



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANANDA MARQUES DE GODOI

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DO POLISSACARÍDEO OBTIDO
DE *Adenantha pavonina* E SEU DERIVADO SULFATADO
CONTRA HERPES SIMPLEX TIPO 1 E POLIOVÍRUS, *IN
VITRO***

Londrina
2014

ANANDA MARQUES DE GODOI

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DO POLISSACARÍDEO OBTIDO
DE *Adenantha pavonina* E SEU DERIVADO SULFATADO
CONTRA HERPES SIMPLEX TIPO 1 E POLIOVÍRUS, *IN*
*VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, tendo como objetivo a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa Dra. Rosa Elisa Carvalho Linhares.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G588a Godoi, Ananda Marques de.

Atividade antiviral do polissacarídeo obtido de *Adenantha pavonina* e seu derivado sulfatado contra herpes simplex tipo 1 e poliovírus, *in vitro* / Ananda Marques de Godoi. – Londrina, 2014.
92 f. : il.

Orientador: Rosa Elisa Carvalho Linhares.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Agentes antivirais – Teses. 2. Polissacarídeos – Teses. 3. Vírus do herpes – Teses. 4. Poliovírus – Teses. I. Linhares, Rosa Elisa Carvalho. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 578.7

ANANDA MARQUES DE GODOI

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DO POLISSACARÍDEO OBTIDO
DE *Adenantha pavonina* E SEU DERIVADO SULFATADO
CONTRA HERPES SIMPLEX TIPO 1 E POLIOVÍRUS, *IN*
*VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, tendo como objetivo a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa Dr. Rosa Elisa Carvalho Linhares
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profo Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa Dr. Lígia Carla Faccin Galhardi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de Fevereiro de 2014.

DEDICATÓRIA

A Deus, por me conceder o dom da sabedoria para
concluir este trabalho.

Aos meus pais e ao meu namorado, que se
esforçaram para que isto se tornasse realidade.

Aos meus outros familiares, aos meus amigos, aos
professores, que me incentivaram em continuar.

Aos leitores, que terão a oportunidade de obter mais
conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter aberto várias portas com novas oportunidades, iluminando sempre a escolha mais correta.

À orientadora Rosa Elisa e ao professor Carlos Nozawa, que tiveram muita paciência em passar o seu conhecimento para que eu entendesse sobre o assunto, incentivando a buscá-lo a cada dia mais.

Aos meus pais, que me deram a oportunidade da vida para mostrar que nada está perdido, e que é necessária paciência e dedicação para que as coisas estejam próximas à perfeição.

Ao meu namorado, que sempre me apoiou e ajudou com as possibilidades que estavam ao seu alcance.

Às meninas do laboratório, que compartilharam tanto do conhecimento científico, como da sabedoria de viver bem.

Aos amigos, que almoçaram, ampararam, discutiram, interpretaram e contribuíram com este trabalho.

A CAPES por todo apoio financeiro.

Epígrafe

Juízo não significa fazer tudo certo, mas saber a hora certa de fazer a coisa errada. Fazer tudo certo é sorte.

Adaptado de Paula S.M. de Mello (2013).

GODOI, Ananda Marques. **Atividade antiviral do polissacarídeo obtido de *Adenantha pavonina* e seu derivado sulfatado contra Herpes simplex tipo 1 e Poliovírus, in vitro.** 2014. 92 f. Dissertação do Mestrado de Microbiologia. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2014.

RESUMO

O vírus herpes simplex tipo, família Herpesviridae, é um vírus cosmopolita que atinge várias faixas etárias, em ambos os sexos, causando lesões na região oro-facial. A droga de escolha para o tratamento do HSV-1 é o aciclovir, porém o uso contínuo desse fármaco pode selecionar cepas resistentes. O poliovírus (PV) pertence à família Picornaviridae, conhecido como agente causador da poliomielite, uma doença que atinge gravemente o sistema nervoso, causando paralisia flácida. Hoje em dia ainda não existe um quimioterápico eficiente para o controle ou tratamento desta doença, limitando-se a vacinação como a única ferramenta. Vários estudos relatam a utilização de produtos naturais com atividade antiviral, incluindo os polissacarídeos. O presente trabalho avaliou o efeito antiviral do polissacarídeo de *Adenantha pavonina* (PLSAp) e a sua forma sulfatada (SPLSAp), em células HEp-2, contra HSV-1 e PV. A citotoxicidade dos polissacarídeos foi analisada pelo método do MTT e a atividade antiviral pelo ensaio de redução de plaque (PRA), utilizando diferentes protocolos de tratamentos. O valor de CC50 para PLSAp foi $> 6000\mu\text{g/ml}$ e $500\mu\text{g/ml}$ para SPLSAp. O melhor efeito antiviral, determinado por PRA, foi encontrado para SPLSAp, que apresentou um IC50 de $15\mu\text{g/ml}$ e índice de seletividade (SI) de 33,3, para o HSV-1 e um IC50 de $1,18\mu\text{g/ml}$ e índice de seletividade de 423,73, para o PV. A inibição do HSV-1 pelo SPLSAp foi demonstrado pelos testes tempo de adição e tempo de remoção, onde a maior porcentagem de inibição viral (%IV) obtida foi de 100% e 99,3%, respectivamente, na concentração de $200\mu\text{g/ml}$. No ensaio de imunofluorescência o SPLSAp inibiu 100% do HSV-1, na maior concentração testada ($200\mu\text{g/ml}$). A ação deste polissacarídeo na síntese de DNA do HSV-1, avaliada por PCR, mostrou uma inibição total da banda na concentração de $25\mu\text{g/ml}$. No ensaio da combinação do SPLSAp com aciclovir, para HSV-1, este teve um efeito antagonista. A melhor porcentagem de inibição viral (%IV) para o PV foi encontrado no tempo 0 hora de infecção, para esse vírus o SPLSAp também apresentou um efeito virucida com %IV de 74,1% na maior concentração testada ($100\mu\text{g/ml}$). No ensaio de imunofluorescência do PV o SPLSAp inibiu 100% a síntese de proteínas na maior concentração testada ($100\mu\text{g/ml}$), de forma dose-dependente. Os resultados demonstraram que o melhor efeito do SPLSAp na replicação do HSV-1 está nas etapas após penetração viral, e para o PV a inibição está principalmente nas fases iniciais da replicação, incentivando a pesquisa detalhada do mecanismo de ação do SPLSAp para a utilização deste composto como um novo antiviral.

Palavras-chave: Herpesvírus. Poliovírus. *Adenantha pavonina*. Atividade antiviral.

GODOI, Ananda Marques. **Antiviral activity of polysaccharide obtained from Adenantha pavonina and its sulfated derivative against Herpes simplex type 1 poliovirus, in vitro**. 2014. 92 p. Dissertation of Master Microbiology. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2014.

ABSTRACT

The virus herpes simplex type 1 (HSV-1), herpesviridae family, is a cosmopolitan virus that affects various age groups, both sexes, causing lesions in the oro-facial region. The drug of choice for treatment of HSV-1 is acyclovir, but their continued use can select resistant strains. O poliovirus (PV), Picornaviridae family, known as causative agent of poliomyelitis, a disease that affects seriously the nervous system, causing flaccid paralysis. Nowadays there is still no effective chemotherapy for control or treatment of this disease, limited vaccination as the only tool. Several studies report the use of natural products with antiviral activity, including polysaccharides. This work evaluated the antiviral effect of polysaccharides of *Adenantha pavonina* (PLSAp) and its sulfated form (SPLSAp), in HEp-2 cells, against HSV-1 and PV. The cytotoxicity of polysaccharides was analyzed by MTT method and antiviral activity by plaque reduction assay (PRA), using different protocols of treatment. The CC₅₀ to PLSAp was > 6000 µg/ml and 500 µg/ml to SPLSAp. The best antiviral effect, determined by PRA, was found to SPLSAp, with IC₅₀ of 15 µg/ml and selectivity index (SI) of 33,3, for HSV-1 and IC₅₀ of 1,18 µg/ml and SI of 423,73 for PV. Inhibition of HSV-1 by SPLSAp was demonstrated by tests of time-of-addition and time-of-removal, where the highest percentage of viral inhibition (%IV) obtained were 100% and 99,3%, respectively, at a concentration of 200 µg/ml. In immunofluorescence assay the SPLSAp inhibited 100% of HSV-1, in the highest concentration (200 µg/ml). The action of this polysaccharide in DNA synthesis of HSV-1, evaluated by PCR, showed total inhibition of band in a concentration of 25 µg/ml. In assay of combination of SPLSAp with acyclovir against HSV-1, this has an antagonistic effect. The best percentage of viral inhibition for PV was found at time 0 hour infection, this polysaccharide also showed virucidal effect with 74.1% of %IV at the highest concentration tested (100 µg/ml). In immunofluorescence assay the SPLSAp inhibited 100% of protein synthesis of PV in the highest concentration tested (100 µg/ml), in a dose-dependent form. These results showed that the best effect of SPLSAp in replication of HSV-1 at these stages after viral penetration and for PV inhibition is mainly in the initial stages, thus it is necessary to do a detailed research of the mechanism of action of SPLSAp for using this as a new antiviral.

Key- Words: Herpesvirus. Poliovirus. *Adenantha pavonina*. Antiviral activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C	Antes de Cristo
AMPc	Adenosina MonofosfatoCiclíco
ApoE	Apoliproteína E
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EUA	Estados Unidos da América
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV	Herpes Simplex Vírus
IF	Imunofluorescência
kpb	kilopares de base
nm	nanômetros
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	potencial Hidrogeniônico
PV	Poliovírus
RN	Ácido Ribonucleico
SNC	Sistema Nervoso Central
WHO	World Health Organization

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1 HERPESVÍRUS	15
3.1.1 Histórico	15
3.1.2 Família <i>Herpesviridae</i>	16
3.1.2.1 Vírus Herpes Simplex.....	16
3.1.2.1.1 Estrutura viral	18
3.1.2.1.2 Replicação viral	18
3.1.2.1.3 Latência	19
3.1.2.1.4 Patogenicidade.....	20
3.1.2.1.5 Epidemiologia.....	20
3.1.2.1.6 Diagnóstico.....	22
3.1.2.1.7 Vacina.....	22
3.1.2.1.8 Mecanismos de Resistência.....	24
3.2 POLIOVÍRUS	25
3.2.1 Histórico	25
3.2.2 Família <i>Picornaviridae</i>	26
3.2.2.1 <i>Poliovirus</i> (PV).....	26
3.2.2.1.1 Estrutura Viral	27
3.2.2.1.2 Replicação viral	27
3.2.2.1.3 Patogenicidade.....	28
3.2.2.1.4 Epidemiologia.....	28
3.2.2.1.5 Diagnóstico.....	29
3.2.2.1.6 Vacinas	29
3.3. Antivirais	31
3.3.1 Histórico	31
3.3.2 Antivirais Utilizados Para o Tratamento do HSV	32
3.3.2.1 Aciclovir	32
3.3.2.2 Foscarnet.....	35
3.4 Compostos Naturais.....	36
3.4.1 Polissacarídeos	37
3.5 <i>Adenantha pavonina</i>	38

3.6 Sinergismo de Antivirais	40
4. REFERÊNCIAS	42
5 ARTIGO	48
5.1 Artigo I	48
5.2 Artigo II	80
6 CONCLUSÃO	92

1 INTRODUÇÃO

Os vírus são os menores agentes infecciosos, constituídos de ácido nucléico, DNA ou RNA, envoltos por uma camada de proteínas, podendo ainda conter um envoltório lipoprotéico. Essas partículas são inertes em ambiente extracelular, pois necessitam da maquinaria da célula para se replicar. Há evidências do surgimento dos vírus desde as primeiras atividades humanas, com registros desde o início das civilizações egípcias e greco-romanas. Os vírus também serviram de inspiração para algumas obras da literatura como: *Iliadas*, *As relações perigosas*, *Tereza Batista cansada de guerra*, *Capitães da areia*, *Os Bestializados*, *Depois daquela viagem*, entre outros. Em 1904 os vírus deixaram outro fato marcante na história, a Revolta da Vacina, que teve como objetivo o saneamento e higienização das cidades, que sofriam de surtos de febre amarela e varíola. Dessa forma os vírus desenvolvem um papel importante na história da evolução, influenciando no processo da seleção natural das espécies, incentivando a busca de novos medicamentos, como agentes de doenças, associação com certos tipos de tumores, incentivando a produção de vacinas, aumentando a diversidade genética e motivando a criação da biologia molecular. Por se adaptarem muito rápido os vírus atingem todas as espécies de vida, tornando-se uma das principais causas de morte no mundo. Os estudos dos vírus surgiram recentemente, por meados da década de 30, quando comparados aos estudos de outras doenças (BLACK, 1975; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008; BROOKS et al, 2012).

Apesar dos avanços tecnológicos no saneamento, na produção de novos medicamentos e de vacinas eficazes, ainda existem infecções virais sem tratamento ou com terapia limitada, como é o caso das causadas pelos Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Vírus da Hepatite C (HCV), vírus Influenza e Herpes Vírus Humanos (HSV). Esses fatos contribuem para a busca de novos antivirais o que constitui uma tarefa muito difícil, pois os vírus se multiplicam dentro da célula, portanto é necessário em primeiro lugar, que o antiviral não seja tóxico para a própria célula. Com esse intuito, ocorreu um aumento na pesquisa de substâncias antivirais extraídas de plantas, sendo que algumas já são utilizadas de forma empírica, desde a antiguidade para o tratamento de várias infecções (KITAZATO, WANG e KOBAYASHI, 2007; TRINDADE et al, 2007).

Entre os compostos naturais, farmacologicamente ativos, escolhidos para avaliação da atividade antiviral, estão os polissacarídeos, proteínas, fenóis, flavonoides, taninos e alcalóides, isolados de plantas como a *Adenantha pavonina*, que possui vários compostos como: saponinas, taninos, alcaloides, flavonoides, glicosídeos cardíacos,

triterpenóides, anel de lactona, O-acetiletanolamina, octanol, dulcitol e quitinase (PLETSCHI, 1998; KITAZATO, WANG e KOBAYASHI, 2007; MARUTHAPPAN e SHREE, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o potencial antiviral do polissacarídeo isolado das sementes de *Adenantha pavonina* e seu derivado sulfatado, para os vírus HSV-1 e PV *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade dos polissacarídeos em células HEp-2.
- Avaliar a atividade antiviral dos polissacarídeos para o HSV-1 e PV, através do ensaio de redução de plaques, seguindo diversos protocolos de tratamento.
- Comparar a eficácia dos polissacarídeos frente a outro antiviral comercial.
- Avaliar a inibição na síntese de proteínas virais pelo ensaio de Imunofluorescência.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HERPESVÍRUS

3.1.1 Histórico

Os primeiros registros sobre doenças possivelmente atribuídas ao vírus do herpes foram encontrados nas tábuas sumerianas, aproximadamente a 3.000 a.C, e no Papiro de Ebers, aproximadamente em 1500 a.C. Mas foram os gregos que nomearam as lesões características da infecção por esse vírus. Hipócrates também utilizou o termo herpes para descrever lesões que rastejavam ao longo da pele, porém naquela época a utilização desse termo era atribuída a qualquer patógeno (ROIZMAN e WHITLEY, 2001; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

O historiador Heródoto associou que as lesões herpéticas causavam febre, conseqüentemente todo o tipo de lesão na pele, que apresentava febre como sintoma, foi diagnosticado como herpes. Dessa forma, separar dados antigos sobre herpes é uma tarefa confusa, pois muitas daquelas infecções de pele não existem mais e outras foram diagnosticadas de forma incorreta (ROIZMAN e WHITLEY, 2001).

Em 1736, o médico John Astruc, observando as prostitutas francesas sob vigilância médica, observou o aumento do aparecimento de lesões herpéticas nos órgãos genitais. Em 1873 Vidal comprovou que o herpes era infeccioso e podia ser transmitido de pessoa para pessoa. Baseado nas descrições dessa época, Fournier, em 1896, escreveu o livro “Les Herpes Genitiaux” que ensinava como diagnosticar e tratar a herpes genital. Nesse livro as indicações para o tratamento das lesões eram feitas a partir da abstenção do tabaco, álcool, excesso sexual, complementado com uma boa higiene (ROIZMAN e WHITLEY, 2001; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

Com o intuito de isolar o agente causador do herpes, Gruter realizou alguns experimentos, em coelhos e publicou os resultados somente em 1924. Futuramente, esses experimentos foram aprimorados por Lowenstein, que coletou secreções de vesículas herpéticas, provenientes da pele ou córnea humana, e inoculou essas secreções em córneas de coelhos, causando lesões semelhantes às observadas em humanos. Assim, em 1919 Lowenstein foi considerado como o primeiro pesquisador a isolar o vírus do herpes, comprovando cientificamente que esse vírus era um agente de infecções (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

Em 1930 Andrews e Carmichael estudaram o recorrente aparecimento das lesões herpéticas, que ressurgiam mesmo após a produção de anticorpos neutralizantes. Essa polêmica originou um debate internacional entre os cientistas daquela época, resultando em uma publicação, de 1939, onde Burnet e Williams descrevem sobre latência do vírus do herpes, que se assemelha muito com os estudos reconhecidos atualmente (ROIZMAN e WHITLEY, 2001; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

No Brasil o histórico do vírus do herpes está relacionado com os estudos das evidências imunológicas, sendo que diversas tribos de índios, desde as mais remotas, tiveram contato com esse vírus, antes mesmo da colonização do país e este se mantém presente nas populações até hoje (BLACK, 1975).

3.1.2 Família *Herpesviridae*

Até o momento já foram identificados cerca de 200 vírus pertencentes à família *Herpesviridae*, destes, oito causam infecções em humanos, entre eles: Herpes Simplex Vírus 1 e 2 (HSV-1; HSV-2), Varicela-Zoster, Epstein-Barr, Citomegalovírus, Herpes vírus 6, Herpes vírus 7 e Herpes vírus 8. Essa família não necessita de vetores, portanto a sua forma de disseminação é exclusivamente de indivíduo para indivíduo (BRUGHA et al, 1997; COSTELLO et al, 2006; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

As principais características da família *Herpesviridae* são: estrutura padrão similar, a capacidade de produzir enzimas que agem no metabolismo da célula infectada, como a timidina quinase, helicase e DNA-polimerase, a predisposição de permanecer em estado de latência, ser reativado periodicamente e conter genoma grande com mais de 200 genes. Esta família é subdividida em três subfamílias, conforme a análise do gene que codifica a glicoproteína H do envelope, nomeadas subfamílias Alfa, Beta e Gama (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008; GELLER et al, 2012).

3.1.2.1 Vírus Herpes Simplex

O HSV pertence à subfamília *Alphaherpesvirinae* e apresenta características morfológicas parecidas, diferenciando-se de forma antigênica, nas glicoproteínas de superfície gC e pela a sua preferência aos sítios anatômicos de infecção. Esse vírus é capaz de infectar, de forma rápida, vários tipos celulares *in vitro*, como: fibroblastos, células do epitélio escamoso, mucoso, cilíndrico, células da glia e terminações nervosas. Também apresenta

propriedades biológicas particulares, como neurotropismo, neurotoxicidade e estado de latência (WHITLEY e ROIZMAN, 2001; COSTELLO, 2006; AZWA e BARTON, 2009; SCHUSTER e BUSS, 2009; GELLER et al, 2012).

A infecção pelo HSV é classificada como uma doença sexualmente transmissível, com maior gravidade para pessoas imunodeficientes ou neonatos. O HSV-1 causa infecções, preferencialmente, na região dos lábios, boca, intra-oral, nariz e olhos, comum durante a infância. Os sintomas mais comuns dessa infecção são: formigamento, queimação, coceira, febre, dor, incapacidade para ingerir alimentos e água. Em alguns casos, o HSV-1 pode induzir a uma infecção secundária por outros microrganismos, com lesões que duram cerca de 2 a 3 semanas. O HSV-2 atinge, principalmente, as áreas genitais e pode ocasionar infecção em neonatos. No caso dessa infecção os sintomas mais comuns são: febre, disúria, coceira, linfadenopatia inguinal, dor de cabeça e mal-estar. As lesões duram cerca de 3 semanas e podem facilitar a entrada de outros patógenos. Mesmo com as definições das áreas afetadas por cada tipo de vírus, há relatos da ocorrência de uma superposição entre os dois tipos, dessa forma ambos podem infectar outros sítios anatômicos ou causar encefalites. O HSV-2 também torna-se um dos principais fatores de risco para aquisição do HIV. (PEREIRA, 1996; WHITLEY; KIMBERLIN; ROIZMAN, 1998; BALDWIN, 2001; VARELLA et al., 2005; THOMPSON, 2006; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008; AZWA e BARTON, 2009).

A infecção pelo HSV pode levar a outras complicações, como é o caso de lesões oculares, comuns em pacientes com transplantes de córnea e recém-nascidos, cujas mães apresentavam lesões herpéticas no trato genital no momento do parto. Também pode ocorrer o aparecimento de nódulos herpéticos nos dedos, esse tipo de lesão é recorrente em crianças com infecção oral, que tem o hábito de chupar os dedos, ou em profissionais que se expõem as lesões da cavidade oral, por exemplo, dentistas. As piores complicações são encefalite e meningite viral, com altas taxas de morbidade e mortalidade, causando sequelas graves, como retardo mental, surdez, convulsões e perdas motoras e sensoriais (KHAN e PAVAN-LANGSTON, 2004; SCHUSTER e BUSS, 2009).

