FERNANDO BORGES HONORATO

Efeito *in vitro* de extratos de *Cocos nucifera* L. sobre herpes simplex vírus em cultura de células

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Carmona

Programa de Pós-Graduação em Saúde da

Criança e do Adolescente

Opção: Investigação em Pediatria.

Ribeirão Preto

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica

Honorato, Fernando Borges

Efeito *in vitro* de extratos de *Cocos nucifera* L. sobre herpes simplex vírus em cultura de células. Ribeirão Preto, 2016.

52 p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente – Opção: Investigação em Pediatria.

Orientador: CARMONA, Fabio.

1. Cocos nucifera. 2. Arecaceae. 3. Herpes simplex vírus. 4. Fitoterapia. 5. Antiviral.

Folha de Aprovação

Fernando	Borges	Honorato:	"Efeito	in vitro	de extratos	de Cocos	nucifera L	. sobre h	erpes
simplex v	írus em	ı cultura d	e células	s ".					

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Saúde da Criança e do

Adolescente

Opção: Investigação em Pediatria.

Aprovado em:/	
	Banca Examinadora
Prof. Dr.	Instituição:
Julgamento:	Assinatura:
Prof. Dr.	Instituição:
	Assinatura:
Prof Dr	Instituição:
	Assinatura:

Agradecimentos

A Deus e à minha família, pelas oportunidades e pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Fabio Carmona, pelo exemplo de caráter, perseverança, profissionalismo, humildade e compreensão, e pelas ideias, apoio e incentivo constantes.

Ao Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto, pela inestimável contribuição intelectual, esclarecimentos e pela utilização do Laboratório de Virologia da FMRP-USP.

À Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira, pela sua dedicação à fitoterapia, amparo pessoal e pelo fornecimento dos extratos testados.

À Maria Lúcia Silva (Pitty) por todo o apoio necessário à realização dos experimentos.

À Miriã Criado, pelo incentivo e estímulo à pesquisa.

À equipe de fitoterapia da Farmácia da Natureza, pelos conhecimentos difundidos e oportunidade de aprendizado.

Resumo

HONORATO, F. B. Efeito *in vitro* de extratos de *Cocos nucifera* L. sobre herpes simplex vírus em cultura de células. 2016. 52 pg. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Os vírus são responsáveis por infecções de distribuição mundial com elevadas prevalência e morbimortalidade sendo, muitas das vezes, sem tratamento efetivo disponível. Existem medicamentos fitoterápicos com atividade antibacteriana ou antiviral comprovadas, porém seu uso na prática clínica ainda é limitado. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença ou ausência de atividade antiviral in vitro de extratos brutos e fracionados de Cocos nucifera L. em cultura de células Vero infectadas com herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1). Foram escolhidas doses não tóxicas dos extratos aquoso e hidroetanólico da fibra do C. nucifera, de 4 frações derivadas daquele com diferentes solventes (hexano, acetato de etila, metanol e água) e de duas substâncias isoladas a partir desta fibra (Substâncias CN1A e CN342B). O HSV-1 foi adicionado à cultura de células Vero uma hora após estas serem incubadas com os dois extratos e seus derivados. As placas foram analisadas em microscópio óptico a cada 24 horas, sendo o material colhido quando o efeito citopático viral no controle negativo atingisse mais de 80% das células e congelado para posterior titulação viral por TCID₅₀. Utilizamos o aciclovir como droga de referência para o HSV-1. A substância CN342B foi capaz de inibir a replicação do HSV-1, com efeito antiviral comparável ao do aciclovir, enquanto que os extratos brutos, as quatro frações e a substância CN1A não foram efetivas. Em conclusão, a substância CN342B isolada das fibras do C. nucifera foi eficaz contra o HSV-1 in vitro.

Palavras-chave: Cocos nucifera, Arecaceae, herpes simplex vírus, fitoterapia, antiviral.

Abstract

HONORATO, F. B. Effects of extracts of *Cocos nucifera* L. against herpes simplex virus in cell cultures. 2016. 52 pg. Dissertation (Master's) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Viruses are responsible for infections worldwide with high prevalence and morbimortality, often with no effective treatment available. There are herbal medicines with proven antibacterial and antiviral activities; however, their use in clinical practice is still limited. The aim of this study was to investigate the presence or absence of *in vitro* antiviral activity of aqueous and hydroethanolic extracts from *Cocos nucifera* L. husk fiber, in culture of Vero cells infected with herpes simplex virus (HSV)-1. Non-toxic dosages of aqueous and hydroethanolic extracts, as well as the hexane, ethyl-acetate, methanol and end-aqueous fractions were used. In addition, two isolated substances (CN1A and CN342B) were tested. HSV-1 was added to the cell culture after one hour of incubation with the extracts and fractions. The plates were analyzed in optical microscopes each 24 hours, and cells were harvested when the cytopathic effect in negative controls were above 80% of the cells. The cells were then frozen for viral titulation (TCID₅₀). Acyclovir was the reference drug for HSV-1. Substance CN342B, but none of the other drugs, was able to reduce HSV-1 replication, similarly to acyclovir. In conclusion, the substance CN342B isolated from *C. nucifera* husk fibers was effective against HSV-1 *in vitro*.

Keywords: *Cocos nucifera*, Arecaceae, herpes simplex virus, herbal medicine, antiviral.

Lista de figuras

Figura 1. Titulação de herpes simplex tipo 1 (HSV-1) em cultura de células Vero após
tratamento com meio essencial mínimo 2% (MEM2%) (C-), com extrato aquoso de C.
nucifera 200 μg/mL (AB) e suas frações com diferentes solventes: hexano 200 μg/mL
(Hex), acetato de etila 100 μg/mL (Ac), metanol 200 μg/mL (Met) e aquoso final 300
μg/mL (AF), com multiplicidades de infecção (MOI)=1, 0,1 e 0,01. *: Diferença mais
significativa em relação ao não tratado (C-)31
Figura 2. Titulação de herpes simplex tipo 1 (HSV-1) em cultura de células Vero após
tratamento com meio essencial mínimo 2% (MEM2%) (C-), com extrato aquoso de C.
nucifera 200 μg/mL (AB) e sua fração metanólica 200 μg/mL (Met) em duas diferentes
MOI (0,01 e 0,001) sem diferença entre os grupos.
Figura 3. Curva do ensaio de MTT mostrando a viabilidade celular (%) em relação a
concentrações crescentes do extrato aquoso bruto de C. nucifera (em µg/mL)33
Figura 4. Curva do ensaio de MTT mostrando a viabilidade celular (%) em relação a
concentrações crescentes da substância CN1A, extraída a partir do C. nucifera (em
μg/mL)34
Figura 5. Curva do ensaio de MTT mostrando a viabilidade celular (%) em relação a
concentrações crescentes da substância CN342B, extraída a partir do C. nucifera (em
concentrações crescentes da substância CN342B, extraída a partir do <i>C. nucifera</i> (em µg/mL).
μg/mL)34
μg/mL)

nimo (bottom) de 1,0; inclinação (slope) de 1,0; concentração que induz metade do	
ito máximo (EC ₅₀) de 91,08 μg/mL (linha pontilhada)	
. Titulação de herpes simplex tipo 1 (HSV-1) em cultura de células Vero após mistura	Figu
eta de HSV-1 com MEM2% (controle negativo), substância CN342B a 200 μg/mL,	
ção metanólica (Met) de $\it C.~nucifera$ a 200 $\mu g/mL$, extrato aquoso bruto (AB) de $\it C.~$	
cifera a 200 µg/mL e álcool 70% (A70%, controle positivo)38	

Lista de tabelas

Tabela 1 – Plantas e algas com atividade anti-herpética demonstrada in vitro	16
Tabela 2 – Citotoxicidade das frações do extrato aquoso de C. nucifera	30
Tabela 3 - Concentrações das drogas ou substâncias utilizadas nos experimentos de	avaliação
do efeito citopático viral.	35

Abreviaturas e siglas

ACV Aciclovir

HSV-1 Herpes simplex vírus tipo 1

IIV Índice de inibição viral

MCFA Ácidos graxos de cadeia média

MEM Meio essencial mínimo

MOI Multiplicidade de infecção

PI Porcentagem de inibição

SFB Soro fetal bovino

Sumário

1 Introdução	12
1.1 Relevância do estudo	12
2 Revisão da literatura	13
2.1 Fitoterapia	13
2.2 Herpes simplex vírus	14
2.3 Cocos nucifera L. (Arecaceae)	18
3 Objetivos	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4 Materiais e Métodos	24
4.1 Delineamento do estudo	24
4.2 Vírus, células, drogas e reagentes	24
4.3 Preparação dos extratos vegetais	25
4.4 Avaliação da citotoxicidade dos extratos em células Vero	26
4.5 Avaliação da capacidade inibitória dos extratos de C. nucifera sobre HSV	27
4.6 Avaliação do efeito dose-resposta dos extratos de C. nucifera sobre HSV	28
4.7 Avaliação do efeito virucida dos extratos de C. nucifera sobre HSV	28
5 Resultados	30
6 Discussão	39
7 Conclusão	42
Referências	43
Anevo A - Análice de compostos inorgânicos da substância CN342R	52

1 Introdução

Vírus são uma séria ameaça à saúde da população em todo o mundo. Enquanto para as doenças bacterianas existem várias drogas eficazes, as doenças virais são difíceis de tratar, pois a disponibilidade de drogas antivirais não é satisfatória (ARORA et al., 2011).

Vários estudos já foram feitos na tentativa de prevenir e tratar as infecções virais, envolvendo o desenvolvimento de vacinas e drogas inibidoras da replicação viral. Para alguns vírus já dispomos de vacinas eficazes, como no caso do vírus da Hepatite B. Para outros, existem tratamentos capazes de controlar a infecção, como no caso dos antirretrovirais para HIV. Os vírus têm alta capacidade de mutação e existem inúmeras cepas de cada tipo viral, o que acaba dificultando, e muito, o desenvolvimento de terapias eficazes contra muitas destas infecções. Em geral, estas pesquisas requerem investimento financeiro elevado, o que gera medicamentos de alto custo, dificultando o acesso da população de baixa renda, principalmente em países subdesenvolvidos, aos tratamentos existentes (CALIXTO; SIQUEIRA JR, 2008).

Muitas pesquisas recentes em fitoterapia foram idealizadas a partir do uso tradicional de determinadas plantas pela população, algumas delas com possível efeito antiviral, sendo algumas com comprovação científica, outras não. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antiviral da espécie *Cocos nucifera* L. ("coco-da-baía", Arecaceae), sobre a qual há relatos etnofarmacológicos de uso em infecções virais, em modelo *in vitro* de infecção pelo herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1).

