

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS E
BIOTECNOLOGIA

GUSTAVO ABRAÃO MENDONÇA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO FITOL CONTRA HERPESVÍRUS
HUMANO**

Cuité – PB
2020

GUSTAVO ABRAÃO MENDONÇA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO FITOL CONTRA HERPESVÍRUS
HUMANO**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Cuité como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Kleber Juvenal Silva Farias

Cuité – PB
2020

M539a

Mendonça, Gustavo Abraão.

Avaliação da atividade antiviral do fitol contra herpesvírus humano. / Gustavo Abraão Mendonça. – Cuité: CES, 2020.

48 fl.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais e Biotecnologia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2020.

Orientador: Dr Kleber Juvenal Silva Farias.

1. Doenças Sexualmente Transmissíveis. 2. Fitol - Antiviral.
3. Herpesvírus Humano. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 616.97

Ficha catalográfica elaborada na fonte - Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

GUSTAVO ABRAÃO MENDONÇA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO FITOL CONTRA HERPESVÍRUS
HUMANO**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Cuité como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais e Biotecnologia.

Aprovado em
10 de março de 2020



Prof. Dr. Kleber Juvenal Silva Farias
Universidade Federal de Campina Grande



Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos
Universidade Federal de Campina Grande



Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana
Universidade de São Paulo

In memoriam de Lírida Carla Moreira de Góes

Acredito que há sempre algo bom para aprender nas situações. Mesmo as ruins.

Eu acho que constrói caráter.

L. M. Montgomery - Anne de Green Gables, 1908.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus por estar do meu lado tanto nos momentos bons quanto nos momentos ruins e por sempre me dá esperança em um futuro sereno e feliz.

Gostaria de agradecer aos meus pais, Fleuriso Mendonça Júnior e Marluce Borges Viana, que me amam incondicionalmente e nunca saíram do meu lado nem no pior momento da minha vida. Agradecer também aos meus irmãos, Guilherme Íkaro Mendonça e Gabriel Eduardo Mendonça, minha cunhada Iolanda Mendonça, e aos meus sobrinhos Iago e Pedro.

Gostaria de agradecer a anjo que entrou na vida e não quer sair de forma alguma que sempre me coloca nas alturas e que eu amo de uma forma que não sei explicar. O nome deste anjo é Ediclécia Macedo de França.

Queria agradecer também a todos os meus amigos, em especial a Maria Thaynara Jorge Freire a minha primeira amiga no país Cuíte, a parasita número 1, que mesmo depois de tantas brigas nossa amizade não acabou, pelo contrário ficou mais forte. Agradecer a Francielly Simões por todas as loucuras que vivemos e por todos os conselhos que demos um para o outro. Agradecer a Camila Pachêco que sempre percebia minha tristeza entre os meus sorrisos e tentava me animar da melhor forma possível.

Gostaria de agradecer aos meus amigos do curso de farmácia Monike Ellen, Letícia Fernandes, Marcos Vinícius, Wilma Santos, Elioce Wisdom, Herbert Luan, Lídio Thiago, Josivan Júnior, Ruth Alves, Andréia Casado, Andresa Casado, Renata Araújo, Isabel Almeida, Carol Caminhoneira e Pedro Victor.

Agradecer aos meus professores do curso de farmácia que sempre acreditaram no meu potencial como Maria Emília, Francinalva Medeiros, Juliano Rufino, Vanessa Barbosa e Júlia Beatriz.

Não poderia deixar de agradecer aos BIU'S Elaíse Leite, Bel, Boca, Sílvia Yasmin, Kleydianne, Carlinda, Maria Rita e aos meus amores da biologia Ana Carla, Mayara Jesuíno e Tita Andrade (mulher de militar).

Agradecer também aos anjos norte-rio-grandeenses Luanda Canário, Ana Paula, Renato Ferreira, Karine Lilian, Francisco Neto, Aurélio, José Neto, Severino

Mosinho, Mikaeli Medeiros, Míria Medeiros e dona Edivania que me acolheu com tanto carinho.

Gostaria de agradecer aos meus grandes amigos do mestrado Sânzia e Hebert por tantos momentos inesquecíveis de conversas construtivas, ou seja, fofocas. E também a Maciel por me proporcionar tantos momentos alegres.

Gostaria de agradecer a algumas pessoas que entraram na minha de forma tão especial que nem consigo mensurar com Neuma, Vinícius, Zaira, Taciana, Itamara, Renata, Márcia, Fabrícia, David, Gabriel, Alba, Camila, Ismael, Joelma, Cacilda, Alcione, Juliana, Fernanda, Rafaela, Larissa, Aluska, Valéria, Edelânia, Walesca, Cida e Livia.

Agradecer a Deus pelos meus amigos Maria Manaíra, Oliveiros, Carlos, Matheus, Denise, Neta, Catarina, Lucinha e Eliane.

Não podia deixar de agradecer aos meus preceptores de estágio Janaína Ferrari, Francisciraine Freire e aos que colaboraram nessa minha estrada Bruna Pereira, Rafaelly Silva, Paula, Jorge, Luciana, Ayla, André, Jonas, Jogador, Mikaelle e Nilson.

Agradecer ao Laboratório de Tecnologia e Biotecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil, em colaboração com o Prof. Dr. Arnóbio Antônio da Silva Júnior e ao Laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em colaboração com o Profa. Dra. Paula Renata Lima Machado. Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia da Universidade Federal de Campina Grande.

E por fim agradecer ao meu orientador (Prof. Dr. Kleber Juvenal Silva Farias).

RESUMO

As infecções pelo Vírus Herpes Simples do tipo 1 (HSV-1) são consideradas um grave problema de saúde pública em todo mundo, acometendo uma parcela significativa da população. O aciclovir e o penciclovir, assim como seus pró-fármacos, o valaciclovir e o fanciclovir, respectivamente, ainda são a terapia padrão para tratamento dessas infecções. Porém, algumas cepas do HSV já apresentam resistência a esses medicamentos, principalmente, em pacientes imunodeprimidos. Desta forma, o uso de produtos de origem natural, aparecem como uma alternativa, juntamente com o uso de novas tecnologias de liberação de fármacos, para o tratamento das infecções resistentes por HSV. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antiviral do fitol incorporado ou não às nanopartículas lipídicas sólidas de 1,3-diesteraril-2-oleil-glicerol TG1 contra o vírus HSV-1 em células Vero E6 através de ensaios de redução de placa. A escolha desse composto se deve ao fato de que já foram observados resultados positivos em sua ação antimicrobiana, antiviral, entre outras. Além disso, foram avaliadas diferentes condições de tratamento durante o período de 48 horas, em que nas condições de pré-tratamento e pós-tratamento, o fitol incorporado às nanopartículas exibiu uma redução significativa no número de placas em relação ao controle. Portanto, conclui-se que o fitol associado às nanopartículas mostra-se eficaz no tratamento da infecção por HSV-1 em culturas de células Vero E6.

Palavras-chave: HSV. Células Vero. Fitol. Nanopartícula. Redução de placa.

ABSTRACT

Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) infections are considered a serious public health problem worldwide, affecting a significant portion of population. Acyclovir and penciclovir, as well as their prodrugs, valacyclovir and famciclovir, respectively, are still the standard therapy for treating these infections. However, some strains of HSV have already shown resistance to these drugs, mainly in immunodepressed patients. Thus, the use of products of natural origin, come out as an alternative, along with the use of new drug delivery technologies, for the treatment of HSV-resistant infections. Therefore, this study aimed to evaluate the antiviral activity of phytol incorporated or not to the solid lipid nanoparticles of TG1 against the HSV-1 virus in Vero E6 cells through plaque reduction assay. The choice of this compound is due to the fact that positive results have already been observed in its antineoplastic, anti-ulcer, anti-inflammatory, immunostimulating, antimicrobial, antiviral action, among others. In addition, different treatment conditions were evaluated during the 48-hour period, in which, the pre-treatment and post-treatment conditions, the phytol incorporated in nanoparticles exhibited a significant reduction in the number of plaques compared to the control. Thereby, it follows that phytol associated with nanoparticles is effective in the treatment of HSV-1 infection in cultures of Vero E6 cells.

Keywords: HSV. Vero cells. Phytol. Nanoparticles. Plaque Reduction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. estrutura do HSV-1:** formado pelo cerne onde é localizado o DNA viral; capsídeo com formato icosaédrico; tegumento amorfo localizado entre o envelope e o capsídeo; e o envelope sendo a camada mais externa do vírus. Fonte: ZOLINI (2012). 16
- Figura 2. genoma do HSV-1:** Estrutura de cada molécula de DNA formadas por duas sequências ligadas de forma covalente, um longo (L) e um curto (S). cada uma desses segmentos é composto por sequências únicas (UL e US) flanqueadas por repetições invertidas. As repetições do segmento longo são as ab e a' b'; já as repetições curto são designadas como a' c' e ca. Fonte: RIOZMAN et al. (2007). 16
- Figura 3. estrutura química do fitol (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol).** Fonte: (COSTA, 2014). 18
- Figura 5. viabilidade de células Vero E6, pela técnica de MTT, submetidas a tratamento com diferentes concentrações do fitol, FIN, Aclovir e NSF. Experimentos realizados em triplicata.** Fonte: autor. 30
- Figura 4. ensaio de placa para titulação do HSV-1.** A titulação obtida foi de 2,5 x 100 PFU/mL a partir do sobrenadante de culturas de células Vero E6 após 48 horas de infecção. O ensaio foi realizado sob uma monocamada de células Vero E6. CN (Controle Negativo). Fonte: autor 31
- Figura 6. pré-tratamento das células por fitol, FIN, aciclovir e NSF.** As concentrações dos compostos (100, 50, 25 e 12,5 µg/mL) foi adicionado a cultura celular duas horas da infecção. Fonte: autor. 32
- Figura 7. tratamento com fitol, FIN, aciclovir e NSF concomitante com a infecção viral.** As concentrações dos compostos (100, 50, 25 e 12,5 µg/mL) foram adicionados simultaneamente a infecção viral. Fonte: autor. 33
- Figura 8: tratamento das células com o fitol, FIN, aciclovir e NSF.** As concentrações dos compostos (100, 50, 25 e 12,5 µg/mL) foram adicionados após a adsorção viral às células Vero E6. Fonte: autor. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. volumes dos compostos utilizados nos ensaios de pré-tratamento e concomitante.	24
Tabela 2. volumes compostos utilizados no ensaio pós-infecção.....	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	13
1. OBJETIVO GERAL	13
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1. HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA.....	14
2. HERPES SIMPLEX HUMANO	15
3. TRANSMISSÃO E DIAGNÓSTICO.....	16
4. TRATAMENTO.....	17
5. FITOL.....	18
6. NANOPARTÍCULAS	19
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	22
7. CULTURA DE CÉLULAS.....	22
8. LINHAGEM VIRAL	22
9. TITULAÇÃO DO HSV-1 A AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACA (PFU).....	22
10. FORMULAÇÃO DA NANOPARTÍCULA.....	23
11. DILUIÇÃO DOS COMPOSTOS	24
6. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	25
7. PREPARO DA AMOSTRA VIRAL	26
8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO FITOL INCORPORADO EM NANOPARTÍCULAS	27
9. ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	27
10. TRATAMENTO DAS CÉLULAS VERO COM AS AMOSTRAS TESTE E POSTERIOR INFECÇÃO COM HSV-1 (PRÉ-TRATAMENTO)	27
11. TRATAMENTO DAS CÉLULAS VERO COM AS AMOSTRAS TESTE E POSTERIOR INFECÇÃO COM HSV-1 (PÓS-TRATAMENTO)	28
12. TRATAMENTO CONCOMITANTE	28
13. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
5. RESULTADOS.....	30
14. CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS	30
15. UNIDADES FORMADORES DE PLACA	30
16. EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE A INATIVAÇÃO DO HSV-1.....	31
6. DISCUSSÃO	35

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
8. REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

Os Vírus Herpes Simples (HSV), HSV-1 e o HSV-2, pertencem a família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvritinae* e do gênero *Simplexvirus* (ICTV, 2018) e causam as infecções virais mais prevalentes em humanos por todo mundo, estando presentes tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (WALD e COREY, 2007). A prevalência das infecções causadas por HSV-1 é de 60% a 80% na população mundial, variando conforme alguns fatores: idade, etnia, localização geográfica e situação socioeconômica da população estudada (WALD e COREY, 2007; FATAHZADEH e SCHWARTZ, 2007). De acordo com Xu et al. (2002), cerca de 90% da população mundial está infectada por um ou ambos os vírus, uma vez que a maior parte das infecções provocadas por estes agentes patológicos são assintomáticas e raramente fatais já que o vírus permanece em estado de latência sendo reativado em situações como estresse, exposição a radiação ultravioleta (UV), imunodepressão entre outras (SANTOS et al., 2008).

