



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

KAROLINE FONTANA AGOSTINHO

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PECTINA DE *CUCUMIS MELO*
VAR. *ACIDULLUS* NA INFECÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
HERPES SIMPLEX**

Londrina
2018

KAROLINE FONTANA AGOSTINHO

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PECTINA DE *CUCUMIS MELO*
VAR. *ACIDULLUS* NA INFECÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE
HERPES SIMPLEX**

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

Orientador: Prof. Carlos Nozawa.

Londrina
2018

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

Agostinho, Karoline Fontana Agostinho.

Atividade antiviral de pectina de Cucumis melo var. acidullus na infecção in vitro e in vivo de herpes simplex // Karoline Fontana Agostinho Agostinho. - Londrina, 2018. 50 f.

Orientador: Carlos Nozawa.

Coorientador: Ligia Carla Faccin Galhardi.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2018.

Inclui bibliografia.

1. Herpes vírus 1(HSV-1) - Tese. 2. Antiviral HSV-1 in vitro e in vivo - Tese. 3. Cucumis melo var. acidulus, melão caipira - Tese. 4. Pectina - Tese. I. Nozawa, Carlos . II. Galhardi, Ligia Carla Faccin. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . IV. Título.

KAROLINE FONTANA AGOSTINHO

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE PECTINA DE *CUCUMIS MELO* VAR.
ACIDULLUS NA REPLICAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE HERPES
SIMPLEX**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador Prof. Carlos Nozawa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Audrey A. Stinghen Garcia Lonni
Universidade Estadual de Londrina- UEL

Dra. Nayara Lopes Samensari
Universidade Estadual de Londrina- UEL

Londrina, 20 de março de 2018.

DEDICO

A Deus por ter me dado esta oportunidade tão maravilhosa.

Aos meus pais por sempre acreditarem em mim, me darem suporte e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me ensinado que tudo tem seu tempo e ter me dado essa oportunidade.

A minha família que sempre me incentivou e me apoiou nas minhas escolhas, me dando suporte, amor e incentivo mesmo que a distância.

Ao meu orientador Prof. Carlos Nozawa, coorientadora Profa. Lígia Carla Facin Galhardi e a Profa. Rosa Elisa Carvalho Linhares por toda a paciência, conhecimento e acolhida nessa caminhada.

Ao Laboratório de Virologia que me acolheu e me ajudou nessa etapa.

Aos amigos conquistados ao longo desses dois anos em Londrina.

As minhas amigas que me apoiaram e compreenderam a distância e a falta de tempo.

As minhas amigas Daniele Rechenchoski, Carla Caloni e Caroline Santos, pela amizade, parceria e histórias construídas ao longo dessa caminhada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação Araucária e a Universidade estadual de Londrina pelo apoio financeiro.

“... se lembre de que, durante a vida, você vai enfrentar momentos muito difíceis, mas é possível encontrar a força que precisa em Deus. Se está faltando alguma coisa na sua vida, peça. Você será atendido. Comprometa-se, e todos os compromissos assumidos serão duradouros. Para sempre.”

Kim Carpenter e Krickitt Carpenter; Para sempre, 2012.

AGOSTINHO, Karoline Fontana. **Atividade antiviral de pectina de *Cucumis melo* var. acidullus na replicação *in vitro* e *in vivo* de herpes simplex.** 2018. 49 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina. 2018.

RESUMO

O vírus herpes simplex (HSV) possui grande importância médica e social com elevada soroprevalência na população mundial, causando infecções, normalmente benignas, além de permanecer latente no hospedeiro. No entanto, a patogenia e a severidade dos casos dependem de alguns fatores como, idade e condições do sistema imune. Cepas resistentes ao medicamento de referência, o aciclovir (ACV), vem sendo amplamente relatada, demonstrando a importância pela busca de alternativas antivirais. O gênero *Cucumis* destaca-se por apresentar diversas atividades medico-biológicas. Desta forma, o presente trabalho avaliou a ação de pectinas ácida (PACm) e sulfatada (PSCm), da espécie *C. melo* var. acidullus na infecção *in vitro* e *in vivo* pelo HSV. A citotoxicidade dos compostos foi avaliada pelo método de MTT, em células Vero, a atividade antiviral *in vitro* por ensaio de redução de plaque (ERP) e *in vivo* em camundongos BALB/c. As concentrações citotóxicas 50% (CC₅₀) da PACm e PSCm foram, respectivamente, >2000 µg/mL e 1440 µg/mL. As concentrações inibitórias 50% (CI₅₀) para as cepas de HSV-1, KOS e AR, respectivamente, sensível e resistente ao ACV, foram de 90 µg/mL e 86.5 µg/mL para PACm. Para o PSCm, as CI₅₀ foram de 6 µg/mL e 12 µg/mL, respectivamente, para as cepas KOS e AR. O melhor índice de seletividade (IS) foi demonstrado para PSCm (240) e para PACm superior a 20. A PSCm demonstrou inibição em diferentes estágios de replicação da cepa KOS, especialmente nas etapas iniciais, com repercussão na inibição das sínteses proteica e de DNA viral. *In vivo*, a PSCm retardou a evolução das lesões das cepas AR e KOS, porém, com maior intensidade na primeira, quando comparada aos grupos infectado e sem tratamento. O nosso trabalho demonstrou que a PSCm é um potencial candidato no desenvolvimento de drogas para o controle da infecção pelo HSV.

Palavras-chaves: Herpes simplex. Antiviral. Pectina. Melão caipira.

AGOSTINHO, Karoline Fontana. The *in vitro* and *in vivo* antiviral activity of *Cucumis melo* var. *acidullus* pectin in herpes simplex replication. 2018. 49 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) - State University of Londrina. 2018.

ABSTRACT

The herpes simplex virus (HSV) is an important medical and social problem with a high seroprevalence in the population worldwide. The agent usually causes benign infections in human, however, the pathogenesis and severity of the disease depend on the profile of the patients, such as, the age and immune system conditions. The resistant strain to the reference medicine, acyclovir (ACV), are reported, demonstrating the importance for the search of alternative antiviral. In this context, the plant genus *Cucumis* is shown to present several medicinal and biological activities. The aim of this study was to investigate the activity of the *Cucumis melo* pectin in the *in vitro* and *in vivo* HSV-1 infection, for KOS and AR strains, respectively, sensitive and resistant to ACV. The pectin cytotoxicity was determined by the MTT assay in Vero cell cultures, the antiviral activity was carried out by plaque reduction assayed (PRA) and the *in vivo* study performed in BALB/c mouse. The cytotoxic concentrations (CC₅₀) for the acid (APC_m) and sulfated (SPC_m) forms of the pectin were, respectively, >2000 µg/mL and 1440 µg/mL. The inhibitory concentrations (IC₅₀) for KOS and AR strains were, respectively, 90 µg/mL and 86.5 µg/mL for APC_m, and, 6 µg/mL and 12 µg/mL for SPC_m. The highest selectivity index (IS) was found for SPC_m (240). The *in vivo* analysis also demonstrated that SPC_m delayed the lesions evolution for both strains, in comparison to control group. We demonstrated that SPC_m inhibited HSV-1 infection in different steps of replication, especially in the initial stages. These results were strengthened by the inhibition of viral DNA and protein syntheses and the protective effect in mice. Therefore, *C. melo* pectin presents a potential quality as a candidate for the development of drug for the control of HSV-1 infection.

Keywords: Herpes simplex. Antiviral. Common melon.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACV	Aciclovir.
BC/UEM	Biotério Central/ Universidade Estadual de Maringá.
CC ₅₀	Concentração citotóxica 50%.
CI ₅₀	Concentração Inibitória de 50%.
DACB- UEM, PR DQOI/UFCE	Departamento de química orgânica e inorgânica/ Universidade Federal do Ceará.
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco.
PAC _m	Pectina ácida de <i>Cucumis melo</i> .
PSC _m	Pectina sulfatada de <i>Cucumis melo</i> .
HSV-1	Herpes simplex vírus tipo 1.
HSV-1 KOS	Herpes simplex vírus tipo 1 sensível ao aciclovir.
HSV-1 AR- 29	Herpes simplex vírus tipo 1 resistente ao aciclovir.
IS	Índice de seletividade.
Ip.	Intraperitoneal.
MTT	Brometo de dimetiltiazolil-difeniltetrazolio.
PCR	Reação em cadeia da polimerase.
Pi	Pós infecção.

SUMÁRIO

Introdução	12
Vírus herpes simplex	14
Vacinas	17
Antivirais	18
Cucumis melo L.	19
Atividade Biológica	21
Cucumis melo var. acidullus	21
Pectina	22
Referências	25
Objetivos	32
Artigo	33
1. Introdução	34
2. Materiais e Métodos	34
3. Resultados:	38
4. Discussão e conclusão	42
Referências	45

Introdução

As doenças virais representam um grande desafio para a humanidade, algumas delas graves e de consequências devastadoras. Ocorrem desde a antiguidade, com o recrudescimento dos eventos, em virtude da emergência de novas viroses e reemergência de outras conhecidas. Os relatos históricos da ocorrência destas doenças graves, remontam nos registros dos antigos Egito e China, sobre a varíola e a poliomielite. Seguidos, na era contemporânea, às epidemias da Dengue, Sarampo, Febre Amarela, às pandemias de Gripe, à epidemia de HIV, Ebola, e aos surtos de Zikavírus e Chikungunya restritos às Américas. Todas estas situações foram e são de grande impacto na saúde pública, caracterizando a importância das infecções virais na biosfera. Para a ocorrência destas doenças, há de se considerar a capacidade de adaptação e evolução dos vírus, a sua variabilidade genética e o eficiente mecanismo de evasão às defesas do hospedeiro. Por outro lado, as ações preventivas e o uso de quimioterápicos, ainda em número irrisório, não devem ser superestimadas no controle das infecções virais. Sendo essencial o desenvolvimento de pesquisas visando o desenvolvimento de medicamentos alternativos e o melhor conhecimento da natureza viral, para o controle destas infecções.

Como alternativa de tratamento para as enfermidades a utilização de produtos naturais começou a ser investigada desde a antiguidade, descrições como o papiro de Erbes, datam esta utilização pelo homem (VIEGAS, BOLSANI, BARREIRO, 2006). Com o passar do tempo, as pesquisas com plantas medicinais e seus compostos isolados demonstraram relação direta no tratamento de doenças, iniciando a era da síntese química. Com a chegada de produtos sintéticos ocorreu à desvalorização dos produtos naturais, porém, atualmente com os relatos de doenças causadas por cepas de microrganismos resistentes aos fármacos de primeira escolha, juntamente com o elevado teor de toxicidade dos demais fármacos utilizados no tratamento ao paciente, fez com que a comunidade científica voltasse novamente os olhos aos compostos naturais, à procura de alternativas (PINTO, et al. 2002).

A base para a exploração de plantas medicinais no controle das doenças é ampla, porém, a baixa toxicidade atribuída aos fitoterápicos é um dos fatores relevantes. Em relação à atividade antiviral de produtos naturais há vários estudos com diversas plantas que demonstram ser promissoras. A possibilidade dos princípios ativos interferirem em

vários alvos virais, variando desde a adsorção do vírus até a célula hospedeira até a liberação de novas partículas virais, faz com que ocorra ação complementar aos medicamentos antivirais existentes no controle de cepas resistentes aos antivirais sintéticos (VLIETINCK, BERGHE, 1991).

Estas pesquisas ampliam o conhecimento sobre produtos naturais possibilitando a produção de novos fármacos, além de demonstrar o potencial fitoterapico que as substâncias natuais poussem. Dentre as diferentes aplicabilidades, a elaboração de novos antivirais é promissora. Desta forma, evidencia-se o grande potencial medicinal de compostos originários de plantas como potenciais drogas inclusive no controle de infecções virais, reforçando a importância de estudos dessa natureza.