Mães infectadas por HSV podem transmitir o vírus aos seus bebês de 3 formas: infecção intrauterina, em 5% dos casos, infecção periparto, em 85% dos casos e infecção pós-parto, em 10% dos casos. Essas infecções podem atingir o bebê em várias áreas, como sistema nervoso central, pele, olhos, cavidade oral, pulmão, fígado, cérebro e glândulas suprarrenais. Quando a infecção atinge o sistema nervoso do bebê a taxa de mortalidade é maior, conseqüentemente somente 50% desses bebês sobrevivem. O tratamento para

infecções neonatais é recomendado de forma imediata, para prevenir a progressão da doença, com aplicação de aciclovir por via endovenosa (CAVINESS, 2013).

3.1.2.1.1 Estrutura viral

O HSV é constituído de DNA de fita dupla de 150-153 kpb, protegido por um capsídeo icosaédrico de 162 capsômeros, com tegumento e envelope lipídico, medindo de 186nm à 225nm. A partícula viral é susceptível a tratamentos químicos, como solventes orgânicos, detergentes e proteases, e a tratamento físico, como calor e radiações (PEREIRA, 1996; WHITLEY e ROIZMAN, 2001; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

O envelope do HVS pode conter 11 glicoproteínas diferentes, ordenadas de B a M, com função de mediar adsorção, penetração e a resposta imunológica na célula hospedeira. Dentre essas glicoproteínas duas delas, gB e gD, foram utilizadas para elaborar uma vacina que apresentou resultados positivos em relação a proteção contra a glicoproteína, mas esta foi pouco efetiva em relação a proteção do vírus como um todo (WHITLEY e ROIZMAN, 2001).

O capsídeo do HSV é constituído de 6 proteínas: VP5, VP26, VP23,VP24, VP19 e VP5. O espaço entre o capsídeo e o envelope é denominado tegumento, que comporta mais de 20 proteínas, as quais ajudam na ativação de genes, na síntese de macromoléculas e na liberação do DNA, após a penetração do vírus na célula (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

3.1.2.1.2 Replicação viral

A replicação viral dura em torno de 24 horas, acontecendo no núcleo da célula infectada. Essa replicação inicia-se com a adsorção do vírus aos receptores celulares, as glicosaminoglicanas, que formam uma ligação irreversível, não dependente de pH. O vírus penetra na membrana citoplasmática por uma fusão direta, liberando o nucleocapsídeo e as suas proteínas. Esses são transportados, por meio de microtúbulos, próximo ao núcleo da célula. Somente o material genético e as proteínas do tegumento entram no núcleo, para começar a transcrição (WHITLEY; KIMBERLIN; ROIZMAN, 1998; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

Quando o DNA viral entra no núcleo, este é remodelado para que seja replicado de forma organizada, pelo mecanismo de círculo rolante. A RNA polimerase II

dependente de DNA, da célula hospedeira, é responsável pela a transcrição de todos os genes virais. Primeiro são transcritos os genes das proteínas precoces imediatas, que participam na regulação e transcrição gênica, controlando a célula. Para essa transcrição é necessário à ajuda da proteína ativadora, contida no tegumento do vírus. O segundo passo é transcrever as proteínas precoces e as enzimas, necessárias na produção dos fatores da transcrição. O terceiro e último passo é a transcrição das proteínas tardias, responsáveis pelas as proteínas estruturais, produzidas no início da replicação do genoma viral (DALAI et al, 2001; STRAUS, 2002; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

Após a produção das proteínas estruturais, as proteínas de suporte (scaffolding) se organizam e empacotam o DNA viral, montando o nucleocapsídeo. Depois dessa montagem, os novos vírus brotam por meio da membrana nuclear, adquirindo o envelope viral. Para a maturação dos vírus, essas novas partículas passam pelo o complexo de Golgi e incorporam glicoproteínas. Quando esses vírus estão maduros saem da célula por exocitose ou lise. Esses novos vírus também podem se disseminar para outras células, através das pontes intracelulares, permitindo que os vírus escapem dos anticorpos (DALAI et al, 2001; STRAUS, 2002; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

3.1.2.1.3 Latência

A família Herpesviridae tem como características estabelecer infecções latentes com recidivas ao longo da vida, em alguns casos estas infecções podem ser assintomáticas. Para cada membro desta família, a infecção latente é estabelecida em um determinado sítio, como por exemplo, a subfamília *Alphaherpesvirinae*, cujos sítios de latência são os nervos sensoriais. Após uma infecção lítica primária, tanto nas mucosas como na epiderme, os vírus invadem as terminações nervosas e são transportados pelos axônios, até o gânglio sensorial. Durante esse período de latência, o HSV não é encontrado nos tecidos neuronal e epitelial, e o seu genoma é conservado na forma de epissomas circulares, em alguns núcleos dos neurônios. Esse genoma tem os genes do ciclo lítico inativado e somente os genes associados à latência são expressos, até que ocorra um estímulo para a reativação da infecção (PEREIRA, 1996; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

O HSV é estimulado à reativação devido a condições favoráveis, como febre, baixa imunidade, stress emocional e físico, menstruação, infecção concomitante, relação sexual, irradiação ultravioleta, injúria tecidual, tratamento odontológico ou estético.

Alguns estudos mostram, que o estímulo pode estar associado com o aumento da produção local das prostaglandinas da classe E e F, pois essas são rapidamente sintetizadas na membrana plasmática para responder as lesões do tecido. Conseqüentemente elas são liberadas no espaço extracelular e ativam a adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que iniciará o ciclo das proteíno-cinases celulares, fosforilando outras proteínas, a qual irão estimular a expressão de genes virais. Quando reativados, o HSV desloca-se novamente pelos gânglios sensoriais dos nervos, gerando vesículas e causando infecção, que são curadas em menor tempo do que a infecção primária (PEREIRA, 1996; BALDWIN, 2001; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008; AZWA e BARTON, 2009).

3.1.2.1.4 Patogenicidade

O HSV apresenta duas características, a primeira é a capacidade de invadir e multiplicar-se no sistema nervoso do hospedeiro, a segunda é estabelecer um sítio de infecção latente. O risco de transmissão ocorre na infecção ativa, pois no estado latente os vírus são incapazes de se replicar (KHAN e PAVAN-LANGSTON, 2004).

A transmissão do HSV ocorre através do contato direto com as secreções cervicais, saliva, sêmen ou líquidos das vesículas, que estejam contaminados. Após o primeiro contato com o vírus, indivíduos susceptíveis, sem anticorpos preexistentes, desenvolvem uma infecção primária. O período de incubação dessa infecção dura em torno de 2 a 12 dias para o HSV-1, e 1 a 16 dias para o HSV-2. Quando o vírus replica em uma célula causa alterações estruturais e bioquímicas, provocando a morte desta (COSTELLO et al, 2006, BRUGHA et al, 1997).

O mecanismo de defesa contra o HSV inicia-se através de uma reposta inflamatória inespecífica, ao mesmo tempo da indução de uma resposta específica. Esse vírus tem a capacidade de se espalhar de forma rápida de célula para célula, assim os anticorpos são poucos eficientes em neutralizar o vírus, que também são capazes de bloquear os interferons. O mecanismo de defesa é construído pelo reconhecimento das glicoproteínas virais, que ativam o sistema complemento (WHITLEY; KIMBERLIN; ROIZMAN, 1998; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

3.1.2.1.5 Epidemiologia

O HVS é ocorrente no mundo inteiro, com variação sazonal, infecta apenas seres humanos, o seu principal reservatório. Alguns estudos mostram que 90% da população possuem anticorpos séricos, contra pelo menos uma cepa desse vírus. Como na maioria das vezes as infecções são latentes, raramente causam infecções fatais. Porém nos casos de transmissão para recém-nascidos, pode ocasionar doenças neurológicas graves ou morte (LUPI, 2000; WHITLEY e ROIZMAN, 2001; BELSHE et al, 2012).

A principal via de transmissão do HSV é por meio do contato do vírus com a mucosa ou pele machucada. O HSV-1 é mais comum em crianças ou adolescentes, nos países menos desenvolvidos a soroconversão desse vírus ocorre mais cedo. Na faixa de 5 anos de idade, a soroconversão afeta cerca de um terço das crianças e para países mais desenvolvidos, a soroconversão atinge cerca de 20% das crianças, dessa mesma faixa etária. O HSV-2 é mais comum na faixa etária em torno de 15 a 30 anos, onde a atividade sexual é maior, pois esse é considerado uma doença sexualmente transmissível. Segundo alguns estudos, após a década de 1970, ocorreu um aumento significativo de pessoas infectadas, em razão da redução da idade para a primeira relação sexual e as mudanças na sua prática. Uma infecção por HSV gera uma porta de entrada para infecções secundárias, por causa das lesões, aumentando o risco de transmissão de HIV, sífilis e gonorréia (BALDWIN, 2001; WHITLEY e ROIZMAN, 2001; CERNIK; GALLINA; BRODELL, 2008).

O HSV atinge em maior quantidade a população feminina, cerca de 45% a mais do que a população masculina. Em mulheres o herpes genital causa lesões na vulva, desfigura a vaginal e causa muita dor. Em homens essa infecção causa lesões na glande e no prepúcio (CERNIK; GALLINA; BRODELL, 2008; PEREIRA et al, 2012).

O perfil epidemiológico dos fatores de risco para infecções causadas por HSV está relacionado com a idade, sexo, grupo étnico, status socioeconômico, número de parceiros sexuais e históricos de doenças sexualmente transmissíveis. A maior taxa de prevalência do HSV-1 se encontra nos países da América Central, África e Ásia e a menor pertence ao Japão e os países escandinavos. Para o HSV-2 a maior taxa de prevalência se encontra nos EUA, Ruanda, Zaire e Haiti e a menor também se encontra nos países do extremo oriente (LUPI, 2000; PEREIRA et al , 2012).

As medidas de controle das infecções causadas pelo HSV estão baseadas no uso de preservativos, medicamentos antivirais, evitar o contato com as lesões contaminadas e a educação sanitária dos pacientes (BALDWIN, 2001; BELSHE et al, 2012).

3.1.2.1.6 Diagnóstico

A cultura celular é o padrão ouro para o isolamento e diagnóstico de infecções causadas pelo HSV, este é feito por meio da coleta do líquido das vesículas, que é inoculado em culturas de células, as quais permitam a replicação deste vírus. O resultado é analisado através da presença do efeito citopático característico, porém esse método é trabalhoso e demorado. Animais de laboratório também podem ser utilizados para inoculação do material clínico, resultando na produção de lesões características, porém com a adaptação deste vírus em culturas celulares, este método não tem sido utilizado com frequência (BRUGHA et al, 1997; COSTELLO et al, 2006; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008; AZWA e BARTON, 2009).

O uso de técnicas de biologia molecular para detecção do HSV mudou o perfil de diagnóstico, deixando este mais rápido e fidedigno, mesmo quando comparados com custo, simplicidade e disponibilidade. Porém eles ainda não substituem os antigos métodos de cultura celular, que apresentam resultados estáveis. Entre os testes de biologia molecular, o mais utilizado frequentemente é a reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite identificar se a infecção é causada por HSV-1 ou HSV-2. Este exame é realizado por meio da identificação do genoma do vírus nas amostras coletadas, dessa forma é possível identificar o vírus, de forma rápida, mesmo com pouca amostra (VARELLA et al, 2005; COSTELLO et al, 2006; AZWA e BARTON, 2009).

Alguns testes sorológicos ainda são utilizados para o diagnóstico de infecções causadas por HSV, principalmente quando as lesões são ausentes, para uma triagem ou para fazer um diagnóstico diferencial, entre esses testes os mais utilizados são: Western blotting, ELISA e imunofluorescência (IF) (COSTELLO et al, 2006).

3.1.2.1.7 Vacina

As primeiras tentativas de elaborar uma vacina contra HSV surgiram por volta de 1938, com a utilização de vírus inativado em formalina, porém o resultado foi pouco efetivo. Desde essa época todas as tentativas para descobrir uma vacina foram feitas com a utilização de vírus atenuado, que apresentavam resultados duvidosos em relação à melhora clínica. Somente em 1970, Skinner sintetizou uma vacina utilizando porções do vírus, importantes para imunogenicidade, abrindo o caminho para as vacinas glicoproteicas

(NASEMANN e WASSILEW, 1979; BERNSTEIN e STANBERRY, 1999; LUPI, 2000; KOELLE e COREY, 2003; TRINDADE et al, 2007).

Devido à falta de modelos animais adequados e conhecimento das funções de cada glicoproteína, os experimentos de Skinner não obtiveram resultados esperados, mas desencadeou a descoberta de Stanberry e colaboradores, que produziram grande quantidade de glicoproteínas por meio de infecções em porcos-da-guiné, onde foi possível analisar que as glicoproteínas gB e gD estimulam a imunidade celular específica. A partir desses estudos foram elaboradas várias vacinas, destacando-se as vacinas Alemãs, a Lupidon H para HSV-1 e a Lupidon G para HSV-2, que são obtidas pela inativação do vírus por calor. Os seus resultados apresentam-se efetivos contra infecções primárias, mas ainda são necessários estudos para melhorar os efeitos dessas vacinas (NASEMANN e WASSILEW, 1979; BERNSTEIN e STANBERRY, 1999; LUPI, 2000; KOELLE e COREY, 2003; TRINDADE et al, 2007).

Também há estudos sobre a elaboração de vacinas gênicas ou de DNA. Essa nova geração de vacinas é fundamentada no isolamento de sequências de DNA que codificam antígenos, produzindo um vírus capaz de ativar o sistema imunológico, mas incapaz de se replicar. Entre elas destaca-se a vacina DISC (DisableInfectious Single Cycle), que utiliza vírus vivos, onde gene UL22, que codifica glicoproteína H, é deletado. Essa partícula é incapaz de produzir um ciclo replicativo, infecta células humanas, como o vírus normal e estimula a imunidade humoral contra antígenos herpéticos. A DISC está na fase II dos ensaios clínicos, onde houve uma falha na resposta de IgG. Como todas as vacinas gênicas se encontram em fase de experimentação, ainda existem algumas restrições do seu uso, dessa forma é necessária à sua padronização, estudos sobre as probabilidades de a vacina causar mutação ou oncogêneses na célula hospedeira e pesquisas sobre a sua intolerância imunológica. Consequentemente ainda são necessárias diversas descobertas para que as vacinas gênicas possam ser utilizadas em humanos (LUPI, 2000; TRINDADE et al, 2007; CHENTOUFI et al, 2012)

Alguns estudos relatam a utilização de vetores virais recombinantes, como é o caso do adenovírus atenuado, recombinado com o vírus da vaccínia, que expressa glicoproteínas de HSV. Essa vacina provocou uma resposta alta nas células T CD8+, após uma única aplicação, mas esta também não foi testada em humanos (CHENTOUFI et al, 2012).

Para a conclusão de uma vacina contra herpes, são necessários alguns estudos de mecanismos moleculares das células envolvidas na resposta celular, que protege

alguns indivíduos HSV soropositivos e assintomáticos, e a interferência da imunização durante o período de latência do vírus. Ou seja, comparado ao conhecimento que se obteve no passado, a conclusão dessa vacina não se encontra em um futuro muito distante (CHENTOUFI et al, 2012).

3.1.2.1.8 Mecanismos de Resistência

Com poucas opções terapêuticas contra HSV e o uso indiscriminado de aciclovir surgiram cepas de HSV resistentes, direcionando o uso para drogas alternativas como valaciclovir, pentaciclovir e foscarnet, porém já foram encontrados alguns vírus resistentes também a essas drogas. Principalmente em pacientes imunocomprometidos, onde o ciclo de vida do vírus é prolongado, que gera uma persistência e uma resposta imune prejudicada, favorecendo assim a replicação dos vírus menos patogênicos e ocasionando doenças evidentes (WHITLEY e RICHARD, 2002; VARELLA et al., 2005; TRINDADE et al, 2007; PIRET e BOIVIN, 2011).

Os sintomas mais comuns em uma infecção por vírus resistente é a persistência das lesões por mais de uma semana após o início da terapia, a não diminuição da lesão, lesões do tipo atípicas e o surgimento de novas lesões mesmo com a administração do medicamento. Essa resistência pode ser diagnosticada por meio de testes que submetem o vírus contra os agentes antivirais, ou pela identificação da mutação específica no gene que confere a resistência (PIRET e BOIVIN, 2011).

As mutações virais que desencadeiam a resistência ao aciclovir, podem estar relacionadas ao gene UL23, responsável pela ativação da fosforilação da enzima timidinaquinase. Essa mutação forma timidinas quinases defeituosas, incapazes de fosforilar o aciclovir, principalmente em pacientes infectados pelo HIV. Nos isolados clínicos de HSV resistente ao aciclovir, 95% sofreram a mutação no gene UL23. Outra mutação, raramente encontrada, para cepas de HSV resistentes ao aciclovir e foscarnet, está relacionada ao gene UL30, que codifica a DNA polimerase viral, consequentemente a forma ativa de aciclovir não consegue se ligar, e a replicação viral continuam sem o mecanismo de terminação de cadeia (WHITLEY e RICHARD, 2002; PIRET e BOIVIN, 2011; BURREL et al, 2010; TUSET et al, 2010; BURREL et al, 2012).

3.2 POLIOVÍRUS

3.2.1 Histórico

A poliomielite é uma das doenças mais antiga, seus primeiros registros foram encontrados nos hieróglifos egípcio, por volta do segundo milênio a.C, onde há uma figura de um jovem com a perna atrofiada, mostrando que esta doença já causava danos a população daquela época. Mas somente a partir de 1800 as primeiras descrições clínicas, relacionadas aos casos de paralisia com febre, foram registradas. Por volta de 1840 devido aos dados publicados por Heine e Medin, a poliomielite foi nomeada como doença de Heine-Medin. Porém a palavra poliomielite, derivada da linguagem grega, significa medula cinza, que corresponde a uma das primeiras características observadas como efeito do poliovírus (PV), descrita em 1950 por Charcot e Joffroy (JESUS, 2007; PALLANSH E ROOS, 2007).

Em 1900 os estudos voltaram para a natureza infecciosa da poliomielite, pois ainda não se conhecia o agente causador. Dessa forma em 1908, Landsteiner e Popper comprovaram que a poliomielite era uma doença infecciosa causada por vírus, por meio de um experimento em que a paralisia era transmitida pela a inoculação de tecido do sistema nervoso central (SNC) de humanos infectados em macacos. Os resultados desses experimentos deixaram os cientistas confusos gerando vários equívocos, pois se acreditava que o *poliovírus* (PV) era somente neurotrópico e pouco se sabia sobre a sua propagação. Em 1949 Ender e colaboradores realizaram um estudo mostrando que o PV se propagava em cultura de células não neuronal, esses estudos colaboraram para a pesquisa de uma vacina eficaz (WIMMWER et al, 1993; PALLANSH E ROOS, 2007; JESUS, 2007; SANTOS; ROMANOS e WIGG, 2008).

Em 1955 Salk cultivou o PV em vários tipos celulares e conseguiu a sua inativação com formaldeído, produzindo ótimos títulos de anticorpos, que colaborou na formulação da primeira vacina eficaz contra a poliomielite, administrada por via intramuscular. Depois em 1961, Sabin elaborou outra vacina contra poliomielite, administrada por via oral, produzida por meio de vírus atenuado (PALLANSH E ROOS, 2007; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

O PV foi um vírus muito importante para esclarecer várias áreas da virologia, pois historicamente foi o primeiro vírus animal a ser clonado, seqüenciado e com estrutura tridimensional resolvida por cristalografia de raio-X (PALLANSH E ROOS, 2007).

No Brasil o primeiro surto de poliomielite foi relatado em 1911, no Rio de Janeiro, pelo pediatra Fernandes Figueira. Como nesta época a forma de transmissão da

poliomielite não era conhecida, os médicos brasileiros acreditavam que esta doença poderia ser transmitida por um vetor, como a mosca doméstica. Outra hipótese considerou a poliomielite como uma doença respiratória, por se observar grande quantidade de vírus nas secreções da garganta e nariz. Dessa forma os tratamentos para essa doença eram feitos por meio do isolamento dos pacientes infectados, junto com medidas de higiene (SCHATZMAYR et al, 2002; CAMPOS et al, 2003).

A partir de 1955 a vacina contra poliomielite foi introduzida no Brasil. Primeiramente houve-se uma discussão de qual vacina seria mais eficiente, porém devido a sua facilidade de aplicação e baixo custo, o Ministério da Saúde optou em criar campanhas usando a vacina Sabin, por volta de 1960. Com o intuito de controlar a poliomielite no Brasil, em 1986, foi construído um grupo de trabalho de erradicação da doença, que teve campanhas de vacinação em massa, diminuindo e controlando os casos em todo o país (CAMPOS et al, 2003, NASCIMENTO, 2011).