1.1 Relevância do estudo

Dada a elevada prevalência, a distribuição mundial e a morbimortalidade das infecções virais e os custos associados, a descoberta de nova droga efetiva para HSV a partir do *C. nucifera*, seria de grande importância, principalmente pelo fato de ser esta uma planta abundante em várias partes do mundo, com custo de produção provavelmente baixo.

2 Revisão da literatura

2.1 Fitoterapia

A utilização de plantas como medicamento remonta às origens da humanidade, com registros mais antigos datando da era paleolítica, e é extensamente difundida em diversos países como, por exemplo, China, Índia, Alemanha e Estados Unidos (FERRO, 2008; LORENZI; MATOS, 2008). Estima-se que cerca de 80% da população mundial faça uso de plantas ou de suas preparações na atenção primária à saúde. A utilização de medicamentos fitoterápicos vem sendo estimulada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1978 (Declaração de Alma-Ata), e também pelo governo brasileiro (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b).

A principal vantagem dos fitoterápicos em relação à terapia convencional é o sinergismo do fitocomplexo. O isolamento de um único princípio ativo (uma única substância) pode ser vantajoso em algumas situações, mas não em outras, onde a atuação do fitocomplexo é superior à de quaisquer dos componentes isoladamente (FERRO, 2008). Um exemplo disto é o estudo que mostra que o extrato feito com a planta toda de *Artemisia annua* é mais eficaz contra o plasmódio do que a artemisinina pura (ELFAWAL et al., 2012; ELFAWAL et al., 2015).

Além disso, fitomedicamentos com associação de mais de uma planta permitem a obtenção de maiores efeitos sinérgicos, com utilização de quantidades mais baixas de cada um dos componentes individuais (SAAD et al., 2009). Na atualidade o número de espécies vegetais investigadas quanto aos seus efeitos terapêuticos vem crescendo em função do elevado custo de desenvolvimento de novas drogas sintéticas, que ultrapassam a cifra de 800 milhões de dólares (CALIXTO, 2003), dos efeitos colaterais de medicamentos sintéticos e do aprofundamento de estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com espécies vegetais, os quais têm confirmado os efeitos terapêuticos divulgados por pesquisas etnofarmacológicas.

2.2 Herpes simplex vírus

Herpes simplex vírus (HSV) é uma causa comum de lesões orais e genitais. Existem dois tipos de HSV: tipo 1 e tipo 2. O HSV-1 é o mais frequente, porém não unicamente, associado a infecções não-genitais e transmitido principalmente durante a infância, enquanto que o HSV-2 é mais associado a doença genital e sua transmissão dá-se via relação sexual (WHITLEY; KIMBERLIN; ROIZMAN, 1998; XU et al., 2006).

O HSV é composto por quatro partes: centro denso (contendo o seu DNA de fita dupla), capsídeo icosaédrico, tegumento (camada externa de proteínas que circunda o capsídeo) e envelope lipídico (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; PEREIRA, 1996; WHITLEY; KIMBERLIN; ROIZMAN, 1998).

A partir da infecção primária, são produzidos anticorpos séricos neutralizantes contra o HSV. Apesar disto, alguns indivíduos soropositivos desenvolvem lesões labiais ou genitais recorrentes, caracterizando uma propriedade biológica deste vírus, que é a habilidade de recorrer na presença de imunidade humoral, também chamada de reativação da infecção latente. O HSV é responsável por um amplo espectro de doenças, incluindo infecções primárias ou recorrentes das mucosas (por exemplo, gengivoestomatite, herpes labial ou genital), ceratoconjuntivite, infecção neonatal, infecção visceral em hospedeiros imunodeprimidos, encefalite herpética e associação com eritema multiforme (KUKHANOVA; KOROVINA; KOCHETKOV, 2014; WHITLEY; KIMBERLIN; ROIZMAN, 1998).

Estudos recentes associaram infecção por HSV-1 como um fator maior para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer em pacientes com o alelo tipo 4 da apolipoproteína E, aumentando a formação da substância amiloide β e proteína TAU nas células infectadas (ITZHAKI, 2014; PIACENTINI et al., 2014).

Para iniciar a infecção, o HSV deve se ligar a receptores da superfície celular, fundir seu envelope com a membrana e permitir que o capsídeo seja transportado ao núcleo da célula. O DNA liberado no núcleo passa a controlar sua transcrição, síntese de novo DNA, montagem do capsídeo, enovelamento do DNA e envelopamento, formando novos vírus. As glicoproteínas da superfície viral são responsáveis pela ligação e entrada do vírus nas células, e também pela ativação da resposta imune do hospedeiro ao vírus. Um ciclo, desde a adesão

do vírus à superfície celular até a liberação de novas partículas virais, dura em média 18 horas (HENNIG; O'HARE, 2015; WHITLEY; KIMBERLIN; ROIZMAN, 1998).

O HSV tem capacidade de invadir e se replicar no sistema nervoso central e de estabelecer uma infecção latente. Após a entrada e infecção do sistema nervoso periférico, tanto o HSV-1 quanto o HSV-2 são transportados ao núcleo do gânglio sensitivo, multiplicando-se em um pequeno número de neurônios e permanecendo em estado epissomal na maioria deles, durante toda a vida do indivíduo. As reativações podem ocorrer devido a uma variedade de estímulos locais ou sistêmicos, como estresse físico ou emocional, febre, exposição a luz ultravioleta, lesão tecidual e imunossupressão (SIMMONS, 2002; WHITLEY; KIMBERLIN; ROIZMAN, 1998).

HSV-1 é bem mais comum que o HSV-2, com soroprevalência estimada entre 60 e 90% em algumas populações. O HSV-1 é frequentemente adquirido durante a infância, por exposição a secreções orais. Entretanto, a epidemiologia do HSV-1 tem mudado, já que a transmissão sexual do HSV-1 aumentou em diversos países, inclusive nos Estados Unidos (BERNSTEIN et al., 2013).

Um estudo norte-americano com mulheres de 18 a 30 anos, encontrou incidência de 3,7% de HSV-1 em um período de 20 meses, enquanto que a soroconversão para HSV-2 foi de 1,6%, resultando em uma taxa de infecção para HSV-1 de 2,5/100 pessoas-ano, mais de duas vezes superior àquela para HSV-2 (1,1/100 pessoas-ano). A maioria das infecções (74% para HSV-1 e 63% para HSV-2) aconteceu sem o reconhecimento dos sinais e sintomas da doença por herpes simplex. Não foram notadas diferenças nas manifestações clínicas genitais entre o HSV-1 e HSV-2 (BERNSTEIN et al., 2013).

Outro estudo populacional norte-americano descreveu soro-prevalência para HSV-1 de 62% entre 1988 e1994 e de 57,7% no período entre 1999 e 2004 (XU et al., 2006).

Estudo nigeriano encontrou uma prevalência de 85,2% em crianças entre 49 e 60 meses e de 44,8% entre crianças de 13-24 meses, sendo a frequência escolar um fator de risco (SHAIBU et al., 2014).

Dentre os medicamentos antivirais eficazes para tratamento das infecções sintomáticas por HSV, o mais utilizado é o aciclovir (ACV). Nos Estados Unidos, é comum também o uso de hidrocloreto de valaciclovir, penciclovir e famciclovir. Estas são medicações com baixa citotoxicidade, pois são convertidas pela timidina-quinase viral para a droga ativa, apenas dentro das células infectadas (CERNIK; GALLINA; BRODELL, 2008; SAWLESHWARKAR; DWYER, 2015; SIMMONS, 2002). Estes medicamentos inibem a

replicação viral, porém proporcionam apenas diminuição da duração e da gravidade das lesões recorrentes. Alguns estudos indicam que a inflamação possui papel adicional nos casos de recorrência e que a terapia com anti-inflamatórios (hidrocortisona), associado ao ACV tópico tem efeito superior (menor área de lesão cumulativa) em relação ao antiviral isolado ou ao controle (HULL et al., 2014).

Junto à descoberta de novos agentes antivirais, tem-se observado o surgimento de resistência a estes análogos de nucleosídeos, fato particularmente importante no caso de pacientes imunocomprometidos, como os transplantados e os infectados pelo vírus HIV, com prevalência de 3,5 a 10% nestes pacientes (PIRET; BOIVIN, 2014; SAWLESHWARKAR; DWYER, 2015).

Visto que já existem cepas de HSV resistentes ao ACV e a outros antivirais, tem aumentado o número de trabalhos voltados à pesquisa de substâncias alternativas com atividade anti-HSV. Várias moléculas derivadas de produtos naturais vêm sendo extraídas e modificadas, com o objetivo de chegar a substâncias bioativas e com baixa toxicidade.

A literatura apresenta diversos trabalhos demonstrando a atividade anti-HSV de fitoterápicos (HASSAN; MASARCIKOVA; BERCHOVA, 2015; KHAN et al., 2005), sendo eles plantas terrestres ou algas, extratos brutos, fracionados ou substâncias isoladas (tabela 1).