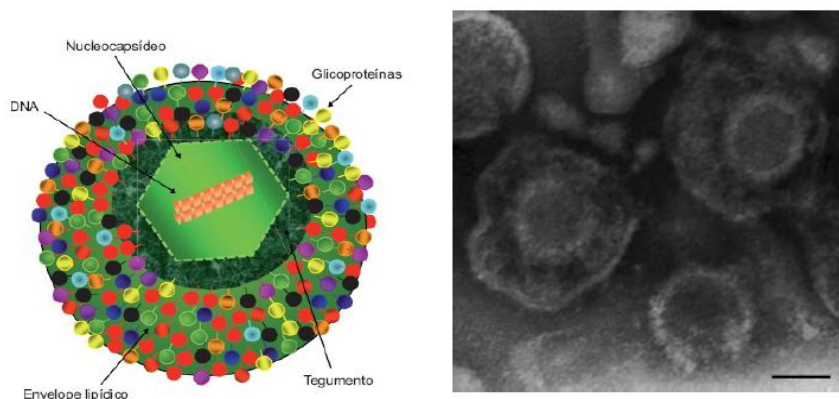
Vírus herpes simplex

O vírus herpes simplex (HSV) é um vírus de grande importância médica, pertence à família *Herpesviridae*, sub-família *Alphaherpesvirinae*, gênero *Simplexvirus* e apresenta-se sob duas formas sorológicas: HSV-1 e HSV-2 (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). Outros alfa herpesvírus de importância médica e veterinária, são os vírus da varicela-zoster e o herpesvírus bovino 1 e 5, respectivamente, do gênero *Varicellovirus* e se assemelham ao HSV, por estabelecerem latência.

Estruturalmente, o HSV é constituído por DNA linear de fita dupla (152 kb), capsídeo icosaédrico, tegumento e envelope lipoproteico com espículas glicoproteicas (Fig. 1) (SANTOS, ROMANOS; WIGG, 2015).

O ciclo replicativo ocorre no núcleo celular e a infecção inicia-se pela adsorção viral à célula hospedeira, através das glicoproteínas virais (OH; FRANSER, 2008) ocasionando a fusão do envelope com a membrana celular (SANTOS, ROMANOS; WIGG, 2015). Após a internalização do nucleocapsídeo este é transferido através dos microtúbulos ao núcleo. O ciclo replicativo ocorre em várias etapas e em forma de cascata, sendo que a transcrição do RNAm, replicação do DNA e montagem do vírion, ocorre exclusivamente no núcleo (SANTOS; ROMANOS; WIGG; 2015). O processo de transcrição é mediado por três grupos de genes, os imediatos iniciais (IE), iniciais (E) e tardios (L). Os genes imediatos iniciais, produzem as proteínas α que induzem a expressão dos genes iniciais que por sua vez codificam as proteínas β , que são responsáveis por toda a síntese proteica e genômica viral (BROOKS et al., 2012).

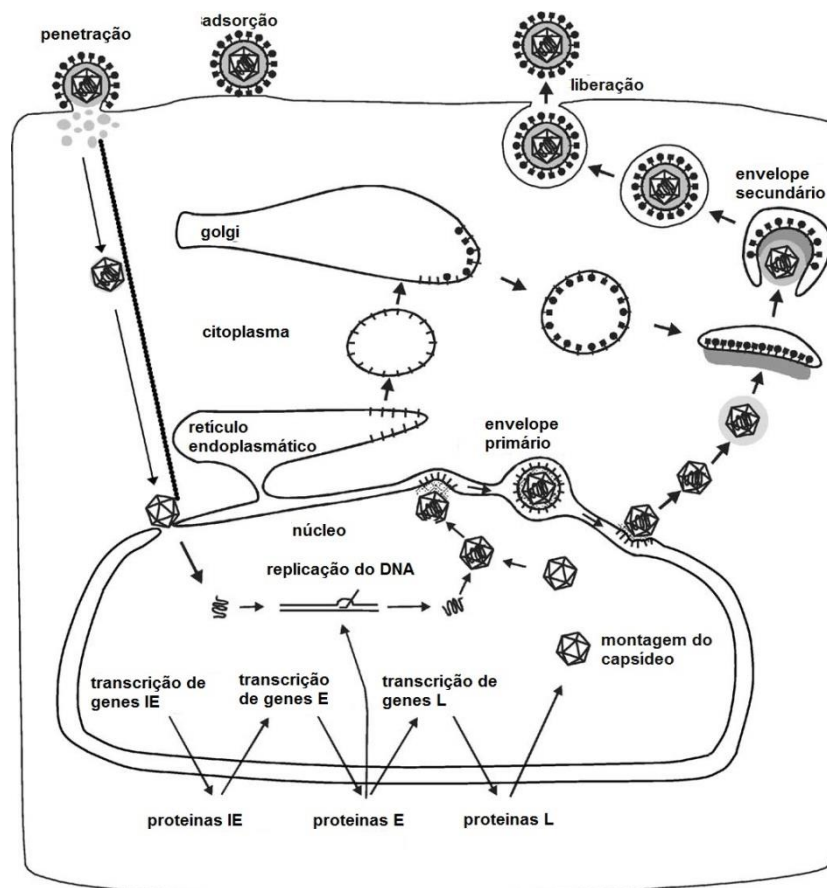
Fig. 1. Esquema ilustrativo da estrutura do Herpesvirus e micrografia eletrônica do HSV-1 (Barra 100 nm) (SANTOS, ROMANOS, WIGG, 2015).



A expressão dos genes é interrompida pelas proteínas γ , sintetizadas pelos genes tardios. Estas proteínas são responsáveis pelas estruturas virais, tais como o tegumento, capsídeo, glicoproteínas (BOEHMER, LEHMAN, 1997). Uma vez que as proteínas funcionais e estruturais estão produzidas, e, sob ação da DNA polimerase, ocorre a replicação do genoma viral, a montagem do vírion no núcleo e a maturação no citoplasma celular. A liberação da subpartícula viral da célula ocorre por viropexia, e, ao final do processo ocorre à lise celular, caracterizando o ciclo lítico, o ciclo lítico (fig. 2 - METTENLEITER, 2004 - com adaptações).

A patogênese da infecção é representada pela penetração viral, através de solução de continuidade nas barreiras fisiológicas naturais (pele/mucosa), seguido de replicação inicial no ponto de entrada, com destruição celular e a reação inflamatória. Pelas terminações nervosas, as partículas viriais fazem o movimento retrógrado ao impulso nervoso e ascendem aos gânglios nervosos locais onde estabelecem a infecção latente. Ao estímulo de fatores que revertem o estado de latência, as partículas virais seguem o sentido do fluxo, pela fibras nervosas, e desencadeiam a replicação na área de penetração. Desta forma, ocorre a destruição celular local e a reação inflamatória (SANTOS, ROMANOS; WIGG, 2015). .

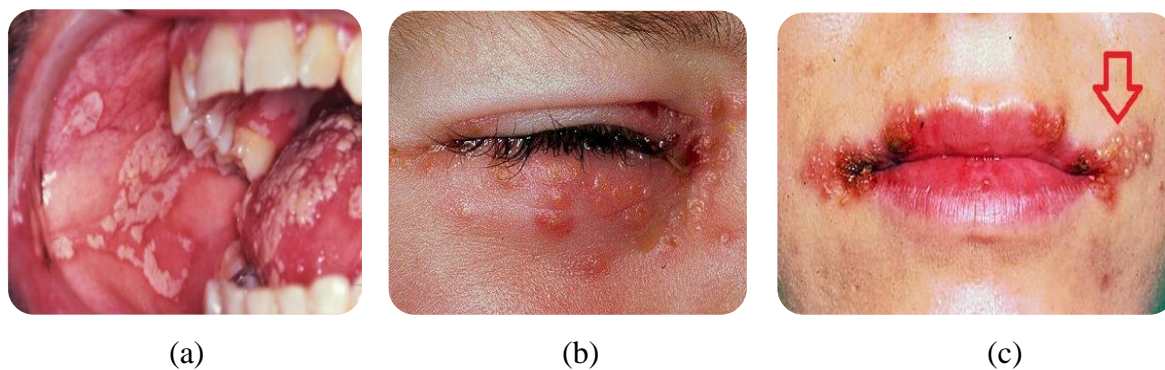
Fig. 2 - Ciclo de replicação do HSV representando as etapas de adsorção, penetração, decapsidação, transcrição dos genes em cascata - imediatos iniciais (IE), iniciais (E) e tardios (L), replicação do DNA viral e montagem de novos vírions.



A manifestação clínica da infecção pelo HSV é variada, representada por vesículas na orofaringe ou em toda cavidade bucal, causada pelo HSV-1 (fig. 3 - <http://adr.sagepub.com/content/23/1/152/F2.expansion.html>; <http://fernandobraganca.com.br/2017/04/22/conjuntivite-neonatal-causas-e-tratamento/>; <http://www.wilsoncorreia.com.br/2010/04/lesoes-bucais-parte-ii-herpes-labial.html>), principalmente, em crianças 1 a 5 anos de idade. Outras manifestações comuns são a glossite, gengivite, panarício, eventualmente, infecções genitais entre outras, até quadros mais graves de ceratoconjuntivite ou encefalite. As infecções genitais são normalmente causadas pelo HSV-2. A infecção neonatal ou doença generalizada do recém-nato é uma manifestação de extrema gravidade, com acometimento dos órgãos internos, incluindo o SNC. Os pacientes imunocomprometidos são alvos de complicações da infecção com o envolvimento do trato respiratório, esôfago e a mucosa intestinal, além de infecções disseminadas levando ao agravamento da infecção, incluindo o acometimento do SNC (SANTOS, ROMANOS;

WIGG, 2015; BROOKS et al., 2012). As lesões vesiculares representam uma combinação da lise celular pela replicação viral, juntamente com a resposta inflamatória do hospedeiro (SANTOS, ROMANOS; WIGG, 2015). Estima-se que grande parte da população mundial apresente anticorpos para o HSV. Infecções por este tipo viral é relatada no mundo inteiro, inclusive em populações mais remotas, como tribos indígenas. Estima-se que 60-95% da população mundial sejam infectados com algum sorotipo de HSV, sendo que a soroprevalência mundial ao HSV-1 varia de 80-90% e 10-25% para HSV-2, em adultos (WHITLEY, 2014; JIANG et al., 2016).

Fig. 3. – Quadros clínicos produzidos pelo HSV-1. a) Vesículas na orofarínge e na cavidade bucal; b) Vesículas na área ocular externa e c) Vesículas labiais e cutâneas.



Vacinas

Apesar da elevada taxa de infecção mundial, motivo de grande impacto social e econômico na saúde pública, o desenvolvimento de eficazes vacinas anti-HSV continua sendo um grande desafio (WILSON; HEROLD; FAKIOGLU, 2009; BELSHE et al, 2012; CHENTOUFI et al., 2012; GOTTLIEB et al., 2017). Testes iniciais, em 1938, utilizaram vacina com o HSV inativado com formalina com resultados discretos (NASEMAN; WASSILEW, 1979; CHENTOUFI et al., 2012). Em 1970, Skinner preconizou o uso de estruturas virais isoladas (glicoproteínas virais) (BERNETEIN; STANBERRY, 1999; TRINDADE et al., 2007) e, baseados nestes testes, foram desenvolvidas duas vacinas, com vírus inativados, o Lupidon H® e G®, para o HSV-1 e HSV-2, respectivamente. Apesar do resultado promissor, a eficácia foi somente demonstrada para a infecção primária (WEITGASSER, 1977; TRINDADE et al., 2007). Outras abordagens foram executadas com HSV mutante, herpesvírus heterólogo (não humano), antígenos recombinantes e vírus

geneticamente modificados (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY., 2007; BOLLAND; PIRCE, 2015). Esta última, baseia-se na tecnologia denominada DISC (Disabled Infectious Single Cycle), cujas partículas virais ativas realizam apenas um ciclo replicativo. Sendo defectivas no gene *UL22*, que expressa a glicoproteína H importante para infecção celular, são limitadas a apenas um ciclo replicativo, porém, induz resposta satisfatória tanto na primo-infecção e infecções recorrentes para HSV-1 (CHENTOUFI et al., 2012; RECHENCHOSKI et al., 2017).

A dificuldade para o desenvolvimento de vacinas anti-HSV está, principalmente, na razão direta do estabelecimento de infecções latentes (CHENTOUFI et al., 2012).

Antivirais

A utilização da terapia antiviral é relativamente nova quando comparada à antibioticoterapia. Os motivos são compreensíveis em virtude da relação íntima vírus/células, ensejando, principalmente, efeitos tóxicos pela não seletividade da maioria dos antivirais. Historicamente, os primeiros antivirais experimentalmente testados foram as tiossemicarbazonas, utilizadas nas infecções pelo vírus da vaccínia e varíola. Esta foi a base para a síntese da metizanona (N-metil-isatin- β -tiossemicarbazona), comercialmente denominado de Marboran®, utilizada na prevenção da varíola. Desde então, o desenvolvimento de antivirais foi estimulado com o advento da descoberta dos análogos de nucleotídeos empregado como anticancerígenos (SANTOS, ROMANOS, WIGG, 2015).

