



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

ANANDA MARQUES DE GODOI

**ATIVIDADE ANTIVIRAL, *IN VITRO*, DE POLISSACARÍDEOS
OBTIDOS DE PLANTAS PARA O HERPES SIMPLEX TIPO 1 E
POLIOVÍRUS**

ANANDA MARQUES DE GODOI

**ATIVIDADE ANTIVIRAL, *IN VITRO*, DE POLISSACARÍDEOS
OBTIDOS DE PLANTAS PARA O HERPES SIMPLEX TIPO 1 E
POLIOVÍRUS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, tendo como requisito à obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^ª Dr.^a. Rosa Elisa Carvalho Linhares

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Godoi, Ananda Marques de.

Atividade antiviral, in vitro, de polissacarídeos obtidos de plantas para o herpes simplex tipo 1 e poliovírus / Ananda Marques de Godoi. - Londrina, 2018.

73 f. : il.

Orientador: Rosa Elisa Carvalho Linhares.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2018.

Inclui bibliografia.

1. Herpesvírus - Tese. 2. Poliovírus - Tese. 3. Inga spp - Tese. 4. Myrciaria dubia - Tese. I. Linhares, Rosa Elisa Carvalho. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . III. Título.

ANANDA MARQUES DE GODOI

**ATIVIDADE ANTIVIRAL, *IN VITRO*, DE POLISSACARÍDEOS
OBTIDOS DE PLANTAS PARA O HERPES SIMPLEX TIPO 1 E
POLIOVÍRUS**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr. Rosa Elisa Carvalho Linhares
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^º Dr. Alexandre Orsato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª Dr. Lígia Carla Faccin Galhardi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

____ Prof^ª Dr. Eliandro Reis Tavares
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª Dr. Marla Karine Amarante
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 31 de Agosto de 2018.

DEDICATÓRIA

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

Aos meus pais e ao meu marido, 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 Prof^a Dr^a Rosa Elisa Carvalho Linhares e ao Prof. Dr. 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 e por agirem como meus pais na virologia.

Aos meus pais, José Augusto Vicuache Godoi e Helena Marques de Godoi, que me deram a oportunidade da vida para mostrar que nada está perdido, que é necessária paciência e dedicação para que as coisas estejam próximas à perfeição, por ser sempre as bases da minha vida.

Ao meu marido, Mateus Rodrigues de Almeida, que se tornou o meu ponto de equilíbrio nos dias mais tumultuados da minha vida, sempre me apoiando e melhorando essa nova família.

À família do laboratório de virologia, ao qual eu sou a irmã do meio, sabendo que posso sempre contar com os conselhos da irmã mais velha, Lígia Carla Faccin Galhardi, assim como os da irmã mais nova Daniele Zandrini Rechenchoski. E aos estagiários que passaram durante esse período, cada um colaborando com o jeito especial que tem.

À diretora do Colégio Estadual Dr. Olavo Garcia Ferreira da Silva, Ednéia Maturana, que sempre me deu o apoio necessário para concretizar esse trabalho.

Aos amigos e demais familiares, alguns me apoiando em momentos difíceis com o que tinham ao seu alcance e os outros que não puderam estar ao meu lado, mas sempre me confortaram com suas palavras.

“Até onde posso, vou deixando o melhor de mim...
Se alguém não viu, foi porque não me sentiu com o
coração”.

Cristina Santos (2013).

GODOI, Ananda Marques. **Atividade antiviral, *in vitro*, de polissacarídeos obtidos de plantas para o herpes simplex tipo 1 e poliovírus.** 2018. 73f. Tese (Doutorado de Microbiologia). Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2018.

RESUMO

As infecções virais estão entre as causas mais frequentes de doenças infecciosas, resultando em constante ameaça para a saúde pública, incentivando a procura de antivirais mais eficientes. O vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), família *Herpesviridae*, compostos por DNA linear de fita dupla, com capsídeo icosaédrico, coberto por envelope lipoproteico, provoca infecções, principalmente na região oral, em todas as faixas etárias, estando presente em 80% dos adultos. A droga de escolha para o tratamento do HSV-1 é o aciclovir, porém tem se observado o surgimento de cepas resistentes. O poliovírus (PV) pertence à família *Picornaviridae* é o agente causador da poliomielite, uma doença que atinge gravemente o sistema nervoso, causando paralisia flácida. A prevenção da doença é feita através da vacinação e até o momento não há antiviral disponível para tratamento dos pacientes. Vários estudos relatam a utilização de produtos naturais com atividade antiviral, incluindo os polissacarídeos. O presente trabalho avaliou o efeito antiviral do polissacarídeo de *Inga spp* (PDT-S) sobre HSV-1 e PV, em células HEp-2 e do polissacarídeo de *Myrciaria dubia* na forma *in natura* (AO) e sulfatada (AOS) contra as cepas KOS (sensível ao aciclovir) e AR (resistente ao aciclovir) de HSV-1, em células Vero. 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 tratamento. O valor de CC₅₀ foi de 870 µg/mL para PDT-S, > 500 µg/mL para o AO e 386 µg/mL para o AOS. O melhor efeito antiviral, determinado por ensaio de plaque para todos os polissacarídeos e vírus, foi encontrado no tempo 0 horas. Para o PDT-S o IC₅₀ foi de 179 µg/mL e 58 µg/mL e índice de seletividade de 5,86 e 15 para o HSV-1 e PV, respectivamente, sugerindo que o PDT-S atua nos estágios iniciais da replicação viral. Para o AO o IC₅₀ foi de 32,6 µg/mL e 87 µg/mL e índice de seletividade de 15,34 e 5,74 para as cepas KOS e AR, respectivamente. Para o AOS o IC₅₀ foi de 2,06 µg/mL e 0,46 µg/mL e índice de seletividade de 187,38 e 839,13 para as cepas KOS e AR. Os resultados encontrados para AO e AOS mostraram que a sulfatação melhora a atividade antiviral do polissacarídeo e que não houve diferença significativa entre as cepas utilizadas, e assim como o PDT-S, o AOS atua nas fases iniciais da replicação viral. Em conclusão esse trabalho sugere que o PDT-S e AOS são substâncias com atividade antiviral promissora, podendo ser utilizados para o desenvolvimento de novos antivirais.

Palavras-Chave: Herpesvírus. Poliovírus. *Inga spp*. *Myrciaria dubia*. Polissacarídeos. Atividade antiviral.

GODOI, Ananda Marques. ***In viro* antiviral activity of polysaccharides obtained from plants for herpes simplex type 1 and poliovirus.** 2018. 73p. Doctorate (Thesis in Microbiology). Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2018.

ABSTRACT

Viral infections are among the most frequent causes of infectious diseases, resulting in constant threat to public health, encouraging the search for increasingly efficient antivirals. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1), family *Herpesviridae*, composed of linear double-stranded DNA, with icosahedral capsid, covered by lipoprotein envelope, cause infections, mainly in the oral region, in all age groups, being present in 80% of adults. The drug of choice for treatment of HSV-1 is acyclovir, but the emergence of resistant strains. Poliovirus (PV) belongs to the family *Picornaviridae* and is the causative agent of poliomyelitis, a disease that severely affects the nervous system, causing flaccid paralysis. The prevention of this disease is done through vaccination and to date there is no antiviral available for treatment of patients. Several studies report the use of natural products with antiviral activity, including polysaccharides. This study evaluated the antiviral effect of a polysaccharide from *Inga* spp (PDT-S) for HSV-1 and PV, into Hep-2 and a polysaccharide from *Myrciaria dubia* in natura (AO) and sulfated (AOS) against the strains of HSV-1: KOS (acyclovir responsive) and AR (acyclovir resistant) in vero cells. The cytotoxicity of polysaccharides was analyzed by MTT method and antiviral activity by plaque reduction assay (PRA), using different treatment protocols. The value of CC_{50} was 870 $\mu\text{g/mL}$ for PDT-S, $> 500 \mu\text{g/mL}$ for AO and 836 $\mu\text{g/mL}$ for AOS. The best antiviral effect determined by plaque assay for all polysaccharide and virus were found at time 0 hours. For PDT-S the IC_{50} was 179 $\mu\text{g/mL}$ and 58 $\mu\text{g/mL}$ and selectivity index of 5.86 and 15 for clinical sample of HSV-1 and PV, respectively, suggesting that PDT-S acts in the stages initial of viral replication. For the AO IC_{50} was 32.6 $\mu\text{g/mL}$ and 87 $\mu\text{g/mL}$ and selectivity index of 15.34 and 5.74 for KOS and AR strains, respectively. For AOS the IC_{50} was 2.06 $\mu\text{g/mL}$ and 0.46 $\mu\text{g/mL}$ and selectivity index of 187.38 and 839.13 for KOS and AR strains, respectively. The results found for AO and AOS showed that sulfation improves the antiviral activity of the polysaccharide and that there were no significant differences between the strains used, and like PDT-S, AOS act in the early stage of viral replication. In conclusion, this work suggests that PDT-S and AOS are substances with promising antiviral activity and can be used for the development of new antivirals.

Keywords: Herpesvirus. Poliovirus. *Inga* spp. *Myrciaria dubia*. Polysaccharides. Antiviral activity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C	Antes de Cristo
AO	Polissacarídeos <i>in natura</i> de <i>Myrciaria dubia</i>
AOS	Polissacarídeos sulfatados de <i>Myrciaria dubia</i>
C	Citosina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EUA	Estados Unidos da América
G	Guanina
GPEI	Global Polio Eradication Initiative
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV	Herpes Simplex Vírus
HSV-1	Herpes Simplex Vírus tipo 1
HSV-2	Herpes Simplex Vírus tipo 2
IF	Imunofluorescência
Kpb	Kilopares de base
Nm	Nanômetros
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDT-S	Pectina extraída do fruto do <i>Inga</i> spp
pH	Potencial Hidrogeniônico
PV	Poliovírus
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Open Reading frame (sequência de leitura aberta)
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
SNC	Sistema Nervoso Central
TK	Timidina quinase
VIP	Vacina Inativada Poliomielite
VOP	Vacina Oral Poliomielite
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
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	Família Herpesviridae	15
3.1.1.1	Vírus Herpes Simplex	15
3.1.1.1.1	Características Estruturais	16
3.1.1.1.2	Replicação viral	17
3.1.1.1.3	Latência	18
3.1.1.1.4	Epidemiologia	19
3.1.1.1.5	Tratamento.....	20
3.1.1.1.5.1	Drogas anti-herpéticas.....	20
3.1.1.1.5.2	Vacinas	22
3.1.1.1.6	Resistência.....	23
3.2	Poliovírus.....	23
3.2.1	Família Picornaviridae	23
3.2.1.1	Poliovírus.....	24
3.2.1.1.1	Características estruturais.....	24
3.2.1.1.2	Replicação	25
3.2.1.1.3	Epidemiologia	25
3.2.1.1.4	Tratamento.....	27
3.2.1.1.4.1	Vacina.....	27
3.3	Produtos Naturais	28
3.3.1	Polissacarídeos	28
3.3.1.1	<i>Inga spp</i>	29
3.3.1.2	<i>Myrciaria dubia</i>	30

4	CONCLUSÃO	32
5	REFERÊNCIAS	33
6	ARTIGOS	39
6.1	Artigo I.....	39
6.2	Artigo II.....	60

1 INTRODUÇÃO

A história das doenças virais está registrada desde as primeiras atividades humanas, nas civilizações egípcias e greco-romanas. Mas somente durante as décadas iniciais do século XX, que esses “vírus filtráveis” foram reconhecidos como agentes causadores de doenças. 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 e dependem da maquinaria das células para se replicarem (BLACK, 1975; SCHATZMAYR e CABRAL, 2012; DIKIDET et al., 2013).

As viroses apresentam grande importância epidemiológica, pois estão entre as causas mais frequentes de doenças, mais de 300 tipos de vírus estão associados a humanos, causando desde infecções subclínicas até infecções graves, gerando altos índices de morbidade e mortalidade. Dessa forma, as infecções virais resultam em uma ameaça constante para a população e um desafio para a saúde pública, além de afetar a economia dos países envolvidos, pois uma parte considerável de todas as drogas compradas em todo o mundo se destina ao tratamento dessas infecções (DIKIDET et al., 2013; LIN et al., 2014; TODOROV et al., 2014; YU et al., 2018).

Com o avanço dos estudos de ácidos nucléicos, aliado à arqueologia, algumas partes da história das doenças foram esclarecidas, revelando os vírus como protagonistas silenciosos, devido a sua rapidez em se adaptar. Os vírus atingem todas as formas de vida, tornando-se uma das principais causas de morte no mundo. Muitas vezes, foram responsáveis em condicionar a existência humana, dizimando populações, infectando combatentes, promovendo êxodos (BLACK, 1975; UJVARI, 2012).

Apesar dos avanços tecnológicos no saneamento, na produção de novos medicamentos e vacinas, a maioria das infecções virais não possuem tratamento ou são de difícil prevenção. Cerca de 90 compostos estão aprovados para a utilização como antiviral e, além disso, estão voltados para um pequeno número de vírus: HIV, hepatites B e C, herpes simplex, varicela-zoster, citomegalovírus, papilomavirus, vírus respiratório sincicial e influenza. Alia-se a este fator, o aparecimento de cepas resistentes aos antivirais disponíveis e a reemergência e emergência de novos vírus (DE CLERCQ e LI, 2016).

Uma infecção viral de grande importância epidemiológica é causada pelo vírus herpes simplex, que pertence à família *Herpesviridae* subfamília *Alphaherpesvirinae*. Apresentam estruturas semelhantes, com genoma de DNA fita dupla, coberto por um capsídeo icosaédrico e envelope lipídico contendo glicoproteínas. O HSV causa infecções orais e

genitais que podem evoluir para infecções severas, principalmente em imunodeficientes ou neonatos, como meningite, encefalite e lesões oculares (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015).

A principal questão no controle da infecção por herpesvírus é o estabelecimento de latência, que dificulta o tratamento ou a elaboração de uma vacina. O HSV pode ser tratado com análogos de nucleosídeos como o aciclovir (análogo da guanósina), que é altamente seletivo para esse vírus; porém o uso constante desse medicamento tem aumentado significativamente o surgimento de cepas HSV resistentes (GOULD et al., 2013; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015).

Outra doença viral que ainda representa uma ameaça mundial é a poliomielite, causada pelo poliovírus, doença que atinge gravemente o sistema nervoso resultando em paralisia flácida. A poliomielite é considerada como uma das doenças mais antigas, seus primeiros registros foram encontrados nos hieróglifos egípcios, por volta do segundo milênio a.C. O agente causador desta doença pertence à família *Picornaviridae*, gênero *Enterovirus*, composto por RNA fita simples, polaridade positiva, coberto com um capsídeo icosaédrico (JESUS, 2007; PALLANSH e ROOS, 2007).

Em 1955 Salk cultivou o PV em vários tipos celulares e conseguiu a sua inativação com formaldeído, produzindo altos títulos de anticorpos, que colaborou na formulação da primeira vacina eficaz contra a poliomielite, administrada por via intramuscular. Em 1961, Sabin elaborou outra vacina contra poliomielite, administrada por via oral, produzida com vírus atenuado. Mesmo com a descoberta das vacinas, atualmente a doença é endêmica no Afeganistão, Paquistão e Nigéria, tendo sido registrados cerca de 10 casos de poliomielite paralítica pelo vírus selvagem e 5 pelo vírus vacinal, nos últimos seis meses (GPEI, 2018). Além da importância epidemiológica, esse vírus é utilizado para estudos de novos antivirais servindo de modelo para outros vírus da mesma família (PALLANSH E ROOS, 2007; FACCIN-GALHARDI et al, 2012; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015).

A pesquisa de antivirais de origem natural tem sido estimulada pela baixa citotoxicidade e poucos efeitos colaterais. Cerca de 50% dos produtos farmacêuticos utilizados são derivados de produtos naturais, uma vez que existe uma grande diversidade de moléculas bioativas com efeitos diversos, atuando como imunomoduladores, antifúngicos, antibacterianos e antivirais. Dentre os produtos naturais, a classe dos polissacarídeos, extraídos de plantas, algas e microrganismos vem se destacando por suas atividades biológicas (ARAKAWA et al., 2009; HAFIDH et al., 2009).

O *Ingá* spp é uma fruta comestível, típica da América do Sul, encontrado na maioria dos estados brasileiros. Seu fruto é uma vagem comprida com sementes negras revestidas por uma sarcotesta branca, flocosa, suculenta e adocicada. Essa planta é utilizada como árvore de sombra para plantações de café, cupuaçu e cacau, dá boa lenha, eleva os níveis de nitrogênio do solo, serve como adubo e é muito procurada pela indústria alimentícia para a fabricação de sucos e essências de sorvetes. Na medicina popular pode ser usada para bronquite, dor de cabeça, cura de feridas, antisséptico, problemas estomacais, queda de cabelo e laringites (ALEGRE et al., 1998; FALCÃO e CLEMENT, 2000; SCHULZ et al., 2014).

A *Myrciaria dubia*, também conhecida como camu-camu, é uma fruta comestível rica em vitamina C, nativa da Amazônia, principalmente nas margens de rios, lagos e igapós. Tem frutos globosos, com casca lisa e brilhante de coloração vermelha, a qual é utilizada pela indústria alimentícia como corante, suco, néctar, conservante, sorvetes, vinhos, geleia, bombons e balas. Também é utilizado na fabricação de cosméticos e na medicina popular, como antioxidante, anti-inflamatório, retardador do envelhecimento e antimicrobiano (YUYAMA, AGUIAR e YUYAMA, 2002; MAEDA et al., 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o potencial antiviral dos polissacarídeos obtidos dos frutos do *Inga spp* e *Myrciaria dubia*, contra HSV-1 e PV, *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade dos polissacarídeos em células HEp-2 e Vero.
- Avaliar a atividade antiviral da pectina isolada do fruto do *Inga spp* para HSV-1 e PV, através do ensaio de redução de plaques.
- Avaliar a atividade antiviral dos polissacarídeos *in natura* e sulfatado isolados do fruto *Myrciaria dubia*, para as cepas KOS (sensível ao aciclovir) e AR (resistente ao aciclovir) do HSV-1, através do ensaio de redução de plaques.
- Avaliar a ação dos polissacarídeos na síntese de proteínas virais pelo ensaio de imunofluorescência.
- Avaliar a ação dos polissacarídeos na síntese de DNA ou RNA virais pelo teste de PCR ou RT-PCR.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HERPESVÍRUS

3.1.1 Família *Herpesviridae*

A família *Herpesviridae* abrange cerca de 200 vírus capazes de infectar diversas espécies, como: mamíferos, aves, reptéis, peixes e moluscos. Ao infectar diversos hospedeiros esses vírus coevoluíram, tornando-se fortemente associados. As características comuns dessa família estão na capacidade de estabelecer latência e na estrutura em comum, composta por: envelope lipídico, capsídeo icosaédrico e genoma de DNA de cadeia dupla (MUYLAERT, TANG e ELIAS, 2011; RECHENCHOSKI et al, 2016; RIDDELL et al., 2017).