Tabela 1 – Plantas e algas com atividade anti-herpética demonstrada in vitro (continua)

Planta/Alga	Extrato/Compostos	Referência
Aaptos aaptos	Alcaloide 4-metilaaptamina	(SOUZA et al., 2007)
Achyrocline satureioides	Extrato hidroetanólico	(BETTEGA et al., 2004)
Dictoyota pfaffi	Diterpenos	(ABRANTES et al., 2009)
Dictoyota menstruallis		
Echinacea pallida	Extrato hidroetanólico	(SCHNEIDER et al., 2009)
Geranium sanguineum	Extrato aquoso	(SERKEDJIEVA;
		IVANCHEVA, 1999)
Leptospermum scoparium	Óleo essencial	(REICHLING et al., 2005)
Limonium brasiliense	Extrato hidroetanólico	(FARAL-TELLO et al.,
Psidium guajava		2012)
Phyllanthus niruri		

Tabela 1 – Plantas e algas com atividade anti-herpética demonstrada in vitro (conclusão)

Planta/Alga	Extrato/Compostos	Referência
Melissa officinalis	Extrato aquoso	(NOLKEMPER et al., 2006)
Mentha piperita		
Prunella vulgaris		
Rosmarinus officinalis		
Salvia officinalis		
Thymus vulgaris		
Mentha suaveolens	Óleo essencial	(CIVITELLI et al., 2014)
Myrothamnus flabellifolia	Extrato hidro-acetônico	(GESCHER et al., 2011b)
Phyllanthus orbicularis	Fração butanólica e ácido-	(FERNANDEZ ROMERO
	acética	et al., 2003)
Phyllanthus urinaria	Extrato acetônico	(YANG et al., 2007)
Prunella vulgaris	Complexo carboidrato-	(ZHANG et al., 2007)
	lignina	
Rheum tanguticum	Emodina (antraquinona)	(XIONG et al., 2011)
Rhododendron ferrugineum	Extrato aquoso	(GESCHER et al., 2011a)
Ribes nigrum	Extrato aquoso	(SUZUTANI et al., 2003)
Rubus eubatus	Extrato etanólico	(DANAHER et al., 2011)
Sargassum tenerrimum	Polissacarídeos	(SINHA et al., 2010)
Sphaerococcus	Polissacarídeos	(BOUHLAL et al., 2011)
coronopifolius		
Boergeseniella thuyoides		
Stypopodium zonale	Diterpenos	(SOARES et al., 2007)
Tridax procubens L.	Polissacarídeo	(NAQASH; NAZEER,
		2011)
Undaria pinnatifida	Galactofucan	(THOMPSON; DRAGAR,
		2004)
Zataria multiflora	Extrato metanólico	(ARABZADEH et al., 2013)

2.3 Cocos nucifera L. (Arecaceae)

É uma planta da família Arecaceae (família das palmeiras), subfamília Coccoideae, conhecida popularmente como coco, coco-da-Bahia, coqueiro-da-Bahia ou coqueiro-comum. É originária da costa oriental da América do Sul, incluindo a costa norte e nordeste do Brasil, sendo também comum no sudeste asiático e sul do Pacífico (LORENZI, 2008).

Quando seu fruto está maduro, a casca torna-se marrom, seca e muito fibrosa, composta principalmente por pentosanas (polissacarídeo), celulose e lignina (ESQUENAZI et al., 2002).

O *C. nucifera* é fonte de vários componentes químicos, os quais são responsáveis pelas diversas atividades desta planta. Recentemente, algumas pesquisas têm confirmado muitos efeitos benéficos de seus produtos (DEBMANDAL; MANDAL, 2011).

Seus principais constituintes químicos são: ácidos graxos, como os ácidos caprílico (8%), cáprico (7%), láurico (49%), mirístico (18%), palmítico (8%), esteárico (2%), oleico (6%) e linoleico (2%), ácidos graxos livres (3 a 5%), delta-lactonas de ácidos graxos 5-hidroxilados (particularmente delta-octalactona) (DEBMANDAL; MANDAL, 2011). A fibra da sua casca possui catequinas, epicatequinas, dois dímeros de procianidina e taninos condensados, juntamente com os ácidos gálico e elágico (E SILVA, 2013). Os frutos contêm grande quantidade de flavonoides. A parte utilizada como medicamento é a casca dos frutos (mesocarpo).

A decocção da fibra da casca do *C. nucifera* é usada na medicina tradicional nordestina do Brasil para tratamento de diarreias e artrites. O óleo extraído do coco é usado como antimicótico na medicina tradicional indiana (ESQUENAZI et al., 2002). Este fitoterápico é também usado historicamente na medicina tradicional para o tratamento de doenças metabólicas (BANKAR et al., 2011) e diabetes (LANS, 2006). Popularmente, seu óleo também é utilizado como cicatrizante de feridas e infecções cutâneas na África. Na América Central tem sido usada para tratamento de resfriados e amigdalites (DEB et al., 2015). No sudeste asiático, para cáries dentárias. Indígenas usam seu óleo para tratamento de disúria, tosse e bronquite (LIMA et al., 2015; LORENZI; MATOS, 2008).

Esquenazi e cols. comprovaram atividade antimicrobiana *in vitro* contra cepas de *S. aureus*, tanto do extrato aquoso bruto da fibra da casca do *C. nucifera*, quanto de 5 de suas frações. Não foi observada inibição contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e

Fonsecaea pedrosoi. O extrato aquoso bruto teve efeito antiviral contra HSV-1 em células HEp-2 e Vero com índice de inibição viral (IIV) >3,0 e porcentagem de inibição (PI) >99,9%. Uma de suas frações obteve maior efeito antiviral nestas células, com IIV>4,5. Já quando o vírus foi diretamente tratado com o extrato aquoso bruto ou com esta fração, o índice virucida (IV) foi igual a 1,81 (PI=98,4%) e 1,0 (PI=90%) para células HEp-2, respectivamente, e 3,0 (PI>99,9%) e 3,25 (PI>99,9%) para células Vero, respectivamente. Estes resultados podem ser atribuídos à presença de catequinas, epicatequinas e taninos condensados (procianidinas tipo B) presentes no extrato aquoso da fibra do *C. nucifera*. A atividade antiviral foi atribuída à interferência com a adsorção viral à célula mais do que à penetração do vírus, além de efeito virucida (ESQUENAZI et al., 2002).

Também foram relatados efeitos de proteção cardiovascular, antitrombogênico, antiaterosclerótico, hipolipidêmico a partir do óleo de coco (DEBMANDAL; MANDAL, 2011).

Naskar e cols. demonstraram efeito anti-inflamatório dose-dependente do extrato hidrometanólico de *C. nucifera*, comparável ao do diclofenaco (DUA et al., 2013; NASKAR et al., 2012). Este efeito anti-inflamatório e analgésico também foi comprovado em modelos animais, indicando possível ação via receptores de opioides (RINALDI et al., 2009; SILVA et al., 2013).

Os ácidos graxos de cadeia média (MCFA) presentes no *C. nucifera* e seus derivados são efetivos em destruir grande parte das bactérias revestidas por lipídeos, através da desintegração de suas membranas lipídicas. Por exemplo, eles podem ser efetivos contra bactérias que causam úlceras gástricas, sinusites, cáries dentárias, intoxicações gastrointestinais e infecções do trato urinário (DEBMANDAL; MANDAL, 2011).

Através deste mesmo mecanismo, o óleo de coco é efetivo contra uma variedade de vírus revestidos por envelope lipídico, como citomegalovírus, Epstein-Bar vírus, influenza, pneumovírus e o vírus da hepatite C. Os MCFA destroem estes organismos por romper suas membranas, interferindo na montagem viral e sua maturação. Os monoglicerídeos são ativos, enquanto que os diglicerídeos e triglicerídeos são inativos contra estes vírus. Dentre os ácidos graxos saturados, o ácido láurico tem melhor atividade antiviral que os ácidos caprílico, cáprico e mirístico. O ácido monoláurico atua solubilizando os lipídeos e fosfolípides do envelope viral, causando a desintegração deste envelope. O efeito antiviral dos ácidos graxos e monoglicerídeos são aditivos, e a concentração total é crítica para a inativação viral (DEBMANDAL; MANDAL, 2011).

Maji Jose e cols. avaliaram as propriedades do *C. nucifera* na saúde bucal, mostrando atividade antimicrobiana significativa, concentração-dependente, contra vários agentes cariogênicos (*Streptococcus mutans, S. salivarius, S. mitis, Lactobacillus acidophilus, Prevotella intermedia*) e *Candida albicans*, embora com efeito inferior à clorexidina (JOSE et al., 2014).

Na Nigéria a decocção da fibra do *C. nucifera* é usada como remédio antimalárico, o que inspirou um estudo brasileiro *in vitro* sobre sua a atividade anti-protozoário. Foi encontrada atividade *in vitro* da fração hexano do *C. nucifera* (variedade mestiço) contra formas sanguíneas do *Plasmodium falciparum*, sem identificação do princípio ativo específico responsável por esta ação ou seu mecanismo de ação (ADEBAYO; SANTANA; KRETTLI, 2012).

Estudo posterior deste mesmo grupo, identificou uma variedade nigeriana de *C. nucifera* (*West African Tall*), cuja fração acetato de etila, contendo alcaloides, taninos e flavonoides, possui atividade *in vitro* conta o *Plasmodium falciparum* W2. Esta mesma fração foi ativa *in vivo* contra o *Plasmodium berghei* NK65, causando redução superior a 50% na parasitemia quatro a seis dias após a inoculação, em várias doses administradas. Esta fração não alterou as provas de função hepática e cardiovascular em todas as doses testadas, porém aumentou significativamente a concentração de creatinina plasmática nas doses de 250 e 500 mg/kg de peso, quando comparada ao controle (ADEBAYO et al., 2013). A atividade antimalárica contra *Plasmodium berghei* NK65 foi confirmada *in vivo* em ratos em outro estudo recente (BALOGUN et al., 2014).

Costa e cols. demonstraram uma eficácia de 90,7% da dose de 1000 mg/kg do extrato butanólico da fibra do *C. nucifera* em reduzir a carga parasitária de nematoides em ratos (COSTA et al., 2010).

O efeito anti-helmíntico também foi avaliado em outro estudo, que comprovou atividade do extrato etil-acético da fibra do *C. nucifera in vitro* contra *Haemonchus contortus*, porém não encontrou efeito *in vivo* em ovelhas contra nematoides intestinais destes animais (OLIVEIRA et al., 2009).

Comprovou-se o efeito do extrato da fibra do *C. nucifera*, rico em polifenois, contra *Leishmania amazonenses*, tanto na forma de promastigota quanto amastigota (MENDONCA-FILHO et al., 2004).

Estudo sul-africano avaliou o potencial antibacteriano *in vitro* do extrato aquoso de *C. nucifera* contra algumas espécies de *Vibrio* e outras bactérias patogênicas, incluindo algumas

normalmente envolvidas em infecções alimentares e cutâneas. Encontrou atividade contra 37 das 45 espécies de *Vibrio* estudadas e contra 17 das 25 bactérias analisadas, sugerindo que esta planta tem potencial como uma alternativa à síntese de antibióticos para tratamento de infecções causadas por *Vibrio sp.* e outras bactérias (AKINYELE et al., 2011).

Estudo mexicano comprovou ação *in vitro* de extrato aquoso e metanólico de *C. nucifera* contra alguns patógenos causadores de diarreias e disenterias, sendo duas espécies de *Escherichia coli*, duas espécies de *Shigella sonnei* e duas espécies de *Salmonella sp.*, com efeito superior ao cloranfenicol, porém inferior à trimetoprima, justificando seu uso tradicional para infecções intestinais naquele país (ALANIS et al., 2005). O efeito antidiarreico deve-se também, ao menos em parte, à diminuição da motilidade intestinal, o que foi comprovado em ratos pela inibição de 30% da hiperperistalse induzida artificialmente, semelhante ao efeito da loperamida (CALZADA; ARISTA; PEREZ, 2010).

