcoumarins as inhibitors of HIV-1 replication. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9245-9257, 2012.

OSORIO, A.C. **Controle de qualidade do extrato fluído e tintura de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel)**. 2002. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências

Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

PADILLA, M. A. **Atividade antiviral de extratos de plantas do cerrado contra herpesvírus**. 2011. 89 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

PENELLO, A. M. et al. Herpes genital. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 2, p. 64-72, 2010.

PEREGRINO, C.A.F.; LEITÃO, S.G. Chromatographical profiles of fluid extracts and tinctures obtained from *Mikania glomerata* Sprengel sterilized by gamma ray irradiation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 237-242, 2005.

PESSINI, G.L. et. al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p. 21-24, 2003.

PITHON, M. M. et al. Avaliação da citotoxicidade de quatro alginatos utilizados na Odontologia. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 66, n. 2, p. 207-10, 2009.

RADUNZ, L.L. **Efeito da temperatura do ar de secagem no teor e na composição dos óleos essenciais de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e hortelã-comum (*Mentha x villosa* Huds)**. 2004. 90 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percents endpoints. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.27, p. 493-497, 1938.

REGGIORI, M.G. et al. Terapia a laser no tratamento de herpes simples em pacientes HIV: relato de caso. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v.26, n.3, p.357-361, 2008.

REHDER, V.L.G.; SARTORATTO, A.; RODRIGUES, M.V.N. Essencial oils composition from leaves, inflorescences and seeds of *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker and *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.esp, p.116-118, 2006.

RINCÃO, V. **Atividade antiviral de polissacarídeos isolados de *lentinula edodes* e *agaricus brasiliensis*, e seus derivados, na replicação do herpesvírus e poliovírus**. 2012. 69 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ROCHA, L. et al. *Mikania glomerata* Spreng: Desenvolvimento de um produto fitoterápico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. Supl, 2008.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M.; WHITLEY, R.J. Herpes Simplex Viruses. In: KNIPE, D. M.;HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 2v., p. 2502-2601.

RUPPELT, B.M. et al. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom. I. Analgesic and anti-inflammatory activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, n.2, p.203-5, 1991.

SALGADO, H.R.N.; RONCARI, A.F.F.; MOREIRA, R.R.D. Antidiarrhoeal effects of *Mikania glomerata* Sprengel (*Asteraceae*) leaf extract in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n. 3, p. 205-208, 2005.

SANTANA, L.C.L.R. et al . Estudo das propriedades físico-químicas e avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 16, n. 3, supl. 1, p. 670-678, 2014.

SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução à virologia humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008.

SANTOS, P.A.; PEREIRA, M.A.S.; FRANÇA, S.C.; LOPES, N.P. Esteróides e cumarina em calos de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas (Impresso)**, v. 35, n. 2, p. 231-235, 1988.

SANTOS, S.C. **Caracterização Cromatográfica de extratos medicinais de guaco: *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker e *M. glomerata* SPRENGEL e ação de *M. laevigata* na inflamação alérgica pulmonar**. 2005. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

SCHLEISS, M. R. Persistent and recurring viral infections: The human herpesviruses. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v.39, n.1, p. 7-21, 2009.

SCHMIDT, S. et al. Sequence analysis of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and DNA polymerase genes from over 300 clinical isolates from 1973-2014 finds novel mutations which may be relevant for development of antiviral resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 00977-15, 2015.

SCHOMOGYI, M.; WALD, A.; COREY, L. Herpes simplex virus-2 infections: an emerging disease? **Infectious disease clinics of North America**, v.12, n.1, p. 47-61, 1998.

SHAFER, W.G.; HINE, M.K.; LEVY, B.M. **Tratado de Patologia Bucal**. 4 ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1987, 837p.

SILVA JUNIOR, A.A. et al. Um novo ecótipo de *Mikania glomerata* Spreng. (*Asteraceae*) rico em óleo essencial no sul do Brasil. **Revista Fitos Eletrônica**, v.10, n.10, 2015.