Nove herpesvírus são conhecidos por causarem infecções em humanos, divididos em três subfamílias, distribuídos conforme a suas características biológicas, estrutura do genoma, tropismo, efeito citopático, sítio de infecção latente, patogênese e manifestação da doença. A subfamília *Alphaherpesvirinae* é formada por: Herpes Simplex Vírus (1 e 2) e Varicela-Zoster, com ciclo de replicação curto e latência em gânglios sensitivos. A subfamília *Betaherpesvirinae* é formada por: Citomegalovírus e Herpesvírus Humano (6A, 6B, 7), com ciclo de replicação longo, lenta progressão da infecção em cultura de células e latência em tecidos glandulares, células linforreticulares, rins e outros tecidos. A subfamília *Gammaherpesvirinae* é formada por Epstein-Barr e Herpesvírus 8 associado ao sarcoma de Kaposi, ambos com potencial oncogênico e latência em células linfoblastóides (ARII et al., 2009; RECHENCHOSKI et al., 2016; RIDDELL et al., 2017; DAI e ZHOU, 2018).

Todos os membros da família *Herpesviridae* têm propriedades biológicas importantes como a codificação de várias enzimas envolvidas na síntese do ácido nucléico e de proteínas do vírus. O seu DNA é sintetizado no núcleo, produz partículas infecciosas e que levam à destruição das células podendo causar infecções persistentes e fazendo com que os vírus permaneçam em estado de latência, com a capacidade de expressar somente alguns genes de interesse (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015).

3.1.1.1 Vírus Herpes Simplex

Os vírus herpes simplex 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2), primeiros herpesvírus a serem descritos na literatura, são neurotrópicos e considerados como agentes causadores de infecções sexualmente transmissível (IST) em nível global, com soroprevalência de 80% em adultos. Causam infecções crônicas com estabelecimento de latência em neurônios sensoriais. O HSV-1 é adquirido durante a infância ou adolescência por contato direto por via oral e está

associado à infecções, principalmente, na região dos lábios, boca, nariz e olhos. O HSV-2 ocorre em adolescentes e adultos sexualmente ativos, suas lesões estão associadas à infecções genitais, envolvendo a genitália e a pele abaixo da cintura. Em alguns casos pode acometer de forma mais severa neonatos, aumentando as taxas de mortalidade (CLEMENS e FARHAT, 2010; KARASNEH e SHUKLA, 2011; GELLER et al., 2012; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015; JOHNSTON e COREY, 2016).

Em sua maioria, a infecção por herpes é assintomática ou com sintomas leves que não são reconhecidos. Os comumente detectados são: bolhas dolorosas, formigamento, ardência, calor, coceira, febre, cefaleia, mal-estar. Nos casos de infecções orais pode ocorrer uma incapacidade de ingerir alimentos, e nos casos de infecções genitais pode ocorrer linfadenopatia inguinal e disúria (SANTOS et al., 2012; MARTINS, ARANTES e NICOLAU, 2016, WHO, 2017).

Embora o HSV-1 tenha preferência pela região oral e o HSV-2 pela região genital, há relatos de infecções genitais causadas pelo HSV-1. Isso pode ser explicado pelas mudanças nos hábitos sexuais, deixando os jovens, sem anticorpos anti-HSV-1, susceptíveis as infecções genitais (BRADLEY et al., 2014).

O HSV pode apresentar dois tipos de ciclo replicativo, com características distintas, como infecção aguda ou produtiva e infecção latente. A replicação da infecção produtiva ocorre nos locais da penetração do vírus no hospedeiro, provavelmente, nos neurônios antes do estabelecimento da latência e durante a reativação da infecção latente. Essa replicação é caracterizada pela expressão de todos os genes virais, replicação do genoma e produção de progênie viral infecciosa, que é incompatível com a sobrevivência das células infectadas do hospedeiro. O estabelecimento da infecção latente ocorre quando o ciclo replicativo é interrompido, logo após a penetração do genoma no núcleo celular. Dessa forma não há uma expressão gênica, sem a produção de proteínas virais e replicação do genoma, ou seja, não há a produção de progênie viral (FLORES, 2017).

3.1.1.1.1 Características Estruturais

O HSV mede cerca de 186 nm de diâmetro, possui capsídeo icosaédrico com 162 capsômeros, constituído de 6 proteínas: VP5, VP26, VP23, VP24, VP19 e U16. Esse capsídeo é envolto em envelope glicolipoproteico com glicoproteínas e poliaminas inseridas na sua superfície. Entre o capsídeo e o envelope existe um espaço com material proteico amorfo, denominado de tegumento, ao qual comporta mais de 20 proteínas importantes para a

replicação viral, como: VP16, VP22, VP1-2. A partícula viral é frágil não resistindo ao tratamento químico com solventes orgânicos, detergentes, proteases, substâncias com pH abaixo de 3 e acima de 11, ou a tratamento físico como calor (acima de 60°C), radiação ionizante e não ionizante (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015; FLORES, 2017).

O núcleo possui um core eletrodense, constituído por DNA de fila dupla linear, com genoma de 152 kpb e proporção de G+C de 68%. O genoma contém pelo menos 84 sequências de leitura aberta (ORF), capaz de codificar cerca de 100 proteínas para constituir o capsídeo, envelope e tegumento, além de outras proteínas utilizadas somente durante o ciclo de replicação viral, chamada de proteínas não estruturais. Os genes são classificados em: iniciais imediatos, iniciais ou tardios. O genoma possui dois componentes que são formados por sequências únicas (U) covalentemente ligadas, chamadas de L (*long*) ou S (*short*), que dependem do tamanho do fragmento genômico que será lido. Esses são nomeados com as siglas UL ou US (SIGAMANI et al., 2013; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015; FLORES, 2017).

3.1.1.1.2 Replicação viral

O HSV infecta diferentes tipos de células, como fibroblastos, células do epitélio escamoso e mucosa, células polarizadas do epitélio cilíndrico, células glias e terminações nervosas. O ciclo replicativo na maioria das vezes ocorre no núcleo da célula infectada, com duração média de 18 a 20 horas. O primeiro passo para a replicação acontece por meio da adsorção do vírus aos receptores da superfície da célula, há uma interação das regiões ricas em glicosaminoglicanas do sulfato de heparana das células com glicoproteínas virais do envelope, principalmente gB e gC. A glicoproteína gD também participa do processo formando uma ligação estável, por meio da seleção de um dos 3 tipos de receptores secundários: HVEM (*Herpesvirus Entry Mediator*), receptores da família da Nectina-1 e Nectina-2, e sulfato de heparana modificado em regiões específicas pela ação da enzima 3 – O – sulfotransferase. Após essa interação ocorre a fusão do envelope do vírus com a membrana plasmática da célula hospedeira, recrutando as glicoproteínas gB, gH e gL, que são responsáveis por essa fusão (KARASNEH e SHUKLA, 2011; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015).

O nucleocapsídeo e suas proteínas são liberados no citoplasma da célula e transportados por meio de microtúbulos para próximo do núcleo da célula. Em seguida o material genético e as proteínas do tegumento entram no núcleo para começar a transcrição.

Quando o DNA viral entra no núcleo, ocorre um remodelamento em sua estrutura nuclear com modificações profundas. Dessa forma, o DNA de fita dupla linear se transforma rapidamente em um genoma circular assim a RNA polimerase II dependente de DNA da célula hospedeira transcreve todos os genes virais. Depois da transcrição, o RNAm vai para o citoplasma, onde ocorre a síntese de proteínas virais (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015; FLORES, 2017).

Os genes são expressos em 3 fases sequenciais: fase imediatamente inicial (IE, α), fase inicial (E, β) e fase tardia (L, γ). Na fase α são expressas proteínas responsáveis pela regulação gênica e transcrição da próxima fase (β), a qual atinge o seu pico máximo em 3 horas após a entrada do vírus na célula e sintetiza proteínas como: ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 e Us1.5. Na fase β são expressas proteínas responsáveis pela replicação do DNA viral e produção de substratos para síntese de DNA, a qual atinge o seu pico máximo em 6 horas após a infecção. Dentre as proteínas sintetizadas nesta fase, destaca-se a timidina quinase viral (TK) e a DNA polimerase viral (UL30). A última fase, γ , é caracterizada pela produção de proteínas estruturais do vírion e pela montagem da partícula viral (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015; FLORES, 2017).

O capsídeo é montado em torno de proteínas da plataforma (*scaffolding*), que são transportadas para o núcleo, por meio da interação de outras proteínas que permitem o empacotamento do DNA viral. O processo de envelopamento do HSV é complexo e controverso, dessa forma a passagem do nucleocapsídeo do núcleo até o espaço extracelular ainda não está bem esclarecido, havendo 3 hipóteses: modelo de duplo envelopamento, modelo nuclear de simples envelopamento e modelo citoplasmático de simples envelopamento (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015; RECHENCHOSKI et al., 2017).

3.1.1.1.3 Latência

Uma das características marcantes dos herpesvírus é a sua capacidade de causar infecções latentes. Nessa fase o genoma viral permanece inativo nas células neuronais do hospedeiro, sem se dividir, sem expressão gênica significativa e ausência de sinais clínicos. Uma vez que o hospedeiro é infectado por herpes esse permanece portador do vírus na forma latente ao longo de sua vida (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015; FLORES, 2017).

Após a replicação primária na mucosa oral ou genital, os vírus se deslocam dos axônios para o neurônio do gânglio sensorial. No núcleo dos neurônios o DNA viral é circularizado na forma de epissomas, compactado por histonas, expressando somente genes

relacionados à latência (LAT's), até que este receba sinais de reativação e retorne para o sítio inicial da infecção (MUYLAERT, TANG e ELIAS, 2011; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015; FLORES, 2017).

Os fatores que desencadeiam a reativação da infecção ainda não são bem conhecidos, porém vários estímulos são descritos como capazes de induzir a infecção como: injúria tecidual, estresse físico e emocional, febre, exposição à luz ultravioleta, menstruação, desequilíbrio hormonal, imunossupressão, tratamentos estéticos que geram abrasão na pele, tratamento odontológicos e elevação das prostaglandinas E e F (MUYLAERT, TANG e ELIAS, 2011; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015; FLORES, 2017).

3.1.1.1.4 Epidemiologia

Os seres humanos são os únicos reservatórios de herpes, que transmitem essa doença para outros indivíduos, por meio do contato direto da pele lesionada ou mucosas orais e genitais. Os vírus estão presentes em fluidos corporais, como saliva, sêmen, secreções cervicais, líquido das vesículas ou fômites. Pode ocorrer a transmissão do vírus de pessoas que não apresentam sintomas (*shedding*) para outras pessoas susceptíveis à infecção. Também há relatos de alguns casos raros, com a prevalência de 1%, da transmissão de herpes genital da mãe para o bebê durante o parto, aumentando a mortalidade em 30% dos casos. Outras complicações sérias podem ocorrer por meio da infecção por herpes, como cegueira, encefalite e meningite. A infecção por herpes aumenta o risco de adquirir outras DSTs, como HPV, que aumenta de 2,2 para 3,4 vezes o risco de desenvolvimento do carcinoma cervical invasivo em mulheres positivas para HPV e nos casos de pacientes infectados pelo HIV a progressão da doença é acelerada (CLEMENS e FARHAT, 2010; BRADLEY et al., 2014; CARVALHO, ANCHIETA e ROMANELLI, 2014; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015; WHO, 2017).

No mundo, o herpes é classificado como uma infecção altamente contagiosa, comum e pandêmica, pois os vírus estão distribuídos em todos os países e etnias. O HSV-1 tem a prevalência de aproximadamente 90%, quase sempre adquirido na primeira infância e se prolonga pelo resto da vida do hospedeiro. Em alguns países desenvolvidos esse tipo viral também tem se destacado em infecções genitais. Já o HSV-2 está relacionado à quantidade de parceiros sexuais e promiscuidade, dessa forma está mais prevalente em adolescentes e adultos sexualmente ativos, em alguns casos, as mulheres são mais prevalentes do que os homens, chegando a ser duas vezes mais prevalentes. Cerca de 500 milhões de pessoas em

todo mundo estão infectadas por herpes e há estimativas que a cada ano mais de 23 milhões de pessoas apresentarão novas infecções por esse vírus (BERNSTEIN et al., 2013; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015; JOHNSTON e COREY, 2016; WHO, 2017).

A partir de 2012, estima-se que 417 milhões de pessoas em todo o mundo, entre as idades de 15 e 49 anos, desenvolveram herpes com soroprevalência de 10% para Europa, Mediterrâneo Ocidental, regiões do sudeste asiático e do pacífico ocidental. Para as Américas e África a soroprevalência aumenta para 15% e 30% respectivamente. O HSV-1 está em declínio em adolescentes de países desenvolvidos, como por exemplo nos EUA, a qual a soroprevalência caiu 29% para as idades de 14 a 19 anos. Quando esses dados são comparados nos últimos 30 anos, a queda é de 42,6% para 30,1%. Mas, em contrapartida houve um aumento de infecções genitais causadas por HSV-1, devido ao aumento da prática do sexo oral. Já no Brasil o Ministério da Saúde registrou mais de 640.900 casos de pessoas infectadas pelo herpes durante a última década (FERRAZ e MARTINS, 2014; JOHNSTON e COREY, 2016).

3.1.1.1.5 Tratamento

Ainda não existe um quimioterápico capaz de curar a infecção herpética, porém há drogas anti-herpéticas que reduzem os sintomas e diminuem o tempo de manifestação clínica, como os análogos de nucleosídeos: aciclovir e seus derivados (penciclovir, valaciclovir, fanciclovir). Esses medicamentos entraram no mercado com o intuito de substituir a iododeoxiuridina, um análogo de timidina, e vidarabina, uma análogo de adenosina, os quais apresentavam efeitos adversos, baixa solubilidade em soluções fisiológicas, além de ser tóxicos (JAMES e PRICHARD, 2014).

O laser de baixa intensidade também pode ser utilizado para o tratamento de infecções por herpes, com efeito analgésico e anti-inflamatório, melhorando a reparação tecidual e diminuindo a replicação viral. Após 5 aplicações, estudos revelaram que houve uma redução da replicação viral de 68,4% e 57,3% para HVS-1 e HSV-2, respectivamente (SANTOS et al., 2012; MARTINS, ARANTES e NICOLAU, 2016; VAZZOLLER et al., 2016).

3.1.1.1.5.1 Drogas anti-herpéticas

O aciclovir tem excelente índice terapêutico e poucos efeitos colaterais e devido a sua aceitabilidade e a droga de escolha para o tratamento de herpes. Seu mecanismo de ação se baseia na sua conversão em monofosfato, pela timina quinase viral, que é novamente

transformado, pelas enzimas celulares, 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, por meio da competição com DNA polimerase viral, bloqueando a transcrição e replicação do DNA viral. O aciclovir é administrado por via oral, tópica ou intravenosa, tem baixa biodisponibilidade, meia vida de 1 hora e excreção por via renal (PLAS e HARDIE, 2010; RODRIGUES e SILVA, 2012; JAMES e PICHARD, 2014; RECHENCHOSKI et al., 2017).

Para melhorar o efeito de aciclovir a sua molécula foi modificada surgindo pró-fármacos (Figura 1) como: valaciclovir, o qual possui um éster de valina para melhorar a absorção; penciclovir, o qual possui a adição de uma hidroxila para melhorar o tempo de permanência no interior da célula; famciclovir, o qual foi adicionado um grupo diacetil de éster para melhorar a biodisponibilidade e absorção; ganciclovir, o qual foi adicionado um grupo hidroximetil na cadeia acíclica, fazendo com que esse medicamento se tornasse ativo contra citomegalovírus, porém o seu uso é feito de forma limitada, devido a depressão que causa na medula óssea, tornando-se tóxico; e por último valganciclovir o qual foi adicionado um éster de valina na composição do ganciclovir com o intuito de melhorar os seus efeitos adversos (Figura 1) (PLAS e HARDIE, 2010; BIRKMANN e ZIMMERNANN, 2016).

Além da terapia com aciclovir existe uma segunda linha de medicamentos utilizados nos casos de infecções resistentes, como por exemplo o uso de análogos de pirofosfato (Foscarnet) e nucleotídeo acíclico análogo de desoxicidina monofosfato (Cidofovir). O foscarnet atua diretamente na DNA polimerase viral, não precisa ser fosforilado pelas quinases virais e celulares, consegue imitar estrutura do pirofosfato produzido durante o alongamento da cadeia de DNA, inibindo de forma não competitiva a DNA-polimerase viral, bloqueando a liberação do pirofosfato. Já o cidofovir é fosforilado pelas quinases da célula do hospedeiro, transformando-se em cidofovir-trifosfatado, o qual irá competir pela incorporação do trifosfato de desoxicidina no DNA viral, fazendo com que ocorra uma inibição da DNA polimerase viral (TUSET et al., 2010; PLAS e HARDIE, 2010; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015; RECHENCHOSKI et al., 2017).

Para tratamento de herpes labial é comum o uso de antivirais tópicos, como aciclovir ou penciclovir. Quando é necessária administração por via oral recomenda-se o uso de valaciclovir; 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. Já para os pacientes com HIV, tem maior probabilidade de apresentar cepas resistentes ao aciclovir, é recomendado o tratamento com foscarnet, por via

intravenosa, ou cidofovir de uso tópico (TUSET et al., 2010; GELLER et al., 2012; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015).