Por exigirem elevados custos na pesquisa e desenvolvimento de antivirais, as metas se concentraram em viroses de importância médica e epidemiológica, como o próprio HSV e o HIV, por exemplo. O desenvolvimento destes fármacos também se tornou viável à medida que a natureza replicativa dos vírus em destaque eram elucidados, assim como os processos celulares, aliado ao fator segurança e baixa toxicidade (SANTOS, ROMANOS, WIGG, 2015). O exemplo da apreciação destes fatores em conjunto, foi a descoberta do aciclovir (ACV) que vem sendo adotado como padrão em termos de eficácia e segurança (GELLER et al., 2012).

Os primeiros antivirais utilizados no tratamento de infecções pelo HSV foram os análogos halogenados de nucleosídeos, como o trifluridina e iododesoxiuridina (IDU), porém, de elevado efeito tóxico, devido a incorporação de suas formas trifosforiladas na cadeia nascente de DNA viral, com o sequente bloqueio da síntese do genoma viral e da replicação viral. Porém, estes antivirais atuam não seletivamente na síntese de DNA viral

também comprometendo o metabolismo celular (LOPES, 2012). O marco histórico no avanço da terapia da infecção por HSV foi a descoberta de análogos de nucleosídeos dotados de mecanismo de ação seletiva, de baixo efeito tóxico. A droga de escolha para o tratamento destas infecções é o ACV, que ao ser incorporado na cadeia nascente, interrompe a síntese do DNA viral, inibindo assim a ação da DNA polimerase viral (RECHENCHOSKI et al., 2017). Entretanto, os relatos demonstram que o uso prolongado do ACV tem selecionado cepas resistentes relacionadas a mutações nos genes da timidina quinase (*tk*) e da DNA polimerase (*pol*), respectivamente, com a frequência de 95% e 5% dos casos (LARDER; DARBY, 1985; WAGSTAFF; FAULDS; GOA, 1994; FROBERT et al., 2014). Estas cepas resistentes têm sido detectadas com frequência em indivíduos imunocomprometidos (WAGSTAFF; FAULDS; GOA, 1994; PIRET & BOIVIN, 2011). Estas cepas resistentes têm sido detectadas com frequência em indivíduos imunocomprometidos (WAGSTAFF; FAULDS; GOA, 1994; PIRET & BOIVIN, 2011). Nestes casos, a necessidade de outros fármacos é impreterível, com o emprego do cidofovir e foscarnet (TORRES et al., 2012; BROWN et al., 2015; SANTOS, ROMANOS, WIGG, 2015).

Portanto, a pesquisa e o desenvolvimento de antivirais sucedâneos é de extrema importância, que proporcionem maior segurança aos pacientes, no controle das infecções pelo HSV.

***Cucumis melo* L.**

O *Cucumis melo* L., popularmente conhecido como melão, pertence à família Cucurbitaceae, subfamília *Cucurbitoideae*, gênero *Cucumis*, com cerca de 40 espécies. Apresenta importância econômica regional e pode ser utilizado também como indutor de resistência vegetal (WHITAKER; DAVIS, 1962; ALVAREZ, 1997). O gênero apresenta caracteres fenotípicos variados de acordo com as condições de cultivo, tais como cor, sabor, aroma e teor de ácido e açúcar, (SEYMOUR; MCGLASSON, 1993; AGUAYO; ESCALONA; RTÉS, 2004; BURGER et al., 2010; GARCIA-MAS et al, 2012). Exemplos destas variações são encontradas nas espécies *Cucumis sativus* L. (pepino), *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai, (melancia) e a *Cucurbita* spp, (abóbora) (GONDA et al., 2010; SEBASTIANI; FICCADENTI 2016).

Acredita-se que a espécie *C. melo* seja originária da África (KERGE; GRUM, 2000), com posterior disseminação para a Ásia (WHITAKER; DAVIS, 1962; ALVAREZ, 1997), sendo de grande valor econômico especialmente nos países do Mediterrâneo e no leste Asiático (GARCIA-MAS, 2012). É a quinta fruta mais produzida no mundo, sob a liderança da China, ficando atrás apenas da laranja, uva, banana e maçã (AGUAYO, ESCALONA, RTÉS, 2004; SOUSA, 2015). No Brasil, representa uma das principais atividades agrícolas na região semiárida do nordeste e concentra 95,8% da produção nacional, grande parte destinada à exportação. As principais variedades da espécie *C. melo* pertencem aos grupos *C. melo* var. *inodorus*, melão espanhol (fig. 4) e *C. melo cantaloupenensis*, melão japonês (fig. 5) (SOUSA, 2015; CARVALHO et al. 2017; www.hortideli.com.br/products/melao-espanhol; www.hortideli.com.br/products/melao-espanhol).



Fig. 4 - *C. melo* var. *inodorus* (melão espanhol)



Fig. 5 – *C. melo* var. *cantaloupenensis* (melão japonês)

O *C. melo* possui na sua composição importantes eletrólitos, como, sódio, potássio, magnésio, fósforo, ferro e vitaminas A e C (KARAKAYA et. al., 1995). Além disso, apresenta açúcares, carotenoides (GARCIA-MAS et al., 2012) e substâncias voláteis originadas de aminoácidos (GONDA et al. 2010). As sementes são ricas em proteínas, tiamina, niacina, cálcio, ferro, fósforo e magnésio (AGUAYO, ESCALONA, RTÉS, 2004; KARAKAYA et. al. 1995).

Atividade Biológica

A família *Cucurbitaceae* apresenta variedades de importância biológica e medicinal (RAHAMAN, 2003), com atividades cardioprotetora, diurética e anti-helmíntica (MILIND, KAUR, 2011), laxativa e antibacteriana e antifúngica (BAGCHI et al., 1998; WANG et al., 2014; HAYET et al., 2016; RASHID et al., 2017), antidiabética, antitumoral, antileucêmica, anti-helmíntica, antimutagênica, antioxidante, antiúlcera, anti-inflamatória, hipocolesterolêmica, hipotrigliceridêmica, hipotensiva, imunoestimulante, além de propriedade inseticida (BELOIN et al. 2005 *apud* GAIA, 2017). A atividade antiviral de alcalóides de *C. metuliferus* foi demonstrada na replicação do vírus da Doença Infecciosa da Bursa (IBDV), em cultura de células, e, em aves infectadas com o vírus da Doença de Newcastle (WANNANG, KWANASHIE, EDE, 2010; AMAGON et al. 2012; ANYANWU et al, 2017). FUJIWARA et al. (2001) demonstraram que uma proteína (Figaren), obtida da espécie *C. figarei*, reduziu as lesões foliares do vírus do Mosaico do Pepino (CMV), nas plantas de tabaco, melão e feijão-caupi. Os extratos aquoso e etanólico de folhas e caule de *C. melo* L. var. *cantaloupensis* reduziram o efeito citopático do citomegalovírus humano (HCMV) em células de fibroblastos de pulmão embrionário humano (MRC-5), com índice de seletividade >2 (HAYET et al., 2016). Entretanto, o extrato etanólico de casca de *C. sativus* não inibiu o herpes simplex-1 (MATZA-PORGES et al., 2014).

Cucumis melo* var. *acidullus

O *C. melo* var. *acidullus*, melão caipira, é muito comercializado na região nordeste do Brasil, não apresenta grande valor comercial, como as variedades *inodorus* e *cantaloupensis*. O amadurecimento do fruto é rápido e tem a casca muito fina, exigindo,

portanto, consumo imediato. Quando maduro, apresenta uma região central alaranjada, onde estão as sementes, polpa branca e casca verde (fig. 6) (SOUSA, 2015).



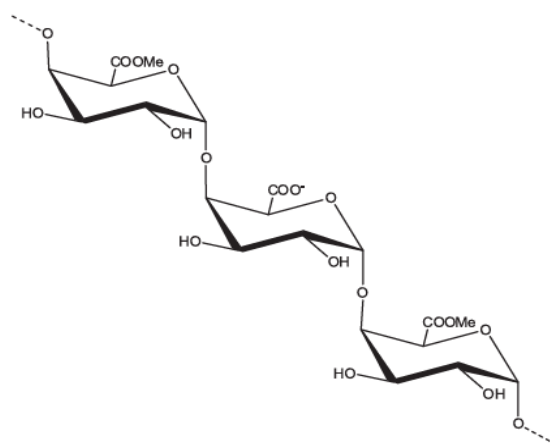
Fig. 6 – *C. melo* var. *acidullus*

Os estudos com esta variedade não são comuns. Godbole & Murthy (2012) investigaram a produção haploide *in vitro* desta espécie por partenogênese, e, recentemente, Sousa et al. (2017) extraíram e modificaram quimicamente uma pectina do fruto, no sentido de agregar valor ao fruto, de pequeno interesse comercial.

Pectina

Presente principalmente em plantas jovens e em frutos, a pectina possui alto interesse econômico e ambiental. A sua descoberta por Louis Nicolas Vauquelin ocorreu em 1790, e, posteriormente, em 1824, Braconnot qualificou-a como sendo derivado de frutas, responsável pela formação de gel e sugeriu o nome pectina (BRAVERMAN; BERK, 1976). São polissacarídeos estruturais, formados por grupos carboxilas de ácido galacturônico, podendo ter ramificações de ramnose, arabinose, galactose. Estas macromoléculas possuem um alto peso molecular e são encontradas em vegetais (fig. 7) (JAYANI, SAXENA, GUPTA, 2005; JORDAN et al., 2012, SOUSA, 2015).

Fig. 7 – Estrutura básica da pectina.



As pectinas possuem grande importância na adesão entre as células vegetais, firmeza e resistência mecânica do tecido, além de auxiliar no amadurecimento, armazenamento e processamento de metabólitos. Encontram-se, normalmente, associadas à celulose, hemicelulose e lignina (MESBAHI, JAMALIAN, FARAHNAKY, 2005; PAIVA, LIMA; PAIXÃO, 2009), na parede celular, células crescentes, nas partes moles e na lamela média (MONHEM, 2008). Os frutos cítricos, juntamente com a maçã são considerados fontes importantes desse carboidrato, na região mesocárpica do fruto (MCCREADY, 1970). Caracterizam-se por serem viscosas, consequentemente, de interesse nas indústrias alimentícia e cosmética, como agente gelificante, estabilizante, espessante, texturizante e emulsificante (MONHEM, 2008; LEBRETON-DECOSTER et al., 2011; ESPIRITO SANTO et al., 2013; MAXWELL et al., 2012; CIRIMINNA et al., 2015). Na medicina, o uso está relacionado aos fármacos de uso oral (proteção da mucosa gástrica e/ou proteção do princípio ativo medicamentoso), e, consequentemente, o aumento da biodisponibilidade (SRIAMORNSAK, 2003). Atividades imunomoduladora (POPOV et al., 2013), redutora de colesterol e triglicérides (FIETZ, SALGADO, 1999), redutora de peso corporal (fibras

dietéticas e elevação da saciedade) (MAXWELL et al. 2012; TUOPING et al., 2014) e aumento da biodisponibilidade de ferro no sangue (MIYADA; NAKAJIMA; EBHARA, 2011) foram também relatadas. Além disso, a pectina é utilizada na fabricação de filmes comestíveis e biodegradáveis, adesivos, substitutos de papel, espumas e plastificantes, materiais para implantação biomédica, entre outras (MOHNEN, 2008).

Além do processo de biorrefinação com vistas ao aproveitamento de subprodutos agrícolas (UENOJO et al., 2007; CIRIMINNA et al., 2015), a utilização destes produtos para o desenvolvimento de novos fármacos é promissor. Nesta linha de intenções e, pelas inúmeras atividades comprovadas do produto, a pesquisa e o desenvolvimento de drogas com a finalidade de controle de infecções virais mostram-se promissoras.