3.2.2 Família *Picornaviridae*

A família *Picornaviridae* é composta de vírus pequeno, de RNA, de grande importância para os homens e para agropecuária, entre os quais se encontram os vírus da hepatite A, poliomielite e febre aftosa. Essa família possui nove gêneros: *Enterovirus*, *Rinovirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus* e *Teschovirus* (PALLANSH E ROOS, 2007; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

O gênero *Enterovirus*, se diferencia dos demais, devido a sua densidade flutuante em cloreto de cério e a estabilidade em ácidos fracos, suportando o pH de 3 a 9. Este gênero ainda pode ser subdividido em 8 grupos, como: *Poliovirus*, *Enterovirus humano A*, *Enterovirus humano B*, *Enterovirus humano C*, *Enterovirus humano D*, *Enterovirus simio A*, *Enterovirus bovino* e *Enterovirus suíno B*. Dentre eles 5 causam infecções em humanos, gerando graves doenças (PALLANSH E ROOS, 2007; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

3.2.2.1 *Poliovirus* (PV)

O PV está distribuído por todo mundo e existem 3 sorotipos: pv1, pv2 e pv3. Esses vírus são os agentes causadores da doença infecciosa aguda que atinge gravemente o sistema nervoso, destruindo os neurônios motores da medula espinhal, resultando em paralisia

flácida. O sorotipo pv1 é o mais freqüente nos casos de paralisia e o sorotipo pv2 apresenta maior imunogenicidade (JESUS, 2007; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

3.2.2.1.1 Estrutura Viral

O PV tem formato esférico, com diâmetro de 25 a 30 nm, sem envoltório lipídico, com capsídeo de simetria icosaédrica. O seu capsômero é composto por 4 polipeptídeos estruturais (VP1, VP2, VP3 e VP4). O seu material genético é composto de RNA de fita simples com polaridade positiva, medindo cerca de 7450 bases. A sua composição química corresponde a 30% de ácido nucléico e 70% de proteína. O PV é resistente a alguns desinfetantes comuns, como etanol, porém é degradado por meio de solventes orgânicos, como clorofórmio, formaldeído e hipoclorito de sódio, este vírus suporta a temperatura até 42 C° e como outros vírus pode ser inativado por luz ultravioleta (ALMOND, 1991; PALLANSH E ROOS, 2007; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

3.2.2.1.2 Replicação viral

A replicação viral ocorre dentro do citoplasma da célula infectada. O primeiro passo é a adsorção do PV ao receptor na superfície celular, o CD155, uma glicoproteína do membro da superfamília das imunoglobulinas. Após a desestabilização do capsídeo do vírus, o RNA ligado a proteína Vpg é liberado, no citoplasma. Essa proteína é clivada por uma fosfodiesterase celular, e a fita de RNA simples de polaridade positiva fica livre para ser traduzida pelos os ribossomos celulares, que irão produzir proteínas essenciais para a replicação e produção de novas partículas virais (MINOR, 2004; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008)

A poliproteína precursora é sintetizada, para futuramente ser clivada por 3 proteinases (2A, 3C e 3CD). Entres as proteínas virais sintetizadas, está a RNA polimerase viral dependente de RNA, outras proteínas acessórias para replicação viral e síntese de RNAm. A fita de RNA de viral é complementada com uma fita de RNA de polaridade negativa, que servirá como molde para a síntese de novas fitas de RNA positivo (JESUS, 2007; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

O aumento dessas novas fitas de RNAs ativa o mecanismo de encapsidação. Para a formação do vírus, a proteína P1, precursora do capsídeo, é clivada produzindo capsômeros imaturos, VP0, VP3 e VP1, formando um pentâmero do provírus. Depois as fitas

de RNAs positivas recém sintetizadas se juntam ao provírus completando a partícula viral. Porém para a maturação do vírus é necessário uma clivagem na VP0, que será dividida em VP2 e VP4. O ciclo de replicação viral dura em torno de 5 a 10 horas (HOGLE, 2002; JESUS, 2007; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

3.2.2.1.3 Patogenicidade

O PV possui tropismo limitado a humanos e outros primatas. Sua transmissão ocorre pela via fecal-oral, sendo a boca a porta de entrada para esse vírus. Durante a infecção o PV pode ser encontrado na garganta e nas fezes, em alguns casos o vírus também pode estar na corrente sanguínea, muito comum em pacientes com poliomielite não paralítica. Inicialmente, por ter a capacidade de sobreviver ao trânsito no estômago, o vírus se multiplica nos tecidos da mucosa, atingindo as placas de peyer e amígdalas, se espalhando para os gânglios linfáticos, medula óssea, baço e fígado. O sistema nervoso pode ser infectado por meio do sangue circulante, propagando-se ao longo dos axônios dos nervos periféricos, até o sistema nervoso central, afetando medula espinhal ou o cérebro. A excreção do PV é feita através das fezes, que podem contaminar águas, alimentos e insetos (ALMOND, 1991; OHKA e NOMOTO, 2001; PALLANSH E ROOS, 2007; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008; BUTEL, 2012).

O PV pode causar 3 tipos de doenças: a poliomielite abortiva, uma das formas mais comum e mais branda da doença, que apresenta sintomas como febre, lassidão, sonolência, cefaléia, náuseas, vômito, prisão de ventre e inflamação da garganta, com recuperação rápida. A poliomielite não paralítica ou meningite viral, que juntamente com os sintomas descritos na poliomielite abortiva, o paciente apresenta rigidez e dor nas costas e nuca. E a poliomielite parálítica que consiste na paralisia flácida decorrente da lesão dos neurônios motores inferiores, que pode ser dividida em poliomielite parálítica espinhal, bulbar e bulboespinhal, conforme o local danificado (HORSTMANN, 1949; BUTEL, 2012).

3.2.2.1.4 Epidemiologia

A poliomielite é uma doença encontrada em todo o mundo, durante todo ano. Epidemiologicamente ela pode ser dividida em 3 fases: endêmica, epidêmica e pós-vacinal. A PV pode atingir todas as faixas etárias, porém as crianças são mais susceptíveis,

pois os adultos já possuem uma imunidade adquirida. Essa doença é mais freqüente na população de baixa renda devido às condições de higiene (BUTEL, 2012).

Em 1985, a OMS informou que havia cerca de 300.000 casos de poliomielite paralítica, em 162 países. Com algumas melhorias nos países populosos, como a China, os casos de poliomielite reduziram, porém em países de baixo desenvolvimento como a África e Ásia meridional o número de casos aumentou, comprovando que as medidas de educação higiênica diminuíram a transmissão dessa doença (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

A Organização Mundial de Saúde certificou que as Américas, em 1994, e a região européia, em 2002, estavam livres da circulação do PV. No ano de 2013, segundo a organização Global Polio Eradication Initiative, o número de casos de poliomielite, em todo o mundo, caiu para 406, sendo endêmico para 3 países: Afeganistão, Nigéria e Paquistão, que estão nessa situação devido a resistência da população a vacina ou pela cobertura vacinal insuficiente (CHUMAKOV e ENRENFELD, 2008; DUTTA, 2008; GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2014).

3.2.2.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial é realizado por meio do isolamento do vírus a partir de swabs da garganta, no início da doença, ou por swabs retais e fezes, durante um período longo. Essas amostras devem ser mantidas congeladas até o seu isolamento em cultura de células humanas ou de macacos. O efeito citopático pode ser observado entre 1 a 7 dias após a infecção. O PV também pode ser diagnosticado por RT-PCR, teste de neutralização, imunofluorescência ou técnicas imunoenzimáticas, que em alguns casos complementam o diagnóstico por cultura de células e também identificam os seus sorotipos (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008; BUTEL, 2012).

3.2.2.1.6 Vacinas

Hoje em dia duas vacinas contra a poliomielite são usadas a vacina de vírus inativados, administrada por via intramuscular, e a vacina de vírus atenuados, administrada por via oral. A segunda vacina foi amplamente usada devido a sua facilidade de administração, custo baixo e eficiência de induzir tanto anticorpos séricos (IgM e IgG), como

anticorpos secretores do intestino (IgA), estabelecendo uma imunidade duradoura de forma mais rápida (BUTEL, 2012).

A vacina oral contém os 3 sorotipos do PV, é produzida em culturas de células primárias de células de humanos ou macacos, podendo ser estabilizada com cloreto de magnésio e conservada durante 1 ano à 4°C. O Ministério da Saúde recomenda a administração de 4 doses da vacina, sendo essas iniciadas aos dois meses de idade, com o intervalo de dois meses, depois um reforço com 15 meses e outro com 5 anos. Vários estudos mostram que essa vacina é segura, porém a sua eficácia depende de vários fatores. Um exemplo de fator ambiental ocorreu com o Japão que utilizou apenas duas doses da vacina oral para o controle, enquanto na Índia foram necessária mais de 10 doses. Esse fato também explica os valores taxa de soro conversão, que é de 50% para países tropicais e 99% para países de clima temperado (DUTTA, 2008; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

A vacinação começou por volta de 1955, e reduziu o número de casos de poliomielite de 76.000 para 1.013, ou seja 99%. Um exemplo em que a vacinação é um dos melhores métodos de controle dessa doença pode ser exemplificado pelos casos encontrados na Nigéria, que em 2009 registrou 541 casos e após uma cobertura vacinal, onde os profissionais da saúde passaram de porta em porta, os casos reduziram para 6, em junho de 2010 (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008; NATHANSON e KEW, 2010).

A partir de agosto de 2012 o Brasil mudou o esquema de vacinação, conforme a recomendação da Organização Mundial de Saúde, com adição da administração da vacina Salk. As crianças são imunizadas com a vacina intramuscular nos 2 e 4 meses idade, combinada com a vacina oral no 6 e 15 meses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Os casos de falhas da vacina oral estão relacionados com a sua má conservação, a interferência da infecção por outros enterovirus presentes no intestino e pela presença de anticorpos do leite materno. Porém em 2000 ocorreu um fato extraordinário, no Haiti e República Dominicana, com o surgimento de poliomielite em crianças vacinadas, causada por PV derivada vacina atenuada, ou seja, esse vírus readquiriu a capacidade de causar a doença. No Brasil foram registrados somente 11 casos de poliomielite após a vacinação durante o período de 1989 a 2006 (KEW et al, 2004; DUTTA, 2008; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

Até o momento ainda não existe um quimioterápico eficiente para o controle ou tratamento da poliomielite, limitando-se a vacinação como a única ferramenta para o controle dessa doença (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

3.3. ANTIVIRAIS

3.3.1 Histórico

A descoberta dos antivirais ocorreu por volta de 1955, quando Bauer utilizou tiossemicarbazonas no tratamento do vírus da vaccínia. Entre 1960 e 1970, com o aumento da descoberta de antibióticos, também houve um aumento no conhecimento de doenças virais comuns. Porém o número de antivirais ainda era escasso, surgindo nessa época os primeiros análogos nucleosídicos, como iododesoxiuridina e a vidarabina, que eram capazes de atuar no DNA viral e conseqüentemente no DNA celular, tornando-se tóxicos para os pacientes. Esses quimioterápicos foram encontrados por acaso, nos programas de triagem de substâncias anticancerígenas (TRINDADE et al, 2007; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008; ENQUIST, 2009).

O aumento das doenças causadas por vírus incentivou as empresas farmacêuticas a pesquisarem moléculas com atividade antiviral. O desenvolvimento de novos antivirais é uma tarefa trabalhosa, pois os vírus são patógenos que se multiplicam dentro da célula infectada, portanto é necessário em primeiro lugar que o antiviral não seja tóxico para a própria célula. Vários químicos tentaram modificar moléculas aparentemente auspiciosas, com a intenção de diminuir a toxicidade, aumentar a biodisponibilidade, solubilidade e melhorar as propriedades farmacocinéticas (TRINDADE et al, 2007; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008; ENQUIST, 2009; FLINT et al, 2009).

As doenças virais podem apresentar altas taxas de mortalidade e morbidade e mesmo após o desenvolvimento de vacinas eficientes contra alguns vírus, como varíola, caxumba e poliomielite, para algumas delas ainda não existe uma alternativa de imunoprevenção, como HIV e Hepatite C. Além disto, tem surgido muitas cepas resistentes aos medicamentos disponíveis. A necessidade de vacinas e drogas alternativas levou ao aumento no investimento para o combate contra viroses epidemiologicamente importantes, como é o caso das viroses respiratórias, Herpes e HIV (KITAZATO, WANG e KOBAYASHI, 2007; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

A compreensão dos mecanismos moleculares da invasão e replicação viral permite o desenvolvimento de antivirais contra vários alvos. Porém a maioria das drogas disponíveis no mercado atua especificamente em um único alvo, que geralmente é uma enzima viral fundamental para a replicação, deixando a droga mais específica e menos tóxica. Dessa forma, o terapêutico ideal seria aquele que tem menor toxicidade e atua em vários

alvos. A partir dessa idealização, os compostos naturais são utilizados há vários anos, na medicina popular, de diversas formas contra infecções virais. Alguns estudos mostram que com o passar do tempo cada vez mais compostos isolados de plantas apresentam atividade contra os vírus, principalmente aqueles compostos que tem uma alta diversidade química e especificidade bioquímica (KITAZATO, WANG e KOBAYASHI, 2007; TRINDADE et al, 2007).

3.3.2 Antivirais Utilizados Para o Tratamento do HSV

A iododesoxiuridina, um análogo da timidina, sintetizada em 1959 por Prusoff, foi o primeiro antiviral utilizado para o tratamento de herpes, porém causava muitos efeitos adversos e era pouco eficiente no tratamento para herpes labial. Depois em 1977 a vidarabina, um análogo de adenosina, foi licenciada como antiviral e indicada para encefalites causadas por herpes, porém, era pouco solúvel em soluções fisiológicas. Em 1970 Gertrude Ellion e colaboradores sintetizaram o aciclovir, um análogo da guanosina, mas somente em 1979, este foi utilizado para o tratamento de infecções causadas por HSV, apresentando um ótimo índice terapêutico e poucos efeitos colaterais, tornando-se a droga de escolha para o tratamento dessas infecções (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008).

O desenvolvimento de novos fármacos frente às infecções contra herpes é fundamentado no melhoramento do perfil farmacocinético de aciclovir, com a otimização terapêutica. A maioria dos fármacos tem como alvo a DNA-polimerase do vírus, porém recentemente foi descoberto outro alvo, a helicase-primase viral, que é utilizado pelo BAY-57-1293, um novo composto que originou a classe de antivirais de tiazolsulfonamidas. Quando esse composto atinge o complexo da helicase-primase viral inibe a atividade da ATPase, mostrando ótimos resultados contra cepas de vírus do herpes resistentes a aciclovir, em modelos animais. Porém esse composto ainda não foi testado em seres humanos, dessa forma é necessário estudar a sua farmacocinética e farmacodinâmica com detalhes, até que esse seja lançado no mercado. Outra opção terapêutica, ainda em estudo, é o uso do laser de baixa intensidade de potência, com efeito analgésico e anti-inflamatório, que reduz o tempo de manifestação da doença (BETZ et al, 2002; TRINDADE et al, 2007; TUSET et al, 2010; CLERCQ, 2012).

3.3.2.1 Aciclovir

Hoje em dia a droga mais utilizada para o tratamento do herpes é o aciclovir, que apresenta alta seletividade e baixa toxicidade para as células hospedeiras. Esse medicamento é composto de um nucleosídeo sintético da purina, que está estruturalmente relacionado com a guanina. O mecanismo de ação de aciclovir é baseado na sua fosforilação, por meio de uma timidinaquinase viral, convertendo-o para monofosfato de aciclovir, logo as enzimas celulares transformam-no em difosfato e trifosfato de aciclovir. O trifosfato de aciclovir é capaz de se ligar ao DNA viral inibindo o alongamento da cadeia de DNA, competindo com a DNA-polimerase do vírus, impedindo a transcrição e replicação do DNA viral (WHITLEY e RICHARD, 2002; VARELLA et al., 2005; TRINDADE et al, 2007; BARBOZA et al, 2010; PIRET e BOIVIN, 2011).

O aciclovir pode ser administrado por via oral, intravenosa ou tópica, tem baixa biodisponibilidade e uma meia vida curta (1hora), exigindo uma dosagem frequente, dessa forma a sua absorção oral é limitada. Esse medicamento é excretado por via renal de forma inalterada, conseqüentemente é necessário cuidado para a sua aplicação em pacientes com insuficiência renal, alterações neurológicas, hipóxia, alterações eletrolíticas e insuficiência hepática grave. Essa droga pode causar alterações gastrointestinais, cefaléia e erupções cutâneas. O aciclovir também sofre interação medicamentosa com meperidina, micofelonato, elevando os níveis séricos, e fenitoína, reduzindo os níveis séricos (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008; BARBOZA et al, 2010; TUSET et al, 2010; GELLER et al 2012)

Quando o efeito de aciclovir é comparado *in vitro*, ele apresenta-se mais potente para os vírus da Varicela Zoster e Epstein barr, os quais pertencem à mesma família do vírus do herpes. Porém em relação ao vírus HSV-1 e 2, pode-se dizer que o efeito de aciclovir para o HSV-1 é duas vezes maior do que para o HSV-2, também ocorrem diferenças no efeito, quando comparamos a eficácia de aciclovir por via oral com o seu uso tópico (CERNIK et al, 2008; PIRET e BOIVIN, 2011).

A partir da descoberta da molécula de aciclovir, foram realizadas modificações na sua estrutura química originando os pró-fármacos de aciclovir como: valaciclovir, penciclovir, famciclovir, ganciclovir e valganciclovir (**Figura 1**) (AZWA e BARTON, 2009; TUSET et al, 2010).

O valaciclovir é um pró-fármaco de aciclovir, com adição de um éster de valina, que ajuda na absorção. Após a sua administração oral, este é metabolizado em aciclovir através das hidroxilases intestinais hepáticas. Esta alteração na molécula de aciclovir melhorou a sua biodisponibilidade de 3 a 4 vezes. Assim o valaciclovir é utilizado em doses

baixas, recomendado para infecções orofaciais ou genitais causadas por HSV e para as infecções causadas por varicela zoster (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008; AZWA e BARTON, 2009; TUSET et al, 2010; GELLER et al 2012).

O pentaciclovir é um pró-fármaco semelhante ao aciclovir, que difere somente em uma adição de uma hidroxila, melhorando o tempo de permanência no interior da célula em relação ao aciclovir. O pentaciclovir tem baixa absorção por via oral, dessa forma, é utilizado de forma tópica, com a eficácia limitada e é pouco utilizado no tratamento de herpes, pois é necessário ser aplicado a cada duas horas (KIM et al, 1996; BACON et al, 2003; TUSET et al, 2010).

Com o intuito de melhorar a biodisponibilidade e absorção por via oral de pentaciclovir, foi elaborado um pró-fármaco chamado de famciclovir, onde foi adicionado um grupo diacetil éster, melhorando a sua biodisponibilidade em 75%. Este é rapidamente convertido em pentaciclovir na parede intestinal, ou no fígado, que conseqüentemente atuará como o aciclovir, porém sem causar terminação de cadeia. Por ter uma meia vida intracelular maior, a sua eficácia é aumentada, dessa forma é possível administrar altas doses por longos tempos. O famciclovir é excretado de forma inalterada por via renal, sendo necessário um ajuste na dose em caso de pacientes com insuficiência renal. Este medicamento é recomendado para infecções causadas por HSV e varicela-zoster. (KIM et al, 1996; BACON et al, 2003; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008; TUSET et al, 2010).

O ganciclovir também é um pró-fármaco de aciclovir, com a adição de um grupo hidroximetil na cadeia acíclica. Essa modificação tornou esse medicamento ativo contra o citomegalovírus, mas pode ser utilizado contra qualquer tipo de herpes vírus, por via venosa. O ganciclovir é tóxico, causa depressão na medula óssea, carcinogênese potencial, diarreia, náuseas, vômito, alterações na função hepática e dores abdominais. Dessa forma esse medicamento é recomendado somente para o tratamento de infecções graves causadas por citomegalovírus e pacientes imunocomprometidos. Com o intuito de melhorar a biodisponibilidade de ganciclovir foi elaborado um pró-fármaco chamado valganciclovir, onde foi adicionado um éster de valina, este pode ser administrado por via oral e é recomendado para os mesmos tratamentos de ganciclovir, porém tem os mesmos efeitos adversos (SILVA, 2002; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008; TUSET et al, 2010).

Para tratamento de herpes labial é comum o uso de antivirais tópicos, como aciclovir ou penciclovir. Quando necessário à administração por via oral é recomendado o uso de valaciclovir e nos casos de tratamentos prolongados, o famciclovir. No tratamento de herpes genital é recomendado a administração de antivirais por via intravenosa ou oral, como

aciclovir ou valaciclovir. Em casos de pacientes com HIV, onde se tem maior probabilidade de ocorrência de cepas resistentes ao aciclovir, é recomendado o tratamento com foscarnet, por via intravenosa, ou cidofovir de uso tópico (TUSET et al, 2010).

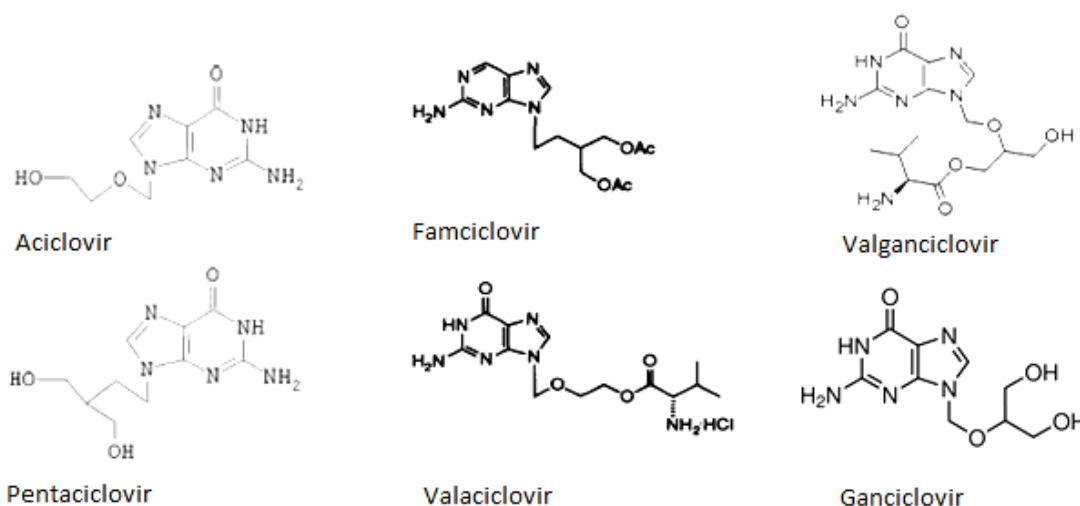


Figura 1: Aciclovir e seus pró-fármacos

Fonte: Adaptado de Bacon et al, 2003; Kim et al, 1996; www.sigmaaldrich.com

3.3.2.2 Foscarnet

O foscarnet, ou fosfonoformato (**Figura 2**) é o segundo antiviral recomendado para infecções causadas por HSV, principalmente em casos de resistência ao aciclovir. Esse medicamento é composto por um sal sódico do ácido fosfonofórmico, um análogo de pirofosfato inorgânico. Sua administração é realizada pela a forma ativa, por via intravenosa, pois tem baixa absorção por via oral. Sua excreção é realizada pelo rim apresentando toxicidade, com efeitos adversos como náuseas, vômitos, anemias, fadiga, cefaleia, alterações genitais, alterações nervosas centrais, hipocalcemia, hipofosfatemia, hipopotasemia e hipomagnesemia (SILVA, 2002; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008; TUSET et al, 2010).