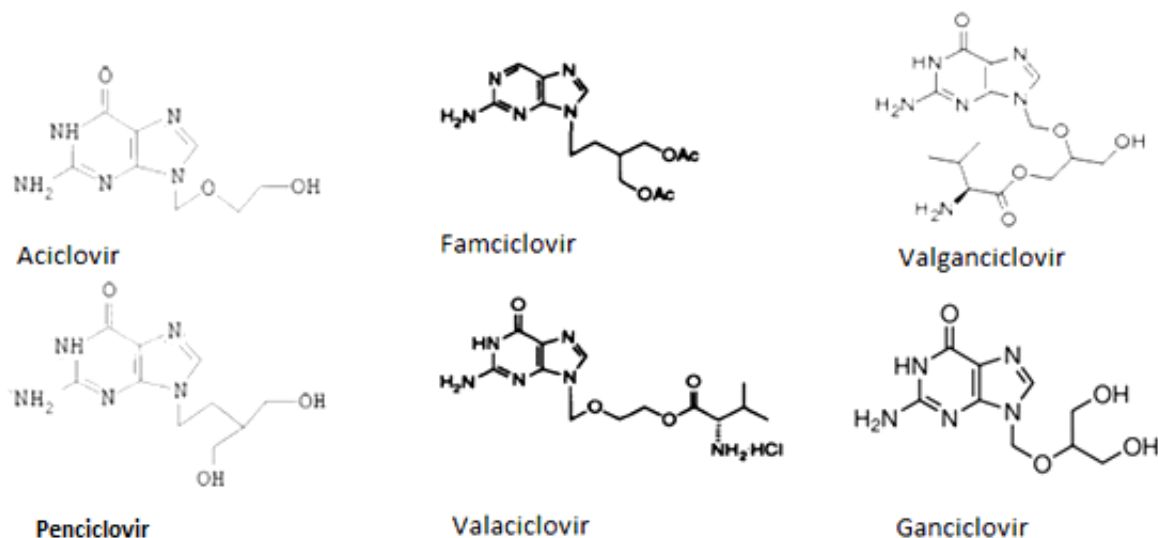


Figura 1: Aciclovir e seus pró-fármacos

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

3.1.1.1.5.2 Vacinas

Não há vacinas licenciadas contra o HSV-1 e HSV-2, mas existe um grande incentivo para a pesquisa de vacinas profiláticas, as quais seriam aplicadas antes da exposição do vírus. Os alvos mais procurados para induzir a produção de anticorpos neutralizantes são as glicoproteínas do envelope de HSV, principalmente a glicoproteína D. Existe uma preocupação na elaboração de uma vacina contra o HSV-2, já que essa é considerada uma IST, porém todas as vacinas disponíveis ainda se encontram em fase de pesquisa (JOHNSTON, GOTTLIEB e WALD, 2016; GOTTLIEB et al., 2017).

A vacina profilática que apresenta resultado mais promissor foi a Herpevac, uma vacina para o HSV-2, imunologicamente ativa contra a glicoproteína gD2, desenvolvida pela companhia farmacêutica britânica, GlaxoSmithKline. Essa vacina conseguiu imunizar cerca de 8000 mulheres soronegativas para HSV-1 e HSV-2, além dos relatos da redução de vírus em lesões clínicas de herpes genital recorrente (BIRKMANN e ZIMMERNANN, 2016).

Quando o assunto é vacina terapêutica, a mais eficiente relatada é a GEN-003, da indústria farmacêutica Genocea Biosciences, que incorporou células T antígenos virais, ICP4

e gD2, juntamente com um adjuvante. Os melhores resultados encontrados mostram uma redução do derramamento de HSV-2 de 58% após 6 meses e em alguns casos, dependendo da dose, 50% dos pacientes ficaram livres das lesões durante esse mesmo tempo (BIRKMANN e ZIMMERNANN, 2016).

3.1.1.1.6 Resistência

Com o tratamento das infecções por HSV, realizado a longo prazo, especialmente em pacientes imunocomprometidos, surgiram cepas virais resistentes. As mutações virais que desencadeiam resistência ao aciclovir e outros análogos de nucleosídeo, estão principalmente relacionadas ao gene UL23, responsável pela ativação da fosforilação da enzima timidina quinase, transformando essa enzima defeituosa e incapaz de fosforilar a droga. Essa modificação ocorre em 95% dos casos de resistência ao aciclovir e seus derivados. Outra mutação que ocorre de forma mais rara, é encontrada em cepas resistentes para aciclovir e foscarnet, é relacionada ao gene UL30, responsável em codificar a subunidade da DNA polimerase viral, o qual impede a ligação da droga, permitindo que a replicação viral continue sem os mecanismos de terminação de cadeia e está frequente em cerca de 5% dos casos de resistência (PLAS e HARDIE, 2010; ANDREI e SNOECK, 2013; JAMES e PRICHARD, 2014; RECHENCHOSKI et al., 2017).

3.2 POLIOVÍRUS

3.2.1 Família *Picornaviridae*

A família *Picornaviridae* é uma das maiores e mais importantes famílias virais para o homem e agropecuária. Composta por vírus pequenos de RNA, consiste em 26 gêneros, os quais 7 são capazes de infectar seres humanos, como: Cardiovírus, Cosavírus, Enterovírus, Hepatovírus, Kobuvírus, Parechovírus e Salivírus (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015).

Primeiramente, os Enterovírus foram separados de acordo com as manifestações clínicas produzidas nos homens e na patogenia observada em camundongos recém-nascido. Mas com os avanços da biologia molecular esse gênero foi novamente organizado, conforme a sua organização genômica, similaridade da sequência de nucleotídeos e propriedades bioquímicas. Dessa forma esse gênero foi dividido em 12 gêneros, das quais 7 infectam humanos, como: Enterovírus humanos A, B, C e D; Rhinovírus humanos A, B e C (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015).

3.2.1.1 Poliovírus

O poliovírus possui 3 sorotipos: pv1, pv2 e pv3, todos eles pertencem ao gênero Enterovirus humanos C, devido à proximidade genética. Este vírus causa uma doença infecciosa aguda que afeta gravemente o sistema nervoso central, destruindo os neurônios motores nos cornos anteriores da medula espinhal, gerando uma paralisia flácida, chamada também de poliomielite (JESUS, 2007; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015).

A poliomielite pode se manifestar de 3 formas: poliomielite abortiva, uma forma mais comum e mais branda, caracterizada por febre, lassidão, sonolência, cefaleia, náusea, vômito, prisão de ventre e inflamação na garganta, o qual o paciente se recupera em poucos dias; poliomielite não paralítica (meningite viral), que além dos sintomas descritos na poliomielite abortiva, o paciente apresenta rigidez e dor nas costas e nuca, durando de 2 a 10 dias, com uma recuperação rápida e completa e com baixo percentual de evolução para paralisia; poliomielite paralítica, cerca de 1% das infecções evoluem para esse caso, decorrente da inflamação e destruição da massa cinzenta do SNC, o período de incubação ocorre de 4 a 10 dias, com aparecimento de paralisia entre 2 a 5 dias após os sintomas iniciais, como nos outros casos juntamente com dor muscular, a paralisia pode ser classificada como espinhal ou bulbar, conforme onde se dá a biossíntese na medula espinhal ou no tronco cerebral (LÉVÊQUE e SEMLER, 2015; RECHENCHOSKI et al., 2015; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015).

3.2.1.1.1 Características estruturais

O poliovírus tem formato esférico, com aproximadamente 25 a 30 nm, sem envoltório glicolipoproteico, com capsídeo icosaédrico. É composto quimicamente por 30% de ácido nucleico e 70% de proteínas. O capsídeo é formado por 60 capsômeros, que se agrupam em 4 polipeptídeos estruturais: VP1, VP2, VP3 e VP4, sendo o VP1 o mais superficial, onde fica o sítio de reconhecimento do receptor celular. O genoma é constituído de RNA linear de fita simples com comprimento de 7,2 a 8,4 kb e polaridade positiva. O genoma desse vírus sempre se apresenta ligado a uma proteína VPg (*virion protein genome linked*), que faz o papel de iniciador na síntese do RNA viral (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015)

Os PV são estáveis na faixa de pH de 3 a 9, sendo inativados por formaldeído, ácido clorídrico, cloro residual, temperaturas acima de 42°C, luz ultravioleta e dessecação. Porém, esses vírus são resistentes a muitos desinfetantes usados em laboratórios, como álcool etílico,

lisol, álcool isopropílico, composto quaternários de amônio, éter e clorofórmio (ALMOND, 1991; PALLANSH e ROOS, 2007; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015).

3.2.1.1.2 Replicação

A transmissão do PV ocorre pela via fecal-oral, tendo a boca como porta de entrada para esse vírus e excreção por meio das fezes, que pode contaminar águas e alimentos. A replicação desse vírus ocorre inteiramente no citoplasma, com duração de 5 a 10 horas (JESUS, 2007; RECHENCHOSKI et al., 2015).

A primeira etapa da replicação consiste na adsorção do vírus à receptores específicos distribuídos na superfície celular, como o CD155, uma glicoproteína da superfamília das imunoglobulinas. Após a adsorção o capsídeo se dissocia através de modificações estruturais das proteínas, formando poros, nos quais os RNAs virais são liberados para o citoplasma da célula. Em seguida, o genoma perde a VPg, deixando o RNA livre para ser traduzido pelos ribossomos da célula hospedeira. As proteínas não estruturais se associam ao RNAm viral para a transcrição da fita negativa de RNA, iniciando a replicação do genoma viral, com a formação de novas moléculas de RNA negativas que servirão como molde para a síntese de RNAm e genômico (RECHENCHOSKI et al., 2015; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015).

O RNA viral funciona como um RNAm, o qual é traduzido para uma única poliproteína, que é clivada pelas proteinases 2A, 3C e 3CD, transformando a poliproteína em proteínas virais individuais P1, P2 e P3. Quando o pool de proteínas do capsídeo atinge um nível suficientemente, começa a encapsidação, por meio da clivagem da P1, que produzirá capsômeros imaturos (VP0, VP3 e VP1) e formará um pentâmero do provírus. Depois as fitas positivas de RNA recém-sintetizado juntam-se ao provírus, formando uma partícula viral completa. Para que o vírus se torne infeccioso ainda é necessário a clivagem de VP0 para VP2 e VP4 (JESUS, 2007; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015).

3.2.1.1.3 Epidemiologia

A epidemiologia do PV pode ser dividida em 3 fases: endêmica, epidêmica e pós-vacinal. O PV atinge principalmente crianças de faixa etária baixa, já que os adultos possuem uma imunidade adquirida contra essa doença. Também está mais frequente em populações de baixa renda, devido às condições precárias de higiene (BUTEL, 2012; SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015).

Em 1985 a OMS informou que havia cerca de 300.000 casos de poliomielite parálitica, 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 diminuem a transmissão dessa doença. Também em 1955 iniciou-se, na maioria dos países, a campanha de vacinação, que diminuiu em 99% o número de casos de poliomielite, após 12 anos de campanha (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015).

Apesar do progresso da erradicação da doença em todo o mundo, em 2017 foram notificados 22 casos de poliomielite parálitica causada pelo vírus selvagem e 2 casos pós-vacinal. Dentre os países acometidos por essa doença, três ainda são considerados endêmicos: Paquistão, Afeganistão e Nigéria (GPEI, 2018).

Como o último caso de poliomielite no Brasil foi registrado em 1989, em 1994, juntamente com as Américas, o país foi certificado como área livre de circulação do poliovírus selvagem, com o reconhecimento da OMS. O Ministério da Saúde sempre está investindo nas campanhas de vacinação contra a poliomielite, em 2015 a primeira campanha de vacinação atingiu 94,4% de cobertura (Figura 2) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Incidência de Poliomielite e Cobertura Vacinal com a VOP, em Campanhas, Brasil, 1968 - 2017

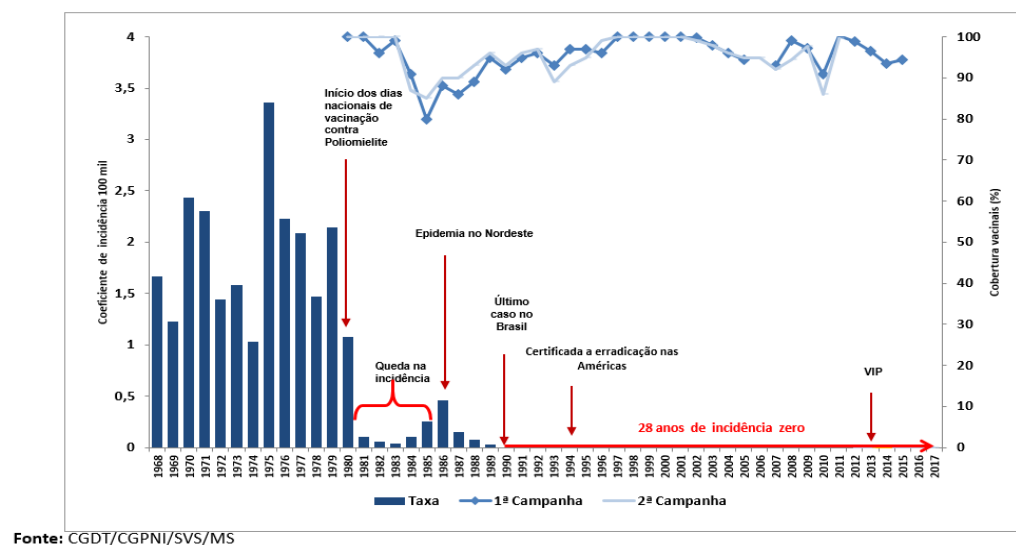


Figura 2: Incidência de poliomielite e cobertura vacinal

Fonte: Ministério da Saúde, 2018.

3.2.1.1.4 Tratamento

Até o momento não existe um quimioterápico eficiente para o controle ou tratamento da poliomielite. Todas as vítimas de contágio devem ser hospitalizadas, recebendo o tratamento dos sintomas, conforme o quadro clínico do paciente. Desse modo, a única forma de prevenção e controle da poliomielite é a vacinação (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

3.2.1.1.4.1 Vacina

Para a prevenção da poliomielite existem duas vacinas, a primeira (VIP) desenvolvida por Salk, em 1955, por meio da inativação do PV com formaldeído, administrada por via intramuscular, capaz de induzir anticorpos séricos, podendo ser aplicada em indivíduos imunocomprometidos e nos casos que não é recomendada a vacina de vírus atenuados. A segunda (VOP) vacina foi desenvolvida em 1961, por Sabin. Produzida por meio de vírus atenuados, a vacina é administrada via oral, o que confere maior facilidade na administração e custos. Essa vacina induz tanto anticorpos séricos como anticorpos secretores (IgA), fazendo com que a imunidade desenvolva de forma mais rápida e duradoura (SANTOS, ROMANOS e WIGG, 2015).

Os casos de falhas da vacina oral estão relacionados com a sua má conservação, interferência da infecção por outros enterovírus presentes no intestino e pela presença de anticorpos do leite materno. Porém, em 2000, ocorreu um fato extraordinário no Haiti e República Dominicana marcado pelo surgimento de poliomielite em crianças vacinadas, causada por PV derivado da vacina atenuada, ou seja, esse vírus readquiriu a sua 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, 2015).

Para se adequar às recomendações da OMS, o programa de imunizações deve ser complementado pela vacina VIP, com o intuito de eliminar o efeito adverso da paralisia associada à VOP e à reintrodução do vírus. Em 2012, o calendário de vacinação passou a ter uma programação combinada de 2 doses VIP seguidas por 2 doses VOP. Mas a partir de 2016 os países livres da poliomielite, como o Brasil, tiveram as vacinas trivalentes de VOP recolhidas e trocadas por vacinas bivalentes, além de outras mudanças no Calendário de Vacinação, com a aplicação da vacina VIP aos 2, 4 e 6 meses e dois reforços com a VOP aos 15 meses e aos 4 anos (CASSEMIRO et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

3.3 PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais são utilizados como fonte de matérias-primas de forma eficaz contra várias doenças, selecionados por meio das experiências práticas de muitos anos, as quais foram passadas ao longo das gerações. Essas descobertas fizeram com que produtos naturais com atividade biológica, usados de forma histórica, fossem fontes para o desenvolvimento para antivirais (SON et al., 2013).

Estudos mostram que os produtos naturais são uma fonte muito rica para a produção de novas drogas, cerca de 50% dos produtos farmacêuticos comercializados são derivados de produtos naturais, e mais de 100 estão em fase de desenvolvimento clínico. Essas moléculas bioativas ocorrem em plantas, como metabólitos secundários e atuam como mecanismos de defesa contra a predação, herbívora, ataque fúngicos, invasões microbianas e infecções virais (HAFIDH et al., 2009; LI et al., 2017).

Os produtos naturais têm vantagens em relação a produtos sintéticos, como a diversidade química, possibilidade dos princípios ativos atuarem em diversos alvos biológicos, baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais. Além do mais, alguns desses podem ser alimentos, tornando-se um recurso eficaz como agente antiviral e virucida. A complexidade estrutural dos produtos naturais tem sido vencida graças ao avanço na síntese orgânica e engenharia genética (ARAKAWA et al., 2009; HAFIDH et al., 2009; MARTINEZ, 2013).

A flora brasileira possui uma vasta diversidade biológica. Dessa forma muitos compostos naturais são utilizados como fonte de: medicamentos, alimentos e seus aditivos, fibras, óleos naturais e essenciais, cosméticos, produtos químicos e biocombustíveis e dentre esses produtos se destacam os polissacarídeos (CUNHA, PAULA e FEITOSA, 2009).

3.3.1 Polissacarídeos

São macromoléculas compostas de um único ou diferentes tipos de monossacarídeos de origem natural, encontrados em plantas, animais, algas e microrganismos. Assim como outras macromoléculas, os polissacarídeos desempenham várias atividades biológicas, como: antitumorais, antioxidantes, anticoagulantes, antitrombóticas, estimuladores do sistema imunológico, anti-inflamatórios e antivirais e por apresentar baixa toxicidade, há um incentivo da sua utilização na produção de novos medicamentos para o tratamento de viroses (HONG et al, 2018; YU et al, 2018).

Há muito interesse em caracterizar e testar as propriedades de polissacarídeos da flora brasileira. Alguns estudos mostram que os encontrados em semente são 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).

3.3.1.1 *Inga* spp

Inga spp (figura 3) (nome derivado do vulgar indígena *angá* = *ingá*, que significa “que tem a semente envolvida”), pertencente à família *Fabaceae* (*Leguminosae*), é uma planta nativa da América Latina Tropical, distribuída por toda Amazônia, América Central e países das Índias Ocidentais, como México, Cuba, Guatemala, Honduras, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia, Chile, Paraguai, Argentina e Brasil (SOUZA et al., 1996; MUHANA, 2003; NICHOLS e CARPENTER, 2006).

No Brasil o *Inga* spp pode ser encontrado na maioria dos estados, com proliferação em terrenos húmidos ou semi-arenosos. Forma uma árvore frondosa de porte elevado, com crescimento rápido, atingindo entre 15 a 20 metros de altura em locais abertos e até 40 metros na floresta. As inflorescências são axilares, algumas vezes terminais; as flores são brancas, atraentes e perfumadas; o fruto é uma vagem comprida, indeiscente, verde e cilíndrica, podendo atingir até 2 metros de comprimento; as sementes são negras, revestidas por uma sarcotesta branca e flocosa, suculenta, adocicada e comestível (FALCÃO e CLEMENT, 2000).