REFERÊNCIAS

- AGUAYO, ESCALONA; ESCALONA, V. H.; RTÉS, F. A. Metabolic behavior and quality changes of whole and fresh processed melon. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 4, may, 2004.
- ALVAREZ, J.M. Tendências em la mejora genética del melón. In: VALLESPER, A.N. (cood.). Melones. Reus: Ediciones de horticultura, S.L., 1997. cap 3, p.25-39. (Compêndios de Horticultura, 10).
- AMAGON, K. I.; WANNANG, N. N.; ILIYA, H. A.; IOR, L. D.; CHRIS-OTUBOR, G. O. Flavonoids extracted from fruit pulp of *Cucumis metuliferus* have antiviral properties. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v.2, n.4, p.249-258, oct., 2012.
- ANYANWU, A. A.; JIMAM, N. S.; OMALE, S.; WANNANG, N. N. Antiviral activities of *Cucumis metuliferus* fruits alkaloids on Infectious Bursal Disease Virus (IBDV). **The Journal of Phytopharmacology**. v.6, n.2, p.98-101, 2017.
- BAGCHI, G. D.; SINGH, A.; KHANUJA, S. P. S.; BANSAL, R. P., SINGH, S. C.; KUMAR, S. Wide spectrum antibacterial and antifungal activities in the seeds of some coprophilous plants of north Indian plains. **Journal of ethnopharmacology**, v. 64, n. 1, p. 69-77, jan. 1998.
- BRAVERMAN, Joseph B. S.; BERK, Zeki. **Braverman's Introduction to the Biochemistry of Foods**. Elsevier Scientific Publishing Co., 1976, p.315.
- BELSHE, P. B., LEONE, P. A.; BERNSTEIN, D. I.; WALD, A.; LEVIN, M. J. M. D.; STAPLETON, T. J.; GORFINKEL, I.; MORROW, R. L. A.; EWELL, M. G.; STOKES-RINER, A.; DUBIN, G.; HEINEMAN, T. C.; SCHULTE, J. M.; DEAL, C. M. Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, p. 34–43, jan., 2012.
- BERNSTEIN, D. I.; STANBERRY, L. R. Herpes simplex virus vaccines. **Vaccine**, v.17,n.13-14, p.1681-1689, jan. 1999.
- BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. **Microbiologia Médica e imunologia de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 25 ed. Porto Alegre, AMGH, 2012, 813 p.
- BROWN, A. E. C.; COHEN, M. N.; TONG, S.; BRAVERMAN, R. S.; ROONEY, J. F.; GILLER, R.; LEVIN, M. J. Pharmacokinetics and safety of intravenous cidofovir for life-threatening viral infections in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 3718-3725, mar., 2015.

- BOEHMER, P. E.; LEHMAN, I. R. Herpes simplex virus DNA replication. **Annual review of biochemistry**, v. 66, n. 1, p. 347-384, jul.,1997.
- BOLLAND, S.; PIERCE, S. K. Ups and downs in the search for a Herpes simplex vírus vaccine. **ELife**, v. 4, p. 1-3, mar.,2015.
- BURGER, Y.; PARIS, H. S.; COHEN, R.; KATZIR, N.; TADMOR, Y.; LEWINSOHN, E.; SCHAFFER, A. A. Genetic Diversity of *Cucumis melo*. In: Janick, J. **Horticultural reviews**, 36. ed. United States of America: Copyright by Wiley Blackwell, 2010. p.165.
- CARVALHO, N.; CANELA, F. M.; LEITE, P. H. S.; FERREIRA, M. A.; OLIVEIRA, V. R.; SANTOS, M. F.; SOUZA, N. O. S.; BUSO, G. S. C. Analysis of genetic variability of commercial melon cultivars using SSR molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, aug. 2017.
- CHENTOUFI, A.A.; KRITZER, E.; YU, D.M.; NESBURN, A.B.; BENMOHAMED, L. Towards a rational design of an asymptomatic clinical herpes vaccine: the old, the new, and the unknown. **Clinical and Developmental Immunology**. v.1, p.1–16, jan., 2012.
- CIRIMINNA, R; CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ. N.; HERNÁNDEZ, A. I. R.; PAGLIAR, M. Pectin: A new perspective from the biorefinery standpoint. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 9, n. 4, p. 368-377, mar., 2015.
- ESPIRÍTO- SANTO, A. P.; LAGAZZO, A.; SOUZA, A. L. P.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M. N. Rheology, spontaneous, whey separation, microstructure and sensorial of probiotic yoghurt enriched with passion fruit fiber. **Journal Food International**, v. 50, p. 224-231, jan. 2013.
- FIETZ, V. R.; SALGADO, J. M. Efeitos da pectina e na celulose nos níveis séricos do colesterol e triglicerídeos em ratos hiperlidêmicos. **Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.3, Campinas, 1999.
- FROBERT, E.; BURREL, S.; DUCASTELLE-LEPRETRE, S.; BILLAUD, G.; ADER, F.; CASALEGNO, J. S.; NAVE, V.; BOUTOLLEAU, D.; MICHALLET, M.; LINA, B.; MORFIN, F. Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: an update from a ten-year survey in France. **Antiviral research**, v. 111, p. 36-41, nov., 2014.
- FUJIWARA, M.; SAKAGUCHI, M.; BO-SONG, R. Y. A. N.; SATOSHI, T. O.; OSAKI, T. Effect of Figaren, an Antiviral Protein from *Cucumis figareii*, on Cucumber mosaic virus Infection. **Journal of General Plant Pathology**, v. 67, n. 2, p. 159-163, may, 2001.
- GAIA, Sâmya Daniele Cardoso. **Levantamento etnobotânico de frutas comercializadas no município de Tefé–Am**. 2017. Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade do Estado do Amazonas, 2017.
- GARCIA-MAS, J.; BENJAK, A.; SANSEVERINO, W.; BOURGEOIS, M.; MIR, G., GONZÁLEZ, V. M.; HÉNAFF, E.; CÂMARA, F.; COZZUTO, L.; LOWY, E.; ALIOTO,

T.; CAPELLA-GUTIÉRREZ, S.; BLANCA, J.; CAÑIZARES, J.; ZIARSOLO, P.; GONZALEZ- IBEAS, D.; RODRÍGUES, L. M.; DROEGE, M.; DU, L.; TEJADO, M. A.; GALDOS, B. L.; MELÉ, M.; YANG, L.; WENG, Y.; NAVARRO, A.; BONET, T. M.; ARANDA, M. A.; NUEZ, F.; PICÓ, B.; GABALDÓN, T.; ROMA, G.; GUIGÓ, R.; CASACUBERTA, J. M.; ARÚS, P.; PUIGDOMÉNECH, P. The genome of melon (*Cucumis melo* L.). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 29, p. 11872-11877, jul. 2012.

GODBOLE, M.; MURTHY, H. N. *In vitro* production of haploids via parthenogenesis in culinary melon (*Cucumis melo* var. *acidulus*). **Indian Journal of microbiology**. v. 12, p. 495-497. oct. 2012.

GONDA, I.; BAR, E.; PORTNOY, V.; LEV, S.; BURGER, J.; SCHAFFER, A. A.; TADMOR, Y.; GEPSTEIN, S.; GIOVANNONI, J. J.; KATZIR, N.; LEWINSOHN, E. Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. fruit. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 4, p. 1111-1123, mar., 2010.

GOTTLIEB, S. L.; GIERSING, B. K.; HICKLING, J.; JONES, R.; DEAL, C.; KASLOW, D. C. Meeting report: Initial World Health Organization consultation on herpes simplex virus (HSV) vaccine preferred product characteristics. **Vaccine**, March, 2017.

GELLER, M.; NETO, M. S.; RIBEIRO, M. G.; OLIVEIRA, L.; NALIATO, E. C.; ABREU, C.; SCHECHTMAN, R. C. Herpes simples: atualização clínica, epidemiológica e terapêutica. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 24, p. 260-266, 2012.

HAYET, E.; LIOUANE, K.; THABTI, F.; SKHIRI, F.; AOUNI, M.; MASTOUR, M. *In vitro* Anticandidal, Antiviral and Antioxidant Activities of *Cucumis melo* L. var. *cantalupensis* Naud Extracts. **Journal of Food and Nutrition Research**. v. 4, n.9, p.596-599, 2016.

JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, sept., 2005.

JIANG, Y. C.; FENG, H.; LIN, Y. C.; GUO, X.- R. New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. **International journal of oral science**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2016.

JORDAN, D. B.; BOWMAN, M. J.; BRAKER, J. D.; DIEN, B. S.; HECTOR, R. E.; LEE, C. C.; MERTENS, A. J.; WAGSCHAL, K. Plant cell walls to ethanol. **Biochemical Journal**, v. 442, n. 2, p. 241-252, feb. 2012.

KARAKAYA, S.; KAVAS, A.; EL, S. N.; GÜNDÜÇ, N.; AKDOGAN. Nutritive value of a melon seed beverage. **Food Chemistry**, v. 52, p. 139-141. 1995.

KERJE, T.; GRUM, M. The origin of melon, *Cucumis melo*: a review of the literature. In: **VII Eucarpia Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding 510**. 2000. p. 37-44.

LARDER, B.A.; DARBY, G. Selection and characterisation of acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 mutants inducing altered DNA polymerase activities. **Virology**; 146, 262–271, oct.1985.

LEBRETON-DECOSTER, C.; ROUSSELLE, P.; LAPERDRIX, C.; LUBRANO, C.;ROBIN, J.R.; COULOMB, B. Oligogalacturonides melhoram a organização de tecido de pele reconstruída *in vitro* . **International Journal Cosmetic Science**, v.33 : p.455-461, 2011.

LOPES, Nayara. **Avaliação da atividade antiviral de um polissacarídeo sulfatado de *Caesalpinia ferrea* e do flavonoide quercetina contra o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1)**, 2012. Dissertação, Universidade Estadual de Londrina. Londrina, Paraná.

MATZA-PORGES, S., EISEN, K.; IBRAHIM, H., HABERMAN, A.; FRIDLENDER, B.; JOSEPH, G.. A new antiviral screening method that simultaneously detects viral replication, cell viability, and cell toxicity. **Journal of virological methods**, v. 208, p. 138-143, nov. 2014.

MAXWELL, E. G.; BELSHAW, N. J.; WALDRON, K. W.; MORRIS, V. J. Pectin- An emerging new bioactive food polyssacaride. **Journal Trends in food Science & Tecnology**, v. 24, p. 64-73, apr. 2012.

MCCREADY, R. M. Pectin. In: Methods on food analysis, p.565- 595. Ed. M. A. Josly. Nem York: **Academic Press**, 1970. p. 845 .

MESBAHI, G.; JAMALIAN, J.; FARAHNAKY, A. A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 4, p. 731-738, july, 2005.

METTENLEITER, T. C. Budding events in herpesvirus morphogenesis. **Virus Research**, v.106, n.2, p.167-180, dec. 2004.

MILIND, P.; KAUR, S. Is bottle gourd a natural guard. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 6, p. 13-17, may. 2011.

MIYADA, T.; NAKAJIMA, A.; EBHARA, K. Iron bound to pectin is utilized by rats. **Bristsh Journal Nutrition**, n.103, p.73-78, jul., 2011.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 3, p. 266-277, jun. 2008.

NASEMANN, T. H.; WASSILEW, S. W. Vaccination for herpes simplex genitalis. **Sexually Transmitted Infections**, v. 55, n. 2, p. 121-122, 1979.

PAIVA, E. P.; LIMA, M.S.; PAIXÃO, J. A. Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. **Revista Iberoamericana de Polímero**, v. 10, n. 4, p. 196-211, jul., 2009.

PINTO, A. C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. D. S., LOPES, N. P., EPIFANIO, R. D. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PIRET, J.; BOIVIN, G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 459-472, feb. 2011.

POPOV, S. V.; MARCOV, P. A.; POPOVA, G. Y.; NIKITINA, I. R.; EFIMOA, L.; OVODOVY, Y. S. Anti-inflammatory activity of low and hightmethoxylated citrus pectin. **Journal Biomedicine & Preventive Nutrition**, v.3, p.59-63, sept., 2013.

RAHMAN, A. H. Bottle Gourd (*Lagenaria siceraria*)-a vegetable for good health. **Natural product radiance**, v. 2, n. 5, p. 249-250, oct. 2003.

RASHID, M. M. O.; AKHTER, K. N., CHOWDHURY, J. A.; HOSSEN, F.; HUSSAIN, M. S.;HOSSAIN, M. T. Characterization of phytoconstituents and evaluation of antimicrobial activity of silver-extract nanoparticles synthesized from *Momordica charantia* fruit extract. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 336, feb. 2017.

RECHENCHOSKI, D. Z.; FACCIN-GALHARDI, L. C., LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. Herpesvirus: an underestimated virus. **Folia microbiologica**, v. 62, n. 2, p. 151-156, nov. 2017.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D.M.; WHITLEY, R.J. Herpes simplex viruses. In: Knipe DM, Howley PM (eds) **Fields Virology**, 5th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 2502–2601, 2007.