O foscarnet atua na DNA-polimerase viral, e diferente dos outros medicamentos utilizados para herpes, esse não necessita ser fosforilado pelasquinases viral e celular. Este composto imita a estrutura do pirofosfato produzido durante o alongamento da cadeia de DNA, atuando como inibidor não competitivo da DNA-polimerase viral, bloqueando a liberação do pirofosfato. O foscarnet apresenta ótimo efeito para infecções

causadas por HSV, porém devido a sua baixa biodisponibilidade e toxicidade, esse medicamento é indicado, geralmente para pacientes com HIV, transplantados de medula e em infecções que apresentam cepas resistentes ao aciclovir. Por ser pouco utilizado, é rara a ocorrência de resistência, mas já existem alguns relatos de modificações na DNA-polimerase viral, que seleciona cepas de vírus não susceptíveis a esse medicamento (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008; TUSET et al, 2010; PIRET e BOIVIN, 2011).

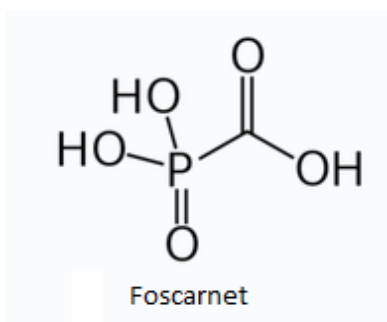


Figura 2: Foscarnet

Fonte: Adaptado de <http://quizlet.com/16246427/med-chem-final-flash-cards/>

3.4 COMPOSTOS NATURAIS

Muitos compostos naturais são utilizados pela população como fonte de medicamentos, alimentos, cosméticos, produtos químicos, combustível entre outros. Para a produção de medicamentos, muitas vezes esses compostos são combinados, de diversas formas, aliviando os sintomas de muitas doenças. Os primeiros registros dessas utilizações foram descritos nas sagradas escrituras e no papiro de Ebers. Desde essa época, os compostos foram melhorados, até a obtenção do primeiro medicamento em 1806, a morfina. Durante a Segunda Guerra Mundial foram descobertas às atividades do carbono radioativo, que incentivou o estudo da biossíntese de substâncias naturais (PLETSCHI, 1998; PINTO et al, 2002; KITAZATO, WANG e KOBAYASHI, 2007; CUNHA, PAULA e FEITOSA, 2009).

O Brasil, devido à riqueza da sua flora, tem uma grande vocação para a descoberta de substâncias terapêuticas de produtos naturais. Esse tipo de extrativismo, acontece desde época dos primeiros médicos portugueses, onde havia uma escassez de medicamentos, assim vários remédios e especiarias indígenas foram exportados para diversos países (PINTO et al, 2002).

Hoje em dia há um vasto acervo de plantas, das quais a humanidade conseguiu selecionar apenas cerca de 300 tipos para alimentação, entre elas um terço tem atividade biológica conhecida, totalizando cerca de 2.700 substâncias diferentes. Os

compostos naturais possuem características comuns, como a alta diversidade química e a especificidade bioquímica. As principais classes químicas desses compostos são: os carboidratos, os lipídeos, os compostos nitrogenados, os terpenóides e os fenilpropanóides, que são utilizados com o intuito de ser menos tóxico (PLETSCHI, 1998; KITAZATO, WANG e KOBAYASHI, 2007).

Uma variedade de compostos naturais foi testada como agentes antivirais, entre eles alguns foram identificados como inibidor da síntese ou replicação do genoma viral. Para HSV foram testadas substâncias contendo fenóis, polifenóis, terpenos, flavonóides, carboidratos, todas apresentando uma boa atividade contra esse vírus *in vitro*. Alguns exemplos são plantas como: Ruibarbo (*Rheum officinale*), Aloe vera (*Aloe barbadensis*), Frângula (*Rhamnus frangula*), Cáscara Sagrada (*Rhamnus purshianus*), Sene (*Cassia angustifolia*), Hipérico ou Erva de São João (*Hypericum mysorense*, *Hypericum hookerianum*) e Unha de gato (*Usnea complanata*). Todas essas plantas já são utilizadas na medicina popular para diversas doenças, após alguns testes comprovou-se que nenhuma delas têm efeito citotóxico (KITAZATO, WANG e KOBAYASHI, 2007).

3.4.1 Polissacarídeos

Muito compostos naturais utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, pertencem à classe dos polissacarídeos, que é uma das quatro substâncias que constituem a vida. Os polissacarídeos são polímeros constituídos de um ou mais monossacarídeos, extraídos de diversas fontes, como fungos, algas, bactérias, fermentação microbiológica, animais e plantas. Esse composto possui uma ampla atividade biológica, compõe a estrutura de alguns organismos, aumenta a imunidade, estimula a hematogênese e atua como antitumoral, antiviral, anticoagulante e antioxidante (CUNHA, PAULA e FEITOSA, 2009; NGUYEN et al, 2012).

Hoje em dia, há muito interesse em caracterizar e testar as propriedades de polissacarídeos da flora brasileira. Alguns estudos mostram que os polissacarídeos de semente são muito ricos em galactomananas e xiloglucanas, substâncias muito utilizadas na indústria. Também é comum fazer modificações nas moléculas de polissacarídeos para melhorar a sua atividade biológica, como a sulfatação (CUNHA, PAULA e FEITOSA, 2009; FERREIRA et al, 2010; NGUYEN et al, 2012).

O primeiro estudo relatando o uso de polissacarídeos sulfatados de plantas surgiu em 1958, quando Gerber e colaboradores utilizaram polissacarídeos de algas da espécie

Gelidium cartilagenium, para realizar um ensaio com o vírus da caxumba e influenza, em cultura de ovos embrionados. Esse estudo foi inspirado pela observação de que bacteriófagos e vírus do mosaico do tabaco, eram inibidos por polissacarídeos bacterianos (GERBER et al, 1958; GHOSH et al, 2009; SONG et al, 2013).

3.5 *Adenanthera pavonina*

A *Adenanthera pavonina* (**Figura 3**) é uma planta que pertence à família *Leguminosae* e a subfamília *Momosoideae*, conhecida popularmente como: olho de pavão, olho de dragão, sândalo vermelho, falso Pau-brasil, Carolina e Segawê. É originária da Ásia tropical, mas nos dias atuais se encontra distribuída em grande escala na região sudeste da China, Índia, Malásia, África, Ilhas do Pacífico, Caribe, Brasil, Costa Rica, Cuba, Jamaica, Porto Rico, Trindade, Tobago, Venezuela e Estados Unidos. No Brasil, esta planta foi introduzida recentemente, encontrada com frequência nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, interior de São Paulo, Minas Gerais e na região Nordeste. Essa planta forma uma árvore de grande porte, medindo em média de 6 a 15 metros. A sua madeira tem a cor vermelha, cresce bem em áreas úmidas e se propaga facilmente por estacas. Historicamente esta árvore foi cultivada em grande escala, devido a qualidade da sua madeira, que serve para ornamentação, fabricação de móveis, combustível e produção de medicamentos (ADEDPO et al, 2009; CERQUEIRA et al, 2009; KRISHNAVENI et al, 2011; SOOMRO e SHERAZI, 2012; SULTANA e GULZAR, 2012).

As sementes de *A. pavonina* (**Figura 4**) têm o formato de lentes, de cor vermelho vivo, são muitos semelhantes em forma e tamanho, servindo como peso e contas, conseqüentemente também são utilizadas na ornamentação e na fabricação de colares. Em algumas tribos os colares dessa semente são utilizados com o intuito de afastar doenças. Essas sementes são amplamente usadas por conter grande quantidade de gordura e proteína, servindo como alimento, porém essas devem ser cozidas, pois são tóxicas quando cruas. Na Indonésia é comum o cozimento das sementes de *A. pavonina* junto com arroz de Java, pois seu gosto é semelhante à soja. Essa semente também é utilizada na produção de medicamentos e cosméticos (OLAJIDE et al., 2004, SOOMRO e SHERAZI, 2012; SULTANA e GULZAR, 2012).

As sementes cozidas de *A. pavonina* são utilizadas de forma empírica para curar febre, vômito, diarreia, problemas estomacais, gota, reumatismo, furúnculos, falta de

apetite sexual, hipertensão, infecções pulmonar e oftalmia crônica. Na Índia essa planta é utilizada na medicina tradicional, em forma de decocção de folhas, para reumatismo e gota; em extrato, para furúnculos e inflamações; em pó, para dores de cabeça e disenteria; em chá da casca, para lavar os cabelos e em pasta como antisséptico (FONSECA e PEREZ, 2003; SULTANA e GULZAR, 2012).

Alguns estudos mostram que *A. pavonina* tem efeito anti-inflamatório, analgésico, anti-hipertensivo, antidiabético, hipolipemiantes, antibacteriano, antifúngico, anti-helmíntico e antioxidante citotóxico. Os microrganismos utilizados para o teste, com ótimo efeito, foram *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pheretima posthuma* e *Ascardia galli*. As análises fitoquímicas desta planta evidenciaram a presença de saponinas, taninos, alcaloides, flavonoides, glicosídeos cardíacos, triterpenóides, anel de lactona, O-acetiletanolamina, octanol, dulcitol e quitinase. As saponinas têm grandes propriedades farmacológicas contribuindo na absorção de hormônios sexuais, cortisona, esteroides diuréticos, vitamina D e glicosídeos cardíacos. Os taninos explicam o efeito antisséptico encontrado na *A. pavonina*, por meio da precipitação de proteínas que ajuda na formação de uma camada protetora nas células superficiais da mucosa e dos tecidos danificados. Os flavonoides estão relacionados aos efeitos anti-inflamatório, antialérgico e antitrombótico. E os glicosídeos cardíacos favorecem o efeito desta planta como anti-hiperlipidêmico. Dessa forma essas análises evidenciam o uso dessa planta para a finalidade medicinal (PANSERA et al, 2003; SANTOS et al, 2004; MAHIDA e MOHAN, 2007; ARA et al, 2010; DASH et al, 2010; MARUTHAPPAN e SHREE, 2010; HUSSAIN et al, 2011; PANDHARE et al 2012a; PANDHARE et al 2012b; SOARES et al, 2012).

Várias plantas, como *A. pavonina* possuem a enzima quitinase, que pode estar localizado em vários tecidos e órgãos. Essas enzimas desempenham diferentes funções na planta, entre elas atuação na defesa, desempenhando atividades inibitórias contra uma variedade de patógenos, como fungos, bactérias, protozoários e nematódeos (SANTOS et al, 2004; SANTOS et al, 2007).

Sultana e Gulzar (2012) elaboraram um óleo de *A. pavonina* e comparam com outros óleos vegetais comercializados. Segundo eles o óleo de *A. pavonina* tem uma formulação nutricional equilibrada, rico em ácidos graxos insaturados e ácido lignocérico de cadeia longa, que é benéfico para humanos. Dessa forma essa semente também pode ser fonte de alimento para animais e aves, devido ao alto teor protéico.



Figura 3: *Adenanthera pavonina*

Fonte: <http://www.ethnoplants.com/catalog/adenanthera-pavonina-santalwood-tree-seeds-pi-109.html>



Figura 4: sementes de *Adenanthera pavonina*

Fonte: Carvalho, 2013

3.6 SINERGISMO DE ANTIVIRAIS

A combinação de drogas para uma terapia eficaz possui dois lados, ao mesmo tempo em que a combinação beneficia o tratamento, ela também aumenta os riscos de efeitos colaterais e a utilização de recursos, principalmente quando estamos falando de antivirais que tem mecanismos de ação similares. A combinação de antivirais para o tratamento de HSV é limitada, pois existem somente duas drogas eficientes. Quando pensamos na família do Aciclovir, como Famciclovir, Valaciclovir e Penciclovir, todos tem o

mesmo mecanismo, porém se administrados em conjunto podem potencializar o efeito, com características aditivas e não sinérgicas. Outra associação poderia ser feita com Aciclovir e Foscarnet, que mostram efeito subaditivo, ou seja, quando as drogas são combinadas tem efeito bom, porém quando administradas sozinhas apresentam maior eficácia. Também é necessário lembrar que quando essas drogas são administradas em conjunto aumentam a sua toxicidade, tornando a sua administração inviável (SUHNEL, 1990; GEBHARDT et al, 2009; CHONO et al, 2013).

4. REFERÊNCIAS

- ADEDAPO, A.D.A. et al. Blood pressure lowering effect of *Adenanthera pavonina* seed extract on normotensive rats. **Records of Natural Products**.v.3, n.2, p.82-89, 2009.
- ALMOND, J.W. Poliovirus neurovirulence. **Seminars in the neurosciences**. V. 3, p.101-108, 1991.
- ARA, A. et al. Anti-inflammatory activity of *Adenanthera pavonina* L., fabaceae, in experimental animals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.20, n.6, p.929-932, dez., 2010.
- AZWA, A.; BARTON, S. Aspects of herpes simplex virus: a clinical review. **Journal of Family Planning and Reproductive Health Care**. Inglaterra, v.35, n.4, p. 237-243, ago., 2009.
- BACON, T.H. et al. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. **Clinical Microbiology Reviews**. V.16, n.1, p.114-128, jan., 2003.
- BALDWIN, H. Genital herpes: diagnosis and treatment. **Journal of the American Academy of Dermatology**. Fev., 2001.
- BARBOZA, F.M. et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico simples e rápido por espectroscopia UV para a quantificação de aciclovir em matrizes hidrofílicas de liberação prolongada. **Química Nova**. V.33, n.3, p.747-749, 2010.
- BELSHE, R.B. et al. Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. **The New England Journal of Medicine**. Massachusetts. V.366, p. 34-43, jan., 2012.
- BERNSTEIN, D.I; STANBERRY, L.R. Herpes simplex virus vaccines. **Vaccine**. V.17, p.1681-1689, 1999.
- BETZ, U.A.K. et al. Potent in vivo antiviral activity of herpes simplex virus primase-helicase inhibitor BAY-57-1293. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Vol. 46, n.6, p.1766-1772, jun., 2002.
- BLACK, F.L. Infectious diseases in primitive societies. **Science**. V.187, p. 515-518, fev., 1975.
- BROOKS, G.F. et al. **Microbiologia Médica**. 25 ed. Porto Alegre: AMGH editora, 813p, 2012.
- BRUGHA, R. et al. Genital herpes infection: a review. **International Journal of Epidemiology**. Inglaterra, v. 26.n. 4, p. 698-709, 1997.
- BURREL, S. et al. Genotypic Characterization of UL23 Thymidine Kinase and UL30 DNA Polymerase of Clinical Isolates of Herpes Simplex Virus: Natural Polymorphism and mutations Associated with Resistance to Antivirals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V.54, n.11, p.4833- 4842, nov., 2010.

- BURREL, S. et al. Impact of novel mutations of herpes simplex virus 1 and 2 thymidine kinases on acyclovir phosphorylation activity. **Antiviral Research**.V.96, p.386-390, 2012.
- BUTEL, J.S. Picornavírus (grupo dos enterovírus e rinovírus) In: BROOKS, G.F. et al. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. AMGH: Porto Alegre. 25 ed., 2012.
- CAMPOS, A.L.V.et al. A história da poliomielite no Brasil e o seu controle por imunização. **História, Ciência e Saúde**, Rio de Janeiro, v.10, p.573-600, 2003.
- CAVINESS, A.C. Neonatal herpes simpexvírus infection.**Elsevier**.V.14, n.2, p.135- 145, 2013.
- CERNIK, C.; GALLINA, K.; BRODELL, R.T.The treatment of herpes simplex infections.**American Medical Association**. V. 168, n.11, p. 1137-1144, jun., 2008.
- CERQUEIRA, M.A. et al. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrates Polymers**.V.75, p.408-414, 2009.
- CHENTOUFI, A.A. et al. Towards a rational design of an asymptomatic clinical herpes vaccine: the old, the new, and the unknown. **Clinical and Developmental**. v. 2012, p.1-16, 2012.
- CHONO, K. et al. Synergistic activity of amenamevir (ASP2151) with nucleoside analogs against herpes simplex virus types 1 and 2 and varicella-zoster virus.**Antiviral Research**.v.97, p.154-160, 2013.
- CHUMAKOV, K. ENRENFELD, E. New Generation of inactivated poliovirus vaccines for universal immunization after eradication of poliomyelitis. **Clinical Infectious Diseases**. V. 15 n. 47, p. 1587-1592, 2008.
- CLERCQ, E. Human viral diseases: what is next for antiviral drug discovery? **Current Opinion in Virology**.V.28, p.572-579, 2012.
- COSTELLO, M.T. et al. Herpes simplex virus infections and current methods for laboratory detection. **Clinical Microbiology Newsletter**, Canadá, V. 28, n. 24, p. 185-192, dez., 2006.
- CUNHA, P.L.R.; PAULA, R.C.M.; FEITOSA J.P.A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira : uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**. V.32, n.3, p.649-660, 2009.
- DALAI, S.K. et al. Prophylactic and therapeutic effects of human immunoglobulin on the pathobiology of HSV-1 infection, latency, and reactivation in mice. **Journal of NeuroVirology**. V. 8, p.35-44, 2001.
- DASH, S. et al. Phytochemical and anthelmintic screening of grude back extract of *Adenanthera pavonina*. **International Journal of Comprehensive Pharmacy**.V.1, n.2, p.1-4, 2010.
- DUTTA, A. Epidemiology of poliomyelitis: options and update. **Vaccine**. v.26, p.5767-5773, 2008.

ENQUIST, L.W. Virology in the 21st century. **Journal of Virology**. V.83, n.11, p.5296-5308, jun., 2009.

FERREIRA, G.E. et al. In vitro anti-HSV-1 activity of chemically sulfated galactomannan from *Leucaena leucocephala* seeds. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. V.31, n.2, p.164-170, 2010.

FLINT, S. et al. **Principles of Virology**. 3 ed. USA: ASMpress, 2009.

FONSECA, S.C.L.; PEREZ, S.C.J.G.A. Ação do polietileno glicol na germinação de sementes de *Adenanthera pavonina* L. e o uso de poliaminas na atenuação do estresse hídrico sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 25, n. 1, p.1-6, 2003.

GEBHARDT, B.M. et al. Effect of combinations of antiviral drugs on herpes simplex encephalitis. **Drug Design, Development and Therapy**. V.3, p.289-294, 2009.

GELLER, M. et al. Herpes simples: atualização clínica, epidemiológica e terapêutica. **Journal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. V. 24, n.4, p.260-266, 2012.

GERBER, P. et al. Protective effect of seaweed extracts for chicken embryos infected with influenza B or mumps virus. **Experimental Biology and Medicine**. v. 99, p. 590-593, 1958.

GHOSH, T. et al. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure-activity analysis to clinical evaluation. **Glycobiology**. V.19, n.1, p. 2-15, 2009.

GLOBAL POLIO ERRADICATION INITIATIVE. Disponível em: <http://www.polioeradication.org/>. Acesso em: 10 fev. 2014.

HOGLE, J.M. Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry. **Annual Review of Microbiology**. V 56, p. 677-702, 2002.

HORSTMANN, D. M. Clinical aspects of acute poliomyelitis. **American Journal of Medicine**. P.592-605, 1949.

HUSSAIN, A. et al. Antibacterial screening of the bark of *Adenanthera pavonina*. **International Journal of Biomedical Research**. V.2, n.2, p.110-122, 2011.

JESUS, N.H. Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis. **Virology Journal**. v.4, n.70, p.1-8, 2007.

KEW, O.M. et al. Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. **Bulletin of the World Health Organization**. V.82, p.16-23, 2004.

KHAN, B.F.; PAVAN-LANGSTON, D. Clinical manifestations and treatment modalities in herpes simplex virus of the ocular anterior segment. **International Ophthalmology Clinics**. V. 44, n. 3, p. 103-133, 2004.

KIM, D.K. et al. Synthesis and evaluation of amino acid ester prodrugs of penciclovir. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. V.6, n.15, p.1849-1854, 1996.