Alviano e cols. demonstraram efeito analgésico e de eliminação de radicais livres do extrato aquoso da fibra do *C. nucifera*, através de modelos *in vivo* e *in vitro* (ALVIANO et al., 2004b). Este mesmo grupo confirmou seu potencial antioxidante e antibacteriano contra patógenos da cavidade oral (*Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*) (ALVIANO et al., 2008).

Viju e cols. demonstraram o potencial do extrato da fibra do *C. nucifera* em combater a formação de biofilme bacteriano *in vitro* por *Pseudomonas sp.*, *Alteromonas sp.* e *Gallionella sp.*, interferindo na substância polimérica extracelular, aumentando sua hidrofobicidade e diminuindo a adesão bacteriana à superfície do vidro (VIJU; SATHEESH; VINCENT, 2013).

Catequinas isoladas a partir da fibra do *C. nucifera* possuem efeito inibitório sobre células tumorais (eritroleucemia K562) e sobre linfócitos ativados por fitohemaglutinina e éster de forbol (KIRSZBERG et al., 2003; KOSCHEK et al., 2007).

Estudo indiano de 2011 comprovou diminuição da glicemia e melhora do perfil metabólico em ratos com diabetes induzida por estreptozocina, com efeito comparável ao da glibenclamida (droga de referência) (NASKAR et al., 2011).

Quanto à segurança, por ser utilizado tradicionalmente, pode ser considerado seguro para uso em humanos, segundo as normas de uso de fitoterápicos no Brasil. Além disso, estudos em animais mostraram que extratos de *C. nucifera* apresentam baixa toxicidade, tanto aguda quanto cronicamente (COSTA et al., 2011). Estudos *in vivo* demonstraram que extrato

de *C. nucifera* tem baixa toxicidade e que não induz reações dérmicas ou oculares (ALVIANO et al., 2004a; LIMA et al., 2015).

Desconhecemos, até o momento, a existência de estudos clínicos dos extratos de *C. nucifera* na prevenção ou tratamento das infecções virais em humanos. Antes que se possam propor estudos *in vivo*, a atividade *in vitro* obtida por outros pesquisadores precisa ser reproduzida, e os mecanismos de ação precisam ser melhor elucidados. Neste estudo, nossa hipótese é a de que o extrato bruto ou fracionado do mesocarpo de *C. nucifera* apresenta atividade antiviral contra o HSV sensível ao aciclovir.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Verificar se há atividade antiviral *in vitro* de extratos aquoso e hidroetanólico de *Cocos nucifera*, além de extratos fracionados, em cultura de células Vero infectadas com Herpes simplex vírus tipo 1 sensível ao aciclovir.

3.2 Objetivos específicos

- 1. Avaliação da citotoxicidade dos extratos de *C. nucifera* em cultura de células Vero.
- 2. Avaliação da capacidade inibitória dos extratos de *C. nucifera* sobre HSV.
- 3. Avaliação do efeito dose-resposta dos extratos de *C. nucifera* sobre HSV.
- 4. Avaliação do efeito virucida dos extratos de *C. nucifera* sobre HSV.

4 Materiais e Métodos

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de estudo experimental de infecção viral *in vitro* em cultura de células, com e sem tratamento em diferentes doses e momentos, para determinação de atividade, curva de dose-resposta e mecanismo de ação.

4.2 Vírus, células, drogas e reagentes

Foi estudada uma cepa do HSV-1 (ACV sensível) constante da coleção do Laboratório de Patogênese Viral no Centro de Pesquisa em Virologia da FMRP-USP, os quais foram propagados em cultura de células Vero (*American Tissue Culture Colection* – ATCC).

Células Vero (células de rim de macaco-verde africano - *Cercopithecus aethiops*) foram cultivadas em Meio Essencial Mínimo (MEM, Gibco/Invitrogen-EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco/Invitrogen-EUA), 1% de uma suspensão de antimicótico-antibiótico (Gibco/Invitrogen-EUA) e mantidas a 37°C em estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂. Após a inoculação do HSV-1, utilizamos MEM suplementado com SFB a 2%.

O ACV (antiviral amplamente utilizado contra HSV) foi inicialmente diluído em água ultrapura na concentração de 50 mg/mL e posteriormente rediluído em MEM2% até as concentrações utilizadas (120 e 500 μg/mL) (FARAL-TELLO et al., 2012).

4.3 Preparação dos extratos vegetais

As plantas foram identificadas pelo Prof. Lin Chau Ming, professor do Departamento de Horticultura da Universidade do Estado de São Paulo (UNESP) de Botucatu, e uma exsicata da espécie está armazenada no Herbário da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), identificada como HPMU=3081

O medicamento fitoterápico de *C. nucifera* foi preparado pela Prof. Dr. Ana Maria Soares Pereira, do Departamento de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). Os frutos foram coletados às 9 horas da manhã e separado somente o mesocarpo (parte fibrosa), que foi seco em estufa de ar circulante a 45°C por 36 horas. Posteriormente foram trituradas em moinho de facas até a granulometria de 40 *mesh.* A droga vegetal foi submetida a controle de qualidade de acordo com a resolução da ANVISA RDC Nº 10, de 9 de março de 2010 (BRASIL, 2010), que dispõe sobre a notificação de drogas vegetais (CARVALHO; SILVEIRA, 2010). Após este processo, foram preparados dois extratos vegetais: aquoso e hidroetanólico. O extrato aquoso foi preparado por decocção de 100 g da droga vegetal para 1 L de água por 1 hora. Depois de fria, a solução foi filtrada em papel de filtro e liofilizada para uso posterior. O extrato hidroetanólico foi preparado adicionando-se 100 g da droga vegetal a 900 mL de etanol a 70% (em água), deixando em maceração por 20 dias em frasco de vidro âmbar, agitando o frasco diariamente. Após esse período, a solução foi filtrada em papel filtro e rotaevaporada para uso posterior.

Para a realização dos experimentos, foram preparadas soluções estoque dos extratos. A solução estoque do extrato aquoso foi feita diluindo-se o pó liofilizado a 20% em MEM2%. A partir desta solução, foram preparadas as soluções para os experimentos com diluições seriadas em MEM2%. A solução estoque do extrato hidroetanólico foi feita diluindo-se o material rotaevaporado a 20% em solução salina isotônica (SF 0,9%) com dimetil-sulfóxido (DMSO) a 5%. A partir desta solução, foram preparadas as soluções para os experimentos com diluições seriadas em MEM2%.

Para a preparação das frações, o mesocarpo do fruto verde de *C. nucifera* (1 kg) foi seco em estufa de ar circulante a temperatura de 45° C por 4 dias. Após este período a fibra foi triturada em moinho de faca até a granulometria de 32 *mesh*. A droga vegetal triturada foi extraída com hexano, acetato de etila, metanol e água, sendo a fração aquosa posteriormente liofilizada.

O extrato metanólico (12 g) foi submetido a cromatografia em coluna sephadex LH20, em modo isocrático, eluída com metanol resultando em 220 frações. Estas frações, após serem submetidas a cromatografia em camada delgada em placas de sílica (DC-fertigfolien ALUGRAM Xtra sil G/UV254) eluídas com metanol/ acetato de etila (9:1) e reveladas com cloreto férrico, foram reunidas em 10 subfrações (Cn1 à Cn10). As subfrações denominadas CN1 e CN3 foram repurificadas em placa preparativa resultando em duas substâncias puras denominadas de CN1A e CN342B. A susbância CN342B foi submetida a análise por métodos espectroscópico RMN1H e 13C uni e bidimensionais, sendo composta por diversas substâncias inorgânicas (anexo 1).

4.4 Avaliação da citotoxicidade dos extratos em células Vero

A avaliação da citotoxicidade dos extratos de *C. nucifera* foi realizada observando-se, ao microscópio óptico, a morfologia e densidade celular das células Vero incubadas com concentrações dos extratos em diluições semilogarítmicas em MEM2%.

Células Vero (1 x 10⁵ células) foram distribuídas em placas de fundo chato com 24 cavidades, e incubadas por 24 horas a 37°C em estufa úmida com 5% de CO₂. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo diluições seriadas dos extratos e a placa novamente incubada a 37 °C. Após 72 horas, as placas foram avaliadas ao microscópio óptico, comparando-se aquelas com diferentes concentrações dos extratos com outra contendo apenas as células e o meio de cultura. Para os experimentos, selecionamos a máxima concentração dos extratos que não tenham alterado a densidade ou morfologia celular.

Após os experimentos iniciais, realizamos também o ensaio de MTT (MOSMANN, 1983) para quantificar a proliferação celular e toxicidade do extrato aquoso bruto do *C. nucifera* e das substâncias CN1A e CN342B. O MTT é um ensaio colorimétrico cujo racional baseia-se na incorporação pelas mitocôndrias do sal hidrossolúvel MTT [3-(4,5-dimethylthiazol, 2yl)-2,5diphenul-212 tetrazolium bromide], o qual é reduzido pelas desidrogenases a sal formazana que é armazenado no citoplasma celular. Após a adição de DMSO ocorre a formação de um produto colorido cuja leitura é realizada a 540 nm. A absorbância obtida é diretamente proporcional a viabilidade celular.

As células Vero foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Foram então colocadas as drogas a serem testadas em concentrações crescentes, diluídas em MEM2%, em triplicatas, assim como os controles negativos (somente MEM2%) e deixadas em incubação por mais 48 horas. Após este período, foram adicionados 50 μL de sal MTT (5 mg/mL em SFB) de maneira a obter uma concentração final de 0,5 mg/mL e incubadas durante 4 horas. Cada poço foi então lavado com SFB e adicionado volume de 200 μL da solução de isopropanol acidificado com HCl (0,04 mols/L de HCl). A viabilidade celular foi determinada por absorbância a 540 nm. O cálculo da viabilidade das células foi realizado através da fórmula:

V%= <u>Absorvância do poço tratado – Absorvância do branco</u> X 100 Absorvância do controle negativo

Utilizamos as concentrações que mantiveram no mínimo 90% das células viáveis ao MTT e que não alteraram a morfologia e a densidade celular ao microscópio.