Atualmente, o tratamento convencional das infecções causadas pelo HSV é através do uso do aciclovir, que tem como efeitos: diminuição da carga viral, aceleração da cicatrização das lesões e interrupção do surgimento de novas lesões (NIKKELS e PIÉRARD, 2002). No entanto, algumas cepas do HSV já apresentam resistência antimicrobiana a esse antiviral (PIRET e BOIVIN, 2014). Essa resistência se dá por mutações que promovem a deficiência em timidina-quinase, enzima que fosforila o aciclovir (GELLER et al., 2012). Além disso, têm sido observados efeitos colaterais, como insuficiência renal aguda e neurotoxicidade (ORION et al., 2005). Dessa forma, o desenvolvimento de novas fórmulas farmacêuticas é necessário para o tratamento das infecções por HSV.

Segundo Guido et al. (2010), desenvolver um novo fármaco e introduzi-lo no mercado é um processo complexo, longo e oneroso com chances de sucesso pequena. Entretanto, os avanços da química e da biologia em relação as vias bioquímicas, alvos moleculares e da história natural de doenças, permitiram a descoberta de inovações terapêuticas que proporcionam uma melhor qualidade de vida as pessoas de todo mundo.

A utilização de plantas como matéria prima para desenvolvimento de novas drogas na terapêutica tem sido relatada há séculos (SIMÕES et al., 2010). Mesmo agora, mais de três quartos da população mundial depende, principalmente, de

plantas e extratos de plantas para a manutenção da sua saúde (RAI et al., 2011). Segundo Clark (1996), aproximadamente metade dos medicamentos no mercado é de origem sintética, dos quais 25% provenientes de plantas, isolados diretamente ou produzidos por semi-síntese, a partir de um precursor vegetal e os 25% restantes são provenientes de outras fontes naturais. Cerca de 55% de todas as novas substâncias ativas descobertas entre 1981 e 2014 são produtos naturais ou são derivados de produtos naturais (NEWDEN e CRAGG, 2016).

Vários estudos mostram que diversas substâncias ativas derivadas de plantas como proteínas, saponinas, flavonoides, alcaloides, terpenos, entre outras apresentam atividade antiviral contra o HSV (KHAN et al., 2005; NAITHANI et al., 2010). Segundo Simoni (2003), mesmo com uma grande quantidade de produtos fitoquímicos ativos com atividade antiviral descobertos, apenas uma pequena parcela é utilizada para no tratamento das infecções virais devido à elevada toxicidade, espectro de ação limitado ou ausência de evidências para assegurar sua aplicação específica.

Os terpenos, ao longo do tempo, têm atraído bastante atenção de pesquisadores por causa das suas atividades farmacológicas (SILVA et al., 2013). O fitol, é um diterpeno, bastante encontrado em plantas medicinais que apresentam várias atividades terapêuticas incluindo atividade antiviral, antibacteriana, anticonvulsivante, antiespasmódica, antitumoral, anti-inflamatória, antiparasitária, ativação de enzimas responsáveis na produção de insulina, diminuição dos níveis séricos de colesterol entre outras ações (DAINES et al., 2003; SAIKIA et al., 2010; SILVA et al., 2013).

O fitol (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol) é um produto secundário do metabolismo da clorofila nas plantas. É classificado como um álcool diterpeno monoinsaturado de cadeia longa e é encontrado nos óleos essenciais de algumas plantas aromáticas, como *Cleome serrata* e *Lantana radula* (MCNEIL, PORTER e WILLIAMS, 2012; PASSOS et al., 2012). Santoyo et al., (2010) já relatou a propriedade antiviral do fitol contra o HVS em seus estudos utilizando a extração líquida pressurizada de microalgas comestíveis.

Apesar de sua eficácia antimicrobiana e antiviral, o fitol ainda não foi aceito como agente farmacêutico, devido à fraca solubilidade, a baixa biodisponibilidade e a natureza hidrofóbica da molécula (ANAND et al., 2007).

Nesse contexto, as nanotecnologias são uma parte importante do futuro mais promissor para alcançar os desafios de entrega de drogas. As nanopartículas são partículas contendo fármaco com tamanho inferior a 1 μm (COUVREUR e VAUTHIER, 2006). As nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) são uma ótima opção como um sistema transportador alternativo, devido ao tamanho, distribuição restrita, biocompatibilidade e adequação a diferentes rotas de administração (GASCO, 2007).

Lima et al., (2018), ao avaliarem a eficiência do uso difosfato de cloroquina contra o HSV-1, observaram uma melhora da atividade antiviral do composto quando esse estava incorporado às nanopartículas de poli(ácido-lático) em comparação com o difostato de cloroquina livre de nanopartículas.

Diante da necessidade de novos medicamentos de menor custo, de baixa toxicidade e de maior eficácia para o tratamento da infecção por HSV-1, se faz necessário um estudo para avaliar a atividade antiviral de novos compostos, como o do fitol incorporado em nanopartículas.

2. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiviral *in vitro* do fitol incorporado ou não em nanopartículas sobre a replicação do HSV-1.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Incorporar o fitol às nanopartículas lipídicas sólidas de 1,3-diesteraril-2-oleil-glicerol (TG1) em concentração não tóxica para o cultivo de células Vero E6;
- Avaliar a atividade antiviral do fitol incorporado ou não a nanopartículas poliméricas sobre a replicação do HSV-1 em culturas de células Vero E6, nas seguintes estratégias metodológicas: (i) ensaio pré-tratamento; (ii) ensaio concomitante; (iii) ensaio pós-infecção.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. HISTÓRIA E EPIDEMIOLOGIA

De acordo Elsayy et al. (2012), as infecções virais são as maiores causas de doenças e mortalidade em todo o mundo acometendo todos os organismos vivos. No decorrer da história humana, diversas epidemias acometeram a população mundial, como, por exemplo, as causadas pelo vírus influenza, as quais levaram ao desenvolvimento de vacinas e programas de saúde pública. Porém, algumas infecções como, o herpesvírus humano e o HIV não houve o sucesso no desenvolvimento de vacinas para o controle de novas infecções (KNIPE e HOWLEY, 2013).

O vírus Herpes Simplex Humano tipo 1 e tipo 2 (HSV-1 e HSV-2) pertencem a família Herpesviridae, subfamília Alphaherpesvitinae e do gênero Simplexvirus (ICTV, 2018), estas duas espécies de herpesvirus foram os primeiros a serem descritos na literatura (VARELLA et al., 2005).

Atualmente, além do HSV-1 e do HSV-2, existem mais seis espécies de herpesvírus com capacidade de provocar infecções em células humanas: varicela zoster (VZV); Epstein-Barr (EBV) responsável pelo desenvolvimento da mononucleose infecciosa conhecida popularmente por acarretar a doença do beijo; citomegalovírus (CMV); os vírus do exantema súbito infantil (HHV-6 e HHV-7); e o vírus do sarcoma de Kaposi (HHV-8) (ICTV, 2018). Todos esses vírus compartilham das mesmas características, como padrão arquitetural semelhante, enzimas capazes de interferir no DNA e nas proteínas do hospedeiro, e genoma relativamente grande com aproximadamente 200 genes (SPODE e SCHMITT, 2003)

Atualmente, o vírus HSV é considerado endêmico em todo mundo com cerca de 640 mil novas infecções por ano, o que leva a crer que aproximadamente 90% da população mundial está infectada por este patógeno (WALD e COREY, 2007; CLEMENS e FARHAT, 2010). As infecções pelo vírus HSV (Tipo 1 e Tipo 2) estão entre as mais comuns no mundo, principalmente, em países em desenvolvimento. Contudo, novos estudos epidemiológicos vêm mostrando que o número de novas infecções de HSV-2 está aumentando em países desenvolvidos (XU et al., 2006). A prevalência da infecção pelo HSV varia de acordo com a região e é influenciada por alguns fatores, como a idade, em que a ocorrência da infecção pelo HSV-1 é de mais

de 40% aos 15 anos de idade e de 60 a 90% em adultos (FATAHZADEH e SCHWARTZ, 2007).

De acordo com Xu et al. (2002), nos Estados Unidos, 65% da população apresenta anticorpos para HSV-1. Na Europa, quase 50% da população é soropositiva para o HSV-1 (WALD e COREY, 2007). Em países em desenvolvimento a prevalência, de acordo com Whitley et al. (1998), é quase universal e geralmente a infecção ocorre na primeira infância quando o sistema imunológico ainda não está completamente desenvolvido.

Cowan et al. (2003) realizaram um estudo no Brasil, na Estônia, na Índia, no Marrocos e no Sri Lanka para avaliar a soroprevalência do HSV-1 e HSV-2. Na pesquisa, 45% da amostra era composta por pessoas do sexo feminino, 32,7% do sexo masculino e 22,3% da amostra era composta por crianças e adolescente com idade variando entre 0 e 19 anos. Os resultados mostraram que dependendo da região a soroprevalência do HSV-1 entre adultos do sexo masculino varia de 78,5% a 93,6%, e entre as mulheres adultas de 75,5% a 97,8%. Este estudo mostrou também que em todos os países a soroprevalência aumentou significativamente com a idade.

No Brasil, a soroprevalência das infecções causadas pelo HSV está presente em todas as faixas etárias sendo mais presente nos indivíduos na faixa etária de 30 a 35 anos de idade (95,20%) (GELLER et al., 2012).

2. HERPES SIMPLEX HUMANO

O HSV-1 (figura 1) é um vírus grande que apresenta um diâmetro o qual varia de 120 a 200 nm e é composto por um cerne elétron-denso contendo um DNA linear de fita dupla com aproximadamente 152 kb, com uma proporção G+C de um 68%, um capsídeo formado por 162 capsômeros arranjados em simetria icosaédrica, sendo 150 hexaméricos e 12 pentaméricos, composto por quatro proteínas virais estruturais, com o diâmetro variando entre 100 e 110 nm, um tegumento amorfo, presente entre o capsídeo e o envelope, contendo ao menos 20 proteínas virais e um envelope, camada mais externa do vírus, composto por uma bicamada de lipídios, com aproximadamente 11 glicoproteínas (BROWN e NEWCOMB, 2011; ICTV, 2018; KELLY et al., 2009).