- KITAZATO, K.; WANG, Y.; KOBAYASHI, N. Viral infectious disease and natural products with antiviral activity. **Drug Discoveries Therapeutics**. V.1, n.1, p.14-22, jul., 2007.
- KOELLE, D.M.; COREY, L. Recent progress in herpes simplex virus immunobiology and vaccine research. **Clinical Microbiology Reviews**. V.16, n.1, p. 96-113, jan., 2003.
- KRISHNAVENI, A. et al. Antidiabetic, hypolipidemic activity of *Adenanthera pavonina* seeds in alloxan induced diabetic rats. **Journal of Pharmacy Research**. V. 4 n.5, p.1440-1442, maio, 2011.
- LUPI, O. Herpes simples. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Rio de Janeiro. V. 75, n. 3, p. 261-275, maio/jun., 2000.
- MAHIDA, Y.; MOHAN, J.S.S. Screening of plants for their potential antibacterial activity against *Staphylococcus* and *Salmonella spp.* **Natural Product Radiance**. V.6, n.4, p. 301-105, jul./ago., 2007.
- MARUTHAPPAN, V.G.; SHREE, K.S. Blood cholesterol lowering effect of *Adenanthera pavonina* seed extract on atherogenic diet induced hyperlipidemia rats. **Internation Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. V.1, n.7, p.87-94, 2010.
- MINOR, P.D. Polio eradication, cessation of vaccination and reemergence of disease. **Nature Reviews Microbiology**. V.2, p.473-482, 2004.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ministério da saúde e Rotary reforçam o compromisso de eliminar a poliomielite no mundo**. Disponível em : <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/profissional-e-gestor/vigilancia/noticias-vigilancia/7682->>. Acesso em: 10 fev. 2014
- MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLEE, M. Herpesvírus humano. In: **Microbiologia Médica**. 6 ed. cap.53. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- NASCIMENTO, D.R. As campanhas de vacinação contra a poliomielite no Brasil (1960-1990). **Ciência e Saúde Coletiva**. V.16, n.2, p. 501-511, 2011.
- NASEMANN, T. H.; WASSILEW, S.W. Vaccination for herpes simplex genitalis. **British Journal of Veneral Diseases**. V.55, p.121-122, 1979.
- NATHANSON, N. e KEW, O.L. From emergence to eradication: the epidemiology of poliomyelitis descontracted. **American Journal of Epidemiology**. V. 172, n.11, p.1213-1229, 2010
- NGUYEN, T.L. et al. In vitro antiviral activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides. **Carbohydrates Polymers**. V.90, p.1254-1258, 2012.
- OHKA, S. e NOMOTO, A. Recent insights into poliovirus pathogenesis. **Trend in Microbiology**. V.9, n.10, p. 501-506; out., 2001.
- OLIJIDE, O.A. Anti-inflammatory studies on *Adenanthera pavonina* seed extract. **Inflammopharmacology**. V.12, n.2, p.197-202, 2004.

- PALLANSH, M. ROOS, R. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Never Enteroviruses. In : KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 5ed. V.2, 2007.
- PANDHARE, R.B. et al. Anti-hyperglycaemic and lipid lowering potential of *Adenanthera pavonina* Linn. in streptozotocin induced diabetic rats. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**. v.12, p.197-203, maio, 2012b.
- PANDHARE, R.B. et al. Attenuating effect of seeds of *Adenanthera pavonina* aqueous extract in neuropathic pain in streptozotocin-induced diabetic rats: an evidence of neuroprotective effects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.22, n.2, p.428-435, mar./abr., 2012a.
- PANSERA, M.R. et al. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista de Farmacognosia**. V.13, n. 1, p.17-22, jan/jun, 2003.
- PEREIRA, F.A. Herpes simplex: evolving concepts. **Journal of the American Academy of Dermatology**. V.35, n.4, p.503-520, out., 1996.
- PEREIRA, V.S.S. et al. Herpes simplex vírus type 1 is the main cause of genital herpes in women of Natal, Brazil. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. V. 161, p. 190-193, 2012.
- PINTO, A.C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**. V.25, p.45-61, 2002.
- PIRET, J.; BOIVIN G. Resistance of herpes simplex virus to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V.55, n.2, p.459-472, fev., 2011.
- PLETSCHI, M. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília. V.1, n. 4, jan./fev., 1998.
- ROIZMAN, B.; WHITLEY, R.J. The nine age of herpes simplex virus. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Washington, V. 8, n. 1, p. 23-27, 2001.
- SANTOS, I.S. A chitinase from *Adenanthera pavonina* L. seeds: purification, characterisation and immunolocalisation. **Plant Science**. V. 167, p. 1203-1210, 2004.
- SANTOS, I.S. et al. Expression of chitinase in *Adenathera pavonina* seedlings. **Physiologia Plantarum**. V.131, p.80-88, 2007.
- SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução à VIROLOGIA HUMANA**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 532 p., 2008.
- SCHATZMAYR, H.G. et al. Erradicação da poliomielite no Brasil: a contribuição da Fundação Oswaldo Cruz. V. 9, n.1, p.11-24, jan.-abr., 2002
- SCHUSTER, L.C.; BUSS, C. Do herpes e suas implicações audiológicas: uma revisão da literatura. **Revista CEFAC**. V. 11, n. 4, p. 695-700, out.-dez., 2009.
- SILVA, P. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1400, p. 2002.

- SOARES, J.R. et al. Antimicrobial peptides from *Adenanthera pavonina* L. seeds: characterization and antifungal activity. **Protein & Peptide Letters**.V.19, n.5, p.520-529, 2012.
- SONG, X. et al. Antiviral activity of sulfated *Chuanminshen violaceum* polysaccharides against duck enteritis virus in vitro.**Antiviral Research**.V.98, p. 344-351, 2013.
- SOOMRO, R.K.; SHERAZI, S.T.H. Spectroscopic and chromatographic evaluation of the wax ester fraction of *Adenanthera pavonina* oil.**Industrial Crops and Products**. v.36. p.294-298, 2012.
- STRAUS, S.E. Vírus herpes simples e vírus relacionados ao vírus herpes. In: SCHAECHTER, M. et al. **Microbiologia**: mecanismos das doenças infecciosas. 3ed. Cap.41. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 338-347, 2002.
- SUHNEL, J. Evaluation of synergism or antagonism for the combined action of antiviral agents.**Antiviral Research**.V.13, p.23-40, 1990.
- SULTANA, R.; GULZAR, T. Proximate analysis of *Adenanthera pavonina* L. seed oil, a source of lignoceric acid grown in pakistan. **Journal of the American Chemical Society**.V.89, p. 1611-1618, 2012.
- THOMPSON, K.D. Herbal extracts and compounds active against herpes simplex vírus. **Lead molecules from natural products**. p. 65-86, 2006.
- TRINDADE, A.K.F. et al. Herpes simples labial: um desafio terapêutico. **Comunicação Ciência e Saúde**. V. 18, n.4, p.307-314, 2007.
- TUSET, M. et al. Características de los fármacos antivíricos frente a vírus del grupo herpes actualización 2009. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. V. 28,n.3, p. 199e1-199e-33,2010.
- VARELLA, R.B. et al. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo virus herpes simples (HSV) em pacientes transplantados e não-transplantados. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. V. 41, n. 4, p. 257-262, ago., 2005.
- WHITLEY, R.J. Herpes simplex virus infection.**Seminars in Pediatric Infectious Diseases**. V. 13, n. 1, p. 6-11, jan., 2002.
- WHITLEY, R.J.; KIMBERLIN, D.W.; ROIZMAN, B. Herpes simplex viruses.**Clinical Infectious Diseases**. V. 26, p. 541-555, 1998.
- WHITLEY, R.J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections.**The Lancet**.V.357, p.1513-1518, maio, 2001.
- WIMMER, E. et al. Genetics of poliovirus.**Annual Reviews Genetics**. V. 27, p.353-436, 1993.

5 ARTIGO

5.1 ARTIGO I

ORIGINAL PAPER: ANTI-HERPETIC ACTIVITY OF POLYSACCHARIDES FROM *Adenantha pavonina*

Ananda Marques de Godoi^a, Ligia Carla Faccin-Galhardi^a, Nayara Lopes^a, Nágila Maria Pontes Silva Ricardo^b, Carlos Nozawa^a, Rosa Elisa Carvalho Linhares^{a*}.

^a Departamento de Microbiologia, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina, PR, Brazil.

^b Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, CEP 60020-181, Fortaleza, CE, Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +55 43 33714617; fax: +55 43 33715828

E-mail: relin@uel.br

Abstract

Herpes simplex virus (HSV) is one of the most regular human pathogens and the causal agent of several diseases, being, therefore, a public health problem. Research for new anti-herpetic compounds from natural products, with low cytotoxicity and acting at different stages of viral replication, is encouraged. *Adenantha pavonina* is a plant traditionally used in Brazil for the treatment of several diseases, among other uses. In this work, we evaluated the anti-herpetic activity of a native and its chemically sulfated polysaccharide from *A. pavonina* seeds, in HEp2 cell cultures. The antiviral activity was greatest for the sulfated derivate polysaccharide (SPLSAP). The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) of SPLSAP was determined as 500 µg/ml by dimethyl thiazolyl diphenyltetrazolium bromide method. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) for SPLSAP was equal to 15µg/ml, determined by the plaque reduction assay (PRA), and the selectivity index (SI) of 33.3. The SPLSAP highest HSV-1 inhibitory activity was demonstrated in concomitantly (time-of-addition and time-of-removal) between 8 – 16h after infection. Concurrently with these findings, we demonstrated that SPLSAP inhibited the viral protein and DNA syntheses evaluated by immunofluorescence and PCR assay, respectively. We demonstrated, therefore, that the SPLSAP acts at different HSV-1 replication stages and suggest as a potential candidate for further assays in view for its future use in herpesvirus infection control.

Keywords: Anti-HSV, polysaccharide, *A. pavonina*.

Abbreviations: CC₅₀, 50% cytotoxic concentration; IC₅₀, 50% inhibitory concentration; SI, selectivity index; PLSAP, polysaccharide from *A. pavonina*; SPLSAP, sulfated polysaccharide from *A. pavonina*; ACV, acyclovir; CI, combination index.

INTRODUCTION

Herpes simplex virus (HSV), belonging to the family *Herpesviridae*, is an enveloped double-stranded DNA virus (150-153 kbp), with an icosahedral capsid formed by 162 capsomers (Whitley and Roizman 2001). Cause infection in the skin or mucosa and establish latent infections in the sensory ganglia. The oral infection is the most common, mainly in childhood and adolescence, followed by genitalia and eyes areas involvement (Lupi 2000; Geller et al. 2012). Severe infections, such, as encephalitis and meningitis can be detected, especially in immunocompromised and neonates (Khan and Pavan-Langston 2004). The highest prevalence of HSV-1 is found in Central America, Africa and Asia (Azwa and Barton 2009).

The reference drug for HSV-1 treatment is the acyclovir (ACV), even after 44 years of its development. ACV inhibits viral DNA chain elongation selectively during HSV replication (Richard and Whitley, 2002). The continuous use of this drug has selected resistant strains, despite its selectivity. Thus, the research for new anti-herpetic compounds from natural products is encouraged, especially because these products can act at different stages of viral replication, decreasing the selection of resistance and probably presenting lower cytotoxicity (Tuset et al. 2010).

The medicinal plants play a major role, and constitute the backbone of the traditional medicine and has been over looked upon not only as a source of affordable health care but also as a source of income (Li and Peng 2013). Brazil presents a great potential for research in this area due to its outstanding biodiversity and ethnopharmacological knowledge of many medicinal plants (Cunha et al. 2009a). *A. pavonina* (Family: Fabaceae), is a tree popularly known as red-bead tree, carolina, pigeon's eye and dragon's eye. On the phytochemical grounds, the seeds of *A. pavonina* contain O-acetyethanolamine and the leaves possesses sterols, such as, octacosanol, dulcitol, b-sitosterol and stigmasterol. The barks also contains stigmasterol and pods contain glycosides, saponins and steroids (Arshad et al. 2010). Pavonin

- a new five-membered lactone ring with an exocyclic double-bonded compound is also found. This species is largely used in Brazil for shade tree, ornamental, reforestation, and handicraft purposes. However, remarkably, empirical knowledge has provided the basis for the treatment of several diseases including boils, blood disorders, arthritis, rheumatism, cholera, paralysis, epilepsy, convulsion, spasm, respiratory infections, indigestion (Burkill et al. 1966; Anna et al. 2006) and chronic ophthalmia (Fonseca and Perez 2003). The following pharmacological effects have been also attributed to the plant, anti-inflammatory, analgesic, blood pressure lowering, antioxidant, cytotoxic, anti-diabetic and antihyperlipidemic (Mujahid et al. 2013). The antimicrobial activity has also been attributed to the plant, against gram-positive (*S. lutea*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *S. aureus* and *S. typhimurium*) and gram-negative bacteria (*E. aerogenes*, *V. mimicus* and *P. aeruginosa*) (Ara et al. 2010; Hussain et al. 2011; Ndidiamaka et al. 2011). The inhibitory effect of *A. pavonina* peptides have been shown in *S. cerevisiae* and *C. albicans* (Santos et al. 2004; Soares et al. 2012). Therefore, this work evaluated the anti-herpetic activity of a polysaccharide isolated from seed of *A. pavonina* and its sulfated derivative, in vitro.

MATERIALS AND METHODS

Cells and virus

HEp-2 cells (human larynx carcinoma cells, ATCC CCL-23) were grown at 37° C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco BRL*, Gaithersburg, USA) and treated with 100 µg/ml streptomycin (*), 100 IU/ml penicillin (Novafarma Indústria Farmacêutica, Anápolis, BR) and 2.5 µg/ml fungizone (Meizler Biopharma S/A, São Paulo, BR). The HSV-1 strain was provided by the Departamento de Virologia/IMPPG/UFRJ, Brazil, propagated in HEp-2 cell cultures and stored at -20°C with 10% glycerol. The virus titer was determined by plaque assay.

Compounds

A. pavonina (L.) seeds were collected at the Campus do Pici, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil, from November to December 2010. *A. pavonina* polysaccharide (PLS Ap) was extracted from the endosperms with hot water (85 °C) (Vieira et al. 2007). To obtain the sulfated derivative (SPLS Ap), 300 mg of galactomannan were allowed to swell in pyridine:N,N-dimethylformamide (50:10 v/v) under stirring at 25 °C for 12 h until finely dispersed suspensions were obtained. The mixture was cooled to 4 °C and 12 ml chlorosulfonic acid was slowly added under stirring over 24 h at 4 °C. The resulting solution was neutralized with saturated aqueous sodium bicarbonate, dialyzed (molecular weight cut off 8-12 kDa) for 120 h against distilled water and the sulfated derivative was collected after lyophilization (O'Neill 1955; Ono et al. 2003).

The degree of sulfation (DS) was ascertained from the sulfur content (%S) determined by elemental analysis using a Perkin-Elmer CHNS 2400 analyzer, and calculated by the equation, $DS = (1.62 \times \%S)/(32 - 1.02 \times \%S)$ (Wang et al. 2010). The PLS Ap and SPLS Ap stock solutions were prepared by dissolving them in ultrapure water.

The Fourier transform IR spectra (FT-IR) of PLS Ap and SPLS Ap were recorded with a Shimadzu IR spectrophotometer (Model 8300) in the range of 400 and 4000 cm^{-1} as a KBr pellet. The molar mass was determined by gel permeation chromatography (GPC) with a Shimadzu LC-10AD chromatograph with an RID-10A refractive index detector at 40 °C. The analysis was performed with an Ultrahydrogel linear column (7.8 mm \times 300 mm), flow rate of 0.5 ml/min, polysaccharide concentration of 0.1% (w/v), dissolved in water and 0.1 mol/l sodium nitrate was used as eluent. The sample volume injected was 20 μl .

The intrinsic viscosity $[\eta]$ measurements were taken using a Cannon-Fenske viscometer (Schott-Geräte, Model AVS-350). Dilutions at concentrations in the range of 0.02 to 0.10 g/dl were prepared in distilled water, followed by filtration in a sintered-glass plate of medium

grade. An aliquot of 5 ml of each solution was placed in a thermostated capillary Schott 520 13 at $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.01$. The values of drainage times obtained are the average of six independent determinations.

The PLSAp antiviral activity

The cytotoxicity of the PLSAp and SPLSAp was performed in cell cultures grown in 96-well microplates (TPP, Trasadingen, Switzerland) and determined by the dimethyl thiazolyl diphenyltetrazolium bromide kit assay (MTT) (Sigma Chem. Co., St. Louis, USA), according to the manufacturer's instructions. The tested concentrations ranged from 50 $\mu\text{g/ml}$ to 1000 $\mu\text{g/ml}$ and cell viability percentage was calculated by the formula, $[100 - (At/Ac) \times 100]$, where *At* and *Ac* refer to the absorbance of test substance and control (untreated cells), respectively. The concentration of the polysaccharides capable of reducing cell viability by 50% in comparison to cell control, represented by the 50% cytotoxic concentration (CC_{50}), was calculated by regression analysis of the generated curves.

The antiviral activity of PLSAp and SPLSAp was determined by plaque reduction assay (PRA). Briefly, cell cultures grown in 24-well microplates (TPP, Trasadingen, Switzerland) were inoculated, simultaneously (time 0 hour) with HSV-1 (50 to 100 PFU) and DMEM containing concentrations of PLSAp and SPLSAp from 6 to 800 $\mu\text{g/ml}$ (Faccin-Galhardi et al. 2012). Cultures were overlaid with nutrient agarose (DMEM 2x/1.8% agarose [v/v]) containing 25 mM magnesium chloride. After 40 h incubation, cells were fixed with 10% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.3, for 24 h and stained with 0.5% crystal violet in 20% ethanol. Plaques were counted and the percentage of viral inhibition (%VI) was calculated as, $[1 - (Vd/Vc)] \times 100$, where *Vd* and *Vc* refer to the number of plaques in the presence and absence of the compounds, respectively (Nishimura et al. 1977). The minimal concentration of the compounds required to reduce 50% of UFP (IC_{50}) was

calculated by regression analysis. The selectivity index (SI) is expressed by the ratio CC_{50}/IC_{50} .

Zynvir (sodium ACV) (Novafarma Indústria Farmacêutica, Anápolis, BR) was used as the positive control for viral inhibition.

The evaluation of the Anti-HSV mechanism by SPLSAP

The virucidal effect of SPLSAP was determined according to Rincão et al. (2012). The virus suspension (10^4 PFU/ml) was incubated for 1 h at 37°C with DMEM containing the concentrations of 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml and 200 µg/ml of test compound, followed by PRA. For pre-treatment assay, cell monolayers were pre-incubated with DMEM containing the SPLSAP (25 µg/ml - 200 µg/ml), for 1 and 2 h at 37 °C, and cells were inoculated with HSV-1 afterwards and followed by PRA (Minari et al. 2011). The inhibitory effect of SPLSAP in the viral adsorption on to the cells, was done according to Yamamoto et al. (2013). Briefly, the cell monolayers were previously maintained at 4°C for 1 h followed by infection and treatment with the test substance, at the same concentrations used before. After 80 min adsorption at 4°C, the cells were washed thrice with cold PBS and followed by PRA. The inhibition of viral penetration assay was performed as described in Lopes et al. (2013). The cells were pre-incubated at 4°C for 30 min, infected and maintained at 4°C for further 90 min adsorption. The cultures were submitted to concentrations of SPLSAP and incubated at 37°C for 10 min. The cells were washed with PBS (pH 3.0) for 1 min and immediately neutralized with PBS (pH 11.0) followed by PRA.

The time-of-addition and time-of-removal assays were performed as described by Su et al. (2008) with minor modifications. For the time-of-addition, DMEN containing varying concentrations (25 – 200 µg/ml) of SPLSAP was added into cell monolayer at varying times after virus infection (1, 2, 4, 8, 16 and 24h) followed by PRA. For the time-of-removal assay,

DMEN added of SPLSA_p was placed into cell monolayer immediately after virus infection. At varying times after virus infection, the medium was removed, and the cells washed thrice followed by plaque assay. The immunofluorescence (IF) assay was performed according to Faccin et al. (2007). HEp-2 cells grown in 24-well microplates with cover slips were inoculated with 500 µl of HSV-1 (MOI = 1) and treated with test polysaccharide at the concentrations of 6 – 200 µg/ml, at the time zero of infection (0 h). Appropriate controls were used. Twenty-four hours post-infection, the cells were washed with 0.05% Tween 20 PBS, fixed with cold acetone (-20°C) for 20 min and blocked with 2% powdered skim milk PBS during 30 min. The cells were incubated for 30 min at 37°C with mouse anti-HSV-1 (Santa Cruz Biotechnol., Paso Robles, USA), washed thrice with Tween 20 PBS and incubated for an additional 30 min at 37 °C with goat anti-mouse IgG FITC conjugate (Sigma Chem. Co., St. Louis, USA). The cells were examined in a Zeiss fluorescence microscope (Zeiss Axio Imager.A1) and 100 cells/cover slips were scored and the percentage of fluorescent cells inhibition calculated. The experiments were carried out in triplicate.

The effect of SPLSA_p in the synthesis of viral DNA was performed, as described by Lopes et al. (2013). Viral DNA of infected cells (2×10^6 cells) treated with varying concentrations of the compound (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.2, 3.1 µg/ml) was extracted with commercial kits (QIAamp® DNA Mini and Blood Mini, Qiagen, Valencia, USA). Viral DNA from infected cells treated with ACV (3 mg/ml), viral DNA of infected cells without SPLSA_p treatment and DNA from noninfected cells and without treatment were used as controls. The primer pairs used for ICP4 were ICP4F (5'GGCGGGAAGTTGTGGACTGG3') and ICP4R (5'CAGGTTGTTGCCGTTTATTGCG3'). The reaction was carried out in a final volume of 25 µl containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 2 pmol of each specific primer (*Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK), 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (*), and 5 µl of extracted DNA. The program consisted of denaturation

at 94°C for 4 min and 40 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min, and polymerization at 72°C for 1 min, followed by a final extension for 7 min at 72°C. Ten microliters of the PCR products were resolved on 12% polyacrylamide gel. The expected size for ICP4 amplicon is 138 bp.