4.5 Avaliação da capacidade inibitória dos extratos de C. nucifera sobre HSV

Concentrações não tóxicas dos extratos foram selecionadas para testar o efeito inibitório da droga sobre a infecção pelo HSV, avaliado pela redução do efeito citopático, conforme descrito anteriormente (ANDRIES et al., 1988). Para isso, monocamadas de células Vero preparadas em microplacas de 24 cavidades foram incubadas por 1 hora a 37°C com 300 µL de diferentes concentrações dos extratos de *C. nucifera*, diluídos em MEM2%. Em seguida, as monocamadas foram infectadas com HSV em diversas multiplicidades de infecção (MOI), e deixadas por 1 h em temperatura ambiente em agitador de placas, na presença da droga, lavadas com PBS, e re-incubadas com meio fresco ou com as devidas concentrações dos extratos (diluídas em meio) em estufa de CO₂ a 37°C. A extensão do efeito dos extratos na replicação viral foi determinada quando a monocamada celular controle negativo (infectada com vírus, mas sem a droga) apresentou mais de 80% de efeito citopático, sendo os poços então raspados e seu conteúdo congelado a -80°C.

Estas amostras foram então submetidas a centrifugação por 5 minutos a 2.000 rpm e posterior titulação viral por TCID₅₀ em monocamadas de células Vero, em microplacas de 96 cavidades, distribuídas em escala logarítmica e incubadas por 72 horas em estufa de CO₂ a 37°C e avaliadas em microscópio óptico, determinando como positivo aqueles poços com qualquer foco de efeito citopático viral.

4.6 Avaliação do efeito dose-resposta dos extratos de C. nucifera sobre HSV

A concentração não tóxica daquele extrato que apresentou atividade inibitória viral foi selecionada para testar o efeito dose-resposta inibitória da droga sobre a infecção pelo HSV, avaliado pela redução do efeito citopático, conforme descrito anteriormente (ANDRIES et al., 1988). Para isso, monocamadas de células Vero preparadas em microplacas de 24 cavidades foram incubadas por 1 hora a 37°C com 300 μL de concentrações crescentes em escala logarítmica do extrato selecionado de *C. nucifera*, diluídos em MEM2% e ACV na concentração de 500 μg/ml como controle positivo. Em seguida, as monocamadas foram infectadas com HSV em MOI de 0,01, e deixadas por 1 h em temperatura ambiente em agitador de placas, na presença da droga, lavadas com PBS, e re-incubadas com meio fresco ou com as devidas concentrações dos extratos (diluídas em meio) em estufa de CO₂ a 37°C. A extensão do efeito dos extratos na replicação viral foi determinada quando a monocamada celular controle negativo (infectada com vírus, mas sem a droga) apresentou mais de 80% de efeito citopático, sendo os poços então raspados e seu conteúdo congelado a -80°C para posterior titulação viral por TCID₅₀.

4.7 Avaliação do efeito virucida dos extratos de C. nucifera sobre HSV

Para investigar efeito virucida (ação da droga diretamente sobre os vírus extracelulares), preparamos triplicatas do vírus (10 μL da solução estoque a 10^{8,25}/mL) misturados com diferentes substâncias: MEM2% (controle negativo), álcool 70% (controle positivo), substância CN342B na concentração final de 200 μg/mL, extrato aquoso bruto na

concentração final de 200 μ g/mL e fração metanólica na concentração final de 200 μ g/mL. As triplicatas foram deixadas em agitador de tubos por 1 hora e por 24 horas, sendo então tituladas diretamente por TCID $_{50}$ em cultura de células Vero.

5 Resultados

Realizamos um experimento utilizando o HSV tipo 1 (sensível ao aciclovir) em cultura de células Vero, tratados com os extratos brutos aquoso e hidroetanólico de *C. nucifera* nas concentrações de 10, 50, 100 e 200 μg/mL, comparando-os com o controle negativo não tratado (MEM2%), com MOI=1 (multiplicidade de infecção de uma partícula viral para cada célula do poço de cultura). Após 24 horas o material foi colhido e titulado por TCID₅₀, não encontrando diferença entre o controle não tratado e os tratados. Nenhuma das concentrações estudadas produziu citotoxicidade.

Neste primeiro experimento, foi utilizada uma MOI=1. Esta proporção é maior do que a que ocorre na infecção *in vivo*. Assim, para determinar se a ausência de atividade antiviral seria resultado da elevada MOI, optamos por testar MOI menores, variando de 1 a 0,01. Da mesma forma, optamos por testar frações ou conjuntos menores de compostos do *C. nucifera* e, para isto, utilizamos diferentes solventes, separando-os por seu grau de solubilidade. Os solventes utilizados foram hexano, acetato de etila, metanol e água.

Testamos a citotoxicidade das frações do *C. nucifera* nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 μg/mL, em cultura de células Vero, em placas de 24 cavidades. As amostras foram analisadas morfologicamente ao microscópio óptico a cada 24 horas, durante 5 dias, a fim de descobrirmos a máxima concentração de cada uma das frações que não alterasse a densidade ou morfologia celular. Ao final das 120 horas de incubação, chegamos às máximas concentrações apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 – Citotoxicidade das frações do extrato aquoso de *C. nucifera*.

Fração	Concentração máxima não tóxica		
	$(\mu g/mL)$		
Extrato aquoso bruto	200		
Hexano	200		
Acetato de etila	100		
Metanol	200		
Aquoso final	300		

Utilizamos estas concentrações máximas não tóxicas para pesquisar o efeito antiviral do extrato aquoso e de cada uma de suas quatro frações, com o mesmo método descrito anteriormente, porém com MOIs decrescentes, de 1 a 0,01.

Com 48 horas da inoculação viral, o controle negativo com MOI=1 estava completamente destruído, sem diferença ao microscópio óptico com as amostras tratadas. O controle negativo com MOI=0,1 apresenta efeito citopático viral em cerca de 80% das células. O controle negativo com MOI=0,01 apresentava cerca de 60% de efeito.

As amostras foram então colhidas e submetidas a titulação viral (figura 1).

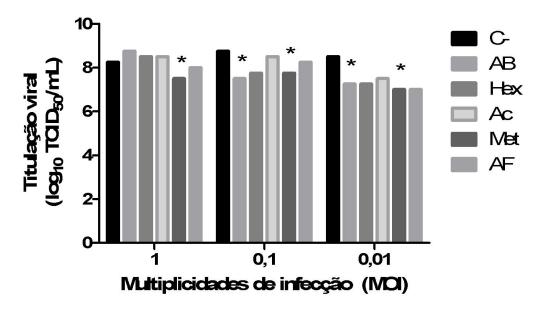


Figura 1. Titulação de herpes simplex tipo 1 (HSV-1) em cultura de células Vero após tratamento com meio essencial mínimo 2% (MEM2%) (C-), com extrato aquoso de *C. nucifera* 200 μ g/mL (AB) e suas frações com diferentes solventes: hexano 200 μ g/mL (Hex), acetato de etila 100 μ g/mL (Ac), metanol 200 μ g/mL (Met) e aquoso final 300 μ g/mL (AF), com multiplicidades de infecção (MOI)=1, 0,1 e 0,01. *: Diferença mais significativa em relação ao não tratado (C-).

Apesar de existir uma diferença significativa entre alguns grupos tratados e o controle negativo, foi observada menor densidade celular nos poços de controle das drogas (células Vero tratadas com as respectivas concentrações de cada uma das frações, porém não infectadas com o vírus). Isso não nos permitiu concluir que as drogas testadas foram capazes de diminuir a replicação celular, pois o efeito observado pode ser explicado por uma provável inibição parcial do ciclo celular, com consequente menor replicação viral.

Realizamos novo experimento utilizando-se aquelas frações que nos pareceram mais promissoras: o extrato aquoso bruto e a fração metanólica, ambas na concentração de 200 µg/mL, com MOI=0,01 e 0,001. O efeito citopático viral nos controles negativos atingiram

mais de 70% das células após 72 horas da inoculação do HSV-1, sendo então colhido o material de todos os poços e congelados, separadamente, a -80°C, para realizarmos a titulação (figura 2).

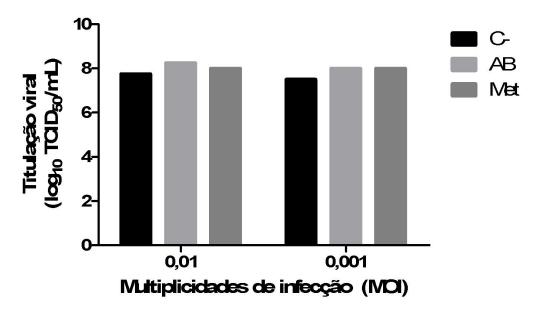


Figura 2. Titulação de herpes simplex tipo 1 (HSV-1) em cultura de células Vero após tratamento com meio essencial mínimo 2% (MEM2%) (C-), com extrato aquoso de C. nucifera 200 $\mu g/mL$ (AB) e sua fração metanólica 200 $\mu g/mL$ (Met) em duas diferentes MOI (0,01 e 0,001) sem diferença entre os grupos.

Como mantivemos a concentração das drogas testadas, a densidade celular nos poços tratados continuou nos parecendo menor em relação ao controle negativo. Além disso, não houve inibição viral após o tratamento com estas drogas neste experimento.

Para descartar um possível problema no método, foi incluída no experimento uma droga de referência. Para testar a atividade antiviral contra o HSV-1, utilizamos o ACV.

Descartamos também as frações feitas com diferentes solventes a partir do extrato bruto de *C. nucifera*, já que não haviam apresentado resultado positivo até o momento e testamos as substâncias isoladas a partir do mesocarpo do *C. nucifera* CN1A e CN342B, que estão presentes no extrato metanólico.

Para descobrir a dose não tóxica dos extratos utilizados, optamos por realizar o ensaio de MTT (MOSMANN, 1983) em células HeLa , aproveitando para incluir, além das substâncias CN1A e CN342B, o extrato aquoso bruto de *C. nucifera*, obtendo-se os resultados apresentados nas figuras 3 a 5.

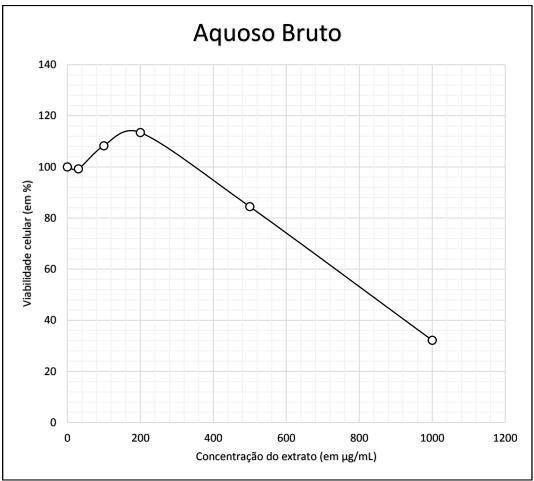


Figura 3. Curva do ensaio de MTT mostrando a viabilidade celular (%) em relação a concentrações crescentes do extrato aquoso bruto de *C. nucifera* (em μg/mL).