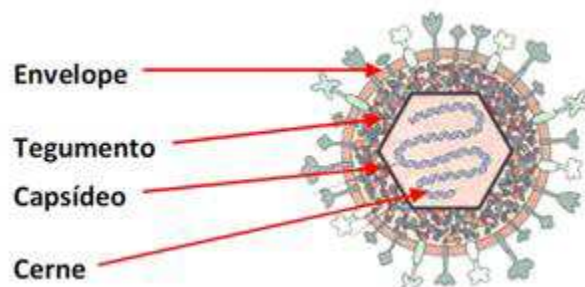


Figura 1. estrutura do HSV-1: formado pelo cerne onde está localizado o DNA viral; capsídeo com formato icosaédrico; tegumento amorfo localizado entre o envelope e o capsídeo; e o envelope sendo a camada mais externa do vírus. Fonte: ZOLINI (2012).

O genoma viral do HSV-1, consiste de dois segmentos ligados, denominados de L (longo) e S (curto). Cada segmento apresenta sequências únicas flanqueadas por repetições invertidas relativamente grandes, em que, pelo menos, 84 glicoproteínas são codificadas pelo genoma viral (figura 2).

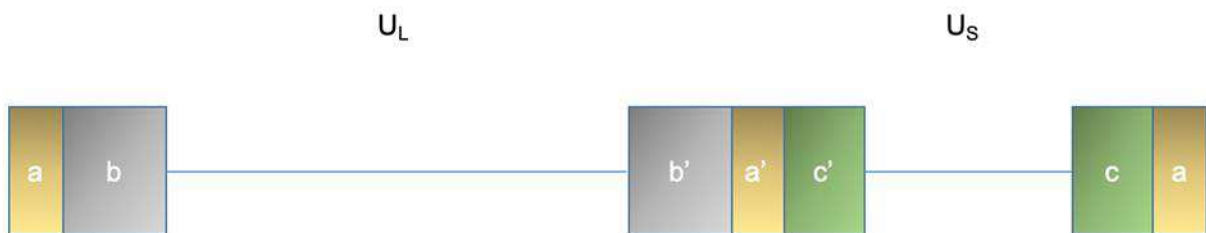


Figura 2. genoma do HSV-1: Estrutura de cada molécula de DNA formadas por duas sequências ligadas de forma covalente, um longo (L) e um curto (S). cada uma desses segmentos é composto por sequências únicas (UL e US) flanqueadas por repetições invertidas. As repetições do segmento longo são as ab e a' b'; já as repetições curto são designadas como a' c' e ca. Fonte: ROIZMAN et al. (2007).

3. TRANSMISSÃO E DIAGNÓSTICO

A infecção e a replicação viral, consiste no uso de todo o maquinário da célula hospedeira, iniciando quando a célula adsorve o vírus, que ocorre por meio da ligação, ou seja, uma fusão entre o envelope viral com a membrana plasmática da célula por uma interação de glicoproteínas, a gB e gC virais, presentes no envelope, que apresentam uma grande afinidade por glicosaminoglicanos das células, em especial os receptores de sulfato de heparan, e a transmissão ocorre quando há um contato direto ou indireto com fluídos biológicos contaminados (NEVILLE et al., 2004).

As infecções causadas pelo HSV-1 podem ser assintomáticas ou sintomáticas. As infecções sintomáticas ou líticas ocorrem no primeiro momento que o indivíduo tem contato com o vírus (10% dos casos) ou quando o vírus é reativado, os genes virais estão sendo expressos e a sua replicação é intensa. Nas infecções líticas, o paciente desenvolve sintomas característico da doença além de febre, mal-estar, disfagia e adenopatia (WHITLEY e ROIZMAN, 2001). Já as infecções assintomáticas ocorrem logo após uma infecção aguda ou após o primeiro contato do paciente com o vírus (90% dos casos) e são aquelas em que o vírus está em seu estado de latência alojado nos gânglios neurais. Neste momento, a replicação viral é reduzida e o hospedeiro não desenvolve sinais clínicos. Todavia, a espécie humana o vírus se mantém viável para transmissão por toda a vida (GELLER et al., 2012), indicando que a espécie humana se torna um reservatório viral (WHITLEY e ROIZMAN, 2001).

Diversos processos podem desencadear a reativação do HSV, como o estresse físico e emocional, a febre, a menstruação, o desequilíbrio hormonal, a exposição à luz ultravioleta, além da injúria ao tecido infectado. Como resultado da reativação, observa-se a transmissão ativa para outros indivíduos (SANTOS et al., 2008).

O diagnóstico pode ser realizado utilizando várias técnicas como, o Método de Tzanck, que consiste na raspagem basal da lesão de material citológico; Cultura viral, o material é coletado a partir de raspagem de vesículas dérmicas e semeados em meio de cultura; Sorologia, que pode ser utilizada tanto em infecções sintomáticas quanto assintomáticas; e PCR, técnica de biologia molecular, bastante utilizada para o diagnóstico de infecções cerebrais pelo HSV (SIMMONS, 2002).

4. TRATAMENTO

O tratamento das infecções por HSV pode ser realizado por via tópica, oral ou parenteral. No tratamento tópico, é indicado o uso de aciclovir 5% creme, penciclovir 1% creme, idoxuridina, doconasol e cidofovir. O objetivo do tratamento tópico é melhorar o quadro clínico local do paciente diminuindo a sensação de dor e acelerando o processo de cicatrização. Entretanto, os benefícios do tratamento tópico são limitados já que a biodisponibilidade do fármaco é baixa. No tratamento por via oral, o aciclovir é o fármaco de primeira escolha também podendo ser utilizado o

penciclovir e seus pró-fármacos valaciclovir e famciclovir, respectivamente. Já no tratamento parenteral pode-se utilizar o aciclovir intravenoso, foscarnet IV e o cidofovir IV (FATAHZADEH e SCHWARTZ, 2007).

De acordo com Gilbert et al. (2002) e Peng (2010), o grande problema que vem se observando no tratamento do HVS é a resistência viral a drogas sintéticas disponíveis, como o aciclovir onde cepas já são resistentes a sua ação devido a mutações que reduzem o número da enzima timidina-quinase, responsável por fosforilar o aciclovir. Além disso, a elevada toxicidade e a interação com outros medicamentos, que podem elevar ou reduzir os níveis séricos do aciclovir, assim, chamando a atenção para o uso generalizado dos antivirais (GELLER et al., 2012).

Portanto, devido às cepas virais resistentes às drogas comercialmente disponíveis para o controle da doença, além da ampla distribuição das infecções herpéticas e da facilidade de transmissão, existe uma necessidade clínica urgente de desenvolver novos compostos com atividade antiviral (BRADY e BERNSTEIN, 2004).

5. FITOL

O fitol (3,7,11,15-tetrametil hexadec-2-en-1-ol) é um diterpeno membro dos álcoois primário de cadeia longa, insaturada e hidrofóbico (Figura 3), derivado do metabolismo da clorofila e são encontrados principalmente em plantas verdes, mas também pode estar presente em algas, cianobactérias, intestino de ruminantes, e em derivados de leite e de pescados. Logo, o fitol é bastante abundante na natureza (ISLAM et al., 2017).

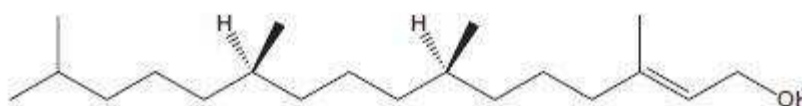


Figura 3: estrutura química do fitol (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol).

Fonte: (COSTA, 2014).

Vários autores têm investigado a aplicabilidade de substâncias fitoterápicas, como os isoprenóides, no tratamento de várias doenças. De acordo com Islam (2017), o fitol apresenta uma considerável atividade biológica positiva sobre o organismo por ter uma capacidade de atuar como agente antioxidante em função da sua estrutura

química, uma vez que apresenta um grupo hidroxila na sua cadeia. Desta forma, foi observado que o fitol foi capaz de reduzir a produção de radicais livres graças sua característica estrutural. Provavelmente, o fitol, ao reagir com um radical livre, doa átomos de hidrogênio para um elétron não emparelhado, o que proporciona conversão de radicais livres em espécies menos reativas (SOUSA, 2011; GUIMARÃES et al., 2010; FACCHINI, 2018).

Além dessa atividade antioxidante, foi observado em outros estudos que o fitol apresenta várias outras propriedades farmacológicas que podem ser utilizadas na medicina moderna como antineoplásico, antiulceroso, anti-inflamatório, imunestimulante, antimicrobiana, antiviral, antiprotozoária, citotóxica, anticancerígena, antigenotóxica, antimutagênica, quimiopreventiva, organoprotetiva, antidiabética, antialérgica, ansiolítica e antidepressiva.

O fitol, ao longo do tempo, tem exibido importante potencial tecnológico e de pesquisa nas áreas de química, farmacologia e farmácia, ciência polimérica, microbiologia aplicada a biotecnologia entre outras conforme o Derwent Innovations Index (2018), tendo um volume considerável de registros de patentes (488) nos últimos anos. Analisando as patentes de acordo o Código Internacional de Patentes (CIP), pode-se ainda observar que o maior número de registros está relacionado com a seção A de Necessidades Humanas.

6. NANOPARTÍCULAS

Nos últimos anos, o desenvolvimento de nanomateriais tem se mostrado como uma alternativa viável em diversas áreas das ciências e, principalmente, na farmacêutica. Diante das limitações comumente encontradas no desenvolvimento de novos medicamentos (concentração insuficiente de fármaco devido à má absorção, metabolismo rápido e eliminação; distribuição de medicamentos a outros tecidos combinados com alta toxicidade de medicamentos; baixa solubilidade do medicamento e alta variação dos níveis plasmáticos devido à biodisponibilidade imprevisível após administração oral, incluindo a influência dos alimentos nos níveis plasmáticos), as nanopartículas têm sido avaliadas como sistemas carreadores de substâncias, tendo em vista que esses possuem ação mais controlada e localizada na liberação das substâncias (MEHNERT e MÄDER, 2012).

Os sistemas de liberação com nanopartículas exibem fatores positivos na administração de substâncias, os quais abrangem o fornecimento controlado da substância ativa no sítio de ação, evitando a liberação precoce do fármaco, a administração de fármacos hidrofóbicos e maior biodisponibilidade, permitindo que o fármaco esteja na maior parte do tempo dentro da janela terapêutica. Mais além, é esperado que esses sistemas nanoestruturados tenham maior eficácia pela sua maior seletividade como também menor concentração, diminuindo os efeitos adversos e prevenindo o acúmulo em células saudáveis. Dessa forma, entende-se as propriedades biofarmacêuticas são otimizadas, resultando em alterações vantajosas nos processos farmacocinéticos de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação de fármacos (LEE, 2016).

Singh et al. (2017) expõem que as melhorias obtidas com o uso de nanosistemas estão relacionadas com as propriedades intrínsecas das nanopartículas, como pequeno tamanho de partícula e conseqüente alta área superficial e volume (o que garante que grandes cargas úteis de medicamentos possam ser acomodadas) e carga superficial sintonizável (para facilitar a entrada celular através da membrana celular carregada negativamente). Além disso, as nanopartículas podem conter propriedades biomiméticas que proporcionam atividades antivirais inerentes. Por fim, há a possibilidade de encapsulamento do medicamento e formação de estruturas estáveis ou modificadas que pode melhorar a dosagem do medicamento e entrega.