Inga spp é comumente cultivado pela população, pois pode ser utilizado como: árvore de sombra em plantações de café, cupuaçu e cacau; atrativo de insetos; fruto comestível, muito procurado por crianças e animais silvestres; na composição de sucos e essências para sorvete; boa lenha, por causa da sua madeira branca; elevador dos níveis de nitrogênio do

solo; biomassa; adubo verde; e também como componente agroflorestal (ALEGRE et al., 1998; FALCÃO e CLEMENT, 2000; SCHULZ et al., 2014).

Na medicina popular a polpa de *Inga* spp é preparada como xarope contra bronquite e dores de cabeça; a decocção da casca é utilizada para a cura de feridas, aftas, laringites, problemas estomacais, diarreia e antisséptico; o chá das folhas é utilizado para queda de cabelo; e a sua casca é utilizada para o curtume. O fruto é rico em vitamina C, açúcares, proteínas, carotenos, macro e micronutrientes, como potássio, magnésio, cálcio, ferro e zinco, que são essenciais à saúde (DUKE, 1975; PERET, 1985; CORREA e BERNAL, 1995; LISBOA et al., 2002; FALCÃO e CLEMENT, 2000).



Figura 3: fruto do *Inga* spp

Fonte: <https://www.sauvedr.com.br/inga/>

3.3.1.2. *Myrciaria dubia*

Na Amazônia existem inúmeras espécies vegetais com potencial econômico, como é o caso *Myrciaria dubia*, também conhecida como camu-camu, caçari, araçá d'água ou sarão. Essa planta pertence à família *Myrtaceae*, nativa da Amazônia e encontrada principalmente às margens dos rios, lagos e igapós, tanto em águas escuras como claras. O seu hábitat varia desde os solos férteis da várzea do Peru até solos paupérrimos da praia de areia branca do Rio Negro, suportando lugares de enchentes. Também está sendo cultivada de forma experimental, na região do Vale do Ribeira no estado de São Paulo (SILVA, 2018; YUYAMA et al., 2002; YUYAMA, AGUIAR e YUYAMA, 2002; MAEDA et al., 2006).

O camu-camu forma um arbusto lenhoso chegando a 4 metros de altura, representado por um conjunto de caules quase do mesmo calibre que emergem do chão. Os frutos (Figura

4) são globosos, sabor cítrico, bacáceo, de superfície lisa e brilhante, mesocarpo carnoso e esbranquiçado, chegando de 2 a 4 cm de diâmetro, com cor variada, que chega desde o vermelho escuro a púrpuro negro, quando maduros (YUYAMA, AGUIAR e YUYAMA, 2002; MAEDA et al., 2006).

O camu-camu é muito conhecido pelo seu alto teor de vitamina C, que varia de 800 a 6100 mg/100g polpa, que corresponde a 13 vezes do mais que a encontrada no caju, 20 vezes mais do que a encontrada na acerola e 100 vezes mais do que a encontrada no limão. Dessa forma é muito utilizado na indústria alimentícia, como suco, néctar, refrigerante gaseificado, geleia, sorvete, vinhos, bombons e balas. Também é utilizado para outros fins, como cosméticos, fármacos, conservante natural e pequena comercialização em feiras regionais. Esse fruto tem se destacado como corante natural, retirado de sua casca, como as antocianinas, que dá uma coloração rósea avermelhada (YUYAMA, AGUIAR e YUYAMA, 2002 INOUE et al., 2008; NASCIMENTO E CARVALHO, 2012).

Na medicina popular o camu-camu é utilizado como antioxidante, pois possui alto teor de vitamina C, tem ação anti-inflamatória, previne a aterosclerose e proporciona um retardamento no envelhecimento por ser rico em compostos fenólicos (YUYAMA, AGUIAR e YUYAMA, 2002 INOUE et al., 2008; NASCIMENTO E CARVALHO, 2012).

Mori e colaboradores (2013) avaliaram o efeito antimicrobiano do extrato das folhas e cascas de *Myrciaria dubia*, mostrando que nas concentrações 800 mg/mL, 700 mg/mL e 600mg/mL esse extrato foi eficiente para *Staphylococcus aureus* (ATCC6538P), mas não para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) e *Escherichia coli* (ATCC35218).



Figura 4: Fruto do camu-camu

Fonte: Nascimento e Carvalho, 2012.

4 CONCLUSÃO

Os polissacarídeos utilizados nos testes, PDT-S, AO e AOS não apresentaram toxicidade nas concentrações utilizadas nos testes e também mostraram um bom índice de seletividade, indicando que esses compostos poderiam ser utilizados de forma efetiva e com margem de segurança. Os resultados mostram que o AOS teve um melhor efeito antiviral quando comparado com o AO, corroborando dados da literatura que mostram que a sulfatação melhora a atividade biológica, principalmente antiviral dos polissacarídeos.

Esses resultados sugerem que PDT-S e AOS podem ser uma alternativa futura para o tratamento de infecções causadas por HSV-1, principalmente para as infecções resistentes ao aciclovir. PDT-S também se mostrou promissor como uma alternativa terapêutica para infecções causadas por PV.

5 REFERÊNCIAS

ALEGRE, J.C.; WEBER, J.C.; BANDY, D.E. The potential of *Inga* species for improved woody fallows and multi-strata agroforests in the Peruvian Amazon basin. In: PENNINGTON, T.D.; FERNANDES, E.C.M. **The genus *Inga* utilization**. Kew: The Royal Botanical Gardens, 1998.

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

ANDREI, G. e SNOEK, R. Herpes simplex virus drug-resistance: new mutations and insights. **Current Opinion Infectious Diseases**. V.26, p.551-560, 2013.

ARAKAWA, T. et al. Antiviral and virucidal activities of natural products. **Current Medicinal Chemistry**. V.16, p. 2485-2497, 2009.

ARII, J. et al. Entry of herpes simplex virus 1 and other alpha herpesviruses via the paired immunoglobulin-like type 2 receptor α . **Journal of Virology**. V 83, n. 9, p. 4520-4527, 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.

BERNSTEIN, D.I. et al. Epidemiology, clinical presentation, and antibody response to primary infection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in young women. **Clinical Infectious diseases**. N. 56, p. 344-351, 2013.

BIRKMANN, A. e ZIMMERMANN, H. Hsv antivirals- current and future treatment options. **Current Opinion in Virology**. V.18, p.9-13, 2016.

BLACK, F.L. Infectious diseases in primitive societies. **Science**. V.187, p. 515-518, fev., 1975.

BRADLEY, H. et al. Soroprevalence of herpes simplex virus types 1 and 3 – United States, 1999-2010. **The Journal of Infectious Diseases**. N. 209, p.325-333, 2014.

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.

CARVALHO, A.L.; ANCHIETA, L.M.; ROMANELLI, R.M.C. Infecções congênitas por herpes-vírus. **Revista Médica de Minas Gerais**. V. 24, p. 223-232, 2014.

CASSEMIRO, K.M.S.M. et al. Molecular and phenotypic characterization of a highly evolved type 2 vaccine-derived poliovirus isolated from seawater in Brazil, 2014. **Plos One**. V.28, p. 1-18, 2016.

CLEMENS, S. A.C. e FARHAT, C.K. Soroprevalência de anticorpos contra vírus herpes simples 1-2 no Brasil. **Revista de Saúde Pública**. V.44, n.4, p.726-734, 2010.

- CORREA, Q.J.E.; BERNAL, M.H.Y. **Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello**. Bogotá: Convenio Andrés Bello, 1995.
- 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.
- DAI, X. e ZHOU, Z.H. Structure of the herpes simplex virus 1 capsid with associated tegument protein complexes. **Science**. V.360, n.47, p. 1-10, 2018.
- DE CLERCQ, E.; LI, G. Approved Drug over the Past 50 Years. **Clinical Microbiology Reviews**. V.29, p.695-747, 2016.
- DIKIDET, T. et al. Emerging & re-emerging infections in India: an overview. **Indian Journal of Medical Research**. v. 138, p.19-31, 2013.
- DUKE, J.A. Ethnobotanical observations on the CunaIndians. **Economic Botany**.1975.
- 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, 2012.
- FALCÃO, M.G. e CLEMENT, C.R. Fenologia e produtividade do ingá-cipó (*Inga edulis*) na Amazônia central. **Acta Amazônica** . v.30, n.2, p173-180, 2000.
- FERRAZ, L.M. e MARTINS, A.C.S. Atuação do enfermeiro no diagnóstico e no tratamento do herpes genital, na atenção primária à saúde. **Revista APS**. V.17, n.2, p.143-149, 2014.
- FERREIRA, G.E. et al. In vitro anti-HSV-1 activity of chemically sulfated galactomannan from *Leucaenaleucocephala* seeds.**Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. V.31, n.2, p.164-170, 2010.
- FLORES, E. **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Virídicas**. 3ed. UFSM, 2017.
- 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: 1 Agosto. 2018.

GOTTLIEB, S.L. et al. Meeting report: Initial World Health Organization consultation on herpes simplex virus (HSV) vaccine preferred product characteristics, March 2017. **Vaccine**, 2017.

GOULD, S. et al. An evaluation of the prevalence of bovine herpesvirus 1 abortions based on diagnostic submissions to five U.S.- based veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 25, n. 2, p.243-247, 2013.

HAFIDH, R.R. et al. Asia is the mine of natural antiviral products for public health. **The Open Complementary Medicine Journal**. V.1, p.58-68, 2009.

HONG, S.J. et al. Sugar-based gene delivery systems: current knowledge and new perspectives. **Carbohydrate Polymers**. V.181, p. 1180-1193, 2018.

INOUE, T. et al. Tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dúbia*) has anti-oxidative and anti-inflammatory properties. **Journal of cardiology**. V.52, p.127-132, 2008.

JAMES, S.H. e PRICHARD, M.N. Current and future therapies for herpes simplex virus infections: mechanism of action and drug resistance. **Current Opinion in Virology**. V.8, p.54-61, 2014.

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

JOHNSTON, C. e COREY, L. Current concepts for genital herpes simplex virus infection: diagnostics and pathogenesis of genital tract shedding. **Clinical Microbiology Reviews**. V.29, n.1, p. 149-161, 2016.

JOHNSTON, C.; GOTTLIEB, S.L.; WALD, A. Status of vaccine research and development of vaccines for herpes simplex virus. **Vaccine**. V.34, p.2948-2952, 2016.

KARASNEH, G.A. e SHUKLA, D. Herpes simplex virus infects most cell types in vitro: clues to its success. **Virology Journal**. V.8, n. 481, p.1-11, 2011.

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.

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.

LÉVÊQUE, N. e SEMLER, B.L. A 21st century perspective of poliovirus replication. **Plos Pathogens**. V.4, p.1-7, 2015.

LI, W.F. et al. Plant phenolic compounds as potential lead compounds in functional foods for antiviral drug discovery. **Current Organic Chemistry**. V.21, p. 1847-1860, 2017.

LIN, L.T. et al. Antiviral natural products and herbal medicines. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**. V.4, n.1, p.24-35, 2014.

- LISBOA, P.L.B.; GOMES, I.A.G.; LISBOA, R.C.L.; URBINATI, C.V. O estilo amazônico de sobreviver: manejo dos recursos naturais. In: LISBOA, P.L.B. **Natureza, homem e manejo de recursos naturais na região de Caxiuana, Melgaço, Pará**. Belém/PA: Museu Paraense Emílio Goeldi. 2002. 237p.
- MAEDA, R. N. et al. Determinação da formulação e caracterização do néctar de camu-camu (*Myrciaria dúbia*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V.26, p.70-74, 2006.
- MARTINEZ, J.P. et al. Antiviral drug discovery: broad-spectrum drug from nature. **Natural Product Reports**, v.00, p. 1-17, 2013.
- MARTINS, M.L.S.; ARANTES, A.C.S; NICOLAU, R.A. Tratamento de herpes simples tipo 1 com laser de baixa intensidade (λ 660 nm) – relato de caso. **Revista Univap**. V.22, n.41, p. 61-67, 2016.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/poliomielite#situacaoepidemiologica>. Acesso em: 1 de Agosto de 2018.
- MORI, T. et al. Efecto antimicrobiano de *Myrciaria dúbia* (camu-camu) y *Cyperus luzulae* (piri-piri) sobre microorganismos patógenos. **Conocimiento Amazonico**. V.4, p.49-57, 2013.
- MUHANA, A. Brasil: Índia Ocidental. **Revista USP**, São Paulo, 2003, n.57, p. 38-49, 2003.
- MUYLAERT, I. ; TANG, K.W.; ELIAS, P. Replication and Recombination of herpes simplex virus dna. **The Journal Biological Chemistry**, v.286, n.18, p. 15619-15624, 2011.
- NASCIMENTO, W.M.O. e CARVALHO, J.E.U. **A cultura do camu-camu**. 1 ed. Brasília: EMBRAPA, 2012.
- NGUYEN, T.L. et al. In vitro antiviral activity of sulfated *Auricularia auricular* polysaccharides. **Carbohydrates Polymers**.V.90, p.1254-1258, 2012.
- NICHOLS, J. D e CARPENTER, F. L. Interplanting *Inga edulis* yields nitrogen benefits to *Terminalia amazonia*. **Forest Ecology and Management**. N. 233, p. 344-351, 2006.
- PALLANSH, M. ROOS, R. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Never Enteroviruses. In : KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 5ed. V.2, 2007.
- PERET, J.A. **Frutas da Amazônia**. Brasília: Senado Federal, 1985.
- PLAS, H.V.D e HARDIE, D. Herpes simplex virus 1 and 2: a therapeutic approach. **Southern African Journal of Epidemiology and Infection**. V.25, n.3, p.5-9, 2010.
- RECHENCHOSKI, D.Z. et al. Herpesvirus: an underestimated virus. **Folia Microbiologica**. V.62, p.151-156, 2017.
- RECHENCHOSKI, D.Z. et al. Poliomielite- erradicação ou controle? **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. V.14, n.2, p.233-237, 2015.

- RIDDELL, A.; SMITH, A.J.; TONG, C.Y.W. Herpesviruses. **Medicine**. V.45, p.767-771, 2017.
- RODRIGUES, D.J.O. e SILVA, L.L. Bastão Labial composto de aciclovir para o tratamento e prevenção de HSV-1. **Cadernos Escola de Saúde**.v.8, p.157-166, 2012.
- SANTOS, M.P.M. et al. Herpesvírus humano: tipos, manifestações orais e tratamento. **Revista CRO**. v.11, n.3, p.191-196, 2012.
- SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução à VIROLOGIA HUMANA** .3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.
- SCHATZMAYR, H.G. e CABRAL, M.C. **A virologia no estado do Rio de Janeiro uma visão global**. 2 ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2012.
- SCHULZ, D.G. et al. Maturidade fisiológica e morfometria de sementes de *Inga laurina* (SW) wild. **Floresta e Ambiente**. N.08, p. 1-7, 2014.
- SIGAMANI, S.S. et al. The structure of the herpes simplex virus dna packaging terminase pU115 nuclease domain suggests an evolutionary lineage among eukaryotic and prokaryotic viruses. **Journal of Virology**. V.87, n.12, p.7140-7148, 2013.
- SILVA, J.A.A. Estação Experimental de Citricultura do Instituto Agrônomo de Bebedouro. Disponível em: <http://www.estacaoexperimental.com.br/>. Acesso em: 01 de agosto de 2018.
- SON, M. et al. Bioactives activities of natural products against herpesvirus infection. **Journal of Microbiology**. V.51, n.5, p. 545-551, 2013.
- SOUZA, A. et al. **Fruteiras da Amazônia**. Brasília: EMBRAPASPI/ EMBRAPA-CPAA, 1996.
- TODOROV, D. et al. Antiviral potential of Bulgarian medicinal plants. **Phytochemistry Reviews**. V.13, p.525-538, 2014.
- 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.
- UJVARI, S.C. **A história da humanidade contada pelos vírus**. 1ed. São Paulo: Editora Contexto, 2012.
- VAZZOLLER, R.M.S. et al. Tratamento do herpes simples por meio da laserterapia-relato de casos. **Revista Científica do ITPAC**, v.9, n.1., p.1-11, 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>. Acesso em: 31 de Janeiro de 2017.
- YU, Y. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharides from natural resources: A review. **Carbohydrate Polymers**. V.183, p. 91-101, 2018.

YUYAMA, K.; AGUIAR, J.P.L; YUYAMA, L.K.O. Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina c. **Acta Amazônica**. V.32, p.169-174, 2002.

YUYAMA, L.K.O. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e camu-camu (*Myrciaria dúbia*) possuem ação anti anêmica? **Acta Amazônica**. V.32, p.625-633, 2002.

6 ARTIGOS

6.1 ARTIGO I

Highlights

- Polysaccharides are promising as antiviral agents.
- Pectin isolates from *Inga* spp. fruit pulp (PDT-S) were characterized for the first time by spectroscopic techniques as FTIR and HNMR.
- *In vitro*, the activity of PDT-S was evaluated against HSV and PV.
- PDT-S inhibited the early stages of viral replication.

Title: Structural characterization and antiviral activity of pectin isolated from *Inga* spp

Ananda Marques de Godoi^a, Ligia Carla Faccin-Galhardi^a, Daniele Zendrini Rechenchoski^a, Arcelina Pacheco^b, Tathilene Bezerra Mota Gomes Arruda^b, Francisco Eduardo Arruda Rodrigues^b, 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 60440-900, Fortaleza, Ceará, Brazil.

*** Corresponding author:**

Rosa Elisa Carvalho Linhares, E-mail: relin@uel.br

Departamento de Microbiologia, CBB, Universidade Estadual de Londrina, Post office box: 6001, Zip code: 86051-990, Londrina, PR, Brazil, Telephone: +55 43 33714617; fax: +55 43 33715828.

Abstract

Several studies have been conducted on polysaccharides derived from natural sources, and their different biological properties have been reported. Their low toxicity and antiviral effects i.e., their action on several steps of viral replication, have been extensively examined. In this work, pectin isolates from *Inga* spp. fruit pulp were first characterized and evaluated using HEp-2 cells against herpes simplex virus (HSV) and poliovirus (PV). The isolated polysaccharides (denoted as PDT-S) were characterized by FTIR and ¹H NMR spectroscopy. Their cytotoxic and antiviral activities were analyzed by the MTT and plaque reduction assays, respectively. The cytotoxic concentration (CC₅₀) of PDT-S was 870 µg.mL⁻¹ and the inhibitory concentrations (IC₅₀) were 179 µg.mL⁻¹ and 58µg.mL⁻¹, for HSV and PV, respectively. A greater inhibitory effect was observed when the cells were simultaneously treated with PDT-S and the viruses, suggesting that PDT-S inhibited the initial viral replication stages, revealing its antiviral potential.