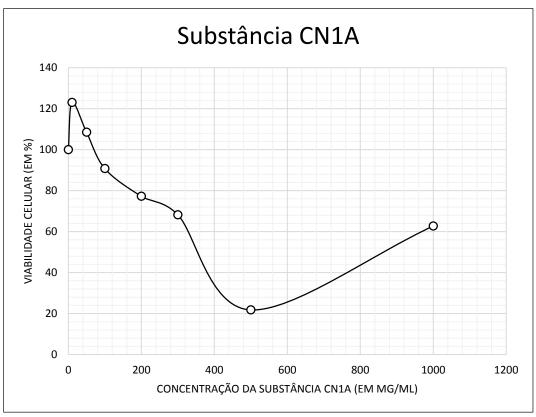


Figura 4. Curva do ensaio de MTT mostrando a viabilidade celular (%) em relação a concentrações crescentes da substância CN1A, extraída a partir do *C. nucifera* (em μg/mL).

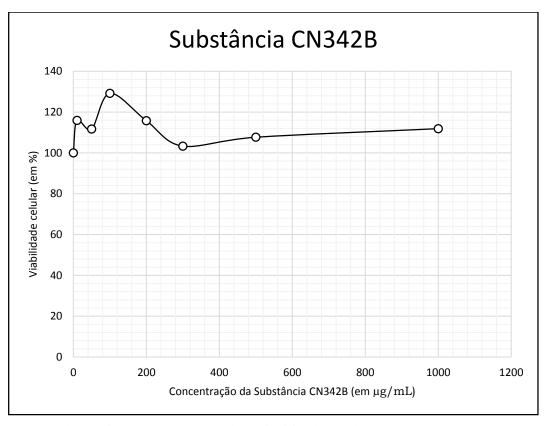


Figura 5. Curva do ensaio de MTT mostrando a viabilidade celular (%) em relação a concentrações crescentes da substância CN342B, extraída a partir do *C. nucifera* (em μg/mL).

Levando-se em consideração o resultado do MTT, a observação das células tratadas com estas substâncias ao microscópio óptico e a quantidade da substância disponível, utilizamos as concentrações descritas na tabela 3.

Tabela 3 – Concentrações das drogas ou substâncias utilizadas nos experimentos de avaliação do efeito citopático viral.

Concentração utilizada	
120 e 500 μg/mL	
$100~\mu g/mL$	
$100 \ \mu g/mL$	
$200~\mu g/mL$	

Para testar a nova amostra de HSV-1 em células Vero, utilizamos a mesma metodologia anterior, porém agora com MOI de 1, 0,1, 0,01 e 0,001, comparando-se o efeito do vírus no controle negativo (não tratado) e na presença de ACV (nas concentrações de 120 e 500 μg/mL), extrato aquoso bruto, substância CN1A e substância CN342B, separadamente. O estoque do HSV-1 estava na titulação de 10^{8,25}/mL e as células Vero na quantidade de 10⁵ células/poço.

Observando-se os controles negativos nas diferentes MOIs, percebemos que aquele com MOI=1 apresentava-se completamente destruído pelo vírus após 24 horas da inoculação. Desta forma, colhemos todas as amostras com MOI=1 neste momento. O controle negativo com MOI=0,1 apresentou destruição maior que 80% 48 horas após a inoculação, sendo então colhidas as amostras com esta MOI. Já as amostras com MOI=0,01 e 0,001, foram colhidas com 72 horas após a inoculação, pois foi neste momento que seus controles negativos apresentaram mais de 80% de efeito citopático viral. Após colhidas, cada amostra foi congelada a -80°C e, posteriormente, descongelada e submetida a titulação viral (figura 6).

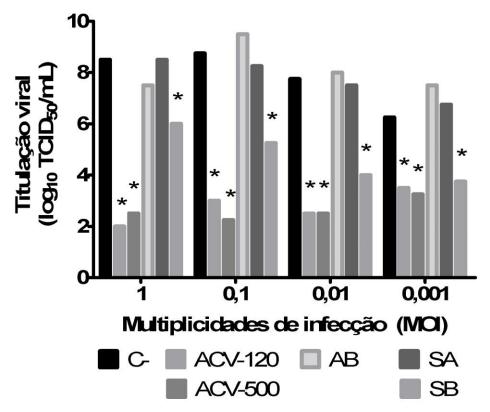


Figura 6. Titulação de herpes simplex tipo 1 (HSV-1) em cultura de células Vero após tratamento com meio essencial mínimo 2% (MEM2%) (C-), aciclovir nas concentrações de 120 e 500 μg/mL (ACV-120 e ACV-500), extrato aquoso de *C. nucifera* 100 μg/mL (AB), substância CN1A na concentração de 100 μg/mL (SA) e substância CN342B na concentração de 200 μg/mL (SB), em quatro diferentes multiplicidades de infecção (MOI) (1; 0,1; 0,01 e 0,001). *: Diferença significativa em relação ao não tratado (C-).

Ao usarmos o ACV como droga de referência, podemos observar que ele reduz significativamente o título do HSV-1, tanto na concentração de 120 quanto de 500 μg/mL. O extrato aquoso bruto de *C. nucifera* e a substância CN1A não inibiram a replicação viral. Já a substância CN342B conseguiu reduzir parcial, mas significativamente, o título viral em relação à amostra não tratada (controle negativo).

Frente a estes resultados, optamos por realizar a pesquisa do efeito dose-resposta da substância CN342B contra o HSV-1 com MOI=0,01. Para isto utilizamos células Vero em placas de 24 poços (10⁵ células/poço), concentrações crescentes da substância CN342B diluída em MEM2% (2; 6,4; 20; 64; 200; 640 e 2000 μg/ml) e ACV na concentração de 500 μg/ml como controle positivo. As células foram incubadas com MEM2% e as diferentes concentrações de CN342B por 1 hora, sendo então adicionado o vírus para MOI=0,01, deixado expostas por 1 hora no agitador de placa em temperatura ambiente. Após este período, o sobrenadante foi aspirado, os poços lavados com 500 μL de PBS, o meio reposto

com cada concentração de CN342B e deixadas em estufa de CO₂ a 37°C por 48 horas. As placas foram analisadas em microscópio óptico, visto o efeito citopático viral no controle negativo superior a 70% e colhidas as amostras para titulação viral (figura 7).

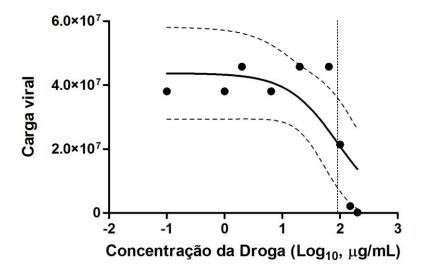


Figura 7. Titulação de herpes simplex tipo 1 (HSV-1) em cultura de células Vero após tratamento com substância CN342B em concentrações crescentes, com multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01. A linha preta representa a curva de dose-resposta e as linhas tracejadas, o intervalo de confiança de 95%. Valor máximo (*top*) de 4,37 x 10⁷; valor mínimo (*bottom*) de 1,0; inclinação (*slope*) de 1,0; concentração que induz metade do efeito máximo (EC₅₀) de 91,08 μg/mL (linha pontilhada).

Com o intuito de investigar o mecanismo de ação antiviral da substância CN342B, realizamos um experimento de pesquisa de efeito virucida (ação da droga diretamente sobre os vírus extracelulares). Para isto, preparamos triplicatas do vírus (10 µL da solução estoque a $10^{8,25}$ /mL) misturados com diferentes substâncias: MEM2% (controle negativo), álcool 70% (controle positivo), substância CN342B na concentração final de 200 µg/mL, extrato aquoso bruto na concentração final de 200 µg/mL e fração metanólica na concentração final de 200 µg/mL. As triplicatas foram deixadas em agitador de tubos por 1 hora ou por 24 horas, sendo então tituladas diretamente por TCID₅₀ em cultura de células Vero (figura 8).

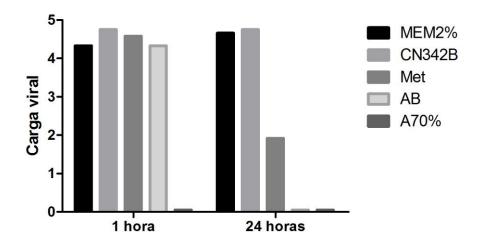


Figura 8. Titulação de herpes simplex tipo 1 (HSV-1) em cultura de células Vero após mistura direta de HSV-1 com MEM2% (controle negativo), substância CN342B a 200 μg/mL, fração metanólica (Met) de *C. nucifera* a 200 μg/mL, extrato aquoso bruto (AB) de *C. nucifera* a 200 μg/mL e álcool 70% (A70%, controle positivo).

Neste experimento, observamos que, após 1 hora de incubação, somente o álcool a 70% foi capaz de matar o vírus. Entretanto, após 24 horas de incubação, o extrato metanólico foi capaz de reduzir substancialmente a carga viral e, surpreendentemente, o extrato aquoso bruto teve atividade virucida comparável à do álcool a 70%.

6 Discussão

Este trabalho demonstrou pela primeira vez que a substância CN342B, isolada a partir do mesocarpo da espécie *C. nucifera*, foi capaz de inibir a replicação *in vitro* do HSV-1, em modelo de infecção de células Vero, com efeito comparável ao do ACV e diretamente proporcional a sua dose. Entretanto, esta substância não apresenta atividade virucida, a qual se observa com os extratos aquoso bruto e metanólico, sugerindo que seu mecanismo de ação seja outro, possivelmente intracelular.

Demonstramos também que a EC₅₀ da substância CN342B foi de 91,08 μg/mL na curva de dose-resposta.

Nossos resultados confirmaram parcialmente os achados de Esquenazi e cols. (ESQUENAZI et al., 2002). Estes testaram a atividade do extrato aquoso de *C. nucifera* e de suas frações contra uma cepa de HSV-1 resistente ao ACV. Esquenazi atribui o efeito antiviral às catequinas e taninos condensados presentes no extrato aquoso bruto e em uma das frações testadas, o que já havia sido descrito anteriormente na literatura (DE BRUYNE et al., 1999; SERKEDJIEVA; IVANCHEVA, 1999). A atividade antiviral encontrada por Esquenazi foi obtida quando as células foram tratadas com o *C. nucifera* antes da infecção viral, que também foi capaz de inativar os vírus extracelulares (efeito virucida).