The CI of SPLSAP with ACV:

The test was performed according to Lopes et al. (2013). The SPLSAP was tested separately for four concentrations: 0.25 x IC₅₀, 0.5 x IC₅₀, 1.0 x IC₅₀ and 2.0 x IC₅₀, and the ACV was also tested separately for four concentrations: 0.25 x IC₅₀, 0.5 x IC₅₀, 1.0 x IC₅₀ and 2.0 x IC₅₀. The mixture of varying concentrations of SPLSAP and ACV in a fixed ratio, i.e., 0.25 x IC₅₀ of SPLSAP combined with 0.25 x IC₅₀ of ACV, added concomitantly to infection, was submitted to PRA. The degree of SPLSAP and ACV interaction was found by the combination index (CI) = CA/CB + IC₅₀A/IC₅₀B, where CA and CB are the concentrations of the substances A and B used in combination to achieve 50% effect, and IC₅₀A and IC₅₀B are the inhibitory concentrations for the agents alone to cause the same effect. A CI less than, equal to or greater than one indicates synergism, additivity and antagonism, respectively (Zhao et al. 2004).

Statistical analysis

Anova followed by Tukey's test (BioEstat 5.0 for Windows XP, 2007) were applied to determine the difference among polysaccharides experiments and control groups. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

The characterization of the PLSAP

The table 1 compares the *A. pavonina* polysaccharides. The presence of sulfated groups was identified by comparison of the infrared spectra of the *A. pavonina* galactomannan (PLS Ap) and its sulfated derivative (SPLS Ap). The SPLS Ap presented 13.6% of amount of S (S%) and degree of sulfation (DS) of 1.21. The derivative spectrum (Fig. 1) presented a new absorption at 1257 cm^{-1} , assigned to the asymmetric stretching vibration of the S=O linkage. The FT-IR spectra for the PLS Ap sample show characteristic absorption bands of the galactomannans (Table 2) as reported in the literature (Mahner et al. 2001; Yang et al. 2003).

The molar mass value ($M_w = 3.90 \times 10^6$ g/mol) for PLS Ap was approximate of those found in other publications where they obtained molar mass values in the range of 7.0×10^5 to 3.05×10^6 g/mol (Fig. 2), noting that the mass variation depends on the source and of the extraction process of the polysaccharide (Beer et al. 1999; Azero and Andrade 2002; Cunha et al. 2009b). The M_w value (7.0×10^5 g/mol), for the derivative SPLS Ap , is similar to those reported for sulfated galactomannans by other authors: *M. scabrella* (6.20×10^5 g mol $^{-1}$) (Chrestani et al. 2009) e *L. leucocephala* (5.74×10^5 g mol $^{-1}$) (Ono et al. 2003). In the sulfated derivative (SPLS Ap) a reduction in M_w value occurred, in relation to the natural polymer, which can be assigned to the degradation of the polysaccharide during the sulfation reaction (Vogl et al. 2000; Yang et al. 2003).

The intrinsic viscosity value $[\eta]$ for PLS Ap (10.4 dL / g), analyzed in the present work, was similar to those reported for seeds galactomannans: from *S. japonica* (10.29-12.11 dL / g) (Smirnova et al. 2004) and from *C. pulcherrima* (13.75 dL / g) (Andrade et al. 1999). There was a reduction in the $[\eta]$ value for SPLS Ap (3.2 dL / g), in relation to the natural polymer PLS Ap , which can be assigned to the minor value of M_w (Fig. 3). The differences found for the $[\eta]$ values can be related to the different extraction processes used, branching degree and the molar mass values of the polysaccharides. (Beer et al. 1999; Monteiro et al. 2005).

The antiviral activity of the PLSAp

The CC_{50} of PLSAp and SPLSAp are shown in Table 3 with the respective values of > 6000 and 500, and 2550 $\mu\text{g/ml}$ for ACV used as positive control. The highest antiviral effect was found for SPLSAp with an IC_{50} of 15 $\mu\text{g/ml}$ and SI of 33.3. PLSAp demonstrated an IC_{50} of 744 $\mu\text{g/ml}$ and $SI > 8$. ACV showed an IC_{50} of 2100 $\mu\text{g/ml}$ and SI of 2.1.

The mechanism of Anti-HSV action of SPLSAp

The Table 4 shows that SPLSAp, under the virucidal and pretreatment (1h before infection) assays, inhibited, in both protocols, about 30% of viral replication, and 24.4% and 18% in the inhibition of the attachment and penetration steps, respectively, at the highest SPLSAp concentration (200 $\mu\text{g/ml}$). The results of the time-of-addition of SPLSAp assay, in that HSV-1 was completely inhibited at the times of 1h and 2h when concentrations of 200, 100, 50 and 25 $\mu\text{g/ml}$ were used are shown in Table 5. Inhibition of 98.8% is shown even at the time 16h post-infection (p.i.) at 200 $\mu\text{g/ml}$. At the same concentration, an inhibition of 51.5% was detected at the time 24h p.i. The time-of-removal assay results are also shown in Table 5. It is shown the lowest inhibitory effect (10.5%) when the SPLSAp was removed after 1h contact. Increasing inhibition directly proportional to the SPLSAp concentration is demonstrated when removed at the time 16h, 66.2% (25 $\mu\text{g/ml}$), 77.4% (50 $\mu\text{g/ml}$), 90.1% (100 $\mu\text{g/ml}$) and 99.3% (200 $\mu\text{g/ml}$). Similar profile is shown for the time of removal 24h. Concordantly, the protocols time-of-addition and time-of-removal of SPLSAp showed the highest HSV-1 inhibition between the times 8 and 16 hours, as shown in Fig. 4.

The evaluation of the SPLSAp effect in HSV-1 protein synthesis showed that at 200 and 100 $\mu\text{g/ml}$ the compound inhibited 100% of viral proteins, nevertheless, at the concentrations of 50, 25, 12.5 and 6.2 $\mu\text{g/ml}$, SPLSAp inhibited viral protein synthesis in 95.2%, 88.1%, 53.4% and 34.6%, respectively (table 6).

The SPLSAP affected HSV-1 DNA synthesis by inhibiting the expression of the *ICP4* gene, as shown in Fig. 5. At 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ of SPLSAP there was a complete inhibition of the respective amplicon (data not show), beginning to be observed the bands from 12.5 $\mu\text{g/ml}$ compared to virus control (HSV-1 inoculated, not treated). The ACV, used as a positive control, inhibited HSV-1 DNA synthesis.

The CI of the SPLSAP with ACV was assayed by the use of four concentrations combinations (SPLSAP/acyclovir), 3.12/500; 7.5/1000; 15/2000 and 30/4000 $\mu\text{g/ml}$. The IC_{50} found after the combinations was of 16.2 $\mu\text{g/ml}$ for the SPLSAP and 2160 $\mu\text{g/ml}$ for ACV, greater than when the compounds were used separately. A CI of 2.1 was found, characterizing an antagonistic effect.

DISCUSSION

The antibacterial and antifungal activities of *A. pavonina* plant extract have been reported, however, it was not investigated on the ground of antiviral effect. This work describes for the first time the effect of a sulfated and the native *A. pavonina* polysaccharide against HSV-1 in cell culture. We demonstrated the highest antiviral effect of the SPLSAP (IC_{50} of 15 $\mu\text{g/ml}$) in comparison to the native form (PLSAP) (IC_{50} of 744 $\mu\text{g/ml}$). This result evidenced that sulfate groups, chemically introduced into the polysaccharide molecule, induces a better effect, and, for this reason the antiherpetic mechanism of action was evaluated for SPLSAP only. The sulfation provides a higher charge density in the molecule interfering efficiently with electrostatic interactions between the positively charged region of a viral glycoprotein and the negatively charged heparan sulfate chains of the cell-surface glycoprotein receptor (Saha et al. 2010). This interaction could explain the inhibition of HSV-1 by SPLSAP under the virucidal and the inhibition of adsorption protocols at all the concentrations used (25 – 200 $\mu\text{g/ml}$). In addition, the polysaccharides can accumulate in the

cells blocking virus penetration as shown elsewhere (Johari et al. 2012). Biesert et al. (1998) showed an increase in cell membrane hydrophobicity as result of exposure to sulfated polyanions, but whether virus entry is actually influenced by a change in membrane polarity remains to be determined. In contrast, it has been shown that sulfated polysaccharides do not interfere with virus attachment or penetration, but exert an indirect action, such as, changes in cell membrane that affect the transmembrane and intracellular signaling processes involved in regulating virus expression (Biesert et al. 1990). In addition, polysaccharide isolated from seeds of *A. pavonina* and its chemically sulfated derivative were characterized as galactomannan. According to Cerqueira (2011), the galactomannans extracted from the seeds of numerous plants (particularly the Leguminosae) are polysaccharides build up of a β -(1–4)-d-mannan backbone with single d-galactose branches linked β -(1–6). β -glucans being predominant to which the antiviral activity may be attributed. Some PLS rich in β -glucans, like PSK from kawaratake, lentinan from shiitake and shizophyllan from suehirotake are effective against several viral agents. The β -glucans can decrease viral nucleic acid levels in infected cells and stimulate the immune system by binding to Toll-like receptors and dectins and causes the induction of various cytokines, among them the interferon. The polysaccharides can induce interferon and, consequently, the antiviral state by stimulation of intracellular signaling pathways (Yamamoto et al. 2013). In order to evaluate whether SPLSAp binding to cell membrane receptor could be triggered by similar effect, the pre-treatment assay was performed. We found that the polysaccharide showed a prophylactic effect, when added 1h before of HSV-1 infection, the percentage of inhibition ranged from 21 to 30.3% for 25 – 200 μ g/ml. In addition and in accordance, the SPLSAp demonstrated an inhibition of viral protein synthesis ranging from 88 – 100%, at the same concentrations. During productive infection, HSV expresses its genes in a tightly regulated cascade, consisting of sequential expression of the immediate-early (IE), early (E) and late (L) genes

and the HSV-1 biosynthesis cycle occur approximately between 18 to 20 h (Roizman et al. 2007; Santos et al. 2008). The analysis of SPLS*Ap* effect in different stages of HSV-1 replication, post-penetration (time-of-addition and time-of-removal, concomitantly), showed the greatest inhibition at the concentrations of 100 and 200 µg/ml, for both tests, at the time 16h. The period from 8 – 16h p.i. roughly coincides with the expression of early and late genes. At this time, synthesis of viral DNA is in course and synthesis of structural protein might be in its initiation, suggesting the SPLS*Ap* action in some of these steps. The total inhibition of viral DNA synthesis when SPLS*Ap* was used at the concentrations 25 - 200 µg/ml, reinforces this hypothesis. We demonstrated that SPLS*Ap* showed an antagonistic effect to that of ACV suggesting that SPLS*Ap* also promotes the inhibitory effect at the similar step of DNA replication, beyond others stages already discussed. We conclude that SPLS*Ap* is an inhibitor of HSV-1 replication with low toxicity and high selectivity, and presents a multistep effect on the replication of HSV-1 infection, therefore, a candidate for further experiments for the control of HSV infection.

REFERENCES

- Andrade, C., Azero, E., Luciano, L., Gonçalves, M., 1999. Solution properties of the galactomannans extracted from the seeds of *Caesalpinia pulcherrima* and *Cassia javanica*: comparison with locust bean gum. *International Journal of Biological and Macromolecules* 26, 181 – 185.
- Anna, J., Robert, Z., Arkadiusz, K., 2006. Emulsions of oil from *Adenanthera pavonina* L. seeds and their protective effect. *Journal Cell Molecular Biology* 11, 438 - 448.

Ara, A., Saleh-e-In, M., Ahmed, N.U., Ahmed, M., Hashem, A., Bachar, S.C., 2010.

Phytochemical screening, analgesic, antimicrobial and anti-oxidant activities of bark extracts of *Adenanthera pavonina* L. (Fabaceae). *Advances in Natural and Applied Sciences* 4, 352-360.

Arshad, H., Sarfaraj, H.M.D., Alisa, R., Shadma, W., 2010. Pharmacognostical

standardization of stem bark of *Adenanthera pavonina* L. *Pharmacognosy Journal* 2, 240-246.

Azero, E.G., Andrade, C.T., 2002. Testing procedures for galactomannan purification.

Polymer Testing 21, 551–556.

Azwa, A., Barton, S., 2009. Aspects of herpes simplex virus: a clinical review. *Journal of*

Family Planning and Reproductive Health Care 35, 237-243.

Beer, M.U., Wood, P.J., Weisz, J., 1999. A simple and rapid method for evaluation of Mark-Houwink-Sakurada constants of linear random coil polysaccharides using molecular weight and intrinsic viscosity determined by high performance size exclusion chromatography: application to guar galactomannan. *Carbohydrate Polymers* 19, 377-380.

Biesert, L., Adamski, M., Zimmer, G., Suhartono, H., Fuchs, J., Unkelbach U., Mehlhorn,

R.J., Hideq, K., Mibradt, R., Rubsamen-Waigmann, H., 1990. Anti-human immunodeficiency virus (HIV) drug HOE/BAY 946 increases membrane hydrophobicity of human lymphocytes and specifically suppresses HIV-protein synthesis. *Medical Microbiology and Immunology*

179, 307 – 321.

Biesert, L., Suhartono, H., Winkler, I., Meichsner, C., Helsberg, M., Hewlett, G., Klimetzek, V., Molling, K., Schlumberger, H.D., Schrunner, E., 1998. Inhibition of HIV and virus replication by polysulphated polyxyylan: HOE/BAY 946, a new antiviral compound. *AIDS* 2, 449 – 457.

Burkill, I.H., Birtwistle, W., Foxworthy, F.W., Scrivenor, J.B., Watson, J.G., 1966. *A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula*. Edited by: Ministry of Agriculture (Malaysia). London: Crown Agents for the Colonies, pp. 2444.

Cerqueira, M.A., Souza, B.W., Simões, J., Teixeira, J.A., Domingues, M.R.M., Coimbra, M.A., Vicente, A.A., 2011. Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. *Carbohydrate Polymers* 83, 179 – 185.

Cunha, P.L.R., Paula, R.C.M., Feitosa, J.P.A., 2009a. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. *Química Nova* 32, 649 - 660.

Cunha, P.L.R., Vieira, I.G., Arriaga, A.M.C., Paula, R.C.M., Feitosa, J.P.A., 2009b. Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. Seeds as a potential guar gum substitute. *Food Hydrocolloids* 23, 880-885.

Faccin, L.C., Benati, F., Rincão, V.P., Mantovani, M.S., Soares, S.A., Gonzaga, M.L., Nozawa, C., Linhares, R.E.C., 2007. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. *Letters in Applied Microbiology* 45, 24-28.

Faccin-Galhardi, L.C., Yamamoto, K.A., Ray, S., Ray, B., Linhares, R.E.C., Nozawa, C., 2012. The in vitro antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. *Journal of Ethnopharmacology* 142, 86-90.

Figueiró, S., Góes, J.C., Moreira, R., Sombra, A., 2004. On the physico-chemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannana collagen films. *Carbohydrate Polymers* 56, 313-320.

Fonseca, S., Perez, S., 2003. Ação do polietilenoglicol na germinação de sementes de *Adenanthera pavonina* L. e o uso de poliaminas na atenuação do estresse hídrico sob diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Sementes* 25, 1–6.

Geller, M., Suchmacher Neto, M., Ribeiro, M.G., Oliveira, L., Naliato, E.C.O., Abreu, C. Schechtman, R.C., 2012. Herpes simples: atualização clínica, epidemiológica e terapêutica. *Journal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis* 24, 260-266.

Hu, C., Kong, Q., Yang, D., Pan, Y., 2011. Isolation and structural characterization of a novel galactomannan from *Eremurus anisopterus* (Ker. et Kir) Regel roots. *Carbohydrate Polymers* 84, 402 – 406.

Hussain, A., Rizvi, A., Wahab, S., Zareen, I. Ansari, S., Hussain, S., 2011. Antibacterial screening of the bark of *Adenanthera pavonina*. *International Journal of Biomedical Research* 2, 110-122.

Johari, J., Kianmehr, A., Mustafa, M.R., Abubakar, S., Zandi, K., 2012. Antiviral Activity of Baicalein and Quercetin against the Japanese Encephalitis Virus. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 16785-16795.

Khan, B.F., Pavan-Langston, D., 2004. Clinical manifestations and treatment modalities in herpes simplex virus of the ocular anterior segment. *International Ophthalmology Clinics* 44, 103-133.

Li, T., Peng, T., 2013. Traditional chinese herbal medicine as a source of molecules with antiviral activity. *Antiviral research* 97, 1-9.

Lopes, N., Faccin-Galhardi, L.C., Espada, S.F., Pacheco, A.C., Ricardo, N.M.P.S., Linhares, R.E.C., Nozawa, C., 2013. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. *International Journal of Biological Macromolecules* 60, 93-99.

Lupi, O., 2000. Herpes simples. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 75, 261-275.

Mahner, C., Lechner, M.D., Nordmeier, E., 2001. Synthesis and characterisation of dextran and pullulan sulphate. *Carbohydrate Research* 331, 203-208.

Minari, M.C., Rincão, V.P., Soares, S.A., Ricardo, N.M.P.S., Nozawa, C., Linhares, R.E.C., 2011. Antiviral properties of polysaccharides from *Agaricus brasiliensis* in the replication of bovine herpesvirus 1. *Acta Virologica* 55, 255-259.

- Monteiro, S.R., Tavares, C., Evtuguin, D.V., Moreno, N., Lopes, S., 2005. Influence of galactomannans with different molecular weights on the gelation of whey proteins at neutral pH. *Biomacromolecules* 6, 3291-3299.
- Mudgil, D., Barak, S., Khatkar, B., 2012. X-ray diffraction, IR spectroscopy and thermal characterization of partially hydrolyzed guar gum. *International Journal of Biological Macromolecules* 50, 1035–1039.
- Mujahid, M., Siddiqui, H.H., Hussain, A., Hussain, M.D.S., 2013. Hepatoprotective effects of *Adenanthera pavonina* (Linn.) against anti-tubercular drugs-induced hepatotoxicity in rats. *Pharmacognosy Journal* 5, 286-290.
- Ndidiamaka, A.E., Chinonye, A.M., Lawrence, O.O., Chigbu, N., 2011. Acute hematological evaluation and antimicrobial properties of methanolic extract of *Adenanthera Pavonina* seed. *Journal of US-China Medical Science* 8, p. 412.
- Nishimura, T., Toku, H., Fukuyasu, H., 1977. Antiviral compounds. XII Antiviral activity of amidinohydrazones of alkoxyphenyl-substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and in mice. *Kitasato Archives of Experimental Medicine* 50, 39–46.
- O'Neill, A.N., 1995. Sulphated derivatives of laminarin. *Canadian Journal of Chemistry* 33, 1097-1101.

Ono, L., Wollinger, W., Rocco, I.R., Coimbra, T.L.M., Gorin, P.A.J., Sierakowski, M.R., 2003. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). *Antiviral Research* 60, 201-208.

Richard, J., Whitley, M.D., 2002. Herpes simplex virus infection. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 13, 6-11.

Rincão, V.P., Yamamoto, K.A., Ricardo, N.M.P.S., Soares, S.A., Meirelles, L.D.P., Nozawa, C., Linhares, R.E.C., 2012. Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. *Virology journal* 9, 1-6.

Roizman, B., Knipe, D.M., Whitley, R.J., 2007. Herpes simplex viruses. In: Knipe, D. M., Howley, P.M. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins. USA, pp. 2502-2599.

Saha, S., Galhardi, L.C.F., Yamamoto, K.A., Linhares, R.E.C., Bandyopadhyay, S.S., Sinha, S., Nozawa, C., Ray, B., 2010. Water-extracted polysaccharides from *Azadirachta indica* leaves: Structural features, chemical modification and anti-bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) activity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 47, 640-645.

Santos, I.S., Cunha, M., Machado, O.L.T., Gomes, V.M., 2004. A chitinase from *Adenanthera pavonina* L. seeds: purification, characterization and immunolocalisation. *Plant Science* 167, 1203-1210.

Santos, N.S.O., Romanos, M.T.V., Wigg, M.D., 2008. *Introdução à Virologia humana*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. pp. 532.

- Shobha, M., Kumar, A.V., Tharanathan, R., Koka, R., Gaonkar, A.K., 2005. Modification of guar galactomannan with the aid of *Aspergillus niger* pectinase. *Carbohydrate Polymers* 62, 267 – 273.
- Smirnova, N.I., Mestechkina, N.M., Sherbukhin, V.D., 2004. Fractional isolation and study of the structure of galactomannan from Sophora (*Styphnolobium japonicum*) seeds. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40, 517–521.
- Soares, J.R., Carvalho, A.O., Santos, I.S., Machado, O.L.T., Nascimento, V.V., Vasconcelos, I.M., Ferreira, A.T.S., Perales, J.E.A., Gomes, V.M., 2012. Antimicrobial peptides from *Adenantha pavonina* L. seeds: Characterization and antifungal activity. *Protein & Peptide Letters* 19, 520-529.
- Su, C.T., Hsu, J.T.A., Hsieh, H.P., Lin, P.H., Chen, T.C., Kao, C.L., Lee, C.N., Chang, S.Y., 2008. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. *Antiviral Research* 79, 62–70.
- Tuset, M., Suñe, E.L., Cervera, C., Moreno, A., Miro, J.M., 2010. Características de los fármacos antivíricos frente a virus del grupo herpes actualización 2009. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 28, 199e1-199e-33.
- Vieira, I.G.P., Mendes, F.N.P., Gallão, M.I., Brito, E.S., 2007. NMR study of galactomannans from the seeds of mesquite tree (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). *Food Chemistry* 101, 70–73.