SANTOS, Norma Suely de O.; ROMANOS, Maria Teresa Villela; WIGG, Marcia Dutra. **Viologia humana**. Terceira edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

SEBASTIANI, Maria Silvia; FICCADENTI, Nadia. In vitro plant regeneration from cotyledonary explants of *Cucumis melo* L. var. *cantalupensis* and genetic stability evaluation using RAPD analysis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 124, n. 1, p. 69-79, 2016.

SEYMOUR, G. B.; MCGLASSON, W. B. Melons. In: **Biochemistry of fruit ripening**. Springer, Dordrecht, 1993. p. 273-290.

SOUSA, André Luiz Nascimento de. **Extração, caracterização e modificação química da pectina do melão caipira (*Cucumis melo* var. *acidulus*)**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Ceará.

SOUSA, A. L.; RIBEIRO, A. C.; SANTOS, D. G.; RICARDO, N. M.; RIBEIRO, M. E.; CAVALCANTI, E. S.; CUNHA, A. P.; RICARDO, N. M. Chemical modification of common melon pectin (*Cucumis melo* var. *acidullus*). **Química Nova**, v. 40, n. 5, p. 554-560, jun. 2017.

SRIAMORNSAK, P. Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses: A Review. **Silpakorn University Journal**, v.3, p.206-228, 2003.

TUOPING, L.; SUHONG, L.; YINPING, D.; RUGANG, Z.; YONGHUI, L. Antioxidant activity of penta-oligogalacturonide, isolated from haw pectin, suppresses triglyceride synthesis in mice fed with a high-fat diet. **Food Chemistry**, v.145, p.335-341, feb., 2014.

TRINDADE, A.K. F.; QUEIROGA, A. S.; SILVA, D. S. C. D.; CAMPOS, S. E. M.; LUCENA, L. B. S. D.; SOUSA, E. M. D. D. Herpes simplex labial: um desafio terapêutico. **Comunicação Ciência e Saúde**, v.18, n.4, p.307-314, 2007.

TORRES, N. I.; CASTILLA, V.; BRUTTOMESSO, A. C.; EIRAS, J.; GALAGOVSKY, L. R.; WACHSMAN, M. B. *In vitro* antiviral activity of dehydroepiandrosterone, 17 synthetic analogs and ERK modulators against herpes simplex virus type 1. **Antiviral research**, v. 95, n. 1, p. 37- 48, july, 2012.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v.30, n. 2, p. 388-394, jul., 2007.

OH, J.; FRANSER, N. W. Temporal association of the herpes simplex virus (HSV) genome with histone proteins during a lytic infection. **Journal of Virology**, v. 86, p. 3530-3537, dec. 2008.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n.2 p. 326-337, 2006.

VLIETINCK, A.J. ; BERGHE D.A.V. Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? **Journal of Ethnopharmacology** v.32, p.141-153, 1991.

WANG, L.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; BLUNDER, M.; LIU, X.; MALAINER, C.; BLAZEVIC, T.; SCHWAIGER, S.; ROLLINGER, M. J.; HEISS, E. H.; SCHUSTER, D.; KOPP, B.; BAUER, R.; STUPPNER, H.; DIRSCH, V. M.; ATANASOV, A. G. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review. **Biochemical pharmacology**, v. 92, n. 1, p. 73-89, nov. 2014.

WANNANG, N. N.; EDE, S. O.; KWANASHIE, H. O. Antiviral activity of the fruit extract of *Cucumis metuliferus* E. meye (Cucurbitaceae) in chicks, **African Journal of Basic and Applied Sciences**, v.2, n.3-4,p. 89-93, 2010.

WAGSTAFF, A. J.; FAULDS, D.; GOA, K. L. Aciclovir. **Drugs**, v. 47, n. 1, p. 153-205, jan.,1994.

WEITGASSER, H. Controlled clinical study of the herpes antigens LUPIDON H and LUPIDON G. **Zeitschrift fur Hautkrankheiten**, v. 52, n. 11, p. 625-628, jun.,1977.

WHITAKER, T. W.; DAVIS, G. N. **Cucurbits: botany, cultivation, and utilization**. London: Leonard Hill, 1962, 250 p.

WHITLEY R.J. Herpes simplex virus. In: Scheld WM, Whitley RJ, Marra CM (eds) Infections of the central nervous system. **Lippincott Williams & Wilkins**, v. 4, p. 137–156, 2014.

WILSON, S. S.; FAKIOGLU, E.; HEROLD, B. C. Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 7, n. 5, p. 559-568, jan., 2009.

Objetivo

Geral

Avaliação da atividade antiviral *in vitro* e *in vivo* da pectina obtida do fruto de *Cucumis melo* var. *acidullus* contra Herpes simplex vírus -1.

Específico:

- Avaliação da citotoxicidade das pectinas ácida e sulfatada do *Cucumis melo* var. *acidullus* em células VERO (ATCC), pelo método brometo de dimetil-tiazolil-difeniltetrazolio (MTT);
- Análise da atividade antiviral de ambas as pectinas para Herpes simplex vírus cepas sensível (KOS) e resistente (AR- 29) ao aciclovir, através do método de plaque;
- Análise a influência das pectinas nas etapas tardias da replicação viral, pelo método de imunofluorescência e reação em cadeia da polimerase;
- Determinação dos índices de seletividade (IS) das pectinas;

Article

The activity of *Cucumis melo* pectin in herpes simplex virus infection

Karoline F. Agostinho^a, Daniele Z. Rechenchoski^a, Ligia C. Faccin-Galhardi^a, André L.N. Sousa^b, Arcelina P. Cunha^b, Nágila M.P.S. Ricardo^a, Rosa E.C. Linhares^a, Carlos Nozawa^{a*}.

^aDepartamento de Microbiologia, CCB, Universidade Estadual de Londrina, 86051-990, Londrina, PR, Brasil. ^bDepartamento de Química Orgânica e Inorgânica. CC, Universidade Federal do Ceará, 60740-903, Fortaleza, CE, Brasil.

*Corresponding autor. +55 43 33714617, cnoz@uel.br

Abstract

The infection by herpes simplex virus (HSV) represents a remarkable medical and social burden with high seroprevalence worldwide. Acyclovir (ACV) is the drug of choice, however, the occurrence of resistant strains is increasing and the search for alternative drugs has been encouraged. Herein, we proposed to evaluate the effect of the *Cucumis melo* var. acidullus pectin in the HSV-1 infection. The acidic (APC_m) and sulfated (SPC_m) forms of pectin were studied. The cytotoxic and the antiviral activities were performed in Vero cells by MTT method and plaque reduction assay, respectively. The *in vivo* test was performed in Balb/c mice. The 50% cytotoxic concentrations (CC₅₀) of the APC_m and SPC_m were, respectively, > 2000 µg/mL and 1440 µg/mL. The APC_m 50% inhibitory concentrations (CI₅₀) for the HSV-1 strains KOS (ACV sensitive) and AR (ACV resistant) were 90 µg/mL and 86.5 µg/mL, respectively. The SPC_m CI₅₀ were, respectively, 6 µg/mL for KOS strain and 12 µg/mL for AR strain. The greatest selectivity index (IS) of 240 was demonstrated for SPC_m with KOS strain and based in these results we demonstrated that SPC_m inhibited the strain at the initial steps of the replication. Inhibition of the virus protein and DNA syntheses was also shown. The *in vivo* assay strengthened the positive effect of SPC_m attenuating the lesions of the AR-29 strain in mice. Therefore, we showed that SPC_m is a potential candidate for the development of an alternative compound to control HSV infection.

Keywords: *Cucumis melo*; pectin; herpes simplex virus

1. Introduction

The herpes simplex virus (HSV), a double-stranded DNA virus, belongs to the family *Herpesviridae* and genus *Simplexvirus*. Is the causal agent of human infection with high incidence worldwide and, therefore, of medical importance (Roizman et al., 2007; Jiang et al., 2016). It is estimated a global seroprevalence of 90% and 16% for HSV-1 and HSV-2, respectively (Bernstein et al., 2013; Quenelle et al., 2018). The establishment of latency in sensory neurons ganglia is the main feature of the infection (Whitley & Roizman, 2001; Balasubramaniam et al., 2014). The treatment of choice with acyclovir (ACV) has been used as a reference since the 1980s. However, its indiscriminate use may be one of the factors for the selection of ACV-resistants (Frobert et al., 2008). Naturally occurring drugs represent an inexhaustible source of possibilities and the research and developments of these products have been encouraged. *Cucumis melo* (*C. melo*), a cucurbit, known as melon, is an important commodity, particularly in the Brazilian northeast region (Alvarez, 1997). Several biological and medicinal properties have been attributed to the genus *Cucumis* (Fujiwara et al., 2001; Beloin et al., 2005; Wannang et al., 2010; Amagon et al., 2012; Hayet et al., 2016; Rashid et al., 2017; Anyanwu et al., 2017). Presently, we evaluated the *in vitro* and *in vivo* anti-HSV-1 activity of *C. melo* var. acidullus fruit pectin.

2. Materials and Methods

2.1. Pectin:

The acidic (APC_m) and sulfated pectin (SPC_m) were prepared from the pulp of *C. melo* var. acidullus (*caipira* melon), according to Koubala et al. (2008). Briefly, 300 mg of lyophilized APC_m (Sousa et al., 2017) was sulfated (SPC_m) by adding to 80 mL of pyridine and N,N-dimethylformamide (50:30 [v/v]) and kept under stirring for 12 h at 25 °C, followed by cooling at 4 °C for 12 h. After heating to 80 °C under stirring, 7.0 mL of chlorosulfonic acid was slowly added, followed by cooling to 25 °C and neutralized with saturated sodium bicarbonate. Followed by dialysis in 12 k membrane for 120 h and lyophilized (O'Neill, 1955; Ono et al., 2003). The lyophile was reconstituted at 2.0 mg/mL (stock solution) with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (*Invitrogen-Gibco, USA) and maintained at -20 °C.

2.2. Cells and virus:

Vero cells (African green monkey kidney epithelium cells - ATCC CCL-81), supplemented with 5% fetal bovine serum (*), 3 mM glutamine (*), 100 µg/mL streptomycin (**Sigma Chem. Co., USA), 100 µg/mL penicillin (Novafarma Ind. Farm, BR) and 2.5 µg/mL amphotericin B (Meizler Biopharma S/A, BR) were used throughout. Stock of HSV-1 KOS and AR-29, respectively, ACV-susceptible and resistant strains, provided by DACB/UEM, were prepared and maintained at -20 °C with 10% glycerol. Viral titer was calculated by plaque assay (PA) (Rovozzo, 1973).

2.3. Pectin cytotoxicity assay

The APC_m and SPC_m cytotoxicity was performed by the MTT (dimethylthiazolyl-diphenyltetrazolium bromide) assay. Confluent cell cultures in 96-well microplates (Falcon, USA) were treated with pectin concentrations (50 µg/mL to 2000 µg/mL) and incubated for 72 h at 37 °C. Subsequently, the supernatant was replaced with 10 µL of the MTT reagent (1.25 µg/mL), followed by incubation for 3 h and the addition of 90 µL of MTT solubilizing solution under agitation for 15 min. Optical density readings at 570 and 690 nm were done. The percent cell viability (% CV) was calculated by the formula % CV = [100-(At/Ac)x100], where At and Ac refer to the absorbance of pectin and cell control, respectively (Yamamoto et al., 2013). The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was defined as the concentration of the pectin capable of reducing the optical density of the MTT product by 50%, comparatively to the cell control, by linear regression of the generated curve.

2.4. Pectin antiviral activity by plaque assay

Confluent cell cultures in 24-well microplates (TPP, Switzerland) were inoculated simultaneously (time 0 h) with KOS (10⁵ UFP/mL) and AR-29 (10⁴ UFP/mL) strains and treated with varying concentrations of APC_m (400 µg/mL - 50 µg/mL) and SPC_m (400 µg/mL - 0.35 µg/mL), followed by the addition of nutrient agarose (DMEM 2x/1.8% agarose [v/v] added of 25 mM MgCl₂) and incubation at 37 °C for approximately 80 h. Cells infected and treated with ACV (Zynvir – Novafarma Ind. Farm. Ltda, BR) and other controls were prepared. Subsequently, cells were fixed with 10% formaldehyde and stained with 0.5% crystal violet (Lopes et al., 2013). Plaques were counted and the percentage of viral inhibition (% VI) calculated according to the formula %VI = [1 – (UFP test/UFP

control)] x100 (Nishimura et al., 1997). The 50% inhibitory concentration (IC_{50}), defined as the concentration of the pectin capable of reducing the UFP by 50%, was calculated by linear regression of the generated curve. The selectivity index (SI) was expressed by the ratio of CC_{50}/IC_{50} (Cheng et al., 2004; Zhu et al., 2004).