Key-words: herpesvirus; poliovirus; polysaccharide; natural products; *Inga* spp.

1. Introduction

Incidences of subclinical and serious viral infections have recently increased. This has resulted in a constant threat to public health, necessitating the discovery of new, safe, and effective antivirals (Lin, Hsu, & Lin, 2014; Yu, Shen, Song, & Xie, 2018). Recent studies have shown that natural products are a very rich source of drugs. About 50% of marketed pharmaceuticals are derived from natural products and more than 100 drugs are under clinical development. The advantages of choosing natural products for the development of new antivirals are their chemical diversity, the possibility of active principles acting at different biological targets, and low toxicity. Organic synthesis and genetic engineering techniques have made possible the structural elucidation of natural products (Arakawa et al., 2009; Kurokawa, Shimizu, Watanabe, & Shiraki, 2010; Martinez, Sasse, Bronstrup, Diez, & Meyerhans, 2013).

Polysaccharides are macromolecules composed of single or different types of monosaccharides of natural origin i.e., derived from plants, animals, algae, and microorganisms. Thus, like other macromolecules, polysaccharides exert various biological activities. Their antitumor, antioxidant, anticoagulant, antithrombotic, immunostimulatory, anti-inflammatory, and antiviral activities have been studied. Their low toxicity is an additional incentive for their use in the development of new drugs for the treatment of viral infections (Hong, Ahn, Sangshetti, Choung, & Arote, 2018; Yu, Shen, Song, & Xie, 2018).

The *Herpesviridae* family is divided into three subfamilies. Among these, nine herpes viruses are known to cause disease in humans: herpes simplex 1 and 2, varicella zoster, cytomegalovirus, Epstein–Barr, and human herpes viruses 6A, 6B, 7, and 8 (Riddell, Jeffery-Smith, & Tong, 2017). Herpes viruses are composed of linear double-stranded DNA and have an icosahedral capsid surrounded by the tegument and a lipoprotein envelope. HSV-1 mainly causes oral infections and encephalitis, while HSV-2 causes genital infections. Both share a certain degree of homology between their DNA but are antigenically different. It is estimated that 80% of the population is infected with HSV-1, but only 40% of them have recurrent infections. The transmission of this virus occurs through direct contact with lesions, droplets, or objects contaminated with secretions of the lesions. Additionally, an infection can result in serious complications, mainly in neonates and immunosuppressed individuals, causing keratoconjunctivitis, meningitis, and encephalitis (Hassan, Masarcíková, & Berchova, 2015; Lin, Hsu, & Lin, 2014).

The poliovirus (PV) is composed of single-stranded RNA with positive polarity, surrounded by an icosahedral capsid. It is non-enveloped and belongs to the family *Picornaviridae* and the genus enterovirus. It is known to cause poliomyelitis, a disease that severely affects the nervous system resulting in flaccid paralysis, through the ingestion of contaminated food and water (Jesus, 2007; Rechenchoski et al., 2015). Although this viral infection is controlled in Brazil, it is endemic in Afghanistan and Pakistan, with 22 cases of paralytic poliomyelitis caused by the wild virus and two cases by the vaccine virus in 2017 (GPEI, February 2018). In addition to the epidemiological importance, this virus is widely used for studies of new antivirals serving as a model for other viruses of the same family (Faccin-Galhardi et al., 2012).

Inga ssp is a fruit tree which can be found in Central and South America and this specie has several properties that made it interesting for studies. It belongs to the Leguminosae family and its plantation improves the nitrogen fixation and helps the growth of other vegetal species (Nichols and Carpenter, 2006) beyond the increase of water infiltration when combined with coffee culture (Canavo et al., 2011). The leaves of inga have several activities and are used in folk medicine against inflammations and diarrhea (Pompeu et al., 2012). The leaves are rich in substances such as flavonoids and polyphenols: several studies about the extraction of these compounds, antioxidant activity and biologic activities, such as antifungal, are reported in the literature (Silva et al., 2011; Silva, Rogez and Larondelle, 2007; Johann et al., 2010). About the fruit, isotherm desorption of inga pulp was determined by Arévalo and contributors (Arévalo-Pinedo et al., 2006) and the content of lipids and sugar was compared to other species (Mello et al., 2010). Researches about pectin or galactomannan extraction were not found to the best of our knowledge.

2. Materials and methods

2.1 Pectin extraction of Inga ssp.

Inga fruits were collected in Munlugu, Ceará, Brazil. The inga fruit pulp was separated manually. The material was weighted (172.76 g) and submitted to exhaustive extraction with ammonium oxalate 0.25% solution. The pH of the ammonium oxalate solution was corrected with oxalic acid 0.1% solution. 1L of extractor solution was used and 900mL of distilled water for each 135g of material. The system containing fresh material, extractor solution and distilled water was kept under stirring at 68-70°C for 3 hours. This process was repeated

three times. After this, the solid material was filtered, and the solution was reduced until a quarter of the initial volume in a hot plate. Before the addition of the ethanol, the pH was corrected to 6 with sodium hydroxide solution and temperature of 40°C. A test for confirmation of pectin presence was realized: ethanol was added to a small quantity of the solution and the formation of precipitate was observed (Figure 1). After the test, ethanol was added in proportion of 1:3 solution:ethanol. A precipitate (pectin) was observed and separated manually. The material in suspension was removed by centrifugation at 7500rpm for 10 minutes. Impure pectin was solubilized in distilled water and extracted with ethanol for purification three times. The material was named PDTS.

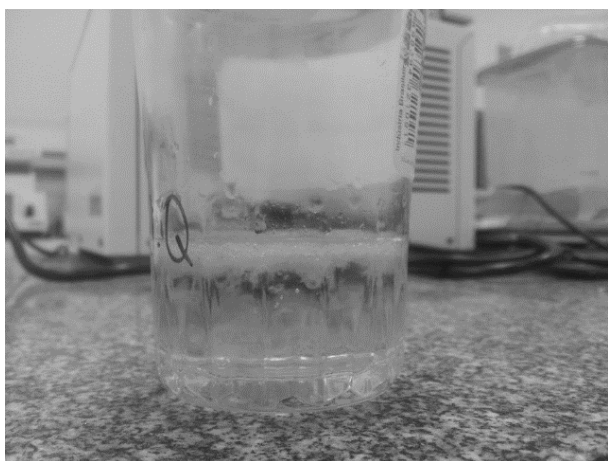


Fig. 1: Test for the presence of pectin in the extractor solution.

2.2 Gel Permeation Chromatography – GPC

Gel permeation chromatogram was obtained in Shimadzu equipment model LC-10AD coupled to index refraction detector model RID-10A at 40°C. The following was utilized, a column Ultra hydrogel linear 7.8m x 300mm, solution of NaNO₃ as liquid phase (0.1 mol. L⁻¹). Analysis conditions were: injection flow of 0.5 mL.min⁻¹, volume sample of 20 µL and temperature room. It was used pululans were used as standard.

2.3 Infrared with Fourier Transformed – IRFT

Infrared with Fourier transformed spectrum was obtained in Perkin Elmer equipment model Espectrum 1000. KBr pastilles were prepared and the spectrum was expressed by

relation between transmittance (%) and number wave. The number wave range was 4000 to 400 cm^{-1} .

2.4 Cells and Virus

Culture of HEp-2 cells (human laryngeal carcinoma cells, ATCC CCL-23) grown in Dulbecco's modified Eagle's (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco BRL), 100 UI.mL^{-1} penicillin (Novafarma), 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ streptomycin (Gibco BRL) and 2.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ amphotericin B (Meizler Biopharma).

Herpesvirus type 1 (HSV-1), clinical isolate sample, was provided by Departamento de Virologia do IMPPG / UFRJ, RJ, and poliovirus vaccine strain (PV). The viral stocks were titted by plaque assay and maintained at -20°C with glycerol.

2.5 Cytotoxicity assay

Cells were grown in 96-well plates until monolayer formation. PDT-S was added to cell cultures at different concentrations (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 62.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 31.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) for 72 hours at 37°C and cytotoxicity was evaluated by MTT method (3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl) -2,5- diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Chem. Co.). The 50% Cytotoxic concentration (CC_{50}) was determined as the concentration capable of reducing optical density of MTT product by 50% relative to cell control, by linear regression (Espada et al., 2015).

2.6 Antiviral activity of PDT-S

2.6.1 Plaque Reduction Assay (PRA)

The antiviral activity of PDT-S was determined by Plaque Reduction Assay (PRA) according Melo et al., 2008. The cells were plated (24 wells), infected with virus and treated with varying concentrations of compound (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for HSV-1 and 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 12.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for PV) using treatment protocols described below. DMEM, plus agarose, was added to cells, followed by incubation at 37°C for 40 hours. Subsequently cells were fixed and strained for counting of plaque forming units (PFU). The percentage of viral inhibition (% VI) was calculated as: % VI = [1- (PFU infected and treated cells / PFU viral control)] x 100. IC_{50} was determined as concentration the substance capable of inhibiting number of PFU in 50%, by linear regression. The Selective Index (SI) was expressed as the ratio of CC_{50} / IC_{50} .

2.6.1.1 Pretreatment, simultaneous treatment and post treatment

PDT-S was added to cell culture, at various concentrations, before viral infections (-2h and -1h), during (0h) and after viral infection (+1h and +2h), followed by PRA (Cavicchioli et al., 2018).

2.6.1.2 Virucidal assay

To evaluate the effect of compound directly on virus particles, virus solutions containing approximately 40 PFU were incubated at different concentration of PDT-S at 37°C for 1 hour, and then inoculated and incubated for another 1h at 37°C, and then PRA was performed (Rincão et al., 2012).

2.6.1.3 Inhibition of adsorption assay

The cells were preincubated at 4°C for 30 minutes, then infected and subjected to different concentrations of PDT-S and incubated for more 1 hour at 4°C, washes with ice-cold PBS, for removal of non-adsorbed particles, followed by PRA (Minari et al., 2011).

2.6.1.4 Inhibition of penetration assay

Cells were first incubated at 4°C for 30 minutes, then inoculated with HSV-1 and maintained for more 90 minutes at 4°C. PDT-S was added to cells at different concentrations (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) under incubation at 37°C for 10 minutes, followed by washing with PBS (pH 3) for 1 minute, with subsequent neutralization with PBS (pH 11) then performed PRA (Lopes et al., 2017).

2.6.2 Immunofluorescence assay (IF)

The immunofluorescence assay was performed according to Faccin et al. (2007). HEp-2 cells were grown in 24 well plates containing coverslips until confluence 70%, then infected with HSV-1 or PV and treated with PDT-S at concentrations tested in plaque reduction assay (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for HSV-1 and 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to 12.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for PV) in time 0 hour of infection (0h), maintaining controls of untreated and uninfected cells (CC), infected and untreated cells (CV). After 24 hours of infection the cells were washed with PBS containing 0.05% Tween 20, fixed with ice-cold acetone (-20°C) for 20 minutes and blocked with 2% skimmed milk powder diluted in PBS for 30 minutes. The cells were incubated for 30 minutes at 37°C with mouse anti-HSV-1 (Santa Cruz Biotechnol., USA) or rabbit anti-PV

(INCQS, BR) followed by three washings with 0.05% Tween 20 PBS and incubated with goat anti-mouse IgG (HSV-1) or sheep anti-rabbit IgG (PV) FITC conjugate (Sigma Chem. Co., USA). Cells were observed in fluorescence microscope (Zeiss axio Imager. A1), 100 cells counted per field and percent inhibition of fluorescent cells was calculated.

2.6.3 Polymerase chain reaction (PCR) and Reverse Transcription Polymerase Chain reaction (RT-PCR)

The effect of PDT-S on HSV-1 DNA synthesis was performed as described in Lopes et al. (2013). Viral DNA was extracted from infected cells (2×10^6 cells), treated with various concentrations of PDT-S ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ to $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) using commercial kit (QIAamp® DNA Mini and Blood Mini). Viral DNA infected and untreated cells and uninfected and untreated cells were extracted as controls. The primer pair used for ICP4 was ICP4F (5'GGCGGGAAGTTGTGGACTGG3') and ICP4R (5'CAGGTTGTTGCCGTTTATTGCG3'). The reaction was performed with final volume of 25 μL containing 20 mM Tris-HCl (pH8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM dNTP, 2 pmol of each primer (*Invitrogen, Life Technologies, UK), 2.5 U of Taq DNA- polymerase (*) and 5 μL of extracted DNA. The program consisted of denaturation at 94°C for 4 minutes and 40 cycle of denaturation at 94°C for 1 minute, annealing at 60°C for 1 minute, and polymerization at 72°C for 1 minute, followed by final extension of 7 minutes at 72°C . Ten microliters of the PCR products were resolved on 12% polyacrylamide gel. The expected size for ICP4 is 138 p.

RT-PCR was performed according to Lopes et al. (2013). RNAs from cells infected with PV and treated with various concentrations of PDT-S ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ to $12.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) were extracted by commercial kit (QIAamp® RNA Mini Kit). RNAs infected and untreated cells, and uninfected and untreated cells were used as controls. Reverse transcription was performed with volume of 20 μL . Mix 1 of first reaction consisted of 5 pmol of random primers, 1 mM of dNTP and 7 μL of Rnase free water. This mix was added 5 μL of each extracted RNA and incubated for 5 minute at 65°C . For the second reaction, Mix 2 was prepared with 1xM-MLV reaction buffer, 0.01M of DTT, 100 U M-MLV reverse transcriptase and 8 μL Rnase free water. Eight microliters of Mix 2 was added from each sample and incubated for 10 minutes at 25°C , 50 minutes at 37°C and 15 minutes at 70°C . The PCR reaction was performed with final volume of 25 μL , consisted of 0.4mM of dNTP, 2 pmol of each primer, 2.5 U of Taq DNA polymerase, PCR buffer and cDNA. The primer pair used for PV was from capsid gene (VP1- VP4), with sense tape

5'AGTTTCACCGAAGGCGGA3' and antisense tape 5'CGCTGACACAAAACCAAGGA3', with a 102 bp amplified product. PCR was programmed with denaturation at 95°C for 10 minutes, 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 second, annealing at 60°C for 1 minute, polymerization at 72°C for 1 minute and final extension of 7 minutes at 72° C. Ten microliters of the PCR product were loaded onto 12% polyacrylamide gel.

3. Results

3.1 Values of ponderal molecular weight (Mw), numeric molecular weight (Mn) and polidispersivity (Mw/Mn) obtained by gel permeation chromatography analysis for the pectin sample of Inga ssp were described in Table. The Ponderal molecular weight found was similar to that reported for other pectin samples such as passion fruit and watermelon (Petkowicz, 2017; Yapo and Koffi, 2006). The polidispersivity values were low in comparison with pectin samples reported in literature (Yang et al., 2018; Fissore et al. 2013). This fact can be explained by possible material depolymerization which contributes to homogenization and resultant reduction of the polidispersivity.

Table 1- Values of Ponderal Molecular Weight (Mw), Numeric Ponderal Weight (Mn) and Polidispersivity (Mw/Mn) for PDT-S

	Mn (g.mol ⁻¹)	Mw (g.mol ⁻¹)	Mw/Mn
PDT-S	36014	55875	1.55

Infrared spectrum (Figure 2) was compatible with depolymerized pectin: bands at 1601 cm⁻¹ and 1473 cm⁻¹ express the state of carboxylic groups and correspond to the stretching vibration of carboxylated anion (Kpodo et al., 2017; Pereira et al., 2016). Due to this suppression of esterified group band around 1740 cm⁻¹ was observed. This suppression can be corroborated with signals between 920 and 820 cm⁻¹ which are characteristic of α and $\beta(1\rightarrow4)$ of galacturonic depolymerized chains. Strong signal between 2800 and 3500 cm⁻¹ are correlated to intra and intermolecular hydrogen bond H-O- of galacturonic acid chain (Kpodo et al., 2017). Bands at 1428 cm⁻¹ and 1310 cm⁻¹ were assigned to stretching of CH₂ and OH, respectively. Fingerprint region is comprised around 1200 and 900 cm⁻¹. This region is unique for a compound and its interpretation is difficult (Hosseini et al., 2016; Fissore et al.,

2013). Bands in 1008, 1070 and 1141 cm^{-1} correspond to glycosidic bonds and pyranosid rings (Kpodo et al., 2017).

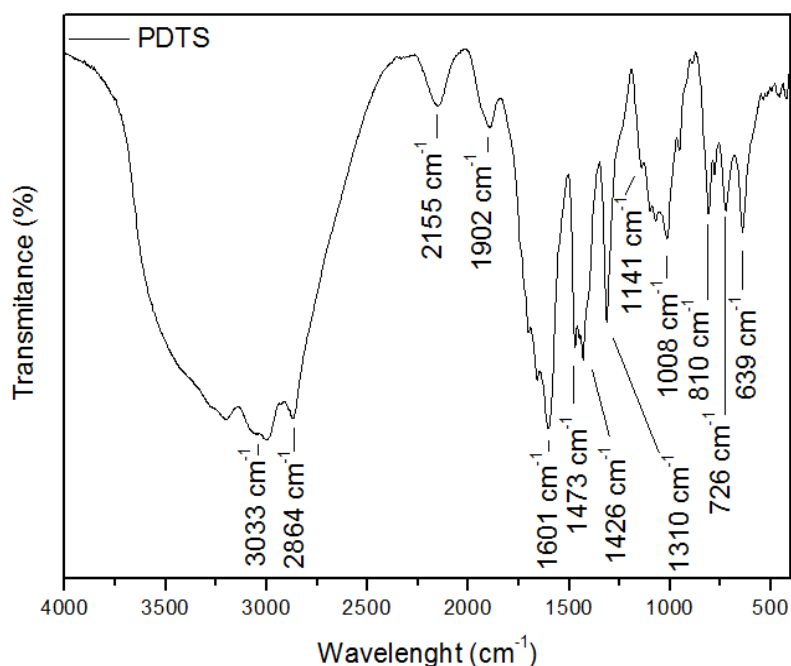


Figure 2 - Infrared of pectin sample of *Inga* ssp.