Vogl, H., Paper, D.H., Franz, G., 2000. Preparation of sulfated linear (1→4)- β -galactan with variable degrees of sulfation. *Carbohydrate Polymers* 41, 185-190.

Wang, L., Li, X., Chen, Z., 2010. Sulfated modification of the polysaccharides obtained from defatted rice bran and their antitumor activities. *International Journal of Biological and Macromolecules* 44, 211–214.

Whitley, R.J., Roizman, B., 2001. Herpes simplex virus infections. *The Lancet* 357, 1513-1518.

Yamamoto, K.A., Galhardi, L.C.F., Rincão, V.P., Soares, S.A., Vieira, I.G.P., Ricardo, N.M.P.S., Nozawa, C., Linhares, R.E.C., 2013. Antiherpetic activity of an *Agaricus brasiliensis* polysaccharides, its sulfated derivative and fractions. *International Journal Biological Macromolecules* 52, 9-13.

Yang, J.H., Du, Y.M., Wen, Y., Li, T.Y., Hu, L. 2003. Sulfation of chinese lacquer polysaccharides in different solvents. *Carbohydrate Polymers* 52, 397–403.

Zhao, L., Wientjes, M.G., Au, J.L.S., 2004. Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. *Clinical Cancer Research* 10, 7994-8004.

Table 1. Characterization of *Adenantha pavonina* polysaccharide (PLSAp) and its sulfated derivative (SPLSAp)

Compounds	S (%)	DS	M _w	[η], dl. g ⁻¹
PLSAp	0	0	3.9 x 10 ⁶	10.4
SPLSAp	13.6	1.21	7.0 x 10 ⁵	3.2

Fig. 1. Fourier transform IR spectra of the galactomannan from *Adenantha pavonina* polysaccharide (PLSAp) and sulfated derivative (SPLSAp)

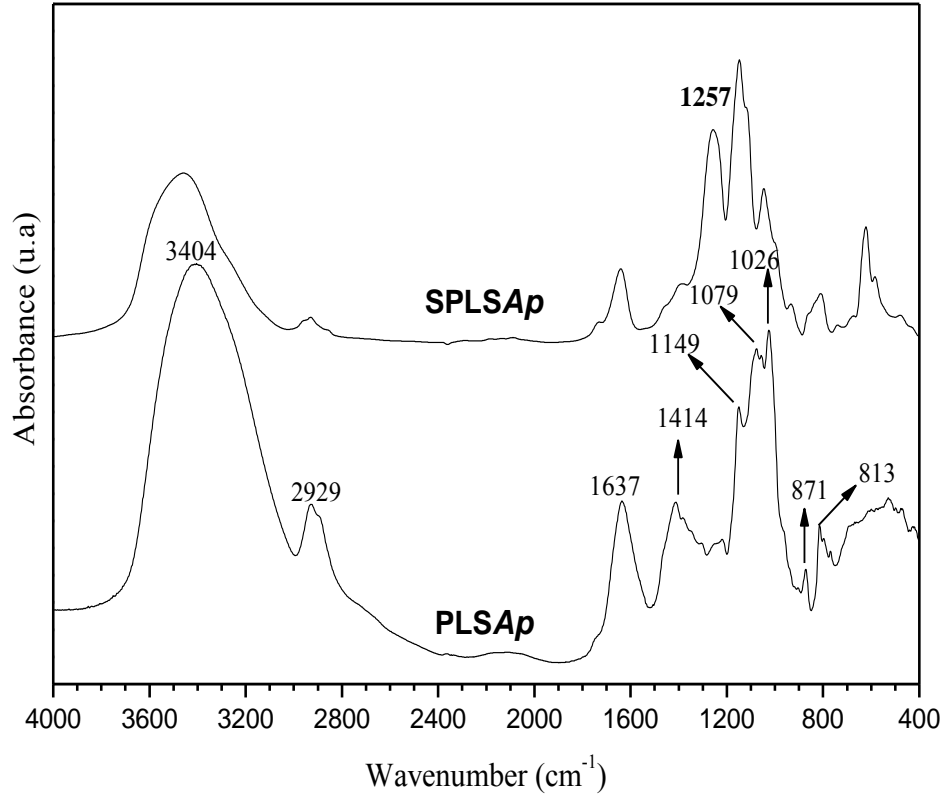


Table 2. Assignment of the IR bands for *Adenantha pavonina* polysaccharide (PLSAp)

Wavenumber (cm ⁻¹)	Assignment	Reference
3404	v (OH)	[a, c, e]
2929	v (C-H) de CH ₂	[a, c, e]
1637	H ₂ O adsorbed	[c, e]
1414	δ (C-H) de CH ₂	[d, e]
1026, 1079, 1149	v (C-C-O), v (C-OH), v(C-O-C)	[d, e]
871	v (C1-H) α-linked D-galactopyranose	[a, b]
813	v (C1-H) β-linked D-mannopyranose	[a, b]

^a Cerqueira et al. 2011; ^b Figueiró et al. 2004; ^c Hu et al. 2011; ^d Mudgil et al. 2012; ^e

Shobha et al. 2005.

Fig. 2. Chromatograms of the *Adenantha pavonina* polysaccharide (PLSAp) and the sulfated derivative (SPLSAp), representing the differential weight fraction vs. $\log M_w$ by gel permeation chromatography

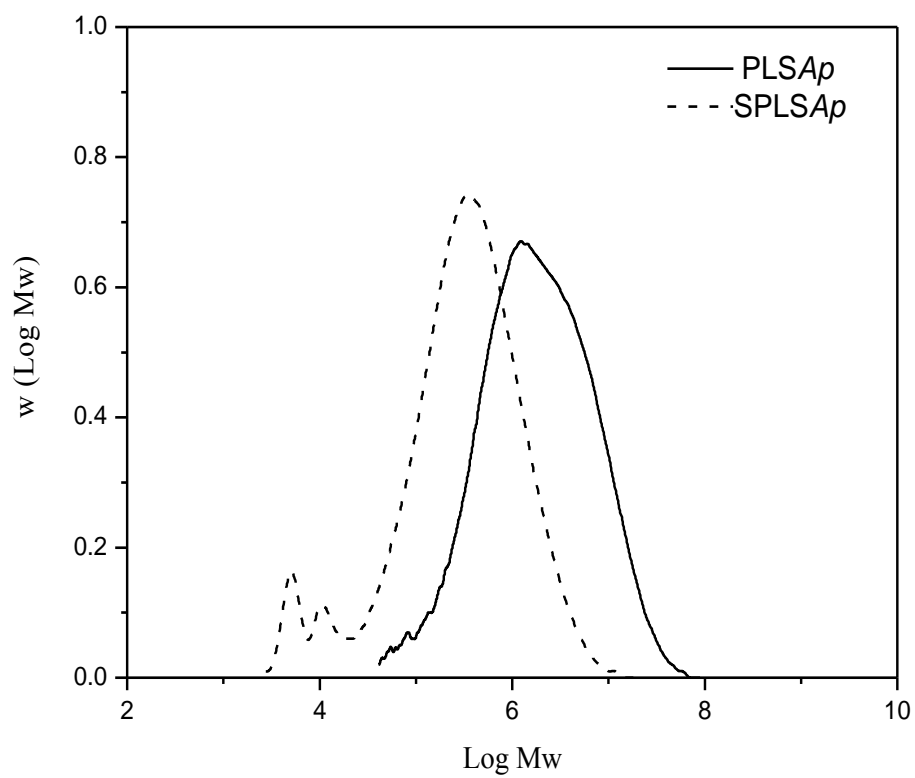


Fig. 3. A plot of reduced viscosity vs. concentration of *Adenantha pavonina* polysaccharide (PLSA_p) and the sulfated derivative (SPLSA_p)

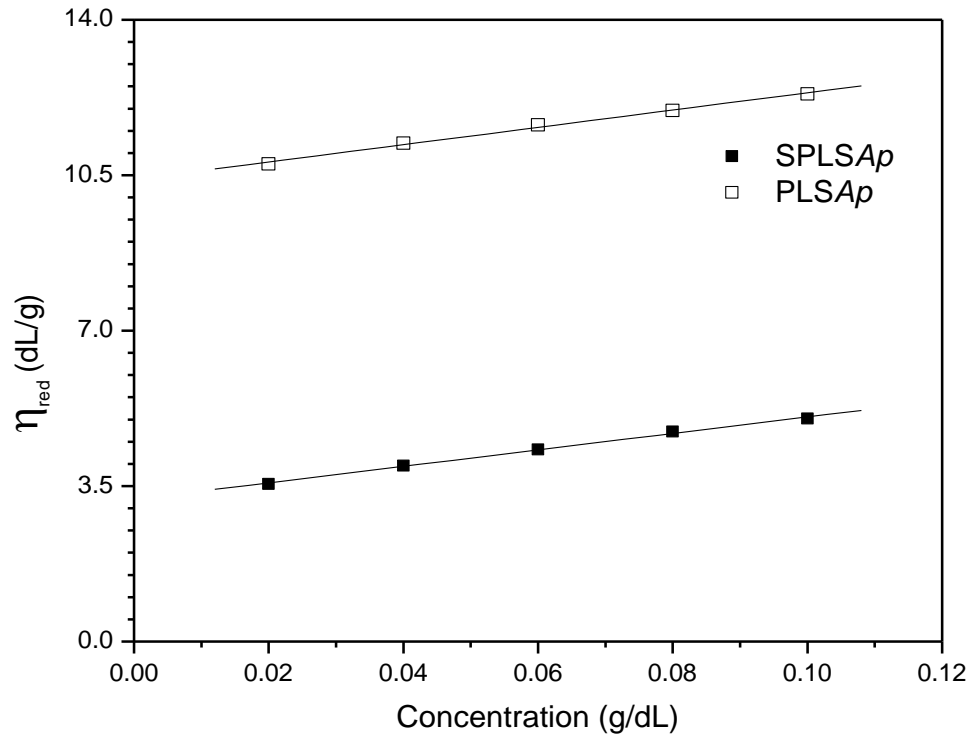


Table 3. The anti-HSV-1 activity of the *Adenanthera pavonina* polysaccharide (PLSAp) and the sulfated derivative (SPLSAp) in HEp-2 cells, by plaque reduction assay (PRA). The cells were inoculated and treated simultaneously (time 0h) with the compounds. Acyclovir was used as control.

	HSV-1		
	IC ₅₀ ^a	CC ₅₀ ^b	SI ^c
PLSAp	744	>6000	8
SPLSAp	15	500	33.3
ACV	2100	2550	2.1

^a 50% inhibitory concentration (µg/ml)

^b 50% cytotoxic concentration (µg/ml)

^c Selectivity index

Table 4. The effect of the *Adenanthera pavonina* sulfated derivative polysaccharide (SPLS Ap) at the initial stages of HSV-1 replication by plaque reduction assay (PRA). The percentage of viral inhibition (%VI) was determined in comparison to controls and the results are expressed as mean \pm SD of triplicate independent experiments.

	Viral Inhibition (%)			
	200 μ g/ml	100 μ g/ml	50 μ g/ml	25 μ g/ml
Virucidal	34.2 \pm 3.7	21.5 \pm 6.8	16.5 \pm 7.0	8.9 \pm 6.0
Pre-treatment (-1h)	30.3 \pm 1.1	27.3 \pm 1.7	21.2 \pm 0.5	24.1 \pm 1.1
Adsorption inhibition	24.4 \pm 1.1	nil	nil	nil
Penetration inhibition	18.0 \pm 3.7	16.0 \pm 3.4	12.0 \pm 3.0	1.0 \pm 2.5

Table 5. The effect of the time-of-addition and time-of-removal of sulfated polysaccharide derivative of *Adenathera pavonina* (SPLSAp) against HSV-1 infection, by plaque reduction assay (PRA). The SPLSAp was added or removed at the indicated times (1 – 24 hours) of HSV-1 infection. The percentage of viral inhibition (%VI) was determined in comparison to controls and the results are expressed as mean \pm SD of triplicate independent experiments.

Time	Time-of-addition				Time-of-removal			
	%VI							
	200*	100	50	25	200	100	50	25
1	100	100	100	100	10.5 \pm 1.4	10.5 \pm 1.4	10.5 \pm 1.4	0
2	100	100	100	100	0	0	0	0
4	100	100	80.3 \pm 2.8	19.7 \pm 3.5	0	0	0	0
8	100	100	20.9 \pm 7.1	3.8 \pm 0.7	33.6 \pm 9.2	30.0 \pm 0.7	27.3 \pm 9.9	23.6 \pm 4.2
16	98.8 \pm 1.4	89.9 \pm 2.1	73.8 \pm 2.8	47.6 \pm 1.4	99.3 \pm 0.7	90.1 \pm 0.7	77.4 \pm 2.8	66.2 \pm 6.4
24	51.5 \pm 8.4	28.0 \pm 4.9	6.8 \pm 7.7	3.8 \pm 3.5	61.6 \pm 7.7	50.0 \pm 0.0	24.1 \pm 6.4	13.4 \pm 7.7

* μ g/ml

Fig. 4. The effects of the addition and removal of sulfated derivative of *Adenathera pavonina* polysaccharide (SPLSAP) at the concentration of 50 μ g/ml by plaque reduction assay (PRA). For the time-of-addition assay (dashed line), the SPLSAP was added either immediately after infection (0 h) or at 1, 2, 4, 8, 16 or 24 h post-infection. For the time-of-removal assay (solid line), similarly, SPLSAP was added into cell monolayer immediately after virus infection (0 h). At the indicated times post-infection, the compound was removed, the cells washed thrice and replenished with fresh medium free of SPLSAP.

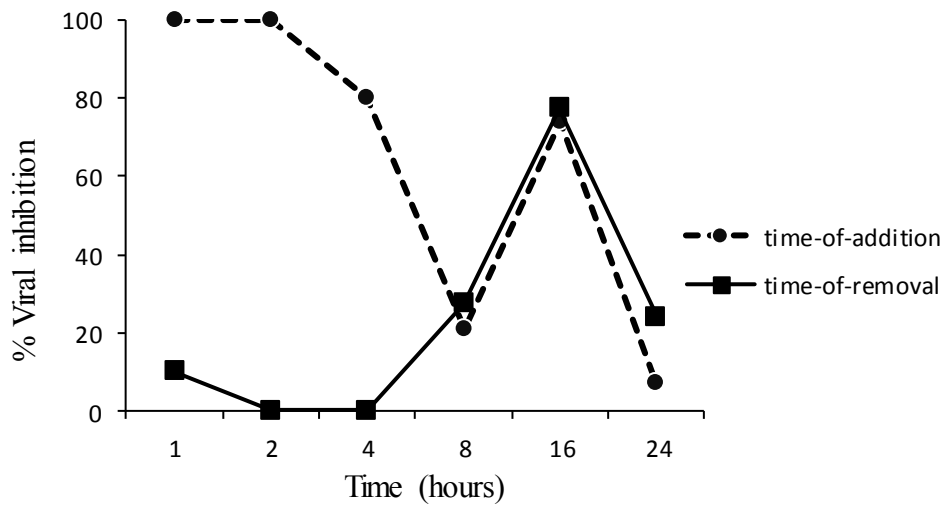
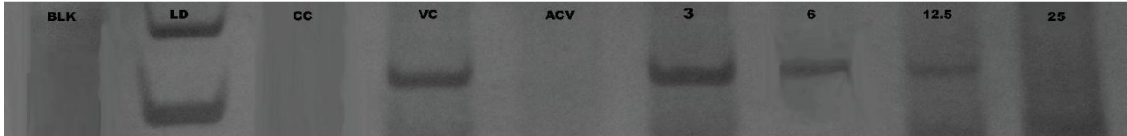


Table 6. The effect of the *Adenantha pavonina* sulfated polysaccharide derivative (SPLS Ap) in the synthesis of HSV-1 protein by immunofluorescence assay, represented by the number of fluorescent cell and % viral inhibition. The compound was added at the time 0h of the infection, at the indicated concentrations (6.2 – 200 μ g/ml). The results are expressed as mean \pm SD of duplicate independent experiments.

SPLS Ap (μ g/ml)	HSV-1	
	Number of fluorescent cells	% Viral Inhibition
0	63.8 \pm 2.7	-
6.2	65.9 \pm 3.2	34.6
12.5	48.4 \pm 11.7	53.4
25	11.0 \pm 6.8	88.1
50	4.3 \pm 2.6	95.2
100	0	100
200	0	100

Fig. 5. The inhibition of HSV-1 DNA synthesis by *Adenathera pavonina* sulfated derivative (SPLSA_p) monitored by PCR. Polyacrilamide gel electrophoresis of PCR amplicon for HSV-1 ICP4 (138 bp). Negative control (BLK); Mw (LD); Cell control (CC); Virus control (VC); Positive control (ACV) and HSV-1 treated with SPLSA_p at the indicated concentrations (3 - 25 μ g/ml).



5.2 ARTIGO II

ATIVIDADE ANTIVIRAL DO POLISSACARÍDEO SULFATADO DE *Adenantha pavonina* CONTRA POLIOVÍRUS EM CÉLULAS HEP-2

Ananda Marques de Godoi¹, Lígia Carla Faccin-Galhardi¹, Nayara Lopes¹, Daniele Zandrini Rechenchoski¹, Nágila Maria Pontes Silva Ricardo², Carlos Nozawa¹, Rosa Elisa Carvalho Linhares¹.

¹Departamento de Microbiologia, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, 86051-990, Londrina, PR, Brasil.

² Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, CEP 60020-181, Fortaleza, Ceará, Brasil.

* Corresponding author. Tel.: +55 43 33714617; fax: +55 43 33715828

E-mail: relin@uel.br

RESUMO:

Vários estudos relatam a utilização de produtos naturais para atividade antiviral, incluindo os polissacarídeos. *Adenantha pavonina* é uma planta da família *Leguminosae*, que possui sementes de coloração vermelha, com formato de lentes, utilizada de forma empírica para o tratamento de doenças gastrointestinais, infecções, febre, hipertensão e falta de apetite sexual. Este trabalho avaliou o efeito do polissacarídeo sulfatado de *Adenantha pavonina* (SPLSAp) contra *poliovirus* (PV), em células HEP-2. A citotoxicidade do SPLSAp foi analisada pelo método de MTT e atividade antiviral pelo ensaio de redução de plaque, usando diferentes protocolos. O valor de CC₅₀ do SPLSAp foi de 500µg/ml e a melhor porcentagem de inibição viral (%IV) foi encontrado no tempo 0 hora de infecção, com IC₅₀ de 1,18 µg/ml e índice de seletividade de 423,73. O SPLSAp apresentou um efeito virucida com %IV de 74,1% na maior concentração testada (100 µg/ml). No ensaio de imunofluorescência o SPLSAp inibiu 100% a síntese de proteínas na maior concentração testada (100 µg/ml), de forma dose-dependente. Os resultados demonstraram que o SPLSAp interfere na replicação do PV, principalmente nas fases iniciais da replicação, incentivando a utilização deste composto na pesquisa de um novo antiviral.

PALAVRAS-CHAVE: polissacarídeo, *poliovirus*, *Adenantha pavonina*, atividade antiviral.

1 INTRODUÇÃO

A *Adenanthera pavonina* é uma planta, que pertence à família *Leguminosae*, conhecida popularmente como: olho de pavão, olho de dragão, sândalo vermelho, falso Pau-brasil, Carolina e Segawê (SOOMRO e SHERAZI, 2012; SULTANA e GULZAR, 2012). Essa árvore, que pode medir de 6 a 15 metros é nativa da Ásia tropical, mas hoje em dia está distribuída no Brasil, principalmente na região Nordeste (OLAJIDE et al., 2004). Devido à coloração vermelha e resistência da sua madeira, essa planta foi cultivada historicamente em grande escala para ornamentação, fabricação de móveis, combustível e medicamentos (FONSECA e PEREZ, 2003; SOOMRO e SHERAZI, 2012).

As sementes de *A. pavonina* têm o formato de lentes, de cor vermelho vivo, são muitos semelhantes em forma e tamanho, servindo como peso, contas, ornamentação e na fabricação de colares (OLAJIDE et al., 2004). Essas sementes são muito utilizadas por serem ricas em gordura e proteína, servindo de alimento em algumas tribos, porém quando cruas são tóxicas (KRISHNAVENI et al, 2011; SULTANA e GULZAR, 2012). Essa sementes também são utilizadas popularmente para o tratamento de febre, vômito, diarreia, problemas estomacais, gota, reumatismo, furúnculos, falta de apetite sexual, hipertensão, infecções pulmonar e oftalmia crônica (ADEDAPPO et al, 2009; KRISHNAVENI et al, 2011).

Alguns estudos científicos mostram que *A. pavonina* tem efeito antiinflamatório, analgésico, anti-hipertensivo, antibacteriano, antifúngico, anti-helmíntico, antioxidante e citotóxico (ARA et al, 2010; HUSSAIN et al, 2011; SOARES et al, 2012). As análises espectroquímicas desta planta evidenciaram a presença de saponinas, taninos, alcaloides, flavonoides, glicosídeos cardíacos, triterpenóides, anel de lactona, O-acetiletanolamina, octanol, dulcitol e quitinase (HUSSAIN et al, 2011). O presente trabalho avaliou o efeito antiviral do polissacarídeo sulfatado de *A. pavonina* in vitro.

O poliovírus (PV) pertence ao gênero do enterovírus, membro da família *Picornaviridae*, composto de um genoma de RNA de polaridade positiva, coberto com um capsídeo icosaédrico, sem envelope (ALMOND, 1991; PALLANSH E ROOS, 2007). Esse vírus é o agente causador da poliomielite, uma doença que atinge gravemente o sistema nervoso, destruindo os neurônios motores da medula espinhal, resultando em paralisia flácida (OHKA e NOMOTO, 2001; JESUS, 2007).