Franco (2013) define as nanopartículas farmacêuticas como um material ou partícula coloidal que esteja compreendida entre o intervalo de 1 a 1000 nm, estando presentes nessa definição os complexos de inclusão, os lipossomas, as nanoemulsões, as nanocápsulas e nanoesferas, as nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) e vetores lipídicos nanoestruturados (NLC), os conjugados fármaco - lípido (LDC), as nanopartículas magnéticas e os quantum dots (QD).

As nanopartículas lipídicas sólidas são partículas composta por uma matriz lipídica sólida, a qual permanece no estado sólido tanto na temperatura ambiente quanto dentro do corpo humano. Elas são capazes de transportar substâncias hidrofílicas ou lipofílicas (SILVA et al., 2012).

O uso dessa nova técnica tem atraído atenção para a possibilidade da aplicação de antivirais à pele e mucosas por ter em sua composição lipídeos similares aos lipídeos fisiológicos. Além disso, nanocápsulas lipídicas oferecem facilidade de

preparação, baixo custo de material, ausência de solventes orgânicos e boa eficiência de carregamento (ABOZAID, 2018)

Lv et al., (2009) aponta que diversos estudos têm sido feitos a fim de avaliar a capacidade de facilitar a absorção de drogas por via cutânea. O principal medicamento para tratamento do HSV é o aciclovir. Porém, devido a sua baixa meia vida e absorção incompleta, é preciso que o paciente administre a medicação várias vezes ao dia, alcançando um valor de 1200 mg/dia. A dosagem intravenosa e a tópica também apresenta uma alta frequência de aplicação (PRAJAPATI, PANCHAL e VARIA, 2017; DONALISIO et al., 2018).

4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

7. CULTURA DE CÉLULAS

No presente estudo, foram utilizadas células Vero E6 (linhagem contínua, proveniente de rim de macaco verde africano). As células foram mantidas em estufa de CO₂ (5%) a 37 °C e cultivadas em meio de cultura Leibovitz-15 (Invitrogen, New York, USA) com L-glutamina (Sigma) suplementado com 10% soro bovino fetal (SBF) (Invitrogen) inativado, 1% de antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 1 mg/mL) (Sigma) e 10% triptose fosfato (Invitrogen).

8. LINHAGEM VIRAL

O HSV-1 (linhagem KOS) foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Cláudia Simões da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. Células Vero E6 foram utilizadas para propagação do vírus. Posteriormente, este foi titulado através do ensaio de unidade formadora de placa (PFU) e os estoques virais foram armazenados a -80 °C até serem utilizados.

9. TITULAÇÃO DO HSV-1 A AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE PLACA (PFU)

Após a propagação do vírus em cultura de células, foi realizada a titulação viral através da técnica de PFU. Para isso, as células Vero E6 foram cultivadas em garrafa de 75 cm² (Corning) até atingir uma monocamada confluenta de células. Após atingir a confluência de 90% ou mais, as células foram removidas com a adição de 1 mL de tripsina (Sigma) diluída em PBS pH 7,4 (1:3). O conteúdo da garrafa foi ressuspendido em 23 mL de meio L-15 (Sigma) suplementado com SBF (10%), triptose fosfato (10%) e antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 1 mg/mL). Após homogeneização, 2x10⁵ células/poço/mL foram adicionadas em placas de 24 poços (Corning) e incubadas por 1 dia em estufa de 37 °C em 5% de CO₂ para formar uma monocamada confluenta. Após 24 horas, a suspensão viral proveniente do estoque viral foi descongelada lentamente em gelo e realizadas diluições seriadas decimais até a diluição de 10⁻⁶ do vírus com o meio de cultura L-15 sem adição de SBF. Em seguida, foi removido o meio de cultura das placas de 24 poços e adicionados 400µL da diluição em cada poço. O meio L-15 sem suplemento de SBF foi utilizado como controle negativo. Cada amostra foi feita em duplicata. A placa foi incubada por 1 hora a 37 °C

em 5% de CO₂, sendo agitada lentamente de 15 em 15 minutos para aperfeiçoar o processo de adsorção viral. Após este tempo, foi retirado o inóculo viral e adicionado 1 mL/poço de Overlay (meio L-15 2% SBF sem vermelho fenol e carboximetilcelulose a 3% estéril) (Sigma). A placa foi incubada em estufa por 48 horas a 37 °C em 5% de CO₂.

Após o período de 48 horas, a camada viscosa foi removida e os poços foram lavados com PBS. Para observar as placas virais, foram adicionados 250 µL do corante preto de naftaleno (Sigma) e a placa foi incubada por 40 minutos a temperatura ambiente. Foi realizado o cálculo para observar a maior diluição, no qual é possível visualizar as placas de lise. Foram levados em consideração a diluição e o volume total do inóculo. Os valores foram expressos em PFU/mL.

10. FORMULAÇÃO DA NANOPARTÍCULA

O fitol (Sigma) incorporado em nanopartículas lipídicas sólidas de TG1 foi preparado pelo Laboratório de Tecnologia e Biotecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil, em colaboração com o Prof. Dr. Arnóbio Antônio da Silva Júnior. Soluções do fitol e do fitol incorporado em nanopartículas foram preparadas a uma concentração de 250 µg/mL e esterilizadas por filtração através de filtros de 0,22 µm e de 0,45 µm, respectivamente.

O 1,3-distearil-2-oleil-glicerol (TG1) foi doado pela Universidade Federal do Piauí (Teresina, Brasil). O fitol foi fornecido por Sigma-Aldrich (Alemanha). Álcool polivinílico (PVA), com massa molecular de viscosidade de 4,7 x 10 g/mol foi obtida pela Vetec (São Paulo, Brasil) e Tween 80 (monooleato de sorbitano de polioxietileno (20) por Synth (Brasil)). O tampão fosfato, dimetilsulfóxido (DMSO) e 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-di-hidro-difeniltetrazólio (MTT) foram adquiridos da Sigma Aldrich (CA, EUA).

Nanopartículas lipídicas sólidas contendo TG1 foram preparadas pelo método de emulsificação por evaporação de solventes (MEHNERT; MÄDER, 2012). Onde a fase orgânica (OP) com 6 mL, contendo 250 mg de lipídios e solvente diclorometano foi injetado na fase aquosa (AP) composta por 14 mL de solução aquosa com surfactante Tween 80 ou PVA sob agitação magnética a 720 rpm a 25° ± 2° C. A fase aquosa foi pré-filtrado usando membrana de 0,45 µm. Em seguida, a emulsão foi levada ao equipamento Ultra-turrax (IKA T18-Labortechnik, Alemanha) por 18 minutos e a evaporação do solvente ocorreu a 25 °C sob agitação magnética a 720 rpm durante a noite (SANTOS-SILVA et al., 2017). As amostras foram colocadas

em frascos de vidro hermeticamente fechados e armazenadas a 25 ± 2 °C. Após a escolha de uma concentração de lipídeo e surfactante, o fitol foi incorporado as nanopartículas na concentração de 250 µg/mL.

11. DILUIÇÃO DOS COMPOSTOS

Foram desenvolvidas quatro concentrações de trabalho para o fitol, o fitol incorporado em nanopartículas lipídicas sólidas de TG1, as nanopartículas sem o fitol e aciclovir, baseadas na viabilidade celular após 48 horas. As concentrações que foram utilizadas nos experimentos: 100; 50, 25 e 12,5 µg/mL para cada um dos compostos.

Os compostos apresentaram uma concentração padrão de 250 µg/mL exceto o aciclovir que apresentou uma concentração padrão de 250 mg/mL. A solução contendo apenas o fitol foi filtrada em filtro de 0,22 µm e o fitol incorporado em nanopartículas lipídicas sólidas de TG1 e as nanopartículas sem o fitol foram filtradas em filtros de 0,45 µm. Logo após, as concentrações mãe foram diluídas em meio L-15 suplementado com 2% de SBF ou overlay a 3% de carboximetilcelulose (CMC), originando as concentrações trabalho.

Os meios utilizados para a diluição das concentrações padrão variaram de acordo com o ensaio antiviral. Dessa forma, no ensaio antiviral concomitante e pré-tratamento os compostos foram diluídos em meio L-15 suplementado com 2% de SBF enquanto, no ensaio pós-infecção os compostos foram diluídos em overlay a 3% CMC.

Tabela 1. volumes dos compostos utilizados nos ensaios de pré-tratamento e concomitante.

Concentrações de trabalho (µg/mL)	Solução Padrão (µL)	L-15 sem suplemento (mL)
12,5	0,100	1,900
25	0,200	1,800
50	0,400	1,600
100	0,800	1,200

Tabela 2. volumes dos compostos utilizados no ensaio pós-infecção.

Concentrações de trabalho (µg/mL)	Solução Padrão (µL)	Overlay 3% CMC (mL)
12,5	0,100	1,900
25	0,200	1,800
50	0,400	1,600
100	0,800	1,200

O fármaco aciclovir, terapia padrão, foi utilizado nos experimentos na forma farmacêutica suspensão de 250 mg/mL. Foi realizada uma diluição seriada para chegar nas concentrações de trabalho dos experimentos de 100; 50, 25 e 12,5 µg/mL.

$$250 \frac{mg}{mL} = 250.000 \frac{\mu g}{mL} \rightarrow 250.000 \mu g \times V1 = 100 \mu g \times 4000 \mu L \rightarrow V1 = 1,6 \mu L$$

6. TESTE CITOTOXIDADE

O teste de viabilidade celular foi realizado em cultura de células Vero E6 com o objetivo de avaliar se os tratamentos seriam citotóxicos para as células após exposição de 48 horas. Foram utilizados o fitol, o fitol incorporado em nanopartículas (FIN) lipídicas sólidas de TG1, as nanopartículas sem o fitol (NSF) e o aciclovir em diferentes concentrações. Através desses, foi possível estabelecer as concentrações que foram utilizadas no ensaio de avaliação da atividade antiviral.

Para os ensaios, placas de 96 poços (Corning) foram utilizadas, nas quais 100µl de meio contendo as células Vero E6 (2×10^5 células/poço/mL) foram semeados e mantidos a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, as células foram incubadas por 48 horas, com várias concentrações do fitol, do FIN, NSF e aciclovir. Foram testadas quatro diluições em triplicada (100; 50; 25 e 12,5 µg/mL). O fitol, as nanopartículas e o aciclovir foram diluídos em meio L-15 suplementado com 2% de SBF. Os experimentos foram feitos em triplicada e em cada poço foi adicionado 200 µL das diferentes concentrações. Células não tratadas foram utilizadas como controle e nesses poços foram adicionadas 200 µL de meio L-15 à 2%.

A viabilidade foi quantificada pela clivagem do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-Il)-2,5 (MTT), um sal de coloração amarela e solúvel em água, a formazan (um sal de coloração roxa e insolúvel em água). A mudança de cor pode ser quantificada medindo a absorbância (MOSMANN, 1983).

Após o período de incubação, o fitol, o FIN, as NSF e o aciclovir foram removidos e 50µL da solução de MTT (1 mg/mL) foram adicionados. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 5% durante 4 horas a 37 °C. Posteriormente, o MTT foi removido e foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), responsável por solubilizar os cristais de formazan. As placas foram levemente homogeneizadas, por 10 minutos, para que os cristais fossem completamente dissolvidos. Ao final, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. A viabilidade celular foi calculada como uma porcentagem da densidade óptica (DO) das culturas tratadas em comparação com os controles não tratados.