3.2 Cytotoxicity assay

The polysaccharides (PDT-S) isolated from the fruit of *Inga* spp exhibited a cytotoxic concentration (CC_{50}) of $870 \mu\text{g.mL}^{-1}$ in HEp-2 cells as shown by the MTT test. Therefore, the concentrations used for the plaque reduction assay ranged from $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ to $12.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.3 Antiviral activity of PDT-S

3.3.1 Antiherpetic activity

Fig. 4 shows the percentage of HSV-1 inhibition by PDT-S in the prophylactic test (before 1 and 2 h), the simultaneous treatment (0 h), therapeutic (after 1 and 2 h), virucidal, inhibition of adsorption, and the inhibition of penetration. An inhibitory concentration (IC_{50}) of $179 \mu\text{g.mL}^{-1}$ was observed, with a selectivity index of 4.86. The best antiviral effect was observed in the plaque reduction assay at time 0 h of infection, with inhibition of 94.7% at the highest concentration tested and 25.4% at the lowest. PDT-S inhibited the penetration of HSV-1 by 44.8% at the highest concentration tested.

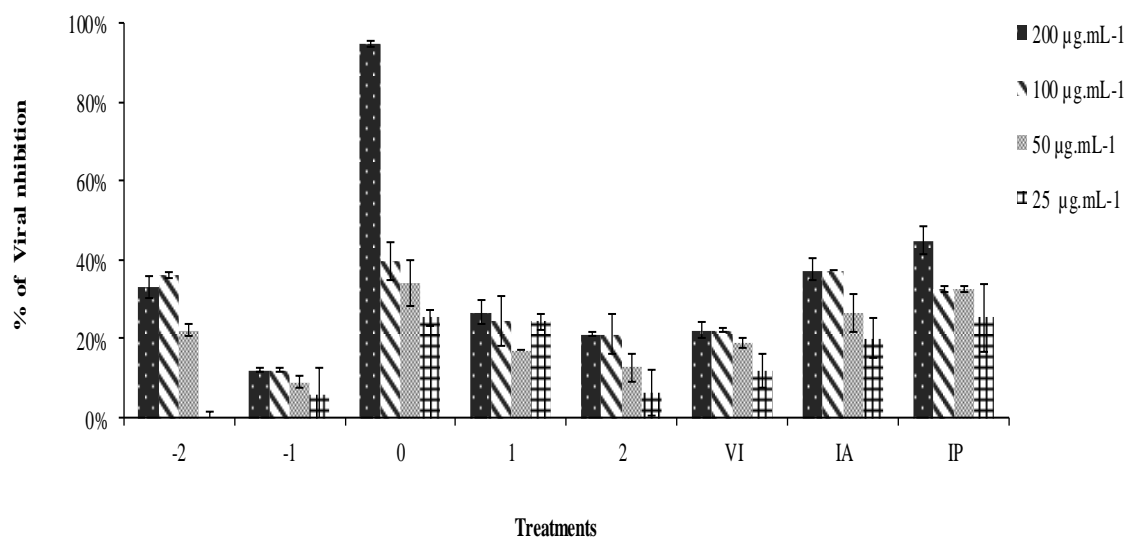


Fig. 4: Antiviral activity of PDT-S for HSV-1 in HEp-2 cells, evaluated by plaque reduction assay, at different concentration ($25 - 200 \mu\text{g.mL}^{-1}$), under the protocols: pretreatment (-1 and -2 h), simultaneous (0h), post treatment (1 and 2 h), virucidal (VI), inhibition of adsorption (IA) and inhibition of penetration (IP). The percentage of viral inhibition was determined in comparison to controls and the results are expressed as mean \pm SD of triplicate independent experiments.

3.3.2 Anti-poliovirus activity

PDT-S, when tested against PV, showed an IC_{50} of $58 \mu\text{g.mL}^{-1}$, with a selectivity index of 15. Fig. 5 shows the percentage of viral inhibition in the prophylactic test, simultaneous treatment, therapeutic, virucidal and inhibition of adsorption. The highest percentage (75.7%) of viral inhibition was found when the cells were treated with PDT-S at 0 h of infection at the highest concentration ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). At the highest concentration used ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), the inhibition of adsorption was 59.4% and the inhibition was 46.9% for treatment after 1 h of infection.

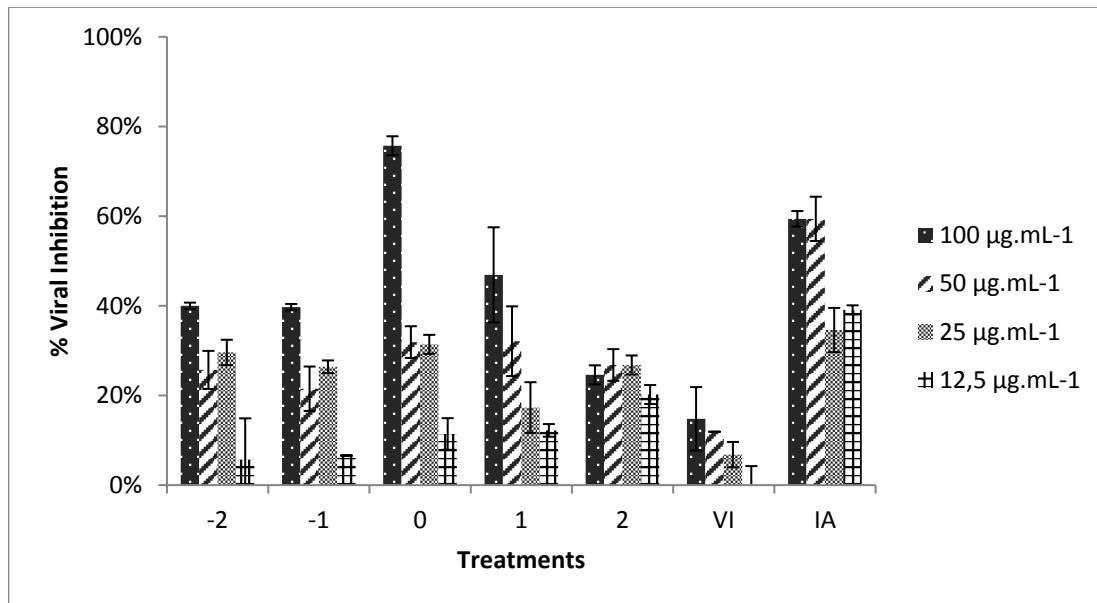


Fig. 5: Antiviral activity of PDT-S for PV in HEp-2 cells, evaluated by plaque reduction assay, at different concentration (12.5 - 100 µg.mL⁻¹), under the protocols: pretreatment (-1 and -2 h), simultaneous (0h), post treatment (1 and 2 h), virucidal (VI) and inhibition of adsorption (IA). The percentage of viral inhibition was determined in comparison to controls and the results are expressed as mean \pm SD of triplicate independent experiments.

3.3.3 Indirect Immunofluorescence (IF)

PDT-S was able to inhibit the protein synthesis of HSV-1 and PV in a dose-dependent manner, with %IV of 98% and 85.71%, respectively, at the highest concentration tested (Table 2).

Table 2: Antiviral activity of pectin isolated from *Inga* spp. (PDT-S) against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and poliovirus (PV) replication, in HEp-2 cells, by indirect immunofluorescence assay. The percentage of viral inhibition was calculated with respect to untreated infected cells.

PDT-S ($\mu\text{g/mL}$)	HSV-1		PV	
	Fluorescent cells	% viral inhibition	Fluorescent cells	% viral inhibition
0	58.0	-	99.0	-
12.5	-	-	60.0	25.00
25	58.0	8.61	66.84	26.00
50	27.0	39.35	36.36	63.75
100	24.0	44.29	13.68	85.71
200	2.0	98.00	-	-

3.3.4 PCR and RT-PCR

PDT-S treatment of HSV-1-infected cells resulted in the inhibition of viral DNA synthesis only at concentrations of $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 6A). In RT-PCR for PV, the presence of bands was observed at all the concentrations used in the tests, suggesting that PDT-S was not able to inhibit the viral nucleic acid (Fig. 6B).

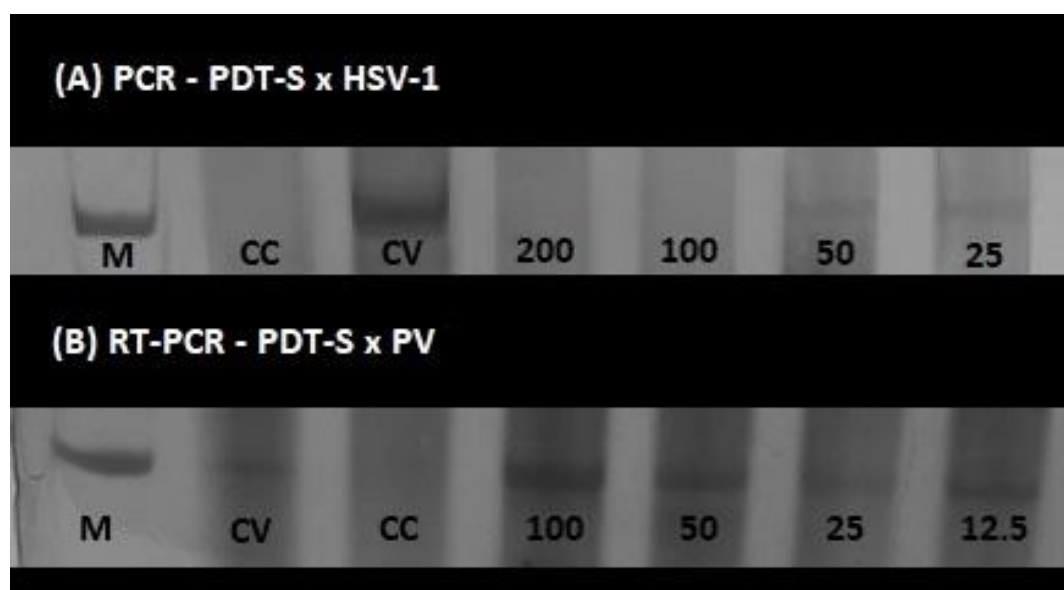


Fig. 6: The inhibition of pectin (PDT-S) isolated from *Inga* spp. In the synthesis of HSV-1 (A) and PV (B) nucleic acids, at the indicated concentrations ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR amplicon for HSV-1 *ICP4* (138 bp) and RT-PCR amplicon for PV *VPI-VP4* (102 bp). MW std. (M) and controls for virus (CV) and cell (CC).

4. Discussion

Several studies on natural products have reported the inhibitory effects of polysaccharides against several viruses. These products have low cytotoxicity and act on the different stages of viral replication. Additionally, they are known to stimulate the immune system of the organism to eliminate the pathogen (Damonte, Matulewicz, & Cerezo, 2004; Wang, Ruan, Gu, & Zhu, 2018). In the present study, we found that PDT-S exhibited a better inhibitory effect at time 0 h (i.e. simultaneous treatment) against both the viruses tested, suggesting that this PDT-S acts on the initial stages of replication. Lopes et al. (2013) evaluated the effect of a sulfated polysaccharide isolated from *Caesalpinia ferrea* on the replication of HSV-1 and PV. They observed better effects on the initial stages of replication for both viruses.

For HSV-1, significant results in the assays of inhibition of adsorption and penetration were also observed. Pre- and post-treatment of the cells with PDT-S resulted in a lower percentage of viral inhibition. These results corroborate those found by Dong, Hayashi, Mizukoshi, Lee, & Hayashi (2012) who evaluated the effects of a polysaccharide obtained from *Basella rubra* against HSV-2. Jin et al. (2015) evaluated the activity of the polysaccharides of *Eucheima gelatinae* against HSV-1, also demonstrating greater inhibition at 0 h and inhibition of adsorption.

Yamamoto et al. (2013) demonstrated that the natural polysaccharides isolated from *Agaricus brasiliensis* with an IC_{50} of $454 \mu\text{g.mL}^{-1}$ showed a strong anti-herpetic activity at the initial stages of infection (at 0 and 1 h) but at concentrations above $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ Godoi et al. (2015) also evaluated the anti-HSV-1 activity of a natural polysaccharide obtained from *Adenantha pavonina* and reported an IC_{50} of $744 \mu\text{g.mL}^{-1}$. This value decreased to $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ when the polysaccharide was sulfated.

A marked inhibition of PV replication by PDT-S was observed at 0 h after infection and in the viral inhibition of adsorption test, also suggesting inhibition at the early stages of viral replication. This fact could also be verified by the reduction of fluorescent cells in the IF. The observation of bands on the RT-PCR gel demonstrated that pectin was not able to inhibit the cDNA synthesis. These results were unlike those observed for the polysaccharides from *Caesalpinia ferrea* that exhibited a dose-dependent inhibition of viral RNA synthesis at higher concentrations (Lopes et al., 2013). Grassauer, Weinmuellner, Meier, Pretsch, & Prieschl-Grassauer (2008) reported the activity of a sulfated polysaccharide isolated from red algae against the human rhinovirus *Picornavirus* and found that replication was inhibited at

the stage of virus binding or entry into the cell, probably by blocking the virus or preventing the conformational changes necessary for the virus to bind to the cell membrane.

The results obtained with PDT-S when compared to those obtained with sulfated polysaccharides reinforce the fact that the degree of sulfation, molecular weight, and sugar composition may influence the antiviral activity of polysaccharides obtained from different sources (Harden, Falshwa, Carnachan, Kern, & Prichard, 2009).

The fact that PDT-S acts on the early stages of viral replication suggests an interaction with positively-charged amino acids of the herpes virus glycoprotein-binding site and the negatively-charged sulfated/carboxyl group of the heparin-sulfate chains of the cell membrane (Dong, Hayashi, Mizukoshi, Lee, & Hayashi, 2012). Although the mechanism has not yet been clarified, polysaccharides also act on non-enveloped viruses. To the best of our knowledge, this is the first report of the antiviral effects of pectin isolated from the fruit of *Inga* spp.

In conclusion, our results suggest that PDT-S is a promising antiviral compound.

Acknowledgements

The authors wish to thank to CNPq and Fundação Araucária for financial aid.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)- Finance code 001

References

Arakawa, T., Yamasaki, H., Ikeda, K., Ejima, D., Naito, T., Koyama, A.H. (2009). Antiviral and virucidal activities of natural products. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 2485-2497. <https://doi.org/10.2174/092986709788682065>.

Arévalo-Pinedo, A., Dos Santos, F. L., Arévalo, Z. D. S., Zuniga, A. D. G., Pinedo, R. A. (2006). Desorption isotherms for murici (*Byrsonimasericea*) and ingá (*Inga edulis*) pulps. *Journal of Food Engineering*, 76, 611-615. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.06.011>.

Canavo, P., Sansoulet, J., Harmand, J. M., Siles, P., Dreyer, E., Vaast, P. (2011). Agroforestry associating coffee and *Inga densiflora* results in complementarity for water uptake and decreases deep drainage in Costa Rica. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 140, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2010.11.005>.

Cavicchioli, V.Q., Carvalho, O.V., Paiva, J.C., Todorov, S.D., Silva Júnior, A., Nero, L.A. (2018). Inhibition of herpes simplex vírus 1 (HSV-1) and poliovirus (PV-1) by bacteriocins from lactococcus lactis subsp. Lactis and enterococcus durans strains isolated from goat milk. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 51, 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.04.020>.

Damonte, E.B., Matulewicz, M.C., Cerezo, A.S. (2004). Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Current Medicinal Chemistry*, 11, 2399-2419. <https://doi.org/10.2174/0929867043364504>.

Dong, C.X., Hayashi, K., Mizukoshi, Y., Lee, J.B, Hayashi, T. (2012). Structures and anti-HSV-2 activities of neutral polysaccharides from an edible plant, *Basella rubra* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 245– 249. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.10.022>.

Espada, S.F., Faccin-Galhardi, L.C., Rincão, V.P., Bernardi, A.L.S, Lopes, N., Longhini, R., Mello, J.C.P., Linhares, R.E.C, Nozawa, C. (2015). Antiviral Activity of *Trichilia catiguá* bark extracts for herpesvirus and poliovirus. *Current Phamaceutical Biotechnology*, 16, 724-732. <https://doi.org/10.2174/1389201016666150505125235>.

Faccin, L.C., Benati, F., Rincao, 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 a isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. *Journal of Applied Microbiology*, *45*, 24-28. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02153.x>.

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 Ethnopharmacology*, *142*, 86-90. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.04.018>.

Fissore, E. N., Rojas, A. M., Gerschenson, L. N., Williams, P. A. (2013). Butternut and beetroot pectins: characterization and functional properties. *Food Hydrocolloids*, *31*, 172-182. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.10.012>.

GLOBAL POLIO ERRADICATION INITIATIVE (GPEI). (2018). Available in: <http://www.polioeradication.org/>. Access in: February 14, 2018.

Godoi, A.M., Faccin-Galhardi, L.C., Lopes, N., Nozawa, C., Almeida, R.R., Ricardo, N.M.P.S., Linhares, R.E.C. (2015). Characterization and antiherpetic activity of native and chemically sulfated polysaccharide from *Adenanthera pavonina*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *16*, 1024-1031. <https://doi.org/10.2174/1389201016666150731111013>.

Grassauer, A., Weinmuellner, R., Meier, Ch., Pretsch, A., Prieschl-Grassauer, E. (2008). Unger H. Iota-carrageenan is a potent inhibitor of rhinovirus infection. *Virology Journal*, *5*, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-107>.

Grassino, A. N., Brncic, M., Vikic-Topik, D., Roca, S., Dent, M., Brncic, S. R. (2016). Ultrasound assisted extraction and characterization of pectin from tomato waste. *Food Chemistry*, *198*, 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.095>.

- Hassan, S.T.S., Masarcíková, R., Berchova, K. (2015). Bioactive natural products with anti-herpes simplex virus properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67, 1325-1336. <https://doi.org/10.1111/jphp.12436>.
- Harden, E.A., Falshaw, R., Carnachan, S.M., Kern, E.R., Prichard, M.N. (2009). Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. *Antiviral Research*, 83(3), 282-289. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.06.007.
- Hong, S.L.; Ahn, M.H.; Sangshetti, J.; Choung, P.H.; Arote, R.B. (2018). Sugar-based gene delivery systems: Current knowledge and new perspectives. *Carbohydrate Polymers*, 181, 1180-1193. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.105>.
- Hosseini, S. S., Khodaiyan, F., Yarmand, M. S. (2016). Aqueous extraction of pectin from sour Orange peel sand its preliminary physicochemical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 920-926. 10.1016/j.ijbiomac.2015.11.007.
- Jesus, N.H. (2007). Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis. *Virology Journal*, 4, 1-18. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-70>
- Jin, F., Zhuo, C., He, Z., Wang, H., Liu, W., Zhang, R., Wang, Y. (2015). Anti-herpes simplex virus activity of polysaccharides from *Eucheuma gelatinae*. *World Journal Microbiology and biotechnology*, 31, 453-460. doi: 10.1007/s11274-015-1798-1.
- Johann, S., Cisalpino, P. S., Watanabe, G. A., Cota, B. B., de Siqueira, E. P., Pizzolatti, M. G., Zani, C. L., de Resende, M. A. (2010). Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Pharmaceutical Biology*, 48, 388-396. doi: 10.3109/13880200903150385.
- Kpodo, F. M., Agbenorhevi, J. K., Alba, K., Bingham, R. J., Oduro, I. N., Morris, G. A., Kontogiorgos, V. (2017). Pectin isolation and characterization from six okra genotypes. *Food Hydrocolloids*, 72, 323-330. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.014>.