2.4.1. Time-of-addition assay of *SPCm* for KOS strain:

Cells cultured in 24-well microplates were treated with varying concentrations of *SPCm* (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), before (-3 h) and after the infection (+1, +3, +6 and +18 h), according to Su et al. (2008), with modifications. For pre-infection treatment, the excess of the substance was removed after incubation, to cells infected with the KOS strain (10^5 UFP/mL), followed by PA (Yang, et al., 2003). For post-infection treatment, the cells were infected and after incubation the inocula were removed and the cells treated at the times of 1, 3, 6 and 18 post-infection.

2.4.2. Inhibition of adsorption assay:

Cells cultured in 24-well microplates were incubated at 4 °C for 30 min, infected with the KOS strain (10^5 UFP/mL) and simultaneously treated with *SPCm* at concentrations of 100 to 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, followed by incubation for 1 h, at 4 °C and subsequently submitted to PA (Minari et al., 2011).

2.4.3. Virucidal assay:

SPCm at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were maintained in contact with the KOS strain suspension (10^4 UFP/mL) for 1 h at 37 °C, followed by dilution to the tenth, inoculation in cells cultures in 24-well microplates and submitted to PA. (Godoi et al., 2014).

2.4.4. Immunofluorescence assay (IFA):

Cells established in glass coverslips in 24-well microplates were simultaneously infected with the KOS strain (10^5 UFP/mL) and treated with *SPCm* at varying concentrations (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated at 37 °C for 24 hours. The cells were fixed (ice-cold acetone) treated with 2% powdered skimmed milk and, subsequently, submitted to anti-HSV-1 mouse serum (Santa Cruz Biotechnol., USA). After washes with buffered Tween-20, cells were treated with goat anti-mouse IgG-FITC (**). Cells were

observed in a UV microscope (Zeiss Axio Imager A1) and the percentage of the reduction in the number of cells with specific fluorescence (total of 100 cells per field) was computed in comparison to the control of infected and untreated cells, in at least three fields (Faccin et al. 2007).

2.4.5. Polymerase chain reaction (PCR):

Cell cultures were simultaneously infected with the KOS strain and treated with *SPCm* at varying concentrations (400 µg/mL - 50 µg/mL) and incubated at 37 °C for 24 h. In parallel, simultaneous treatment with 1.0 mg/mL ACV and the respective virus and cell controls were prepared. DNA was extracted with the QIAamp® DNA Blood Mini kit (Qiagen, Germany) and PCR was prepared using 2 pmol of the primers: F - CATCGAAACCCACTTTCCCGAACA e R – GCTGTCGCATTTGGCGGCAA of the gene *UL52* (240 pb) (Invitrogen, Life Technologies, GB*), 0.4 mM of dNTP (*), 2 mM KCl, 0.6 mM MgCl₂, 0.2 *Taq* DNA polimerase (*), 3 µl of DNA extracted and sufficient quantity to 20 µL of ultrapure water. The reaction was programmed according to Su et al., 2008 apud Bomfim, 2014, consisting of 94 °C - 4 min, 35 cycles of 94 °C - 30 sec, 55 °C - 30 sec, 72 °C for 1 min and 7 min extension at 72 °C. The product of PCR (10µL) was resolved in 12% polyacrylamide gel electrophoresis.

3. *In vivo* antiviral activity:

The experiment was carried out with 35-day-old male Balb/c mice (BC/UEM, PR) (UEL Animal Ethics Committee approval n° 24414.2015.49), fed with regular diet and maintained at 22 °C. Six groups with five animals each (G1-6) were used for infection with the KOS and AR-29 strains and treatment with *SPCm* only. G1 (KOS-infected and untreated animals – virus control); G2 (KOS-infected and treated with *SPCm* at 12 µg/mL); G3 (KOS-infected and treated with topical ACV [50 mg/g]), G4 (AR-29-infected and untreated animals – virus control), G5 (AR-29-infected and treated with *SPCm* at 12 µg/mL); G6 (AR-29-infected and treated with topical ACV [50 mg/g]). Dorsal hairs were removed after intraperitoneal anesthesia (ketamine [10 mg/mL] and xylazine [4 mg/mL]) and locally scarified with hypodermic needle after topical isoflurane anesthesia. Mice were infected with 70 µL of KOS or AR-29 strains and 4 h latter treated with 50 µL of *SPCm* and ACV. The same treatment was repeated during 8 days with 4 daily applications at 3 h

intervals (Nocchi et al., 2017 with minor changes). The animals were daily observed and lesions scored from zero to five, being zero - nil; 1 - vesicles; 2 - erosion and/or ulceration; 3 - mild zosteriform lesions; 4 - moderate zosteriform lesions; 5 - severe zosteriform lesions or death. The results represent the mean of the scores (Bag et al., 2013).

4. Statistical analysis:

Anova followed by Tukey's test (BioEstat 5.0 for Windows XP, 2007) were applied to determine the difference among experiments with the polysaccharides and control groups. The *in vitro* experiments were carried out in triplicate. Values of $p < 0.05$ were considered significant. The *in vivo* experiments were analyzed according Anova followed by Tukey's test too. The results were considered significant values above of $p < 0,05$.

5. Results:

5.1 Antiviral activity in cell culture:

Table 1 shows the CC_{50} , IC_{50} and SI of *SPCm* and *APCm*. Both *SPCm* and *APCm* presented high CC_{50} 1440 $\mu\text{g/mL}$ and above 2000 $\mu\text{g/mL}$, respectively. *SPCm* showed the best antiviral effect to KOS strain with corresponding IC_{50} and SI of 6 $\mu\text{g/mL}$ and 240, respectively. Herein, subsequent assays were performed with *SPCm* and the KOS strain only.

Tab. 1. Cytotoxic concentration 50% (CC_{50}), inhibitory concentration 50% (IC_{50}) and selectivity index (SI) of the *C. melo* sulfated (*SPCm*) and acid (*APCm*) pectins for the HSV-1 KOS and AR-29 strains, in Vero cell culture. Positive control - acyclovir (ACV).

Strains	<i>PCm</i>						ACV		
	<i>SPCm</i>			<i>APCm</i>			CC_{50}	IC_{50}	SI
	CC_{50}^a	IC_{50}^b	SI^c	CC_{50}	IC_{50}	SI			
KOS	1440	6	240	>2000	90	>22.22	>2000	0.135	>14814
AR-29	1440	12	95.23	>2000	86.5	>23.12	>2000	-	-

^{a, b} $\mu\text{g/mL}$

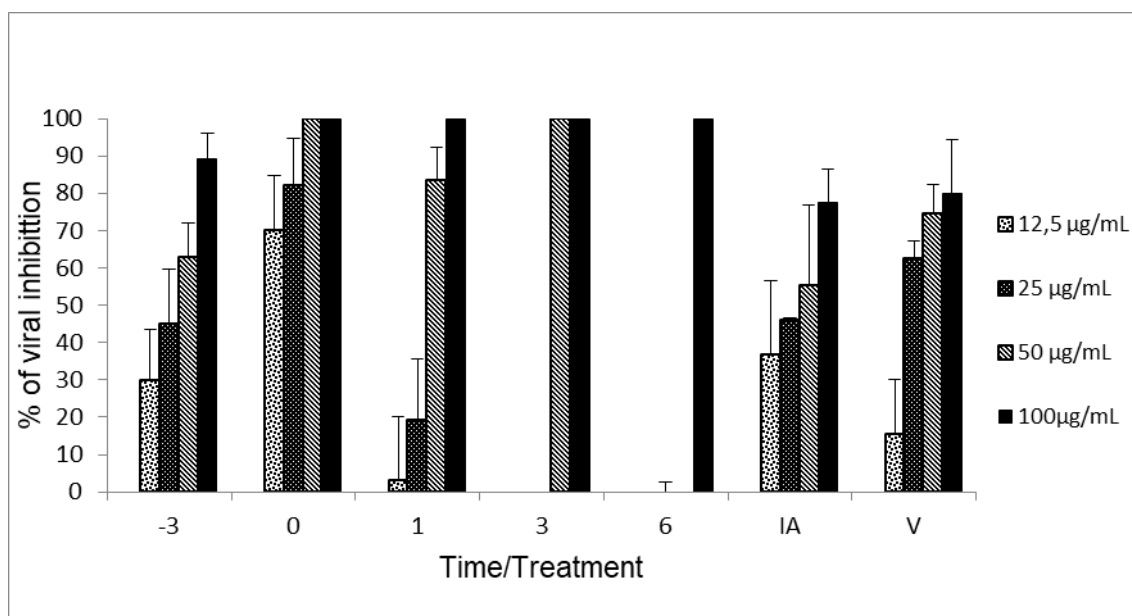
^c CC_{50}/IC_{50}

5.2 *SPCm* time-of-addition assay:

Figure 1 shows the inhibition of KOS strain by *SPCm* in the time-of-addition assay. Cells submitted to *SPCm* treatment 3h prior infection (-3 h) resulted in percentages of

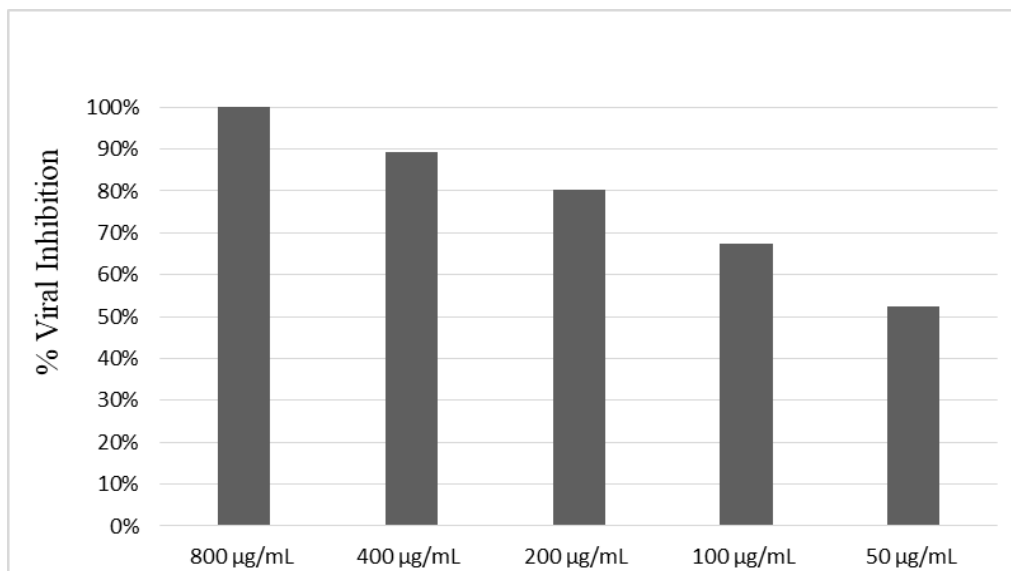
inhibition from 90 to 30, at the highest and the lowest concentrations (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectively. The highest inhibition was found with cells treated simultaneously with the infection (zero h) at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. High percentages of inhibition (70% and 82%) were also found at the lowest concentrations (12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Treatment at 1 h post-infection (pi) showed maximum inhibition at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and, approximately, 83.6% at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. At 3 h pi treatment, maximum inhibition was observed at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, however, maximal inhibition was observed at 6 h pi at maximal concentration. No inhibition was detected for treatment performed at 18 h pi (not shown). SPCm inhibited viral adsorption by 55.2% and 77.6%, respectively, at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In the virucidal assay the inhibition was 80%, 62.7% and 74.5% for the concentrations of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

Fig. 1. The percentage of HSV-1 KOS strain inhibition by sulfated *C. melo* pectin (SPCm) at the indicated concentrations. It is shown the time-of-addition assay (at the indicated times), the inhibition of adsorption (IA) and virucidal (V) assays, by plaque assay in Vero cells.



The figure 2 shows the inhibition of SPCm in the synthesis of protein of KOS strain as assayed by IFA. The percentage of the inhibition was demonstrated by the reduction of fluorescent foci of 52.3% to 100%, at the lowest (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the highest (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) concentrations, respectively.