A poliomielite é considerada uma das doenças mais antigas, seus primeiros registros encontram-se nos hieróglifos egípcios, por volta de 2.000 a.C, representado pela figura de um jovem com a perna atrofiada (PALLANSH E ROOS, 2007). Essa doença é transmitida pela via fecal-oral, inicialmente o vírus se multiplica nos tecidos da mucosa, atingindo as placas de

peyer e amígdalas, se espalhando para os gânglios linfáticos, medula óssea, baço e fígado (ALMOND, 1991; OHKA e NOMOTO, 2001).

Hoje em dia ainda não existe um quimioterápico eficiente para o controle ou tratamento da poliomielite, limitando-se a vacinação como a única ferramenta para o controle dessa doença (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2008) Existem duas vacinas eficientes para o controle da poliomielite, porém a vacina mais utilizada é a composta de vírus atenuados, elaborada por Sabin em 1961, que é facilmente administrada por via oral (DUTTA, 2008).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Composto

Sementes de *Adenanthera pavonina* (L.) foram coletadas no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil, no período de novembro a dezembro de 2010. Para obter o polissacarídeo de *Adenanthera pavonina* (PLSA_p), o endosperma foi isolado e extraído com água quente a 85 °C (vieira et al. 2007). Para obter a forma sulfatada (SPLSA_p), 300 mg do polissacarídeo (galactomanana) foram dispersas em uma solução de piridina:N,N-dimetilformamida (50:10 v/v) com agitação a 25 °C, por 12 h. Após essa reação, a mistura foi resfriada a 4°C, sendo adicionado lentamente ácido clorossulfônico (12 ml), sob agitação, por 24 horas. Seguiu-se a neutralização com solução aquosa de NaHCO₃ saturado, diálise (peso molecular aproximado de 8-12 kDa) por 120 horas contra água destilada e liofilização (O'NEILL , 1955 ; ONO et al , 2003). O grau de sulfatação (DS) do SPLSA_p foi determinado pela análise do teor de enxofre (%S) através de Perkin-Elmer 2400 CHNS e os dados obtidos pela equação: $DS = (1,62 \times \% S) / (32 - 1,02 \times \% S)$ (WANG et al. , 2010). A solução estoque do polissacarídeo sulfatado de *A. pavonina* foi dissolvido em água ultrapura.

2.2 Células e vírus

Células HEp-2 (célula epitelial de carcinoma de laringe humano, ATCC CCL-23) foram cultivadas a 37°C, com meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) e tratados com 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 100 IU/ml de penicilina (Novafarma Indústria Farmacêutica, Anápolis, GO, BR) e 2,5 µg/ml de anfotericina B (MeizlerBiopharma S/A, São Paulo, SP, BR). Cepas de *poliovírus* (PV) tipo 1,

ATCC (VR-58), foram inoculadas em células HEp-2 para o preparo do estoque, que foi mantido a -20, com 10% de glicerol. O título viral foi determinado pelo ensaio de plaque.

2.3 Teste de citotoxicidade

A citotoxicidade do polissacarídeo sulfatado de *Adenantha pavonina* (SPLSAp) foi avaliada em células HEp-2, cultivadas em placas de 96 poços (TPP, Trasadingen, CH), pelo o ensaio de MTT (dimethylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromide), (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Foram testadas concentrações de 50 µg/ml a 1000 µg/ml, e a porcentagem de viabilidade das células foi calculada pela fórmula: $[100 - (At/Ac) \times 100]$, onde At e Ac correspondem a absorbância da substância testada e controle (células não tratadas), respectivamente. A concentração do polissacarídeo capaz de reduzir a viabilidade das células em 50% em comparação ao controle de célula (CC₅₀) foi calculada pela análise de regressão linear.

2.4 Ensaio de Redução de Plaque

A atividade antiviral do polissacarídeo sulfatado de *Adenantha pavonina* (SPLSAp), foi determinada pelo ensaio de redução de plaque (PRA) conforme Lopes et al.(2013). Células HEp-2 foram cultivadas em placas de 24 poços (TPP, Trasadingen, CH) até 100% da sua confluência, essas foram infectadas por PV(10⁴ UFP/ml) e tratadas simultaneamente com varias concentrações (0,78 a 100 µg/ml). Essas culturas de células foram cobertas com agarose nutriente (DMEM 2x/1.8% agarose [v/v]) contendo 25 mM MgCl₂. Após 40 horas de incubação, as células foram fixadas com 10% de formaldeído, em solução tampão fosfato salina (PBS), pH 7,3, por 24 horas. As células foram coradas com 0,5% de cristal violeta em etanol a 20%. Os plaques foram contados e a porcentagem de inibição viral (%IV) foi calculada pela fórmula: $[1 - (Vd/Vc)] \times 100$, onde Vd e Vc correspondem ao número de plaques na presença e ausência do composto, respectivamente (Nishimura et al., 1977). A concentração do composto capaz de inibir 50% de UFP (IC₅₀) foi calculada por análise de regressão linear. O índice de seletividade (SI) foi expresso pela fração CC₅₀/IC₅₀.

Ensaio de tempo de adição: Esse teste foi realizado de acordo com Yamamoto et al.(2013), várias concentrações do SPLSAp (12,5µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml) foi adicionada as culturas de células antes (-1h e -2h) e depois (+1h e +2h) da infecção, seguido pelo ensaio de plaque.

Virucida: O efeito virucida do SPLSAp foi determinado de acordo com Minari et al. (2011). A suspensão de PV (10^4 UFP/ml) foi incubada por 1 hora à 37°C, com DMEM contendo concentrações de 12,5 µg/ml, 25µg/ml, 50 µg/ml e 100 µg/ml do composto testado, seguido pelo PRA.

2.5 Ensaio de Imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência foi realizado de acordo com Faccin-Galhardi et al. (2012). Células HEp-2 foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas, essas foram infectadas com 500 µl de PV (10^3 UFP/ml) e simultaneamente tratadas com diferentes concentrações (12,5µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml) de polissacarídeo sulfatado de *Adenathera pavonina* (SPLSAp). Culturas de células infectadas e não tratadas, e culturas de células não infectadas, foram mantidas para os controles. Depois de 24 horas de infecção as células foram lavadas com PBS mais Tween 20 à 0,05% , fixadas com acetona gelada (-20°C) por 20 minuto e bloqueadas com leite em pó desnatado à 2% em PBS, por 30 minutos. As células foram incubadas durante 30 minutos a 37°C com soro de coelho anti-PV-1(INCQSD Fiocruz, RJ, BR), depois lavadas 3 vezes, com PBS mais Tween 20 e novamente incubadas, por 30 minutos à 37°C, com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com FITC (Sigma Chem. Co., EUA). As células foram examinadas em um microscópio de fluorescência Zeiss (ZeissaxioImager.A1), 100 células foram contadas por lamínula, para cálculo da porcentagem de inibição de células fluorescentes. Os experimentos foram realizados em duplicata.

2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pela ANOVA seguida do teste de Tukey (BioEstat 5.0 para Windows XP, 2007), que foram aplicados para determinar a diferença entre os experimentos do polissacarídeo e os grupos controles. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS

3.1 Atividade antiviral

O polissacarídeo sulfatado de *Adenathera pavonina* (SPLSAp) mostrou uma CC_{50} de 500 µg/ml, IC_{50} de 1,18 µg/ml e índice de seletividade de 423,73 µg/ml. Quando o

SPLSAp foi adicionado antes de infecção a inibição viral foi baixa, em relação aos demais testes (figura 1), com %IV de 59,52% no tempo -1h e 68,8% no tempo -2h, na maior concentração (100 µg/ml). Porém quando o SPLSAp foi adicionado depois de 1 e 2 horas da infecção a %IV foi de 100%, na maior concentração (100 µg/ml). No ensaio virucida a %IV foi de 74,1% na maior concentração (100 µg/ml) (figura 2).

O resultado do ensaio de imunofluorescência mostrou que o SPLSAp é capaz de inibir a síntese de proteína do PV, de forma dose-dependente, com % IV de 100% e 70,9% para a maior e menor concentração, respectivamente (100 µg/ml e 12,5 µg/ml) (tabela 1).

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho o polissacarídeo sulfatado de *Adenantha pavonina* (SPLSAp) foi avaliado em relação a sua atividade antiviral. O teste de citotoxicidade mostrou que nas concentrações utilizadas para o plaque (12,5-100 µg/ml) o SPLAp não apresentou toxicidade, resultando em um alto índice de seletividade.

Os resultados mostram que o melhor efeito do SPLSAp foi encontrado no tempo 0 hora de infecção, ou quando adicionado 1 e 2 horas depois da infecção, sugerindo uma inibição nas fases iniciais da replicação viral, confirmado pelo ensaio de imunofluorescência. A inibição do SPLSAp na replicação viral também pode estar relacionada com a sua interação com a partícula viral, como demonstrado no ensaio de virucida, esses dados também são encontrados na literatura, como nos experimentos de Faccin-Galhardi et al. (2012) e Lopes et al. (2013). Quando a atividade do SPLSAp foi analisada em relação a sua interação com os componentes da membrana das células-alvos (-1h e -2h) a porcentagem de inibição foi menor em relação aos outros testes.

O SPLSAp pertence a classe das galactomananos, com massa molecular (7.0×10^5 g mol⁻¹) semelhante aos relatados na literatura, como *M. scabrella* com M_w de 6.20×10^5 g mol⁻¹ (Chrestani et al., 2009) e *L. leucocephala* com M_w 5.74×10^5 g mol⁻¹ (ONO et al., 2003). Também há relatos do efeito antiviral de galactomananos, explicado pela interação com a partícula viral e as características polianiónicas, pois os galactomananos podem atuar como homólogos dos receptores da célula, ligando-se a partícula viral e inibindo a sua adsorção, além de apresentarem também atividade imunomoduladora (GEMIN et al, 2010; LI e PENG, 2013). Porém diversos fatores podem estar relacionados com a ligação do vírus a célula, como peso molecular, grau de sulfatação, distribuição dos grupos sulfatos na molécula e as cadeias de hidrocarboneto (TALARICO 2008; CHRESTANI et al., 2009).

A sulfatação de polissacarídeos melhora a atividade antiviral, aumentando a característica poliônica da molécula, com construção de zonas altamente carregadas na estrutura do polissacarídeo ou aumentando peso molecular. Os polissacarídeos sulfatados constituem estruturas complexas e heterogêneas, dificultando a determinação da relação da atividade antiviral (GHOSH et al., 2009).

Em conclusão, nossos resultados sugerem que SPLSAp é um composto com atividade antiviral promissora, que interfere principalmente nas etapas iniciais da replicação do poliovírus, podendo ser uma alternativa futura para o tratamento do PV.

5 REFERÊNCIA

ADEDAPO, A.D.A. et al. Blood pressure lowering effect of *Adenanthera pavonina* seed extract on normotensive rats. **Records of Natural Products**.v.3, n.2, p.82-89, 2009.

ALMOND, J.W. Poliovirus neurovirulence. **Seminars in the neurosciences**. V. 3, p.101-108, 1991.

ARA, A. et al. Anti-inflammatory activity of *Adenanthera pavonina* L., fabaceae, in experimental animals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.20, n.6, p.929-932, dez., 2010.

CHRESTANIA, F. et al. In vitro antiherpetic and antirotaviral activities of a sulfate prepared from *Mimosa scabrella* galactomannan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.45, p.453-457, 2009.

DUTTA, A. Epidemiology of poliomyelitis: options and update. **Vaccine**. v.26, p.5767-5773, 2008.

FACCIN-GALHARDI, L.C. et al. The in vitro antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. **Journal of Ethnopharmacology**. V.142, p.86-90, Abril, 2012.

FONSECA, S.C.L.; PEREZ, S.C.J.G.A. Ação do polietileno glicol na germinação de sementes de *Adenanthera pavonina* L. e o uso de poliaminas na atenuação do estresse hídrico sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 25, n. 1, p.1-6, 2003.

GEMIN, E. In vitro anti-HSV-1 activity of chemically sulfated galactomannan from *Lecythis leucocephala* seeds. **Revista de Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada**. V.31, n.2, p.165-170, 2010.

GHOSH, T. et al. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure-activity analysis to clinical evaluation. **Glycobiology**. V. 19, n.1, p. 2-15, set. 2009.

HUSSAIN, A. et al. Antibacterial screening of the bark of *Adenanthera pavonina*. **International Journal of Biomedical Research**. V.2, n.2, p.110-122, 2011.

JESUS, N.H. Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis. **Virology Journal**.v.4, n.70, p.1-8, 2007.

KRISHNAVENI, A. et al. Antidiabetic, hypolipidemic activity of *Adenanthera pavonina* seeds in alloxan induced diabetic rats. **Journal of Pharmacy Research**.V. 4 n.5, p.1440-1442, maio, 2011.

LI, T. e PENG, T. Traditional chinese herbal medicine as a source of molecules with antiviral activity. **Antiviral Research**.v. 97, p.1-9, 2013.

LOPES, N. et al. Sulfated polysaccharide of *Caesalpiniaferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus.**InternationalJournalofBiologicalMacromolecules**. V. 60, p.93-99, maio, 2013.

MINARI, M.C. et al. Antiviral properties of polysaccharides from *Agaricusbrasiliensis* in the replication of bovine herpesvirus 1.**Acta Virologica**. V. 55, p. 255-259, Jul.2011.

NISHIMURA, T.; TOKU, H.; FUKUYASU, H. Antiviral compounds. XII Antiviral activity of amidinohydrazones of alkoxyphenyl-substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and in mice. **The Kitasato Archives of Experimental Medicine**, v. 50, n. 1-2, p. 39-46, jun. 1977.

O'NEILL, A. N. Sulphated derivatives of laminarin. **Canadian Journal of Chemistry**, v.33, p.1097-1101, 1995.

OHKA, S. e NOMOTO, A. Recent insights into poliovirus pathogenesis. **Trend in Microbiology**. V.9, n.10, p. 501-506; out., 2001.

OLIJIDE, O.A. Anti-inflammatory studies on *Adenanthera pavonina* seed extract.**Inflammopharmacology**.V.12, n.2, p.197-202, 2004.

ONO, L. et al. In vitro and in vivo antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral Research**.,v. 60, p.201-208, 2003.

PALLANSH, M. ROOS, R. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Never Enteroviruses. In : KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 5ed. V.2, 2007.

SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução à VIROLOGIA HUMANA** .2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 532 p., 2008.

SOARES, J.R. et al. Antimicrobial peptides from *Adenanthera pavonina* L. seeds: characterization and antifungal activity. **Protein & Peptide Letters**.V.19, n.5, p.520-529, 2012.

SOOMRO, R.K.; SHERAZI, S.T.H. Spectroscopic and chromatographic evaluation of the wax ester fraction of *Adenanthera pavonina* oil.**IndustrialCropsandProducts**. v.36. p.294-298, 2012.

SULTANA, R.; GULZAR, T. Proximate analysis of *Adenantha pavonina* L. seed oil, a source of lignoceric acid grown in pakistan. **Journal of the American Chemical Society**.V.89, p. 1611-1618, 2012.

TALARICO, L.B. La entrada del virus dengue a La célula como um potencial Blanco antiviral: estudo de polissacáridos sulfatados como antivirales. **Revista Química Viva**. N. 7. Ano 2. Ago., 2008.

YAMAMOTO, K.A. et al. Antiherpetic activity of an *Agaricus brasiliensis* polysaccharide, its sulfated derivative and fractions. **International Journal od Biological Macromolecules**. V. 52, p. 9-13, 2013.

Figura 1 Avaliação da atividade antiviral do polissacarídeo sulfatado de *Adenantha pavonina* (SPLS_{Ap}) para o PV-1, analisado pelo teste de redução de plaque em tempos variados de adição, em células HEp-2, nas concentrações indicadas.

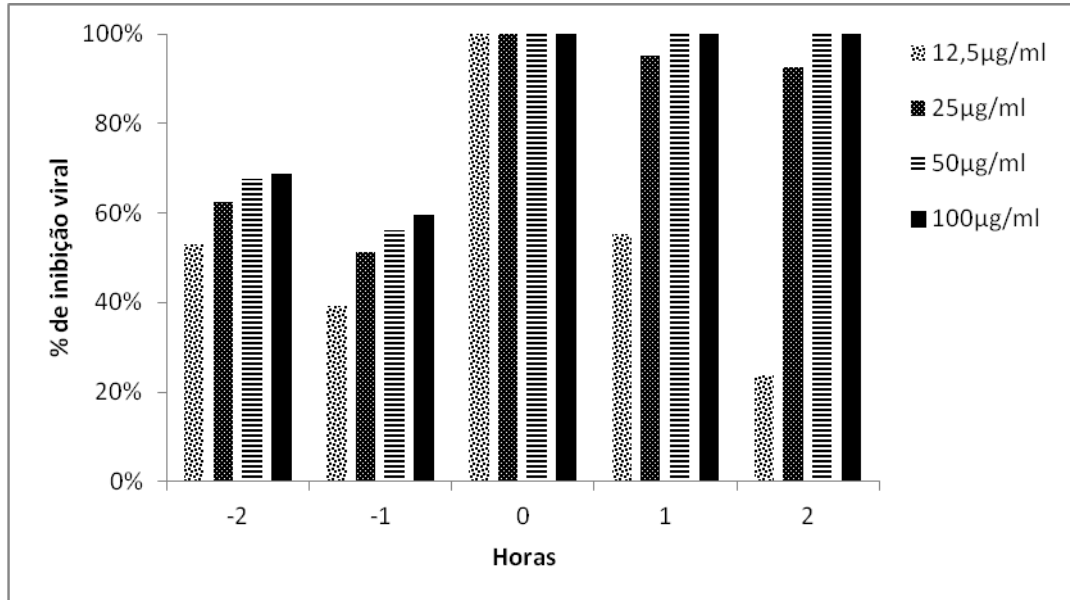


Figura 2 Efeito virucida do polissacarídeo sulfatado de *Adenanthera pavonina* (SPLSAp) para o PV-1, em células HEp-2.

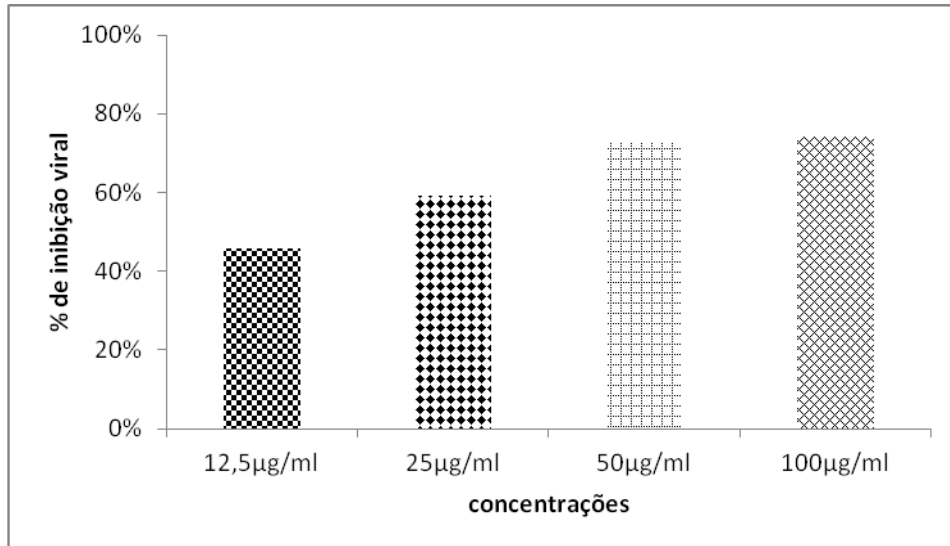


Tabela 1

Efeito do polissacarídeo sulfatado de *Adenantha pavonina* (SPLSAp) na replicação de PV-1 monitorado pelo ensaio de imunofluorescência, em células HEp-2. O composto foi adicionado nas concentrações de 12,5-100 µg/ml, no tempo 0 hora de infecção. Os testes foram realizados em duplicata e foram contadas 100 células por lamínula. Os dados são expressos em média ± DS (n=2).

SPLSAp (µg/ml)	HSV-1	
	Número de células fluorescente	% inibição viral
0	79.0± 1.4	-
12.5	22.5± 2.12	70.9
25	17.5± 0.7	82.6
50	9.0± 1.4	92.2
100	0±0.0	100

6 CONCLUSÃO

O polissacarídeo de *Adenantha pavonina* (PLSA_p) e sua forma sulfatada(SPLSA_p) não apresentaram toxicidade nas concentrações utilizadas nos testes (200-12,5 µg/ml), com um bom índice de seletividade, indicando que esses compostos poderiam ser utilizados de forma efetiva com uma margem de segurança. O resultados mostram que o SPLSA_p teve um melhor efeito antiviral que o polissacarídeo não sulfatado, pois os grupos sulfatos induzem um melhor efeito antiviral, tanto aumentando a densidade da molécula, como a construção de zonas altamente carregadas.

Para o HSV-1 o SPLSA_p atuou em varias fases da replicação viral, principalmente após a penetração do vírus na célula, em concentrações melhores que o fármaco utilizado como referencia, aciclovir, porém esses quando utilizados em conjunto apresentam um efeito antagonista. Quando comparado a atuação do SPLSA_p no PV, a sua interferência ocorreu de forma diferente, envolvendo as fases iniciais da replicação viral, com uma interação entre a partícula viral e o composto (efeito virucida). Esses resultados sugerem que o SPLSA_p pode ser utilizada como uma nova alternativa terapêutica para as infecções causadas por HSV-1 e PV.