Kurokawa, M., Shimizu, T., Watanabe, W., Shiraki, K. (2010). Development of new antiviral agents from natural products. *The open Antimicrobial Agents Journal*, 2, 49-57. Doi:10.2174/18765181010020200049.

Lin, L.T., Hsu, W.C., Lin, C.C. (2014). Antiviral natural products and herbal medicines. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 4, 24-35. doi: 10.4103/2225-4110.124335.

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 férrea* inhibits herpes simplex vírus and poliovirus. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 93-99. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.05.015.

Lopes, N., Ray, S., Espada, S.F., Bomfim, W.A., Ray, B., Faccin-Galhardi, L.C., Linhares, R.E.C, Nozawa, C. (2017). Green seaweed *Enteromorpha compressa* (Chlorophyta, Ulvaceae) derived sulphated polysaccharides inhibits herpes simplex virus. *International Journal Biological Macromolecules*, 102, 605-612. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.043.

Martinez, J.P., Sasse, F., Bronstrup, M., Diez, J., Meyerhans, A. (2013). Antiviral drug discovery: broad-spectrum drug from nature. *Natural Product Reports*, 32(1), 29-48. doi: 10.1039/c4np00085d.

Minari, M.C., Rincao, 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. doi:10.4149/av_2011_03_255.

Melo, F.L., Benati, F.J., Roman-Junior, W.A., Mello, J.C.P., Nozawa, C., Linhares, R.E.C. (2008). The in vitro antiviral activity of on aliphatic nitrocompound from *Heteropteris aphrodisiac*. *Microbiological Research*, 163, 136-139. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.03.011>.

Mello, J. I. O.; Barbedo, C. J., Salatino, A., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L. (2010). Reserve carbohydrates and lipids from the seeds of four tropical tree species with different sensivity to

desiccation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 889-899.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132010000400019>.

Nichols, J. D & Carpenter, F. L. (2006). Interplanting *Inga edulis* yields nitrogen benefits to *Terminalia amazonia*. *Forest Ecology and Management*. 233, 344-351. doi:0.1016/j.foreco.2006.05.031.

Pereira, P. H. F., Oliveira, T. I. S., Rosa, M. S., Cavalcante, F. L., Moates, G. K., Wellner, N., Waldron, K. W., Azeredo, H. M. C. (2016). Pectin extraction from pomegranate peels with citric acid. *International Journal of Biological Macromolecules*. 88, 373-379. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.03.074.

Petkowicz, C. L. O., Vriesmann, L. C., Williams, P. A. (2017). Pectins from food waste: extraction, characterization and properties of watermelon rind pectin. *Food Hydrocolloids*, 65, 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.040>.

Pompeu, D. R., Rogez, H., Monteiro, K. M., Tinti, S.V., Carvalho, J. E. (2012). Capacidade antioxidante e triagem farmacológica de extrato bruto de folhas de *Byrsonimacassifoliae* de *Ingaedulis*. *Acta Amazônica*, 42, 165-172. <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672012000100019>.

Rechenchoski, D.Z., Godoi, A.M., Botura, T.J., Faccin-Galhardi, L.C., Nozawa, C., Linhares, R.E.C. (2015). Poliomielite-erradicação ou controle? *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 2, 233-237. DOI: <http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v14i2.13413>.

Riddell, A., Jeffery-Smith, A., Tong, C.Y.W. (2017). Herpesviruses. *Medicine*, 45, 767-771. <https://doi.org/10.1016/j.mppmed.2017.09.006>

Rincão, V.P., Yamamoto, K.A., Ricardo, N.M.P.S, Soares, S.A., Meirelles, L.P.D., Nozawa, C., Linhares, R.E.C. (2012). Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. *Virology Journal*, 9, 1-6. doi: 10.1186/1743-422X-9-37.

Silva, E. M., Rogez, H., Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics compounds from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55, 381-387. DOI: 10.1016/j.seppur.2007.01.008.

Silva, E. M., Da Silva, J. S., Pena, R. S., Rogez, H. (2011). A combined approach to optimize the drying process of flavonoid-rich leaves (*Inga edulis*) using experimental desing and mathematical modelling. *Food and Bioproducts Processing*, 89, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.03.004>.

Wang, C., Ruan, S., Gu, X., Zhu, B. (2018). Antiviral activities of *Radix Isatidis* polysaccharides against type II herpes simplex virus *in vitro*. *Food Science and Technology*, 1-4. DDOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.19317>.

Yamamoto, K.A., Galhardi, L.C.F., Rincao, V.P., Soares, S.A., Vieira, I.G.P., Ricardo, N.M.P.S., Nozawa, C., Linhares, R.E.C. (2013). Antiherpetic activity of on *Agaricus brasiliensis* polysaccharides, its sulfated derivate and fractions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 52, 9-13. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.09.029.

Yang, J., Mu, T., Ma, M. (2018). Extraction, structure and emulsifying properties of pectin from potato pulp. *Food Chemistry*, 244, 197-205. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.059>.

Yapo, B. M., Koffi, K. L. (2006). Yellow passion fruit rind – a potential source of low-methoxyl pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2738-2744. doi: 10.1021/jf052605q.

Yu, Y., Shen, M., Song, Q., Xie, J. (2018). Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharides from natural resources: A review. *Carbohydrates Polymers*, 183, 91-101. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.12.009.

6.2 ARTIGO II

Título: Atividade anti-herpética de polissacarídeos isolados de *Myrciaria dubia*.

Autores: Ananda Marques de Godoi^a, Lígia Carla Faccin-Galhardi^a, Arcelina Pacheco^b, 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, Brasil.

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

* Autor Correspondente: Tel.: +55 43 33714617, e-mail: relin@uel.br

RESUMO:

As infecções causadas por herpes simplex (HSV) são altamente contagiosas e endêmicas em todo o mundo. O HSV-1 é um vírus de DNA de fita dupla linear, com capsídeo icosaédrico e envelope glicoproteico, causa infecções principalmente na mucosa oral, com o estabelecimento de latência, que dificulta o tratamento ou elaboração de uma vacina. As drogas mais utilizadas para o tratamento de herpes são o aciclovir e seus derivados, porém o uso frequente destes fez com que surgissem cepas resistentes. Isso incentiva a procura de produtos naturais com ação antiviral, que tem como vantagem a baixa toxicidade e mecanismo de ação em várias etapas da replicação. A *Myrciaria dubia*, uma planta típica da Amazônia, popularmente conhecida como camu-camu, possui frutos ricos em vitamina C. O presente trabalho avaliou o efeito antiviral dos polissacarídeos *in natura* (AO) e sulfatado (AOS) de *Myrciaria dubia*, em células Vero, para as cepas KOS e AR-29 de HSV-1. 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, imunofluorescência e PCR. O valor de CC₅₀ foi > 500 µg/mL e 386 µg/mL para AO e AOS, respectivamente, mostrando baixa toxicidade. O AOS apresentou um melhor efeito de inibição no tempo 0 hora de infecção para ambas as cepas de HSV-1, sem diferenças significativas para as cepas utilizadas. Também foi analisado que o efeito antiviral está relacionado às fases iniciais da infecção, confirmado pelo teste de imunofluorescência. Em conclusão, nossos resultados sugerem que AOS é um composto com atividade antiviral promissora, sugerindo a sua utilização para o desenvolvimento de novos medicamentos antivirais.

PALAVRAS-CHAVE: Herpes, polissacarídeos, *Myrciaria dubia*, camu-camu, atividade antiviral.

1 INTRODUÇÃO

As infecções causadas por herpes simplex (HSV) são altamente contagiosas e endêmicas em todo mundo, com soro prevalência em 90% dos adultos, isso representa uma ameaça constante para população e um desafio para saúde pública. O HSV-1 é um vírus de DNA fita dupla linear, com capsídeo icosaédrico e envelope glicoproteico. Pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, geralmente é contraído na infância ou adolescência, por contato direto por via oral e está associado a infecções na região dos lábios, boca, intra-oral, nariz e olhos (CLEMENS e FARHAT, 2010; SON et al., 2013; JOHNSTON e COREY, 2016).

Uma das características marcantes da infecção por HSV-1 é o estabelecimento da latência. Após a replicação primária na mucosa oral ou genital, os vírus se deslocam dos axônios para o neurônio do gânglio sensorial, permanecendo inativos, sem se dividirem, com ausência de sinais clínicos e expressando somente genes relacionados a latência (LAT's). Essa característica dificulta o tratamento ou a elaboração de uma vacina (MUYLAERT, TANG e ELIAS, 2011; GOULD et al., 2013; GRINDE, 2013).

Ainda não existe um quimioterápico capaz de curar a infecção herpética. As drogas anti-herpéticas utilizadas reduzem os sintomas e diminuem o tempo de manifestação clínica, como os análogos de nucleosídicos, aciclovir e seus derivados (penciclovir, valaciclovir, famciclovir), o seu mecanismo de ação é baseado na sua fosforilação pela timidina quinase viral, convertendo-se em monofosfato de aciclovir, posteriormente em difosfato e trifosfato de aciclovir, pelas enzimas celulares (JAMES e PRICHARD, 2014; JIANG et al., 2016)

O trifosfato de aciclovir se liga ao DNA, competindo com desoxiguanosina trifosfatada, inativando então a DNA polimerase viral e consequentemente inibindo a replicação do DNA. Além dessas drogas, existe uma segunda linha de medicamentos, que são utilizados em casos de infecções resistentes, como por exemplo os análogos de pirofosfato (Foscarnet) e nucleotídeo acíclico análogo de fosfonato da citidina (Cidofovir). Porém com o uso a longo prazo e pacientes imunocomprometidos, surgiram cepas resistentes a esses medicamentos, que estão relacionados as mutações na timidina quinase viral ou na DNA polimerase (JAMES e PRICHARD, 2014; JIANG et al., 2016; RECHENCHOSKI et al., 2017; GOTTLIEB et al., 2017).

O Brasil possui a maior diversidade genética do mundo, com uma flora rica em plantas medicinais, calcula-se que pelo menos metade das plantas contenham substâncias com princípios ativos, as quais tem propriedades curativas e preventivas para muitas doenças. Os

produtos naturais possuem vantagens em relação aos sintéticos, como: segurança no uso, pois podem estar presentes em alimentos e bebidas consumidos diariamente; são mais facilmente assimilados pelo corpo devido à sua origem natural; e têm menos efeitos colaterais. Além disso, o desenvolvimento de cepas resistentes a esses produtos é dificultado devido à complexidade na estrutura química e muitas vezes por apresentarem mecanismos de ação variados (ARAKAWA et al., 2009; CARNEIRO et al., 2014; TORODOV et al., 2014).

A *Myrciaria dubia* pertence à família das *Myrtaceae*, que produz frutos com grande potencial de comercialização, é uma planta nativa da Amazônia, conhecida como camu-camu, caçari, araçá d' água ou sarão, encontrada em regiões sujeitas a inundações, como às margens dos rios, lagos, várzeas e igapó. Forma um arbusto lenhoso chegando a 1,5 a 4 metros de altura, tem frutos globosos, com sabor cítrico, mesocarpo carnoso e esbranquiçado, com cor que chega desde o vermelho escuro a púrpuro negro e casca lisa e brilhante (NASCIMENTO E CARVALHO, 2012).

As análises fitoquímicas mostram que o camu-camu é rico em polifenóis, flavonoides, elagitaninos, carotenos e antioxidantes. Mesmo com todas essas potenciais substâncias, o camu-camu tem mais reconhecimento pelo seu alto teor de vitamina C. Por ser comestível é muito utilizado como sucos, néctares, refrigerantes gaseificados, geleias, sorvetes, vinhos, bombons e balas. As indústrias também utilizam o fruto como conservante, antioxidante, cosméticos e pastilhas de vitamina C. Na medicina popular esse fruto é utilizado como antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, previne a aterosclerose e proporciona o retardamento no envelhecimento. (BORGES; CONCEIÇÃO e SILVEIRA, 2014; CAMERE-COLAROSSO et al., 2016).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Polissacarídeos de *Myrciaria dubia*

Os polissacarídeos de *Myrciaria dubia* in natura (AO) e sulfatados (AOS) foram obtidos no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE. Os polissacarídeos liofilizados foram dissolvidos, diluídos em água ultrapura e armazenados em alíquotas à -20°C.

2.2. Vírus e Células

HSV-1, cepa KOS (sensível ao aciclovir) e cepa AR-29 (resistente ao aciclovir), doadas pelo Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá –

PR, foram utilizadas nos experimentos. Os estoques virais foram titulados por ensaio de redução de plaque e mantidos a -20°C .

Células Vero (ATCC CCL-81) 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 tratadas com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 100 IU/mL de penicilina (Novafarma Indústria Farmacêutica, Anápolis, GO, BR) e 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anfotericina B (MeizlerBiopharma S/A, São Paulo, SP, BR).

2.3 Teste de Citotoxicidade

A citotoxicidade dos polissacarídeos AOS e AO foram avaliados em células Vero, cultivadas em placas de 96 poços (TPP, Trasadingen, CH) e avaliadas pelo ensaio de MTT (dimethylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromide) (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Foram testadas concentrações 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 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. As concentrações dos polissacarídeos capazes de reduzir a viabilidade das células em 50% em comparação ao controle de célula (CC_{50}) foram calculadas pela análise de regressão linear.

2.4 Ensaio de Redução de plaques (PRA)

A atividade antiviral do AOS foi determinada pelo ensaio de redução de plaques (PRA), conforme Espada et al (2015). Células Vero foram cultivadas em placas de 24 poços (TPP, Trasadingen, CH) até 100% de confluência, foram infectadas com HSV-1(KOS e AR-29) e tratadas com várias concentrações dos compostos (12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em diferentes tempos: antes da infecção (-2h e -1h), simultaneamente (0h) após a infecção (+2 e +1). As células foram então cobertas com agarose nutriente (DMEM 2x/1.8% agarose [v/v]) contendo 25 mM MgCl_2 . Após 72 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 (IS) foi expresso pela fração CC₅₀/IC₅₀.

2.4.1 Virucida: O efeito virucida de AOS foi determinado de acordo com Minari et al. (2011). As cepas de HSV-1 contendo aproximadamente 40 UFP foram incubadas 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. Em seguida foram inoculadas em células para realização do PRA.

2.4.2 Inibição da adsorção: O efeito inibitório na adsorção viral nas células foi realizado de acordo com Yamamoto et al. (2013). As células foram pré-incubadas a 4°C por 30 minutos, infectadas pelas duas cepas de HSV-1 e tratadas com AOS, nas mesmas concentrações utilizadas nos outros testes. Depois de 90 minutos de adsorção a 4°C, as células foram lavadas com PBS frio seguido do PRA.

2.5 Ensaio de Imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência foi realizado de acordo com Lopes et al. (2017). Células Vero foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas, essas foram infectadas com as duas cepas de HSV-1 e simultaneamente tratadas com diferentes concentrações de AO e AOS (12,5µg/mL, 25µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL). Cultura de células infectadas e não tratadas (CV), e culturas de células não infectadas e não tratadas (CC), foram mantidas como 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 rato anti-HSV-1 (Santa Cruz Biotechnol., USA), 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 rato 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.

2.6 PCR

O efeito do AOS na síntese de DNA do HSV-1 (cepas KOS e AR-29) foi realizado como descrito em Lopes et al. (2013). O DNA viral foi extraído de células infectadas (2 x

10^6 células), tratadas com várias concentrações do AOS (6 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$) utilizando-se kit comercial (QIAamp® DNA Mini and Blood Mini). DNA viral de células infectadas e não tratadas, e de células não infectadas e sem tratamento, foram extraídos como controles. O par de primers utilizado para o ICP4, foi ICP4F (5'GGCGGGAAGTTGTGGACTGG3') e ICP4R (5'CAGGTTGTTGCCGTTTATTGCG3'). A reação foi realizada com o volume final de 25 μL contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP, 2 pmol de cada primer (*Invitrogen, Life Technologies, UK), 2,5 U de Taq DNA-polimerase (*) e 5 μL do DNA extraído. O programa foi construído com uma desnaturação a 94°C durante 4 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto, polimerização a 72°C durante 1 minuto, seguido por uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Dez microlitros dos produtos da PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida a 12%. O tamanho esperado para o ICP4 é de 138pb.

3 RESULTADOS

A tabela 1 mostra o CC_{50} , IC_{50} e os valores de IS dos polissacarídeos isolados de *Myrciaria dubia* contra a cepa KOS e AR-29 do HSV-1. A maior atividade antiviral foi encontrada para o polissacarídeo sulfatado (AOS) para ambas cepas virais utilizadas, que apresentou também um melhor índice de seletividade, sendo utilizado então para os testes de redução de plaque em outros protocolos de tratamento.

Tabela 1 – Atividade antiviral dos polissacarídeos *in natura* (AO) e do derivado sulfatado (AOS) de *Myrciaria dubia* contra as cepas KOS (sensível ao aciclovir) e AR-29 (resistente ao aciclovir) de HSV-1, em células vero, por ensaio de redução de plaque. As células foram infectadas e tratadas simultaneamente (tempo 0h) com os compostos.

Polissacarídeos	HSV-1 KOS			HSV-1 AR-29		
	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^a	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^b	IS ^c	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^a	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^b	IS ^c
AO	>500	32,6	15,34	> 500	87	5,74
AOS	386	2,06	187,38	386	0,46	839,13

^a Concentração citotóxica de 50%

^b Concentração inibitória de 50%

^c Índice de seletividade ($\text{CC}_{50} / \text{IC}_{50}$)

A figura 1 mostra a porcentagem de inibição viral da cepa KOS do HSV-1, para os testes profiláticos 1 e 2 horas, tratamento simultâneo (0h), terapêutico 1 e 2 horas, virucida e inibição da adsorção. Os resultados que mostraram o melhor efeito antiviral foram encontrados no tempo 0 hora da infecção, com inibição viral de 100% para as 3 maiores concentrações testadas (100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL) e 96,6% para a menor concentração testada (25 µg/mL). O AOS também apresentou resultados significantes na maior concentração (100 µg/mL) para outros testes, como 95,1% para inibição da adsorção, 93,7% para após uma hora de infecção e 91,6% para o teste de virucida.