A porcentagem de células viáveis foi obtida pela razão:

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

Onde “DO” corresponde à densidade óptica medida em espectrofotômetro.

Foram consideradas concentrações não tóxicas aquelas que mantiveram viabilidade celular igual ou maior que 80%.

7. PREPARO DA AMOSTRA VIRAL

Após a titulação do HSV-1, foram realizadas diluições para obter o inóculo viral. Para realizar a primeira diluição, um eppendorf foi retirado do estoque viral e descongelado lentamente em gelo. Uma alíquota de 100 µL foi retirada do estoque viral e diluída em 900 µL de meio L-15 sem suplemento. Em seguida, foi realizada uma nova diluição da etapa anterior, em que uma alíquota de 200 µL foi diluída em 800 µL L-15 sem suplemento. Afim de atingir a concentração de 100 PFU/400 µL, foi retirada uma alíquota de 100 µL da etapa anterior e diluída em 9,9 mL L-15 sem suplemento. Finalmente, foi realizada a infecção celular por 1 h a 37 °C. Em seguida, foi retirado o inóculo viral e as células infectadas foram tratadas de acordo com o ensaio.

8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO FITOL INCORPORADO EM NANOPARTÍCULAS

Para a avaliação da atividade antiviral do fitol incorporado em nanopartículas lipídicas sólidas de TG1 foram realizados os ensaios antivirais.

Os ensaios de citotoxicidade e de atividade antiviral foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil em colaboração com o Profa. Dra. Paula Renata Lima Machado.

9. ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

O fitol incorporado ou não em nanopartículas lipídicas sólidas de TG1, as nanopartículas sem o fitol e aciclovir foram testados quanto à atividade antiviral pelo ensaio de redução de placa, nas concentrações de trabalho, frente ao HSV-1.

Em todos os ensaios, as células Vero E6 foram cultivadas em garrafa 75 cm² (Corning) até atingir uma monocamada confluenta. Após atingir a confluência de 90% ou mais, as células foram removidas com a adição de 1 mL de tripsina (Sigma) diluída com tampão salino (PBS) (1:3). O conteúdo da garrafa foi ressuspendido em 23 mL de meio L-15 (Sigma) suplementado com SBF (10 %), triptose fosfato (10%) e antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 1 mg/mL). Após homogeneização, 2x10⁵ células/poço/mL foram adicionadas em placas de 12 e 24 poços (Corning) e incubadas por 1 dia em estufa de 37 °C em 5% de CO₂ para formar uma monocamada confluenta para posteriormente ser realizados os ensaios. Os controles negativo e positivo foram realizados em todos os experimentos com o objetivo de se ter um parâmetro de normalidade. A porcentagem de inibição viral foi determinada usando a seguinte relação:

$$\% \text{ de inibição} = \left[1 - \frac{(\text{número de placas dos testes})}{\text{Número de placas do controle vilra}} \right] \times 100$$

10. TRATAMENTO DAS CÉLULAS VERO COM AS AMOSTRAS TESTE E ANTERIOR INFECÇÃO COM HSV-1 (PRÉ-TRATAMENTO)

As células foram incubadas em meio de cultura L-15, suplementado com SBF (10%), triptose fosfato (10%) e antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 1

mg/mL). Após 24 horas, foi observado 90% da monocamada em cada poço, sendo o meio de cultura descartado e adicionada 1 mL das soluções de trabalho com concentrações variando de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL. Decorridas 2h de incubação, a solução foi retirada e inoculada com 400 µL de HSV-1, seguida de incubação por 1 h nas mesmas condições já descritas. Passado o período de adsorção do vírus, o mesmo foi removido e adicionado 1 mL de overlay em cada poço e a placa foi incubada por 48h. O experimento de controle foi realizado nas mesmas condições, diferindo no momento da adição das soluções de trabalho em que foi adicionado overlay à 3 % de CMC.

11. TRATAMENTO DAS CÉLULAS VERO COM AS AMOSTRAS TESTE E POSTERIOR INFECÇÃO COM HSV-1 (PÓS-TRATAMENTO)

As células foram cultivadas em meio de cultura L-15 modificado, suplementado com SBF (10 %), triptose fosfato (10 %) e antibióticos (penicilina 100U/mL, estreptomicina 1mg/mL). Após 24 horas, quando foi observado 90 % de confluência em cada poço, o meio de cultura foi descartado e as células foram infectadas com 400 µL do HSV-1 incubando por 1 h e homogeneizadas a cada 15 min. Ao fim da adsorção viral, o inóculo viral foi retirado. Em seguida, foi adicionado 1 mL das seguintes soluções: solução de fitol, fitol incorporado a nanopartículas sólidas, solução branco e solução de aciclovir nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL em cada poço e incubado por 48 horas em estufa de 37 °C com 5% de CO₂. O experimento de controle foi realizado nas mesmas condições.

12. TRATAMENTO CONCOMITANTE

As células foram cultivadas em meio de cultura L-15 modificado, suplementado com SBF (10%), triptose fosfato (10%) e antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 1 mg/mL). Após 24h, quando foi observado 90% de confluência em cada poço, foi retirado o meio de cultura e no mesmo momento foi adicionado 400 µL da solução viral e 1 mL das soluções de fitol, FIN, solução branco e solução de aciclovir nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL em cada poço e incubado por 48 horas em estufa de 37 °C com 5% de CO₂. O experimento de controle foi realizado nas mesmas condições.

13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar os resultados, foram utilizados o programa estatístico GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc., EUA) versão 4.0. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste estatístico one-way ANOVA (não-paramétrico), seguido pelo teste de Bonferroni. Para todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

14. CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS

Antes dos ensaios para avaliar a atividade antiviral dos compostos, foi realizada a avaliação da citotoxicidade em células Vero E6 do fitol, do FIN, das NSF e do aciclovir usando o ensaio MTT, observou-se que nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ não demonstraram citotoxicidade, apresentando, uma viabilidade superior que 80%.

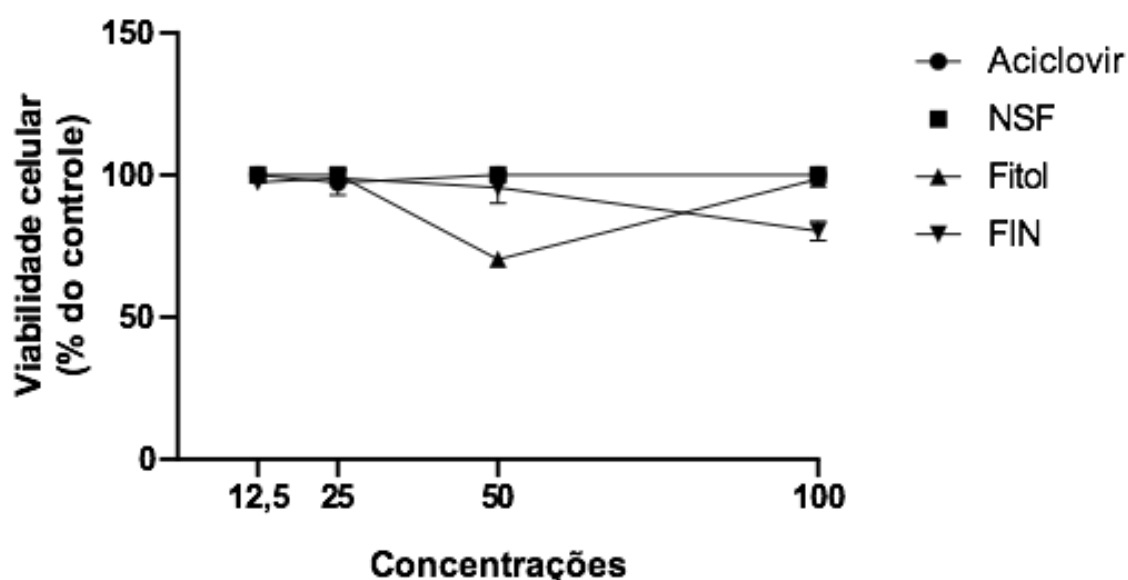


Figura 4. viabilidade de células Vero E6, pela técnica de MTT, submetidas a tratamento com diferentes concentrações do fitol, FIN, Aclovir e NSF. Experimentos realizados em triplicata. Fonte: autor.

15. UNIDADES FORMADORES DE PLACA

Após serem realizados os cálculos, com base na maior diluição dos títulos virais onde as placas foram visíveis, obteve-se a titulação viral de $2,5 \times 10^6$ PFU/mL proveniente da infecção viral da cultura de células Vero E6. Esta titulação foi utilizada nos experimentos para avaliar a atividade antiviral do fitol, do fitol incorporado em nanopartículas lipídicas sólidas de TG1, das nanopartículas sem o fitol e do aciclovir.

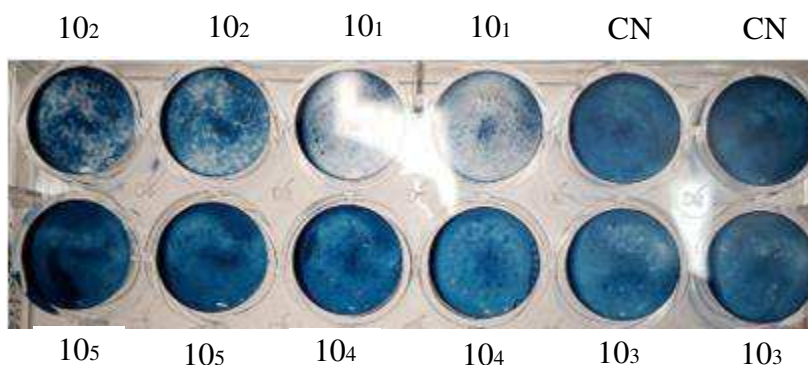


Figura 5. ensaio de placa para titulação do HSV-1. A titulação obtida foi de $2,5 \times 10^4$ PFU/mL a partir do sobrenadante de culturas de células Vero E6 após 48 horas de infecção. O ensaio foi realizado sob uma monocamada de células Vero E6. CN (Controle Negativo).
Fonte: autor

16. EFEITO DOS COMPOSTOS SOBRE A INATIVAÇÃO DO HSV-1

Como mencionado na metodologia, foram utilizadas três condições para avaliar a capacidade antiviral do FIN, da NSF, do aciclovir e do fitol: pré-tratamento; pós-tratamento e tratamento concomitante a infecção. Para a análise dos dados, utilizou-se o controle viral, replicação 100%. No ensaio, as células do controle viral foram infectadas e mortas pelo vírus. Portanto, às porcentagens de inibição de formação de placa detectadas, para cada concentração, correspondem ao número médio de placas no controle positivo e no teste.

Na condição pré-tratamento, seguido de infecção, objetivou-se avaliar a capacidade dos compostos de exercerem uma proteção para as células Vero E6 contra o HSV-1. Após o ensaio, observou-se que o FIN demonstrou atividade antiviral quando comparado com o controle positivo, tendo assim, em todas as concentrações testadas, uma inibição de 100% do HSV-1. Já aciclovir, demonstrou uma inibição viral menor que 30% comparada ao controle positivo. O fitol, neste ensaio, não demonstrou inibição viral em nenhuma das concentrações testadas. As NSF, como esperado, não apresentaram nenhuma alteração, uma vez que este composto não apresentava nenhum princípio ativo em sua constituição e assim constatar que as nanopartículas não interferem no processo de replicação viral (Figura 6).