Fig. 2. The inhibition of HSV-1 KOS strain protein synthesis by *C. melo* sulfated pectin (SPC_m). The percentage of virus inhibition is the representation of the reduction of fluorescent foci, at the indicated concentrations, by immunofluorescence assay.



The effect of the SPC_m in the nucleic acid synthesis of KOS strain is shown in figure 3. The results demonstrated that SPC_m inhibited the replicon of the *UL52* gene at the concentrations of 400 µg/mL and 200 µg/mL, but not at 100 µg/mL and 50 µg/mL.

Fig. 3. Effect of the sulfated pectin of *C. melo* (SPC_m) in the synthesis of HSV-1 KOS strain nucleic acid by the inhibition of the replicon of *UL52* gene, at the indicated concentrations (µg/mL). MW, CC, CV, ACV represent, respectively, molecular weight standard, cell control, virus control and acyclovir positive control. The PCR product (240 pb) was resolved in a 12% polyacrylamide gel electrophoresis.



6. The effect of SPC_m in the *in vivo* infection of KOS and AR-29 strains

Figure 4 shows the effect of SPC_m (12 µg/mL) in the *in vivo* infection of KOS strain. G1 (infected and untreated) and G2 (infected and treated) animals groups showed

vesicular lesions (grade 1), on the second day of the experiment. From the fourth day, grade 1 lesions progressed to the ulcerative stage (grade 2). The lesions of G1 animals evolved to mild zosteriform type (grade 3) on the fifth day, and moderate zosteriform type (grade 4) on the sixth day. The G2 animals presented grade 2 lesions until the fifth day and evolved to grade 3 lesions at the end of the experiment. The G3 group (infected and treated with ACV) developed ulcerative lesions from the second day and demonstrated resolution of the lesions on the third day, without progressing to the zosteriform lesions.

Fig. 4. The effect of the *C. melo* sulfated pectin (SPC_m) in Balb/c mice infected with the HSV-1 KOS strain. Results are shown as the mean of the lesion scores (1 to 5) in the animals (n = 5) of the groups, according to the time of the experiment.

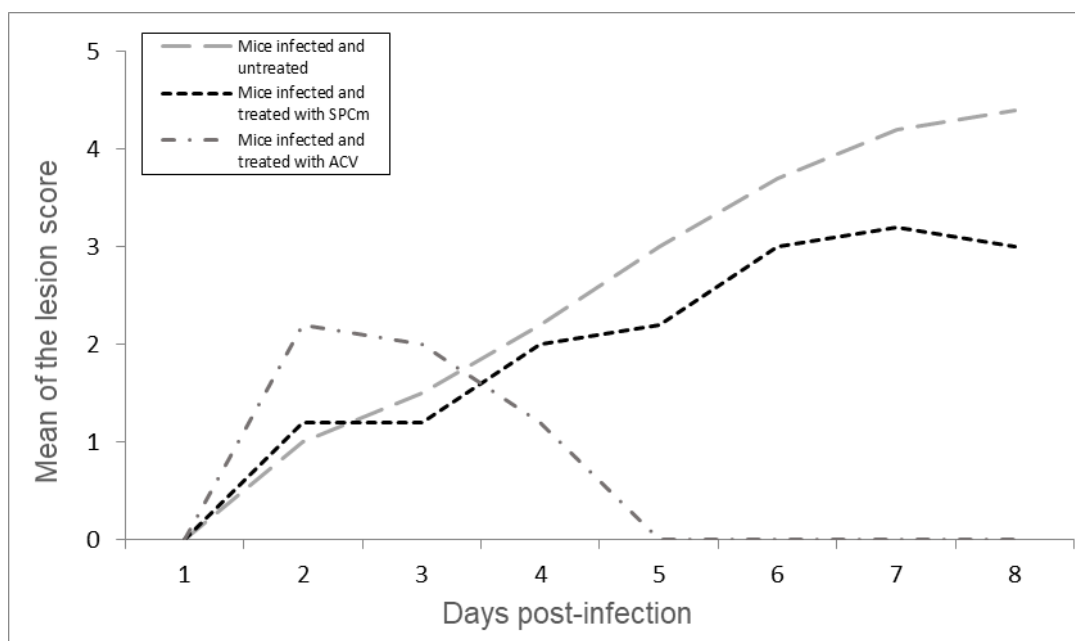
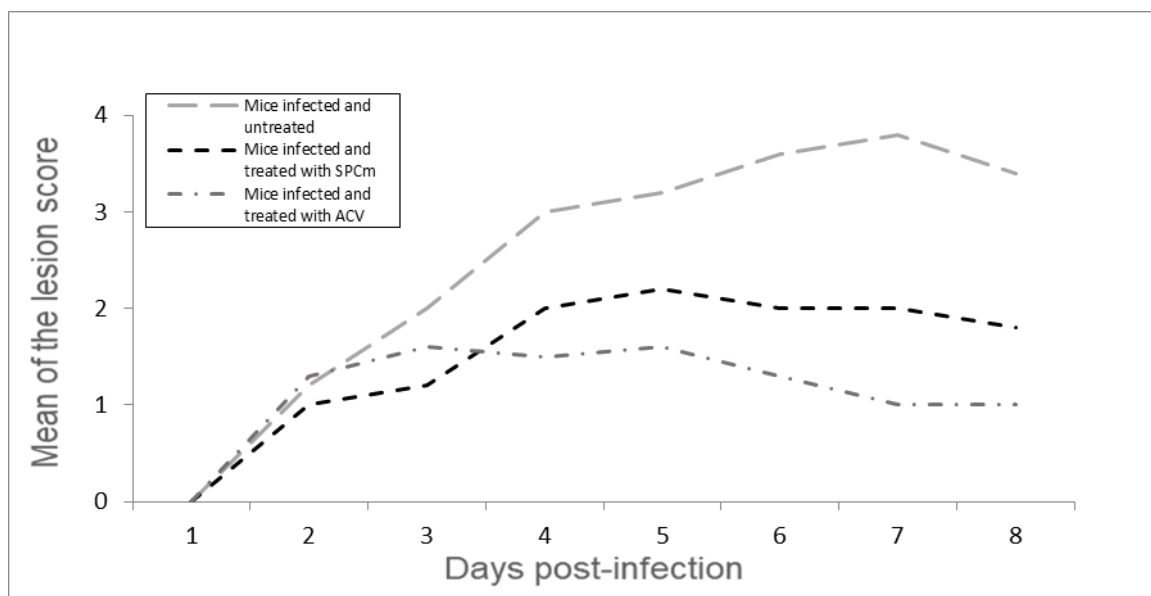


Figure 5 shows similar experiment (SPC_m at 12 µg/mL) but with AR-29 strain infection. Vesicular lesions were also observed on the second day of the infection for animals of the G4 (infected and untreated), G5 (infected and treated) and G6 (infected and treated with ACV) groups. The G4 animals rapidly evolved to mild zosteriform lesions on the fourth day, with a slight exacerbation until the seventh day, followed by a slight retrieve of the lesions. The G5 animals developed grade 2 lesions from the fourth day of infection and remained unchanged until the end of the experiment. The G6 animals did not

even develop ulcerative lesions, presented vesicular lesions only, without resolution until the end of the experiment.

Fig. 5. The effect of the *C. melo* sulfated pectin (SPC_m) in Balb/c mice infected with the HSV-1 AR-29 strain. Results are shown as the mean of the lesion scores (1 to 5) in the animals (n = 5) of the groups, according to the time of the experiment.



6. Discussion and conclusion

It is known that polysaccharides from a variety of natural sources have been shown to present antiviral activity (Gonzalez et al., 1987). Although some Cucumis species have been reported as antivirals, this is the first time that we demonstrated pectin of *Cucumis melo* var. *acidullus* inhibiting the *in vitro* and *in vivo* HSV-1 infection. Extract of *C. figaro* and *C. metuliferus* inhibited the replication of Cucumber Mosaic Virus (Fujiwara et al., 2001) and Newcastle Disease Virus (Wannang et al., 2010), respectively. Similarly, *C. metuliferus* blocked the replication of Bursa Disease Virus (Amagon et al., 2012; Anyanwu et al., 2017). Hayet et al. (2016) reported the inhibition of human cytomegalovirus with ethanol and aqueous extracts of *C. melo* var. *cantaloupensis*. *C. sativus* extract was shown not to interfere with the replication of HSV-1 (Matza-Porges et al., 2014).

In our work, acidic (APC_m) and chemically sulphated derivative (SPC_m) forms of *C. melo* pectins showed low cytotoxic effect. HSV-1 KOS and AR-29 strains were inhibited with low concentrations of SPC_m with high selectivity, *in vitro*. Herein, the

experiments were performed with the SPC m with KOS strain. It is presumed that *pectin* is structurally and functionally the most complex polysaccharide in nature found in plant cell walls. Probably the biological reactivity of pectin relies upon its complex structure and the polyanionic character of the polysaccharide. Evidences demonstrate that the presence of sulphate radical in polysaccharides, whether native or chemically modified, improves their various biological activities (Harden et al., 2009; Sun et al., 2009; Kim et al., 2011; Sousa et al., 2017). We have found that SPC m inhibited HSV-1 replication with greater intensity in the initial phases of virus replication, especially at the time zero hour, where cells treatment was simultaneously to the infection. The anionic property itself was shown to be a potent feature for the inhibition of herpes virus binding to host cells, competing with viral glycoproteins (Ghosh et al., 2009; Witvrouw & De Clercq, 1997). Moreover, our finding is in accordance with the understanding that sulfation confers better antiviral activity to polysaccharides (Ghosh et al., 2009). Our result is also in agreement with reports demonstrating that sulfated derivative polysaccharides from plants, mushroom and algae were more effective as antiviral, than their native forms, for Dengue virus, HSV, bovine herpesvirus, HIV, human cytomegalovirus, respiratory syncytial virus and poliovirus (Saha et al., 2010; Jiao et al., 2011; Cardozo et al., 2011; Faccin-Galhardi et al., 2012; Yamamoto et al., 2013; Jin et al., 2015; Lopes et al., 2017). SPC m also exerted lower inhibition as virucidal and blocking virus adsorption. The virucidal effect may be due to modifications or degradation of viral envelope or the interaction viral glycoproteins and in both cases, preventing virus attachment to cell surface, irreversibly.

Secondary inhibitory effect of SPC m was also observed in pre-infection treatment. The prophylactic action could be due its interaction with cell receptors, blocking virus adsorption. It is also possible that SPC m stimulates the production of interferon eliciting the antiviral state (Merigan and Finkelstein, 1968; De Clercq and Luczak, 1976; Gonzalez et al., 1987; Huheihel et al., 2002; Ghosh et al. 2009). Inhibition of adsorption may occur through the interaction of pectin with cell receptors preventing viral adsorption to the cells (Ghosh et al., 2009; Dong et al., 2011; Lopes et al., 2013; Lopes et al. 2015).

Inhibition of KOS strain protein synthesis as well as inhibition of the *UL52* gene transcript also demonstrated that the antiviral effect of SPC m exceeds the initial steps of viral replication but affects the synthesis of early and late proteins, similarly as shown by Cardozo et al., 2011; Jin et al. 2015; Lopes et al. 2015. *In vivo* SPC m presented inhibitory

effect for both strains, however, a better effect was demonstrated in the attenuation of lesions caused by the ACV-resistant AR-29 strain.

In conclusion, we demonstrated that *C. melo* pectin inhibited the *in vitro* and *in vivo* HSV-1 infection encouraging further studies of this potential compound candidate for the control of HSV infection.

Acknowledgements

The authors thank to CAPES (finance code 001), CNPq, Fundação Araucária and UEL for financial support.