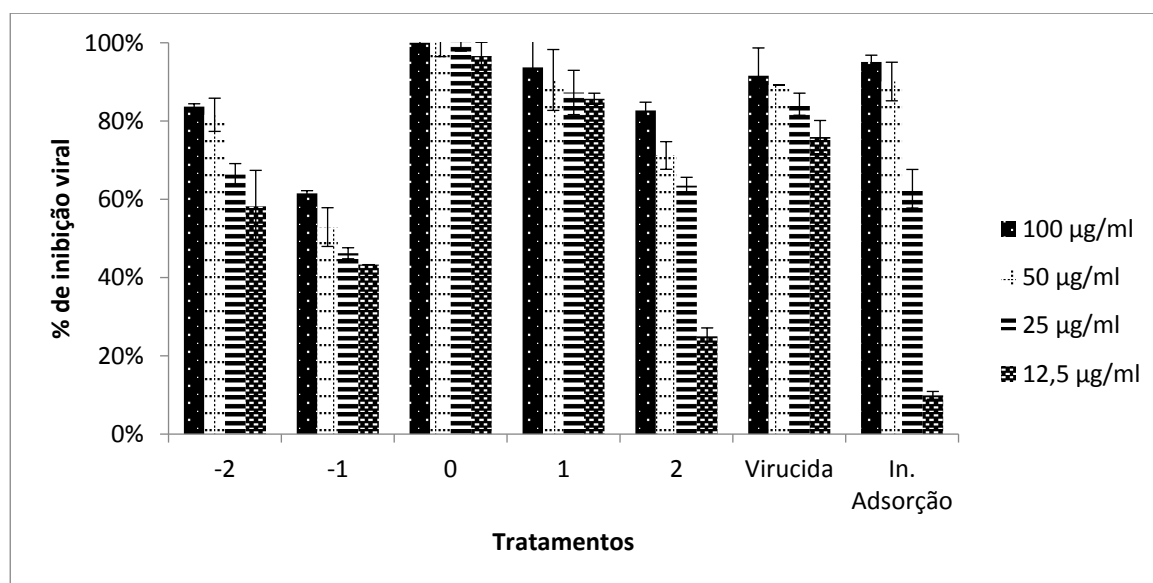


Figura 1 – Atividade antiviral do AOS para cepa KOS de HSV-1, em células Vero, avaliada pelo ensaio de redução de plaque, em diferentes concentrações e nos protocolos de tratamento. O AOS foi adicionado nos tempos: 1 e 2h antes da infecção, no momento da infecção (0 h), 1 e 2h após a infecção. Foram avaliadas também as atividades virucida e inibição da adsorção.

A figura 2 mostra a porcentagem de inibição viral da cepa AR-29 do HSV-1, para os testes profilático 1 e 2 horas, tratamento simultâneo (0h), terapêutico 1 e 2 horas, virucida e inibição da adsorção. Os resultados que mostraram o melhor efeito antiviral, foram encontrados no tempo 0 hora da infecção, com inibição viral de 100% para as 3 maiores concentrações testadas (100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL) e 98% para a menor concentração testada (25 µg/mL). O AOS também apresentou resultados significantes na maior concentração (100 µg/mL) para outros testes, como 95,9% para Inibição da adsorção, 94,4% para após o tratamento após uma hora de infecção, 84% para o teste profilático (-2h),

89% para o teste de virucida, já para o teste profilático (-1h) se mostrou menos significativo, com porcentagem de inibição viral de 61,20%.

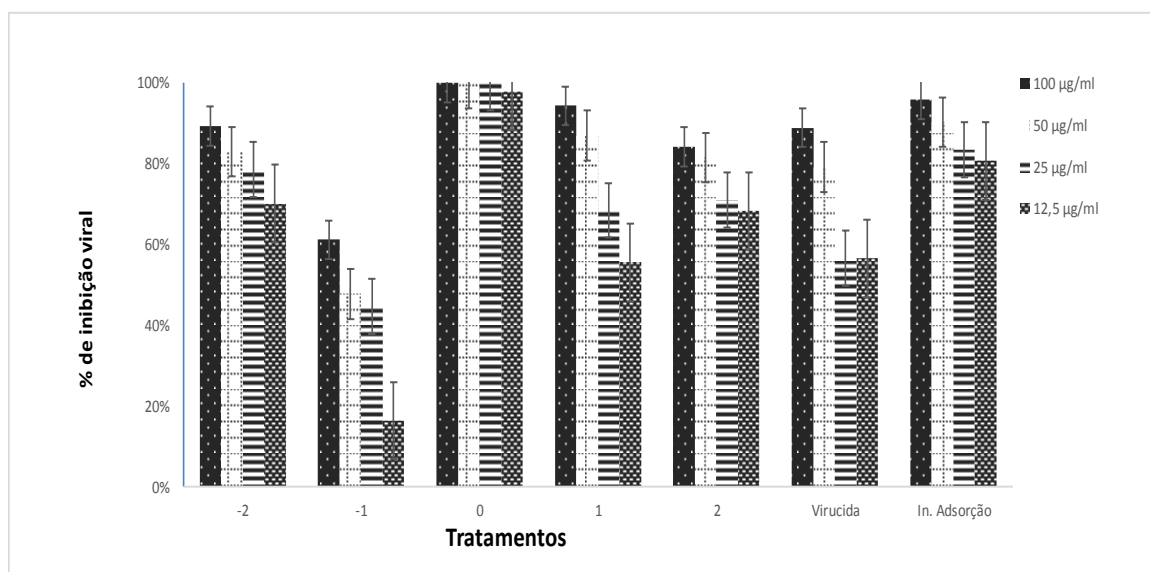


Figura 2 – atividade antiviral do AOS para cepa AR-29 de HSV-1, em células Vero, avaliada pelo ensaio de redução de plaque, em diferentes concentrações e nos protocolos de tratamento. O AOS foi adicionado nos tempos: 1 e 2h antes da infecção, no momento da infecção (0 h), 1 e 2h após a infecção. Foram avaliadas também as atividades virucida e inibição da adsorção.

O resultado do teste de imunofluorescência mostrou que o AOS e AO foram capazes de inibir a síntese de proteína de ambas cepas de HSV-1, de forma concentração dependente, conforme mostrado na tabela 2.

Tabela 2: Atividade antiviral dos polissacarídeos *in natura* (AO) e sulfatado (AOS) de *Myrciaria dubia* na replicação viral das cepas KOS e AR-29 do HSV-1, monitorado pelo ensaio de imunofluorescência, em células vero. Os polissacarídeos foram adicionados em diferentes concentrações, no tempo 0 hora de infecção. Foram contadas 100 células por lamínulas.

Concentrações (µg/mL)	AO		AOS	
	KOS	AR-29	KOS	AR-29
12,5	18,14	0	9,68	27,35
25	21,92	10,64	15,96	31,92
50	40,67	31,20	35,72	45,21
100	44,05	37,99	39,97	48,16

Os tratamentos com AOS de células infectadas com as cepas KOS e AR-29 de HSV-1 não apresentaram efeito significativo sobre a síntese do DNA viral nas concentrações utilizadas, 6 µg/mL, 25 µg/mL e 50 µg/mL, conforme mostra a figura 3.

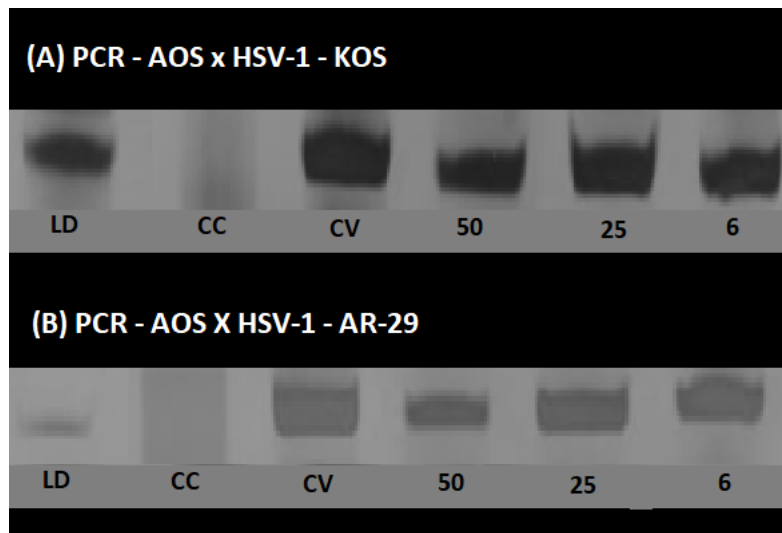


Figura 3: Efeito do polissacarídeo sulfatado de *Myrciaria dubia* (AOS) na síntese de DNA das cepas KOS (A) e AR-29 (B) do HSV-1, nas concentrações indicadas (µg/mL). Eletroforese em gel de poliacrilamida do amplicon HSV-1 ICP4 (138 bp). Marcador molecular (LD); Controle de célula (CC); Controle de vírus (CV); e HSV-1 tratado com AOS nas concentrações indicadas (50, 25 e 6 µg/mL).

4 DISCUSSÃO

Os produtos naturais há muito tempo têm sido usados como terapêuticos, um bom exemplo disso são as frutas, que além do alto valor nutritivo são ricas em compostos fenólicos, com a inserção na alimentação com facilidade e boa aceitabilidade (LI et al., 2017). Nos últimos anos, os polissacarídeos isolados de plantas têm atraído cada vez mais a atenção, devido a sua ampla variedade de atividades farmacológicas, como antitumoral, hiperglicêmicos, imunomoduladores, antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobianos e antivirais (YU et al., 2018; WANG et al., 2018).

Um exemplo de produto natural promissor são os frutos de *Myrciaria dubia*, que possuem atividade antimicrobiana relatada. Mori et al. (2013) avaliaram o efeito antimicrobiano do extrato das folhas e cascas de *Myrciaria dubia*, nas concentrações 800 mg/mL, 700 mg/mL e 600mg/mL, e foi demonstrado efeito contra *Staphylococcus aureus*

(ATCC6538P), mas não para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) e *Escherichia coli* (ATCC35218).

Colarossi et al. (2016) também avaliaram o efeito antimicrobiano do extrato metanólico de sementes e polpas de camu-camu, ao qual foi observado um efeito antimicrobiano contra microrganismos prevalentes na cavidade oral, como *S. mutans* e *S. sanguinis*.

Não existem relatos na literatura sobre a atividade antiviral do camu-camu, dessa forma este trabalho avaliou os polissacarídeos *in natura* (AO) e sulfatado (AOS) dessa fruta contra herpesvírus. O teste de citotoxicidade mostrou uma baixa toxicidade desses polissacarídeos e esses resultados são semelhantes aos encontrados por vários autores (GODOI et al. 2015; DONG et al. 2012). A atividade biológica de polissacarídeos está relacionada diretamente com a sua estrutura, alguns estudos têm mostrado que modificações químicas como a sulfatação melhoram essas atividades (CHEN e HUANG, 2018; LOPES et al. 2017). Esta constatação pode ser observada nos trabalhos de atividade antiviral onde polissacarídeos sulfatados tem apresentado maior efeito, principalmente para vírus envelopados.

No nosso trabalho podemos observar melhor atividade anti-herpética do polissacarídeo sulfatado, de *Myrciaria dubia*, em relação ao *in natura*, com menores IC₅₀ e maiores IS para as duas cepas testadas. AOS inibiu ambas as cepas de HSV-1 em todos os protocolos de tratamento, mas o melhor resultado foi observado quando o polissacarídeo foi adicionado no tempo 0 h de infecção, mantendo boa atividade em todas as concentrações testadas. A avaliação do efeito dos polissacarídeos sobre a replicação das cepas KOS e AR-29 mostrou efeito semelhante para ambas. Pela reação em cadeia da polimerase não foi possível observar uma redução significativa na detecção do DNA viral. O efeito antiviral de polissacarídeos e seus derivados sulfatados tem sido demonstrado em vários estudos, principalmente nas etapas iniciais da replicação viral, corroborando com os resultados encontrados para AO e AOS (SAHA et al., 2012; LOPES et al., 2013). Embora o mecanismo pelo qual os polissacarídeos inibem os vírus não estejam bem esclarecido, devido sua ação virucida e principalmente nos estágios iniciais da replicação viral, como na etapa de adsorção, sugere-se uma ligação destes com a partícula viral, através de ligações eletrostáticas entre grupamentos ácidos do sulfato e aminoácidos básicos de proteínas da superfície viral ou ainda que estes polissacarídeos se liguem a receptores específicos do vírus na célula hospedeira impedindo a adsorção e penetração (YE et al., 2007; LI et al., 2013).

Em conclusão, nossos resultados sugerem que AOS é um composto com atividade antiviral promissora, que interfere principalmente nas etapas iniciais da replicação do HSV-1, podendo ser uma alternativa futura para o tratamento de infecções causadas por este vírus, principalmente para as infecções por herpes resistentes ao aciclovir.

5 REFERÊNCIAS

ARAKAWA, T. et al. Antiviral and virucidal activities of natural products. **Current Medicinal Chemistry**. V.16, p. 2485-2497, 2009.

BORGES, L.L; CONCEIÇÃO, E.C.; SILVEIRA, D. Actives compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. **Food Chemistry**.v.153, p.224-233, 2014.

CAMERE-COLAROSSO, R. et al. Antibacterial activity of *Myrciaria dubia* (camu-camu) against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**.v.6, n.9, p.740-744, 2016.

CARNEIRO, F.M et al. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**. V.3, n.2, p.44-75, 2014.

CHEN, L., HUANG, G. The antiviral activity of polysaccharides and their derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**. V.115, 77–82, 2018.

CLEMENS, S. A.C. e FARHAT, C.K. Soroprevalência de anticorpos contra vírus herpes simples 1-2 no Brasil. **Revista de Saúde Pública**. V.44, n.4, p.726-734, 2010.

Dong CX et al. Structures and anti-HSV-2 activities of neutral polysaccharides from an edible plant, *Basella rubra* L. **Int J Biol Macromol** 2012; 50: 245–249.

Dong CX et al. Structures and anti-HSV-2 activities of neutral polysaccharides from an edible plant, *Basella rubra* L. **Int J Biol Macromol** 2012; 50: 245–249.

DONG, C.X. et al. Structures and anti-HSV-2 activities of neutral polysaccharides from an edible plant, *Basella rubra* L. **International journal of biological macromolecules**. V.50. 245-249, 2012.

ESPADA, S.F. Antiviral activity of *Trichilia catiguá* bark extracts for herpesvirus and poliovirus. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. V.16, P.724-732, 2015

Dong CX et al. Structures and anti-HSV-2 activities of neutral

polysaccharides from an edible plant, *Basella rubra* L. *Int J Biol Macromol* 2012; 50: 245–249.

Dong CX et al. Structures and anti-HSV-2 activities of neutral polysaccharides from an edible plant, *Basella rubra* L. *Int J Biol Macromol* 2012; 50: 245–249.

GODOI, A.M. et al. Characterization and antiherpetic activity of native and chemically sulfated polysaccharide from *Adenanthera pavonina*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. V. 16, p.1024-1031, 2015.

GOTTLIEB, S.L. et al. Meeting report: Initial World Health Organization consultation on herpes simplex virus (HSV) vaccine preferred product characteristics, March 2017. **Vaccine**, 2017.

GOULD, S. et al. An evaluation of the prevalence of bovine herpesvirus 1 abortions based on diagnostic submissions to five U.S.- based veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 25, n. 2, p.243-247, 2013.

GRINDE, B. Herpesviruses: latency and reactivation – viral strategies and host response. **Journal of Oral Microbiology**. V.5, p.1-9, 2013.

JAMES, S.H. e PRICHARD, M.N. Current and future therapies for herpes simplex virus infections: mechanism of action and drug resistance. **Current Opinion in Virology**. V.8, p.54-61, 2014.

JIANG, Y.C. et al. New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. **International Journal of Oral Science**.v.8, p.1-6, 2016.

JOHNSTON, C. e COREY, L. Current concepts for genital herpes simplex virus infection: diagnostics and pathogenesis of genital tract shedding. **Clinical Microbiology Reviews**. V.29, n.1, p. 149-161, 2016.

LI, W.F. et al. Plant phenolic compounds as potential lead compounds in functional foods for antiviral drug discovery. **Current Organic Chemistry**. V.21, p. 1847-1860, 2017.

LI, P. et al. Heparosan-derived heparan sulfate/heparinlike compounds: one kind of potential therapeutic agents. **Medicinal Research Reviews**. V.3, p. 665-692, 2013.

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

LOPES, N. et al. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal of Biological Macromolecules**.v.60, p.93-99, 2013.

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

MORI, T. et al. Efecto antimicrobiano de *Myrciaria dúbia* (camu-camu) y *Cyperus luzulae* (piri-piri) sobre microorganismos patógenos. **Conocimiento Amazonico**. V.4, p.49-57, 2013.

MUYLAERT, I. ; TANG, K.W.; ELIAS, P. Replication and Recombination of herpes simplex virus dna. **The Journal Biological Chemistry**, v.286, n.18, p. 15619-15624, 2011.

NASCIMENTO, W.M.O. e CARVALHO, J.E.U. **A cultura do camu-camu**. 1 ed. Brasília: EMBRAPA, 2012.

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.

RECHENCHOSKI, D.Z. et al. Herpesvirus: an underestimated virus. **Folia Microbiologica**. V.62, p.151-156, 2017.

SAHA, S. et al. Sulfated polysaccharides from *Laminaria angustata*: structural features and in vitro antiviral activities, **Carbohydrate Polymers**. V.87, p.123–130, 2012.

SON, M. et al. Bioactives activities of natural products against herpesvirus infection. **Journal of Microbiology**. V.51, n.5, p. 545-551, 2013.

TODOROV, D. et al. Antiviral potential of Bulgarian medicinal plants. **Phytochemistry Reviews**. V.13, p.525-538, 2014.

WANG, C. Antiviral activities of *Radix Isatidis* polysaccharide against type II herpes simplex virus in vitro. **Food Science and Technology**. p.1-4, 2018.

YAMAMOTO, K.A. Antiherpetic activity of on *Agaricus brasiliensis* polysaccharides, its sulfated derivate and fractions. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 52, P. 9-13, 2013.

YE, S.M. et al. Antiviral activities of polysaccharides from *Eucheuma gelatinae* and *Eucheuma striatum* in vitro. **Chinese Journal of Marine Drugs**. V.26, p.14-19, 2007.

YU, Y. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharides from natural resources: A review. **Carbohydrate Polymers**. V.183, p. 91-101, 2018.