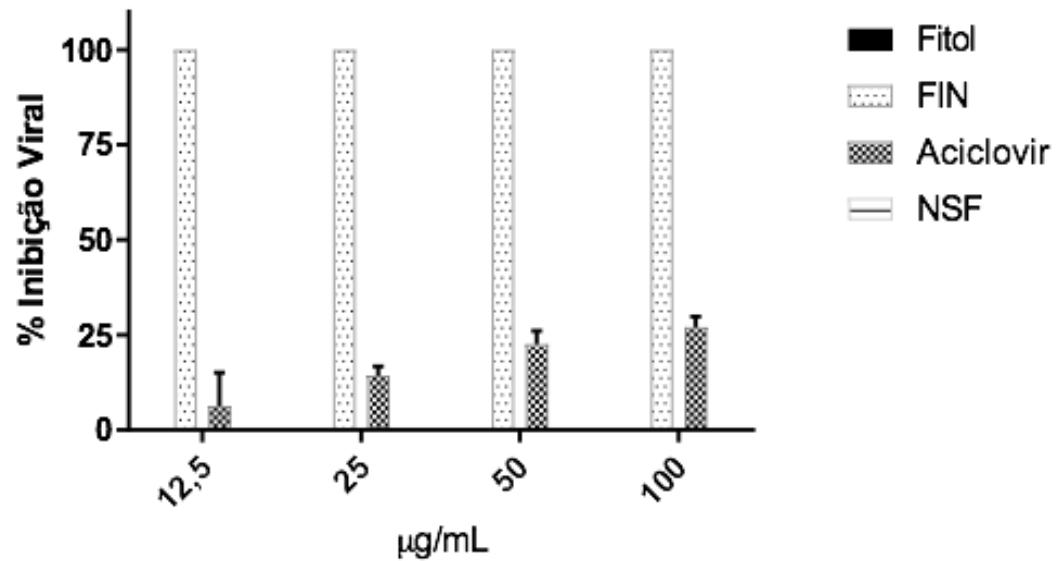


Figura 6. pré-tratamento das células por fitol, FIN, aciclovir e NSF. As concentrações dos compostos (100, 50, 25 e 12,5 µg/mL) foram adicionado a cultura celular duas horas antes da infecção. Fonte: autor.

Ao administrar os compostos concomitante a infecção viral, notou-se que o FIN não demonstrou nenhum tipo de inibição viral do HSV-1. Por outro lado, tanto o aciclovir quanto o fitol, sem estar incorporado às nanopartículas, demonstraram uma redução significativa da formação de placas do HSV-1 quando comparados ao controle positivo (Figura 7). Este ensaio teve como objetivo investigar se os fármacos interferiam no início do ciclo replicativo do vírus.

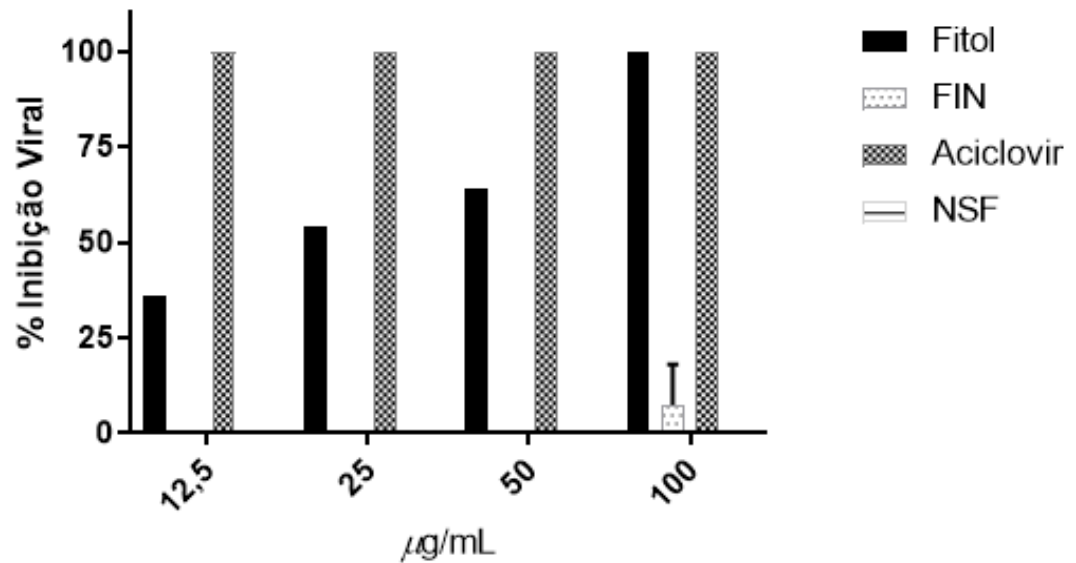


Figura 7. tratamento com fitol, FIN, aciclovir e NSF concomitante com a infecção viral. As concentrações dos compostos (100, 50, 25 e 12,5 µg/mL) foram adicionados simultaneamente a infecção viral. Fonte: autor.

Na condição de pós-tratamento, foi demonstrado que o FIN, em todas as concentrações, exibiu uma redução significativa no número de placas comparado ao controle positivo quando administrada após a infecção. Enquanto o fitol sem estar incorporado às nanopartículas lipídicas sólida de TG1 só apresentou inibição viral na concentração máxima estudada. O aciclovir em todas as concentrações avaliadas, neste ensaio, demonstrou redução do número de placas virais de 100%.

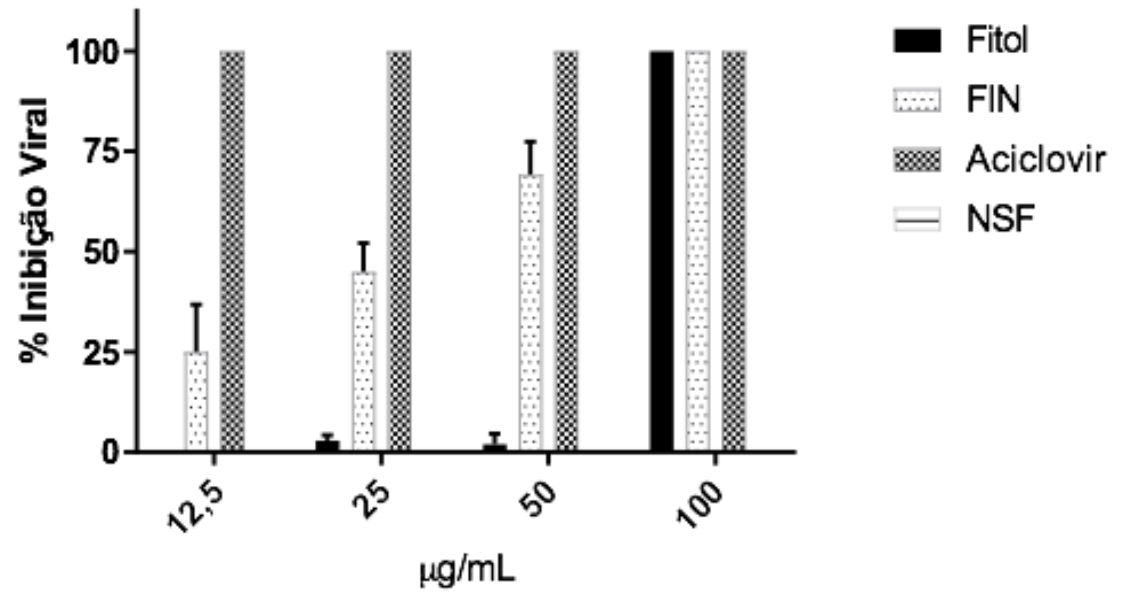


Figura 8: tratamento das células com o fitol, FIN, aciclovir e NSF. As concentrações dos compostos (100, 50, 25 e 12,5 µg/mL) foram adicionados após a adsorção viral às células Vero E6. Fonte: autor.

6. DISCUSSÃO

As infecções causadas pelo HSV são um grave problema de saúde pública em todo mundo, atingindo mais de um terço da população mundial (AL-DHUBIAB et al., 2015). Atualmente, estas infecções podem ser tratadas com o aciclovir. Porém, diversos fatores interferem no sucesso do tratamento como resistência viral (PIRET e BOIVIN, 2014), efeitos colaterais, como insuficiência renal aguda e neurotoxicidade (ORION et al., 2005). Dessa forma, é esperado o desenvolvimento de novas fórmulas farmacêuticas a fim de superar essas limitações supracitadas e garantir uma melhor qualidade de vida para os pacientes durante o tratamento das infecções pelo vírus herpes.

Assim, o nosso estudo almeja que no futuro o fitol possa ser utilizado como uma droga alternativa no tratamento das infecções por HSV-1 resistentes a terapia convencional, o que corrobora com a Política Nacional de Medicamentos (PNM) do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001), em que é incentivada a revisão de tecnologias de formulações farmacêuticas, além do apoio às pesquisas que visam o aproveitamento do potencial terapêutico da flora e fauna nacionais.

No presente estudo, o aciclovir foi utilizado como controle positivo e só foram observados efeitos inibitórios nos ensaios concomitante e pós-tratamento. No ensaio pré-tratamento não foram observados nenhuma atividade anti-HSV-1, uma vez que o aciclovir age intracelularmente, ou seja, este fármaco só apresenta eficácia de tratamento em células já infectadas por HSV (SCHLEISS, 2009).

A atividade antiviral do fitol tem sido relatada na literatura (SANTOYO et al. 2010; SANTOYO et al., 2012; KESHARWANI et al. 2017). Porém, o mecanismo de ação do fitol ainda não foi totalmente esclarecido (PRABHA, PARTHIK e CHANDRIKA, 2019). De acordo com Gavanji et al. (2015), compostos vegetais naturais têm vários mecanismos de ação anti-herpéticos que dependem dos compostos ativos da planta. Lee et al. (2016) sugerem que o fitol provoque a inativação de proteínas e enzimas gerando um dano a membrana celular pela indução do estresse oxidativo.

Estes dados sugerem que apenas o FIN interferiu no processo de infecção do HSV-1 intracelularmente por processos de endocitose, uma vez que de acordo com Radaic et al, (2016) as nanopartículas podem ser internalizadas nas células eucariontes por meio de danos a membrana celular e/ou por endocitose.

Segundo Sahay, Alakhova e Kabonov (2010), as nanopartículas utilizam diferentes vias de endocitose para entrada celular sendo um processo dinâmico onde as macromoléculas são transportadas para diferentes destinos subcelulares. Cavalli et al. (2009) relataram que o uso de nanopartículas alterou a biodisponibilidade e a biodistribuição dos princípios ativos, reduzindo efeitos colaterais e melhorando a eficácia dos medicamentos.

Santoyo et al., (2010) ao avaliarem a atividade anti-HSV-1 do fitol em experimentos de redução de placa observaram que nos ensaios em que as células Vero foram pré-tratadas com fitol, em doses de 75 µg/mL e de 100 µg/mL ocorreu uma inibição viral significativa de, aproximadamente, 65% e 90% respectivamente para um tempo de exposição de três horas, tendo assim uma inibição viral dose-dependente. Em nossos ensaios, o fitol não apresentou atividade anti-HSV. Portanto, acredita-se haver influência do tempo sobre a atividade antiviral do fitol, uma vez que compostos solubilizados em meio aquoso apresentam um tempo de meia vida curto e/ou absorção lenta pelo organismo (SZUNERITS et al., 2015), além disso, são necessárias várias doses para manter o nível da droga relativamente constante (TYRING, BAKER e SNOWDEN, 2002).