SILVA, C.R. et al. Método espectroscópico para determinação de cumarina em xarope de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p. 594-599, out./dez. 2008.

SILVA, I.T. et al. In vitro antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction

of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n.2, p. 143–148, 2010.

SILVA, L.S. et al. Preparation of dry extract of *Mikania glomerata* Sprengel (Guaco) and determination of its coumarin levels by spectrophotometry and HPLC-UV.

Molecules, v.17, n.9, p.10344-10354, aug. 2012.

SILVA, M.I.G.; GONDIM, A.P.S.; NUNES, I.F.S.; SOUSA, F.C.F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, p. 455-462, 2006.

SILVEIRA, C.S. et al. *In vitro* cytotoxic, antioxidant and antiviral effects of *Pterocaulon alopecuroides* and *Bidens segetum* extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 343-348, 2009.

SIMÕES, C.M.O. et al. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., compositae. **Journal of ethnopharmacology**, v. 22, n. 3, p. 281-293, 1988.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: UFSC, 2002.

SIMÕES, L.R. **Fitoquímica, atividade antiviral e antioxidante de *Distictella elongata* (VAHL) urb. (BIGNONIACEAE)**. 2010. 154 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2010.

SOARES, A.K.A.; CARMO, G.C.; QUENTAL, D.P.; NASCIMENTO, D.F.; BEZERRA, F.A.F.; MORAES, M.O.; MORAES, M.E.A. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, p. 447-454, 2006.

STANBERRY, L. et al. New developments in the epidemiology, natural history and management of genital herpes. **Antiviral Research**, v.42, n.1, p. 01-14, 1999.

STREISSLE, G.; SCHWOBEL, W.; HEWLETT, G. Evaluation of antiviral compounds in cell cultures with acute or persistent virus infection. **Advanced Cell Culture**, v. 1, p. 67-90, 1981.

SUZUKI, M.; OKUDA, T.; SHIRAKI, K.; Synergistic antiviral activity of acyclovir and vidarabine against herpes simplex virus types 1 and 2 varicella-zoster virus. **Antiviral Research**, v. 72, p. 157-161, 2006.

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

TALEB-CONTINI, S.H. et al. Differences in secondary metabolites from leaf extracts of *Mikania glomerata* Sprengel obtained by micropropagation and

cuttings. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 596-598, dec. 2006.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Herbarium: Compêndio de Fitoterapia**. 3. ed. Paraná: Herbarium Laboratório Botânico, 1997.

TSINONTIDES, S. C. et al. Freeze drying—principles and practice for successful scale-up to manufacturing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n.1-2, p. 1-16, ago. 2004.

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

VENUGOPALA, K.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

VIANNA, D.R. **Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica e citotóxica de cumarinas naturais e sintéticas**. 2011. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

VICENTINO, A.R.R.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p.384-387, 2007.

VILEGAS, J.H.Y.; MARCHI, E.; LANÇAS, F.M. Extraction of lowpolarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* ("guaco") leaves. **Phytochemistry**, v.8, p.266-270, 1997.

VLIETINCK, A. J. et al. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. **Planta medica**, v. 64, n. 2, p. 97-109, 1998.

YANG, Jun-Li et al. Three new coumarins from *Saposhnikovia divaricata* and their porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) inhibitory activity. **Tetrahedron**, v.71, n.8, p. 4651–4658, jul. 2015.

YATSUDA, R. et al. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of *mutans streptococci*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 183-189, 2005.

YU, J. et al. Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2009-2014, 2005.

ZAVRŠNIK, D. et al. Benzylidene-bis-(4-hydroxycoumarin) and benzopyrano-coumarin derivatives: synthesis, ¹H/¹³C-NMR conformational and X-ray crystal structure studies and *in vitro* antiviral activity evaluations. **Molecules**, v. 16, n. 7, p. 6023-6040, 2011.