References

- ALVAREZ, J. M. Tendencias de la mejora genética del melón. In: VALLESPER, A. N. (coord.). Barcelona: Ediciones de Horticultura, 1997. p. 25-34. (Competendions de Horticultura 10).
- AMAGON, K. I.; WANNANG, N. N.; ILIYA, H. A.; IOR, L. D.; CHRIS-OTUBOR, G. O. Flavonoids extracted from fruit pulp of *Cucumis metuliferus* have antiviral properties. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v.2, n.4, p.249-258, oct., 2012.
- ANYANWU, A. A.; JIMAM, N. S.; OMALE, S.; WANNANG, N. N. Antiviral activities of *Cucumis metuliferus* fruits alkaloids on Infectious Bursal Disease Virus (IBDV). **The Journal of Phytopharmacology**, v.6, n.2, p.98-101, jun. 2017.
- BAG, P.; OJHA, D.; MUKHERJEE, H.; HALDER, U. C.; MONDAL, S.; CHANDRA, N. S.; NANDI, S.; SHARON, A.; SARKAR, M. C.; CHAKRABARTI, S.; CHATTOPADHYAY, D. An indole alkaloid from a Tribal folklore inhibits immediate early event in HSV-2 infected cells with therapeutic efficacy in vaginally infected mice. **PLoS One**, v. 8, n. 10, oct. 2013.
- BERNSTEIN, D.I.; BELLAMY, A.R.; HOOK III, E.W.; LEVIN, M.J.; WALD, A., EWELL, M.G.; WOLFF, P.A.; DEAL, C.D.; HEINEMAN, T.C.; DUBIN, G.; BELSHE, R.B. 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, feb. 2013.
- BALASUBRAMANIAM, R.; KUPERSTEIN, A.S.; STOOPLER, E.T. Update on oral herpes virus infections. **Dental Clinics North Am.** n.58, p.265–280, apr. 2014.
- BELOIN, N.; GBEASSOR, M.; AKPAGANA, K.; HUDSON, J.; SOUSSA, K.; KOUMAGLO, K.; ARNASON, J. T. Ethnomedicinal uses of *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) in Togo and relation to its phytochemistry and biological activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2, p. 49-55, 2005.
- BOMFIM, W. A. **Estudo do efeito citopático de isolados clínicos de vírus Herpes simplex e suscetibilidade ao aciclovir**. 2014. 38pg. Trabalho de conclusão de curso em ciências biológicas. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, 2014.
- CARDOZO, F. T. G. S.; CAMELINI, C. M.; MASCARELLO, A.; ROSSI, M. J.; NUNES, R. J.; BARARDI, C. R. M.; MENDONÇA, M. M.; SIMÕES, C. M. O. Antiherpetic

activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis mycelia*. **Antiviral research**, v. 92, n. 1, p. 108-114, 2011.

CHENG, H.Y.; LIN, T. C.; YANG, C.M.; K.C. WANG, K. C.; LIN, L.T.; LIN, C.C. Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits both virus entry and late stage replication of herpes simplex virus type 2 *in vitro*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n.53, apr. 2004.

DONG, C.; HAYASHI, K.; MIZUKOSHI, Y.; LEE, J.; HAYASHI, T. Structures of acidic polysaccharides from *Basella rubra* L. and their antiviral effects. **Carbohydrate Polymers**, v.84 p.1084–1092, jan., 2001.

DE CLERCQ, E.; LUCZAK, M. Antiviral activity of carbopol, a cross-linked polycarboxylate. **Archives of virology**, v. 52, n. 1-2, p. 151-158, 1976.

FACCIN, L. C.; BENATI, F.; RINCÃO, V. P.; MANTOVANI, M. S.; SOARES, S. A.; GONZAGA M. L.; C. NOZAWA, C.; CARVALHO LINHARES, R. E. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. **Letters in applied microbiology**, v. 45, n. 1, p. 24-28, apr. 2007.

FACCIN-GALHARDI, L. C.; YAMAMOTO, K.A.; RAY, S.; RAY, B.; LINHARES, R.E.C.; NOZAWA, C. The *in vitro* antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 86-90, 2012.

FUJIWARA, M.; SAKAGUCHI, M.; BO-SONG, R. Y. A. N.; SATOSHI, T. O.; OSAKI, T. Effect of Figaren, an Antiviral Protein from *Cucumis figarei*, on Cucumber mosaic virus Infection. **Journal of General Plant Pathology**, v. 67, n. 2, p. 159-163, may, 2001.

FROBERT, E.; CORTAY, J. C.; OOKA, T.; NAJIOULLAH, F.; THOUVENOT, D.; LINA, B. Genotypic detection of aciclovir-resistant HSV-1: characterization of 67 ACV – sensitive and 14 AVC- resistant viruses. **Antiviral Research**. v. 79, p. 28-36, 2008.

GHOSH, T.; CHATTOPADHYAY, K.; MARSCHALL, M.; KARMAKAR, P.; MANDAL, P.; RAY, B. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure–activity analysis to clinical evaluation. **Glycobiology**, v. 19, n. 1, p. 2-15, 2009.

GODOI, A. M.; FACCIN-GALHARDI, L. C.; LOPES, N.; RECHENCHOSKI, D. Z.; ALMEIDA, R. R.; RICARDO, N. M. S.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Antiviral Activity of Sulfated Polysaccharide of *Adenantha pavonina* against Poliovirus in HEp-2 Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Brasil, v. 2014, p. 1-7, jul 2014.

GONZALEZ, M.; ALARCON, B.; CARRASCO, L. 1987. Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 31, n. 9, p. 1388-1393, 1987.

HAYET, E.; LIOUANE, K.; THABTI, F.; SKHIRI, F.; AOUNI, M.; MASTOUR, M. In vitro Anticandidal, Antiviral and Antioxidant Activities of *Cucumis melo* L. var. cantalupensis Naud Extracts. **Journal of Food and Nutrition Research**. v. 4, n.9, p.596-599, 2016.

HUHEIHEL, M.; ISHANU, V.; TAL, J.; ARAD, S.M. Activity of Porphyridium sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v.50, p.189-200, 2002.

HARDEN, E.A.; FALSHAW, R.; CARNACHAN, S.M.; KERN, E.R.; PRICHARD, M.N. Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 83, p. 282-289, 2009.

JIANG, Y.C.; FENG, H.; LIN, Y.C.; GUO, X.R. New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. **International Journal Oral Science**, n.8, p.1-6, mar. 2016.

JIN, F.; Zhuo, C.; HE, Z.; WANG, H.; LIU, W.; ZHANG, R.; WANG, Y. Anti-herpes simplex virus activity of polysaccharides from *Eucheuma gelatinae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 453-460, 2015.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine drugs**, v. 9, n. 2, p. 196-223, 2011.

KIM, J.K.; CHO, M.L.; KARNJANAPRATUM, S.; SHIN, I.S; YOU, S.G. *In vitro* and *in vivo* immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 49, p.1051-1058, 2011.

KOUBALA, B. B.; KANSCI, G.; MBOME, L. I.; CRÉPEAU, M.-J.; THIBAUT, J.-F.; RALET, M.-C. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1345, 2008.

LOPES, N.; FACCIN-GALHARDI, L. C.; ESPADA, S. F.; RICARDO, N. M. P. S.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, n. 1, p. 93-99, sep.2013.

LOPES, N.; FACCIN-GALHARDI, L.C.; NOZAWA, C.; LINHARES, R.E.C. Antivirais Naturais. In: YAMADA-OGATTA, S. F., NAKAZATO, G., FURNALETTO, M., & NOGUEIRA, M. (Orgs.). **Tópicos Especiais em Microbiologia**.1 ed. Londrina, 2015. Cap 13, p. 200-212.

LOPES, N.; RAY, S., ESPADA, S. F.; BOMFIM, W. A., RAY, B., FACCIN-GALHARDI, L. C., LINHARES, R. E.; NOZAWA, C. Green seaweed *Enteromorpha compressa* (Chlorophyta, Ulvaceae) derived sulphated polysaccharides inhibit herpes simplex virus. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 605-612, sep. 2017.

MATZA-PORGES, S.; EISEN, K.; IBRAHIM, H.; HABERMAN, A.; FRIDLENDER, B.; JOSEPH, G. A new antiviral screening method that simultaneously detects viral replication, cell viability, and cell toxicity. **Journal of virological methods**, v. 208, p. 138-143, nov., 2014.

MERIGAN, T., C.; FINKELSTEIN, M., S. Interferon-stimulating and in vivo antiviral effects of various synthetic anionic polymers. **Virology**, v. 35, n. 3, p. 363-374, 1968.

MINARI, M. C.; RINCÃO, V. P.; SOARES, S. A.; RICARDO, N. M. P. S.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Antiviral properties of polysaccharides from *Agaricus brasiliensis* in the replication of bovine herpesvirus 1. **Acta Virologica**, v. 55, n. 3, p. 255-259, jan. 2011.

O'NEILL, A. N. Sulphated derivatives of laminarin. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 1097-1101, 1955.

ONO, L.; WOLLINGER, W.; TEREZINHA, I.; COIMBRA, L. M.; GORIN, P. A. M.; SIERAKOWSKI, M-R. *In vitro* and *in vivo* antiviral properties of sulfated galactomannans against yellow fever virus (BeH111 strain) and dengue 1 virus (Hawaii strain). **Antiviral research**, v. 60, n. 3, p. 201-208, 2003.

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.

NOCCHI, S. R.; MOURA-COSTA, G. F.; NOVELLO, C. R.; RODRIGUES, J.; LONGHINI, R.; MELLO, J. C. P.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; UEDA-NAKAMURA, T. Antiviral activity of crude hydroethanolic extract from *Schinus terebinthifolia* against Herpes simplex Virus Type 1. **Planta medica**, v. 234, n. 06, p. 509-518, apr.- jun. 2017.

QUENELLE, D.C.; BIRKMANN, A.; GOLDNER, T.; PFAFF, T.; ZIMMERMANN, H.; BONSMANN, S; COLLINS, J.; RICE, T. L.; PRICHARD, M. N. Efficacy of pritelivir and acyclovir in the treatment of herpes simplex virus infections in a mouse model of herpes simplex encephalitis. **Antiviral Research**, v. 149, p. 1-6, jan. 2018.

RASHID, M. M. O.; AKHTER, K. N.; CHOWDHURY, J. A.; HOSSEN, F.; HUSSAIN, M. S.; HOSSAIN, M. T. Characterization of phytoconstituents and evaluation of antimicrobial activity of silver-extract nanoparticles synthesized from Momordica charantia fruit extract. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 336, feb., 2017.

ROIZMAN, B. KNIPE, D.M.; WHITLEY, R.J. Herpes Simplex Viruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 2503-2601.

ROVOZZO, G. C. & BURKE, C. N. **A manual of basic virological techniques**. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. pp.287 1973.

SAHA, S.; GALHARDI, L.C.F.; YAMAMOTO, K. A.; LINHARES, R.E.C.; BANDYOPADHYAY, S.S.; SINHA, S.; NOZAWA, C.; RAY, B. Water-extracted polysaccharides from Azadirachta indica leaves: Structural features, chemical modification and anti-bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 47, n. 5, p. 640-645, 2010.

SOUSA, A. L.; RIBEIRO, A. C.; SANTOS, D. G.; RICARDO, N. M.; RIBEIRO, M. E.; CAVALCANTI, E. S.; CUNHA, A. P.; RICARDO, N. M. Chemical modification of common melon pectin (*Cucumis melo* var. *acidullus*). **Química Nova**, v. 40, n. 5, p. 554-560, jun. 2017.

SU C.T.; HSU J. T.A.; HSIEH H.P.; LIN P.H.; CHEN T.C.; KAO C.L.; LEE C.N.; CHANG S.Y. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. **Antiviral Research**, v.79, n.1, p.62-70, 2008.

SUN, Z.W.; HE, Y.L.; LIANG, Z.H.; ZHOU, W.; NIU, T. Sulfation of (1→3)-β-D-glucan from the fruiting bodies of *Russula virescens* and antitumor activities of the modifiers. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 628-633, 2009.

YAMAMOTO, K. A.; GALHARDI, L. C. F.; RINCÃO, V. P.; SOARES, S. A.; VIEIRA, I. G. P.; SILVA, N. M. P.; RICARDO; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Antiherpetic activity of an *Agaricus brasiliensis* polysaccharide, its sulfated derivative and fractions. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 52, n. 1, pp. 9–13, jan. 2013.

YANG, J.; DU, Y.; WEN, Y.; LI, T.; HU, L. Sulfation of Chinese lacquer polysaccharides in different solvents. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, n. 4, p. 397-403, 2003.

WANNANG, N. N.; EDE, S. O.; KWANASHIE, H. O. Antiviral activity of the fruit extract of *Cucumis metuliferus* E. Meyer (Cucurbitaceae) in chicks. **African Journal of Basic and Applied Sciences**, v.2, n.3-4, p. 89-93, 2010.

WITVROUW, M.; DE CLERCQ, Etienne. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 29, n. 4, p. 497-511, 1997.

WHITLEY, R.J., ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **Lancet**, n.357, p.1513–1518, may. 2001.

ZHU, W.; CHIU, L. C.; OOI, V. E.; CHAN, P. K.; ANG, P. O. J. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2. **International Journal of Antimicrobials Agents**, v. 24, n. 3, p. 279-283, sep. 2004.