Em nossos experimentos, quando os extratos brutos de *C. nucifera* e suas frações foram adicionados às células uma hora antes da infecção viral, não encontramos atividade antiviral contra HSV-1. Porém conseguimos demonstrar o efeito virucida do extrato aquoso bruto e da fração metanólica do *C. nucifera*. Possíveis explicações para estas discrepâncias incluem: as plantas que deram origem aos extratos podem ter composições químicas diferentes (fatores ambientais, genéticos, beneficiamento, entre outros); e o tipo viral utilizado (aqueles autores usaram HSV-1 resistente ao ACV, enquanto nós utilizamos HSV-1 sensível a esta droga). Além disso, um tempo maior do que uma hora de exposição do vírus aos extratos parece ser necessário para que haja efeito virucida.

Testamos também aquelas duas substâncias isoladas a partir do extrato aquoso bruto de *C. nucifera*, sendo que a substância CN342B foi capaz de inibir parcialmente a replicação

viral, com efeito comparável aquele exercido pelo ACV, sendo este efeito diretamente proporcional à dose da substância no meio de cultura.

Nossos resultados mostram que a espécie *C. nucifera* apresenta grande potencial para a bioprospecção de novos medicamentos antivirais. Esta é a primeira vez que substâncias puras, isoladas a partir da fibra do *C. nucifera*, são investigadas com relação a atividade antiviral. Este trabalho é o primeiro a detectar uma molécula isolada derivada da fibra do *C. nucifera* com atividade contra o HSV-1. A substância CN342B extraída do *C. nucifera* tornase um promissor alvo de pesquisa de droga antiviral contra HSV-1 e outros vírus com estrutura similar.

Um dos mecanismos de ação propostos para a atividade antiviral da *C. nucifera* é a ação do ácido monoláurico, que solubiliza os lipídeos e fosfolípides do envelope viral, causando a desintegração deste mesmo. Entretanto, com base em nossos resultados, acreditamos que a atividade antiviral seja resultado da ação sinérgica de diversos compostos presentes na planta: da substância CN342B, do ácido monoláurico e outros ácidos graxos, das catequinas, dos taninos condensados, e de outros mais ainda não identificados. Acreditamos nisto porque a atividade virucida observada com os extratos aquoso e metanólico não pode ser atribuída à substância CN342B, devendo haver outras moléculas antivirais com mecanismos de ação diversos.

Isso é compatível com dados da literatura que afirmam que a atividade terapêutica de um fitoterápico pode ser resultante da combinação de vários compostos (fitocomplexo), e o processo de isolamento ou purificação leva a redução ou perda da efetividade (RASKIN; RIPOLL, 2004). Um bom exemplo encontra-se no estudo de Capasso *et al*, que mostra que um extrato padronizado de *Cannabis sativa* (maconha) é superior ao canabidiol, seu principal constituinte, na inibição da contratilidade vesical em ratos e seres humanos (CAPASSO et al., 2011). Mais recentemente, demonstrou-se que o extrato bruto de *Artemisia annua* é mais eficaz do que a artemisinina isolada contra a malária em animais (ELFAWAL et al., 2012; ELFAWAL et al., 2015).

Com base nisto, podemos especular que um medicamento fitoterápico produzido a partir do mesocarpo de *C. nucifera* poderia ser mais eficaz como antiviral do que um fitofármaco, isto é, uma única molécula originária de uma espécie vegetal. Não é possível afirmar isto, entretanto com base em nossos resultados.

As limitações deste trabalho incluem:

- a) Não foi possível repetir os experimentos de dose-resposta com concentrações mais elevadas da substância CN342B devido à quantidade disponível desta matéria-prima.
- b) Não realizamos o experimento de variação do tempo de adição ou subtração da droga, a fim de explicar o possível mecanismo de inibição da replicação viral pela substância CN342B em relação ao controle não tratado.

No futuro, os extratos e as substâncias isoladas a partir do mesocarpo do *C. nucifera* poderão ser testados contra outros tipos de vírus, preferencialmente que possuam envelope lipídico, como por exemplo, citomegalovírus e adenovírus. Além disso, estudos em modelos *in vivo* podem ajudar a determinar o potencial desta espécie para bioprospecção de novo medicamento antiviral.

7 Conclusão

Os extratos aquoso bruto e metanólico do mesocarpo do fruto de *C. nucifera* apresentaram atividade virucida contra o HSV-1 sensível ao aciclovir; entretanto, em modelo de infecção em cultura celular, somente a substância CN342B, isolada a partir do extrato metanólico, apresentou efeito antiviral contra o HSV-1, comparável ao do ACV, e diretamente proporcional à sua dose.

Referências¹

- ABRANTES JL, BARBOSA J, CAVALCANTI D, PEREIRA RC, FREDERICO FONTES CL, TEIXEIRA VL, et al. The effects of the diterpenes isolated from the Brazilian brown algae Dictyota pfaffii and Dictyota menstrualis against the herpes simplex type-1 replicative cycle. **Planta Med**, 2009;76(4):339-44.
- ADEBAYO JO, BALOGUN EA, MALOMO SO, SOLADOYE AO, OLATUNJI LA, KOLAWOLE OM, et al. Antimalarial Activity of Cocos nucifera Husk Fibre: Further Studies. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2013;2013:742476.
- ADEBAYO JO, SANTANA AE, KRETTLI AU. Evaluation of the antiplasmodial and cytotoxicity potentials of husk fiber extracts from Cocos nucifera, a medicinal plant used in Nigeria to treat human malaria. **Hum Exp Toxicol**, 2012;31(3):244-9.
- AKINYELE TA, OKOH OO, AKINPELU DA, OKOH AI. In-vitro antibacterial properties of crude aqueous and n-hexane extracts of the husk of Cocos nucifera. **Molecules**, 2011;16(3):2135-45.
- ALANIS AD, CALZADA F, CERVANTES JA, TORRES J, CEBALLOS GM. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. **Journal of ethnopharmacology**, 2005;100(1-2):153-7.
- ALVIANO DS, RODRIGUES KF, LEITAO SG, RODRIGUES ML, MATHEUS ME, FERNANDES PD, et al. Antinociceptive and free radical scavenging activities of Cocos nucifera L. (Palmae) husk fiber aqueous extract. **J Ethnopharmacol**, 2004a;92(2-3):269-73.
- ALVIANO DS, RODRIGUES KF, LEITAO SG, RODRIGUES ML, MATHEUS ME, FERNANDES PD, et al. Antinociceptive and free radical scavenging activities of Cocos nucifera L. (Palmae) husk fiber aqueous extract. **Journal of ethnopharmacology**, 2004b;92(2-3):269-73.

_

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023

- ALVIANO WS, ALVIANO DS, DINIZ CG, ANTONIOLLI AR, ALVIANO CS, FARIAS LM, et al. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Arch Oral Biol**, 2008;53(6):545-52.
- ANDRIES K, DEWINDT B, DE BRABANDER M, STOKBROEKX R, JANSSEN PA. In vitro activity of R 61837, a new antirhinovirus compound. **Arch Virol**, 1988;101(3-4):155-67.
- ARABZADEH AM, ANSARI-DOGAHEH M, SHARIFIFAR F, SHAKIBAIE M, HEIDARBEIGI M. Anti herpes simplex-1 activity of a standard extract of Zataria multiflora Boiss. **Pak J Biol Sci**, 2013;16(4):180-4.
- ARORA R, CHAWLA R, MARWAH R, ARORA P, SHARMA RK, KAUSHIK V, et al. Potential of Complementary and Alternative Medicine in Preventive Management of Novel H1N1 Flu (Swine Flu) Pandemic: Thwarting Potential Disasters in the Bud. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2011;2011:586506.
- BALOGUN EA, MALOMO SO, ADEBAYO JO, ISHOLA AA, SOLADOYE AO, OLATUNJI LA, et al. In vivo antimalarial activity and toxicological effects of methanolic extract of Cocos nucifera (Dwarf red variety) husk fibre. **J Integr Med**, 2014;12(6):504-11.
- BANKAR GR, NAYAK PG, BANSAL P, PAUL P, PAI KS, SINGLA RK, et al. Vasorelaxant and antihypertensive effect of Cocos nucifera Linn. endocarp on isolated rat thoracic aorta and DOCA salt-induced hypertensive rats. **Journal of ethnopharmacology**, 2011;134(1):50-4.
- BATAGLIA OC, FURLANI AMC, TEIXEIRA JCE, FURLANI PR, GALLO JR. Métodos de analises químicas de plantas. **Boletim Técnico**. Campinas: Instituto Agronômico; 1983. p. 48.
- BERNSTEIN DI, BELLAMY AR, HOOK EW, 3RD, LEVIN MJ, WALD A, EWELL MG, et al. Epidemiology, clinical presentation, and antibody response to primary infection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in young women. **Clin Infect Dis**, 2013;56(3):344-51.
- BETTEGA JM, TEIXEIRA H, BASSANI VL, BARARDI CR, SIMOES CM. Evaluation of the antiherpetic activity of standardized extracts of Achyrocline satureioides. **Phytother Res**, 2004;18(10):819-23.

- BOUHLAL R, HASLIN C, CHERMANN JC, COLLIEC-JOUAULT S, SINQUIN C, SIMON G, et al. Antiviral activities of sulfated polysaccharides isolated from Sphaerococcus coronopifolius (Rhodophytha, Gigartinales) and Boergeseniella thuyoides (Rhodophyta, Ceramiales). **Mar Drugs**, 2011;9(7):1187-209.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Departamento de Assistência Farmacêutica, 2006a. p.
- BRASIL. Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS. Atitude de ampliação de acesso. Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. p.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 10: Guia de notificação de drogas vegetais, de 09 de março de 2010. Brasília: Diário Oficial da União, 2010. 8 p.
- CALIXTO JB. Biodiversidade como fonte de medicamentos. Cienc Cult, 2003;55(3):37-39.
- CALIXTO JB, SIQUEIRA JR JM. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, 2008;Suplemento 1(78):98-106.
- CALZADA F, ARISTA R, PEREZ H. Effect of plants used in Mexico to treat gastrointestinal disorders on charcoal-gum acacia-induced hyperperistalsis in rats. **Journal of ethnopharmacology**, 2010;128(1):49-51.
- CAPASSO R, AVIELLO G, BORRELLI F, ROMANO B, FERRO M, CASTALDO L, et al. Inhibitory effect of standardized cannabis sativa extract and its ingredient cannabidiol on rat and human bladder contractility. **Urology**, 2011;77(4):1006 e9-1006 e15.
- CARVALHO ACB, SILVEIRA D. Drogas vegetais: uma antiga forma de utilização de plantas medicinais. **Brasilia Med**, 2010;48(2):219-237.
- CERNIK C, GALLINA K, BRODELL RT. The treatment of herpes simplex infections: an evidence-based review. **Arch Intern Med**, 2008;168(11):1137-44.
- CIVITELLI L, PANELLA S, MARCOCCI ME, DE PETRIS A, GARZOLI S, PEPI F, et al. In vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication by Mentha suaveolens essential oil and its main component piperitenone oxide. **Phytomedicine**, 2014;21(6):857-65.