Medini et al., (2014) ao avaliar o uso de extratos vegetais em hexano, diclorometano, etanol e metanol sobre a inibição viral do HSV-1 em células Vero não observaram valores significativos nos ensaios de redução de placa em testes pré-tratamento.

Lin et al. (2011) realizaram estudos para avaliar a potencial atividade antiviral de taninos em ensaios de pré-tratamento analisando a infecção primária e secundária, ligação e ou adsorção viral e infecção célula a célula. O pré-tratamento das células Vero com os taninos não teve efeito na replicação do HSV-1 indicando que é improvável mascarar os receptores da superfície celular ou os fatores de entrada do HSV-1 pelos taninos estudados.

Os ensaios realizados com os compostos adicionados às células concomitantemente à infecção viral também demonstraram uma redução significativa da inibição do HSV-1. Porém, somente o fitol apresentou essa característica, tendo uma melhor eficácia na maior concentração, sendo dose-dependente, enquanto o FIN, nessas condições, não demonstrou eficácia para o tratamento.

Medini et al. (2014) observaram resultados similares ao nosso ao utilizarem extrato etanólico *Limonium densiflorum* e obtiveram 100% de inibição do HSV-1 em

que o resultado obtido foi atribuído pela presença de compostos polares e do grupo -OH do solvente, os quais são responsáveis por atividades antivirais. Os autores atribuíram o desempenho do composto observado ao mecanismo de solubilização do envelope do vírus e degradação ou mascaramento de algumas das proteínas essenciais presentes no envelope as quais são necessárias para adsorção ou entrada dos vírus nas células hospedeiras. Além disso, também ressaltaram que esses extratos podem ter componentes ativos responsáveis por melhorarem a inativação do vírus, podendo impedir a replicação no sistema hospedeiro.

Assim como observado por Medini et al. (2014), os quais explicam que polifenóis se ligam as proteínas e formam complexos instáveis deixando o vírus mais susceptível, uma vez que o composto interage com facilidade com as glicoproteínas do envelope viral, Islam, (2017) afirma que os diterpenos em altas concentrações penetram na membrana criando poros em diversos organismos, como vírus, causando a perda de componentes essenciais como organelas, ocasionando a morte dos organismos, podendo promover o aumento da permeabilidade da membrana celular devido a sua alta hidrofobicidade.

Em relação aos resultados obtidos para o FIN, não houve atividade antiviral significativa. Durante este ensaio, o FIN ficou simultaneamente em contato com o vírus e com as células Vero por um período de uma hora. A falta de inibição viral do FIN provavelmente ocorreu pelas características das nanopartículas terem uma ação controlada do fármaco impedindo, assim, a inibição viral, de modo que o tempo de exposição não tenha sido suficiente para a liberação do ativo. Santos-Silva et al. (2017), Kang et al. (2016) e Lin et al. (2010) *apud* Lima et al., (2018) as nanopartículas têm a capacidade de preservar o fármaco aprisionando na matriz polimérica, lhe dando uma característica promissora para o direcionamento de fármacos destinado às células ou tecidos afetados específicos.

Nos ensaios pós-tratamento o FIN apresentou uma inibição da replicação do vírus em todas as concentrações enquanto que o fitol apresentou eficácia na concentração de 100 µg/mL. Levando em consideração o tempo de exposição igual para todos os ensaios, o fitol pode ter atuado impedindo a infecção célula a célula, ocasionando o efeito inibitório. Já para o FIN, acredita-se que o período tenha sido suficiente para liberar o princípio ativo, sendo assim tendo uma inibição viral significativa em todas as concentrações. Santoyo et al. (2012) avaliaram a atividade antiviral de extratos de algas marinhas, principalmente na etapa da ligação viral, e

perceberam que os compostos foram capazes de inibir a replicação viral intracelular do HSV-1 em 75% em uma concentração de 150 µg/mL, atribuindo esta atividade antiviral a compostos ativos presentes nos extratos etanólicos das algas, entre eles o fitol.

Kesharwani et al. (2017), ao investigarem a atividade antiviral de extratos etanólicos de *Terminalia chebula*, afirmaram que a inibição da replicação viral do HSV-1 dá-se através de uma ligação entre estes extratos e a glicoproteínas virais expressadas na superfície das células Vero infectadas, impedindo a replicação viral célula a célula e não intracelularmente.

De acordo com os nossos resultados, serão necessários novos estudos para verificar como ocorre o mecanismo de ação do FIN, já que ele tanto pode agir na membrana celular das células infectadas como na inibição intracelular, além de uma otimização sobre o uso de nanopartículas como sistemas de liberação de medicamentos. Além do mais, nosso grupo realizará novos estudo mais aprofundado para avaliar a influência dos solventes não aquosos sobre o fitol, assim como o comportamento do sistema celular e viral.

Os resultados deste estudo são considerados promissores para o tratamento de infecções resistentes por HSV-1 a terapia convencional, sendo uma possível abordagem no tratamento com o uso de novas tecnologias de liberação de fármaco. Nesse caso, ressalta-se o uso das nanopartículas lipídicas sólidas de TG1, que são sistemas capazes de atuar no organismo ocasionando menores efeitos colaterais pelos medicamentos, assim como manter o princípio ativo dentro da janela terapêutica por mais tempo que as tecnologias convencionas utilizadas no mercado atualmente.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento do presente estudo avaliou a possibilidade do uso do fitol como agente antiviral frente ao vírus HSV-1, podendo o princípio ativo estar ou não incorporado às nanopartículas. Para tanto, a metodologia abordada teve como base expor o sistema trabalhado em condições diferentes (pré-tratamento, concomitante e pós-tratamento) para fim de compreender a possível atuação do fitol e se o complexo fitol-nanopartículas proporcionaria um melhor efeito inibitório.

De tal modo, nossos resultados indicam que o fitol incorporado às nanopartículas de TG1 nas concentrações testadas foi capaz de reduzir o número de placas do HSV-1 na cultura de célula Vero E6. Igualmente, o agente antiviral administrado antes ou após a infecção conseguiu inibir a replicação viral do HSV-1.

Pondera-se ainda que o ativo, quando incorporado às nanopartículas de TG1 administrado simultaneamente à infecção viral nas concentrações testadas, não foi capaz de inibir a replicação do vírus HSV-1 em células Vero E6. Já o fitol apresentou melhor atividade antiviral nos ensaios concomitantes.

Por fim, dentro das hipóteses do mecanismo de ação do fitol, acredita-se que o mesmo possa ter impedido a entrada do HSV-1 nas células Vero E6, interferindo no seu ciclo replicativo, como também na ligação célula a célula.

8. REFERÊNCIAS

ABOZAID, D. RAMADAN, A. BARAKAT, H. KHALAFALLAH, N. Acyclovir lipid nanocapsules gel for oromucosal delivery: A preclinical evidence of efficacy in the chicken pouch membrane model. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 121, p. 228 – 235, 2018.

AL-DHUBIAB, B. E. NAIR, A. B. KUMRIA, R. ATTIMARAD, M. HARSHA, S. Formulation and evaluation of nano based drug delivery system for the buccal delivery of acyclovir. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 878 – 818, 2015.

ANAND, P. KUNNUMAKKARA, A. B. NEWMAN, R. A. AGGARWAL, B. B. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular Pharmaceutics*, v. 4, p. 807 – 818, 2007.

BRASIL. Ministério da saúde, 2001. Política nacional de medicamentos, 2001. Disponível em <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_medicamentos.pdf>. Acessado em 04 de janeiro de 2020.

BRADY, R. C. BERNSTEIN, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Research*, 61(2): 73-81. 2004.

BROWN, J. C.; NEWCOMB, W. W. Herpesvirus capsid assembly: Insights from structural analysis. **Curr Opin Virol.**, 1 (2), p. 142–9, 2011.

CAVALLI, R. DONALISIO, M. CIVRA, A. FERRUTI, P. RANUCCI, E. TROTTA, F. LEMBO, D. Enhanced antiviral activity of Acyclovir loaded into β -cyclodextrin-poly(4-acryloylmorpholine) conjugate nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 137, p. 116 – 122, 2009.

CLARK, A. M. Natural Products as a resource for new drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 1133 – 1144, 1996.

CLEMENS, S. A. C; FARHAT, C. K. Soroprevalence of herpes simplex 1-2 antibodies in Brazil. **Revista de Saúde Pública**. v. 37 n. 4 p. 1-8. 2010.

COSTA, J. P.; et al. Anxiolytic-like effects of phytol: Possible involvement of GABAergic transmission. **Brain. Res.**, n. 1547, p. 34-42, 2014.

COUVREUR, P. VAUTHIER, C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease. **Pharmaceutical Research**, v. 23, p. 1417 – 1450, 2006.

COWAN, F. M. FRENCH, R. S. MAYAUD, P. GOPAL, R. ROBINSON, N. J. OLIVEIRA, S. A. de. FAILLAGE, T. UUSKÜLA, A. NYGÅRD-KIBUR, M. RAMALINGAM, S. SRIDHARAN, G. Seroepidemiological study of herpes simplex virus types 1 and 2 in Brazil, Estonia, India, Morocco, and Sri Lanka. **Sexually Transmitted Infections**. v. 79, p. 286 – 290, 2003.

DAINES, A. PAYNE, R. J. HUMPHRIES M. E. ABELL, A. The synthesis of naturally occurring Vitamin K and Vitamin K analogues. **Current Organic Chemistry**, v. 7, p. 1625 – 1634, 2003.

DONALISIO, M. LEONE, F. CIVRA, A. SPAGNOLO, R. OZER, O. LEMBO, D. CAVALLI, R. Acyclovir-Loaded Chitosan Nanospheres from Nano-Emulsion Templating for the Topical Treatment of Herpesviruses Infections. **Pharmaceutics**, v. 10, p. 1 – 12, 2018.

ELSAWY, K. M. TWAROCK, R. VERMA, C. S. CAVES, L. S. D. Peptide Inhibitors of Viral Assembly: A Novel Route to Broad-Spectrum Antivirals. **J. Chem. Inf. Model.** 52, 3, 770-776. 2012.

FACCHINI, G. Estudo da administração de fitol e retinol sobre linhagens celulares humanas de glioblastoma. Tese (doutorado). Universidade Estadual de Campinas. São Paulo. 2018.

FATAHZADEH, M. SCHWARTZ, R. A. Human herpes simplex labialis. **Clinical Experimental Dermatology**, v. 32, p. 625 – 630, 2007.

FRANCO, Nuno Araújo. Nanopartículas e suas Aplicações em Ciências Farmacêuticas: O Estado da Arte. 2013, 67 fls. Projeto de Pós Graduação (Mestrado) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

GASCO, M. R. Lipid nanoparticles: perspectives and challenges. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 377 – 378, 2007.

GAVANJI, S. SAYEDIPOUR, S. S. LARKI, B. BAKHTARI, A. Antiviral activity of some plant oils against herpes simplex virus type 1 in Vero cell culture. **Journal of Acute Medicine**. 2015.

GELLER, M; NETO, M. S; RIBEIRO, M. G; OLIVEIRA, L; NALIATO, E. C. O; ABREU, C; SCHECHTMAN, R. C. Herpes Simples: Atualização Clínica, Epidemiológica e Terapêutica. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 24, p. 260 – 266, 2012.

GILBERT, C. BESTMAN-SMITH, J, BOIVIN G. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. **Drug Resist Update**. 5:88e114.8. 2002

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Revista Estudos Avançados**. São Paulo, v.24, n.70, p.81-98, 2010.

GUIMARÃES, A. G. OLIVEIRA, G. F. MELO, M. S. CAVALCANTI, S. C. H. ANTONIOLLI, A. R. BONJARDIM, L. R. SILVA, F. A. SANTOS, J. P. ROCHA, R. F. MOREIRA, J. C. ARAÚJO, A. A. GELAIN, D. P., QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol**. 107,949–957. 2010.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/>>. Acesso em: 04 de dezembro de 2019.

ISLAM, M. T. STRECK, L. ALENCAR, M. V. de. CARDOSO SILVA, S. W. CONCEIÇÃO, K. M. da. CONCEIÇÃO, K. M. da. GOMES JÚNIOR, A. L. PAZ, M. F. MATA, A. M. da. CASTRO E SOUSA, J. M. de. COSTA JUNIOR, J. S. da. LINS, H. M. R. SILVA-JUNIOR, A. A. da. CARVALHO A. M. C. de. Evaluation of toxic, cytotoxic and genotoxic effects of phytol and its nanoemulsion. **Chemosphere**, v. 177, p. 93 – 101, 2017.

ISLAM, M. T. PROSPECÇÃO TOXICOGENÉTICA NÃO CLÍNICA DO FITOL LIVRE E EM NANOEMULSÃO. Programa De Pós-Graduação Em Biotecnologia. TERESINA – PI. 2017.

KELLY, B. J. FRAEFEL, C. CUNNINGHAM, A. L. DIEFENBACH, R. J. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. **Virus Research**, v. 145, p. 173 – 186, 2009.

KHAN, M. T. H. ATHER, A. THOMPSON, K. D. GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral Research**, v. 67, p. 107 – 119, 2005.

KESHARWANI, A. POLACHIRA, S. K. NAIR, R. AGARWAL, A. MISHRA, N. N. GUPTA, S. K. Anti-HSV-2 activity of Terminalia chebula Retz extract and its constituents, chebulagic and chebulinic acids. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 17, p. 1620 – 1628, 2017.

KNIPE, D. M. HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 6° edição. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013. 2664 p.

LEE, W. WOO, E. R. LEE D. G. Phytol has antibacterial property by inducing oxidative stress response in pseudomonas aeruginosa. **Free Radical Research**, v. 50, p. 1309 – 1318, 2016.

LIMA, T. L. C. FEITOSA, R. C. SANTOS-SILVA, E. SANTOS-SILVA, A. M. SIQUEIRA, E. M. S. MACHADO, P. R. L. CORNÉLIO, A. M. EGITO, E. S. T. PEDROSA, M. F. F. FARIAS, K. J. S. SILVA-JÚNIOR, A. A. Improving Encapsulation

of Hydrophilic Chloroquine Diphosphate into Biodegradable Nanoparticles: A Promising Approach against Herpes Virus Simplex-1 Infection. **Pharmaceutics**. 2018.

LIN, L. T. CHEN, T. Y. CHUNG, C. Y. NOYCE, R. S. GRINDLEY, T. B. MCCORMINK, C. LIN C. C. RICHARSSON, C. D. Hydrolyzable Tannins (Chebulagic Acid and Punicalagin) Target Viral Glycoprotein-Glycosaminoglycan Interactions To Inhibit Herpes Simplex Virus 1 Entry and Cell-to-Cell Spread. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 85, p. 4386 – 4398, 2011.

LV, Q. YU, A. XI, Y. LI, H. SONG, Z. CUI, J. CAO, F. ZHAI, G. Development and evaluation of penciclovir-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, p. 191 – 198, 2009.

MCNEIL, M. J. PORTER, R. B. WILLIAMS, L. A. Chemical composition and biological activity of the essential oil from Jamaican *Cleome serrata*. **Natural Product Communications**, v. 7, p. 1231 – 1232, 2012.

MEDINI, F. LEGAULT, J. PICHETTE, A. ABDELLY, C. KSOURI, R. Antiviral efficacy of *Limonium densiflorum* against HSV-1 and influenza viruses. **South African Journal of Botany**, v. 92, p. 65 – 72, 2014.

MEHNERT, W. MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 83 – 101, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55 – 63, 1983.

NEVILLE, B. W; DAMM, D. D; ALLEN, C. M; BOUQUOT, J. E. *Patologia Oral & Maxilofacial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.; 2004.

NEWMAN, D. J. CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629 – 661, 2016.

NIKKELS, A. F. PIÉRARD, G. E. Oral antivirals revisited in the treatment of herpes zoster. What do they accomplish? **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 3, p. 591 – 598, 2002.

NAITHANI, R. MEHTA, R. G. SHUKLA, D. CHANDERSEKERA, S. N. MORIARTY, R. M. Antiviral Activity of Phytochemicals: Current Perspective. 2010.

ORION, E. MATZ, H. WOLF, R. The life-threatening complications of dermatologic therapies. **Clinics in Dermatology**, v. 23, p. 182 – 92, 2005.

PASSOS J.L., BARBOSA L.C., DEMUNER A.J., ALVARENGA E.S., SILVA C.M., BARRETO R.W. Chemical characterization of volatile compounds of *Lantana camara* L. and *L. radula* Sw. and their antifungal activity. **Molecules**. 17 11447–11455. 2012.

PIRET, J. BOIVIN, G. Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus. **Reviews in Medical Virology**, v. 24, p. 186 – 218, 2014.

PENG, T. Strategies for Antiviral Screening Targeting Early Steps of Virus Infection. **Virologica Sinica**, 25: 281-293. 2010.

PRABHA, S. P. KARTHIK, C. CHANDRIKA S. H. Phytol – A biosurfactant from the aquatic weed *Hydrilla verticillate*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p.736 – 742, 2019.

PRAJAPATI, B. PANCHAL, M. VARIA, U. Formulation and Evaluation of Aciclovir Loaded Novel Gelfor Topical Application. **Biomedical Journal of Science & Technology Research**, v. 1, p. 319 – 324, 2017.

RADAIC, A. PUGLIESE, G. O. CAMPESE, G. C. PESSINE, F. B. T. JESUS, M. B. Como estudar interações entre nanopartículas e sistemas biológicos. *Quím. Nova* vol.39 no.10 São Paulo Dec. 2016.

RAI, M. P. THILAKCHAND, K. R. PALATTY, P. L. RAO, P. RAO, S. BHAT, H. P. BALIGA, M. S. Piper betel Linn (betel vine), the maligned Southeast Asian medicinal

plant possesses cancer preventive effects: time to reconsider the wronged opinion. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 12, p. 2149 – 2156, 2011.

ROIZMAN, B. KNIPE, D. M. WHITLEY, R. J. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe, D.M. & Howley, R.M. Fields virology. 5th ed. Pennsylvania-Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p.2502–601. 2007.

SCHLEISS, M.R. Persistent and recurring viral infections: the human herpesviruses. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 39(1): 7-23. 2009.

SAIKIA D. PARIHAR S. CHANDA D. OJHA S. KUMAR J. K. CHANOTIYA C. S. SHANKER K. NEGI A. S. Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 508 – 512, 2010.

SAHAY, G., ALAKHOVA, D.Y. KABANOV, A.V. Endocytosis of nanomedicines. **J. Control. Release** 145, 182–195. 2010.

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

SILVA, R. O. SOUSA, F. B. M. DAMASCENO, S. R. B. CARVALHO, N. S. SILVA, V. G. OLIVEIRA, F. R. M. A. SOUSA, D. P. ARAGÃO, K. S. BARBOSA, A. L. R. FREITAS, R. M. MEDEIRO, J. V. R. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 28, p. 455 – 464, 2013.

SILVA, A. H. FILIPPIN-MONTEIRO, F. B. MATTEI, B. ZANETTI-RAMOS, B. G. CRECZYNSKI-PASA, T. B. In vitro biocompatibility of solid lipid nanoparticles. **Science of the Total Environment**, v. 432, p. 382 – 388, 2012.

SIMONI, I. C. Tratamentos antivirais. In: Reunião Anual do Instituto Biológico, 65(1-2): 41-44. 2003

SANTOYO, S. PLAZA, M. JAIME, L. IBAÑEZ, E. REGLERO, G. SEÑORANS, F. J. Pressurized Liquid Extraction as an Alternative Process To Obtain Antiviral Agents from the Edible Microalga *Chlorella vulgaris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8522 – 8527, 2010.

SANTOYO, S. JAIME, L. PLAZA, M. HERRERO, M. MEIZOSO, I. R. IBAÑEZ, E. REGLERO, G. Antiviral compounds obtained from microalgae commonly used as carotenoid sources. **J Appl Phycol**. 24:731–741. 2012.

SINGH, L. KRUGE, H. G. MAGUIRE, G. E. M. GOVENDER, T. PARBOOSING, R. The role of nanotechnology in the treatment of viral infections. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 4, p. 105 – 131, 2017.

SIMÕES, M. O. GUERRA, M. P. NODARI, R. O. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Ed. 6^o. Editora UFRGS. Capítulo 1, pp. 13-29. 2010.

SPODE VL, SCHMITT VG. Estudo sobre as possíveis vias de transmissão do Herpesvírus Humano tipo 8. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 35, p. 41 – 43, 2003.

SIMMONS, A. Clinical manifestations and treatment considerations of herpes simplex virus infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 71 – 77, 2002.

SOUSA, D. P. Analgesic-like activity of essential oils constituents. *Molecules* 16,2233–2252. 2011.

SZUNERITS, S. BARRA, A. KHANAL, M. PAGNEUX, Q. BOUKHERROUB, R. Nanostructures for the Inhibition of Viral Infections. *Molecules*. 20(8): 14051–14081. 2015.

TYRING S.K. BAKER D. SNOWDEN W. Valacyclovir for herpes simplex virus infection: Long-term safety and sustained efficacy after 20 years' experience with acyclovir. **J. Infect. Dis.** 186(Suppl. S1):S40–S46. 2002.

VARELLA, R. B. PIRES, I. L. SARAIVA, C. A. GUIMARÃES, A. C. C. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus herpes simples (HSV) em pacientes transplantados e não-transplantados. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, p. 257 – 262, 2005.

WALD, A. COREY, L. Persistence in the population: epidemiology, transmission. Human herpesviruses: biology, therapy and immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge University Press, p. 656–671. 2007.

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

WHITLEY, R; COREY, L; ARVIN, A. MINTZ, E. LAKEMAN, F. D. SUMAYA, C. V. WRIGHT, P. F. DUNKLE, L. M. STEELE, R. W. SOONG, S. NAHMIAS, A. J. ALFORD, C. A. POWELL, D. A. JOAQUIN, V. S. Changing presentation of herpes simplex virus infection in neonates. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 158, p. 109 – 116, 1998.

XU, F. JULIA, A. SCHILLINGER, M. R. STERNBERG, R. E. JOHNSONFRANCIS, K. LEE, A. J. MARKOWITZ, N. L. E. Seroprevalence and Coinfection with Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 in the United States, 1988 – 1994. **The Journal of Infectious Diseases**, v 185, p 1019 – 1024, 2002.

XU, F. STERNBERG, M. KOTTIRI, B. Trends in herpes simplex vírus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. **The Journal of the American Medical Association (JAMA)**, v. 296, p. 964 – 973, 2006.

ZOLINI, G. P. P. Ativação da Resposta Imune Inata Mediada por Receptores do Tipo Toll em Infecção por Vírus Herpes Simplex tipo 1(HSV-1) em Modelo Murino. Tese (doutorado). Belo Horizonte, 2012.