- COSTA CT, BEVILAQUA CM, MORAIS SM, CAMURCA-VASCONCELOS AL, MACIEL MV, BRAGA RR, et al. Anthelmintic activity of Cocos nucifera L. on intestinal nematodes of mice. **Res Vet Sci**, 2010;88(1):101-3.
- COSTA CTC, BEVILAQUA CML, NASCIMENTO NRF, NUNES-PINHEIRO DCS, TOMÉ AR, CAMURÇA-VASCONCELOS ALF, et al. Toxicological activity evaluation of Cocos nucifera L. in experimental models. **Ciência Animal**, 2011;21(1):35-44.
- DANAHER RJ, WANG C, DAI J, MUMPER RJ, MILLER CS. Antiviral effects of blackberry extract against herpes simplex virus type 1. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 2011;112(3):e31-5.
- DE BRUYNE T, PIETERS L, WITVROUW M, DE CLERCQ E, VANDEN BERGHE D, VLIETINCK AJ. Biological evaluation of proanthocyanidin dimers and related polyphenols. **J Nat Prod**, 1999;62(7):954-8.
- DEB L, LAISHRAM S, KHUMUKCHAM N, NINGTHOUKHONGJAM D, NAMEIRAKPAM SS, DEY A, et al. Past, present and perspectives of Manipur traditional medicine: A major health care system available for rural population in the North-East India. **J Ethnopharmacol**, 2015;169:387-400.
- DEBMANDAL M, MANDAL S. Coconut (Cocos nucifera L.: Arecaceae): in health promotion and disease prevention. **Asian Pac J Trop Med**, 2011;4(3):241-7.
- DUA K, SHESHALA R, LING TY, HUI LING S, GORAJANA A. Anti-inflammatory, antibacterial and analgesic potential of cocos nucifera linn.: a review. **Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem**, 2013;12(2):158-64.
- E SILVA DOM, G. R.; DA SILVA, A. J. R.; ALVIANO, D. S.; NASCIMENTO, R. P.; KAPLAN, M. A. C.; ALVIANO, C. S. Chemical and antimicrobial analysis of husk fiber aqueous extract from Cocos nucifera L. **African Journal of Biotechnology**, 2013;12(18).
- ELFAWAL MA, TOWLER MJ, REICH NG, GOLENBOCK D, WEATHERS PJ, RICH SM. Dried whole plant Artemisia annua as an antimalarial therapy. **PloS one**, 2012;7(12):e52746.
- ELFAWAL MA, TOWLER MJ, REICH NG, WEATHERS PJ, RICH SM. Dried whole-plant Artemisia annua slows evolution of malaria drug resistance and overcomes resistance

- to artemisinin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015;112(3):821-6.
- ESQUENAZI D, WIGG MD, MIRANDA MM, RODRIGUES HM, TOSTES JB, ROZENTAL S, et al. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from Cocos nucifera Linn. (Palmae) husk fiber extract. **Res Microbiol**, 2002;153(10):647-52.
- FARAL-TELLO P, MIRAZO S, DUTRA C, PEREZ A, GEIS-ASTEGGIANTE L, FRABASILE S, et al. Cytotoxic, virucidal, and antiviral activity of South American plant and algae extracts. **ScientificWorldJournal**, 2012;2012:174837.
- FERNANDEZ ROMERO JA, DEL BARRIO ALONSO G, ROMEU ALVAREZ B, GUTIERREZ Y, VALDES VS, PARRA F. In vitro antiviral activity of Phyllanthus orbicularis extracts against herpes simplex virus type 1. **Phytother Res**, 2003;17(8):980-2.
- FERRO D. Fitoterapia: Conceitos Clínicos. São Paulo: Editora Atheneu; 2008. p.
- GESCHER K, KUHN J, HAFEZI W, LOUIS A, DERKSEN A, DETERS A, et al. Inhibition of viral adsorption and penetration by an aqueous extract from Rhododendron ferrugineum L. as antiviral principle against herpes simplex virus type-1. **Fitoterapia**, 2011a;82(3):408-13.
- GESCHER K, KUHN J, LORENTZEN E, HAFEZI W, DERKSEN A, DETERS A, et al. Proanthocyanidin-enriched extract from Myrothamnus flabellifolia Welw. exerts antiviral activity against herpes simplex virus type 1 by inhibition of viral adsorption and penetration. **Journal of ethnopharmacology**, 2011b;134(2):468-74.
- HASSAN ST, MASARCIKOVA R, BERCHOVA K. Bioactive natural products with antiherpes simplex virus properties. **J Pharm Pharmacol**, 2015;67(10):1325-36.
- HENNIG T, O'HARE P. Viruses and the nuclear envelope. **Curr Opin Cell Biol**, 2015;34:113-21.
- HULL CM, LEVIN MJ, TYRING SK, SPRUANCE SL. Novel composite efficacy measure to demonstrate the rationale and efficacy of combination antiviral-anti-inflammatory treatment for recurrent herpes simplex labialis. **Antimicrob Agents Chemother**, 2014;58(3):1273-8.

- ITZHAKI RF. Herpes simplex virus type 1 and Alzheimer's disease: increasing evidence for a major role of the virus. **Front Aging Neurosci**, 2014;6:202.
- JOSE M, CYRIAC MB, PAI V, VARGHESE I, SHANTARAM M. Antimicrobial properties of Cocos nucifera (coconut) husk: An extrapolation to oral health. **J Nat Sci Biol Med**, 2014;5(2):359-64.
- KHAN MT, ATHER A, THOMPSON KD, GAMBARI R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral Res**, 2005;67(2):107-19.
- KIRSZBERG C, ESQUENAZI D, ALVIANO CS, RUMJANEK VM. The effect of a catechin-rich extract of Cocos nucifera on lymphocytes proliferation. **Phytother Res**, 2003;17(9):1054-8.
- KOSCHEK PR, ALVIANO DS, ALVIANO CS, GATTASS CR. The husk fiber of Cocos nucifera L. (Palmae) is a source of anti-neoplastic activity. **Braz J Med Biol Res**, 2007;40(10):1339-43.
- KUKHANOVA MK, KOROVINA AN, KOCHETKOV SN. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. **Biochemistry** (Mosc), 2014;79(13):1635-52.
- LANS CA. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. **J Ethnobiol Ethnomed**, 2006;2:45.
- LIMA EB, SOUSA CN, MENESES LN, XIMENES NC, SANTOS JUNIOR MA, VASCONCELOS GS, et al. Cocos nucifera (L.) (Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. **Braz J Med Biol Res**, 2015.
- LORENZI H, MATOS FJA. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2008. p.
- LORENZI HM, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2ª Edição ed. Ltda. IPdEdF, editor. Nova Odessa, Brasil; 2008. 560 p.
- MENDONCA-FILHO RR, RODRIGUES IA, ALVIANO DS, SANTOS AL, SOARES RM, ALVIANO CS, et al. Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of Cocos nucifera Linn. (Palmae). **Res Microbiol**, 2004;155(3):136-43.

- MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 1983;65(1-2):55-63.
- NAQASH SY, NAZEER RA. Anticoagulant, antiherpetic and antibacterial activities of sulphated polysaccharide from Indian medicinal plant Tridax procumbens L. (Asteraceae). **Appl Biochem Biotechnol**, 2011;165(3-4):902-12.
- NASKAR S, MAZUMDER UK, PRAMANIK G, GUPTA M, KUMAR RB, BALA A, et al. Evaluation of antihyperglycemic activity of Cocos nucifera Linn. on streptozotocin induced type 2 diabetic rats. **Journal of ethnopharmacology**, 2011;138(3):769-73.
- NASKAR S, MAZUMDER UK, PRAMANIK G, SAHA P, HALDAR PK, GUPTA M. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activity of hydromethanol extract of Cocos nucifera L. **Inflammopharmacology**, 2012;21(1):31-5.
- NOLKEMPER S, REICHLING J, STINTZING FC, CARLE R, SCHNITZLER P. Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against Herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. **Planta Med**, 2006;72(15):1378-82.
- OLIVEIRA LM, BEVILAQUA CM, COSTA CT, MACEDO IT, BARROS RS, RODRIGUES AC, et al. Anthelmintic activity of Cocos nucifera L. against sheep gastrointestinal nematodes. **Vet Parasitol**, 2009;159(1):55-9.
- PEREIRA FA. Herpes simplex: evolving concepts. **J Am Acad Dermatol**, 1996;35(4):503-20; quiz 521-2.
- PIACENTINI R, DE CHIARA G, LI PUMA DD, RIPOLI C, MARCOCCI ME, GARACI E, et al. HSV-1 and Alzheimer's disease: more than a hypothesis. **Front Pharmacol**, 2014;5:97.
- PIRET J, BOIVIN G. Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus. **Rev Med Virol**, 2014;24(3):186-218.
- RASKIN I, RIPOLL C. Can an apple a day keep the doctor away? Curr Pharm Des, 2004;10(27):3419-29.
- REICHLING J, KOCH C, STAHL-BISKUP E, SOJKA C, SCHNITZLER P. Virucidal activity of a beta-triketone-rich essential oil of Leptospermum scoparium (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture. **Planta Med**, 2005;71(12):1123-7.

- RINALDI S, SILVA DO, BELLO F, ALVIANO CS, ALVIANO DS, MATHEUS ME, et al. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities from Cocos nucifera L. (Palmae). **Journal of ethnopharmacology**, 2009;122(3):541-6.
- SAAD GA, LÉDA PHO, SÁ IM, SEIXLACK ACC. Fitoterapia Contemporânea: Tradição e Ciência na Prática Clínica. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. p.
- SAWLESHWARKAR S, DWYER DE. Antivirals for herpes simplex viruses. **BMJ**, 2015;351:h3350.
- SCHNEIDER S, REICHLING J, STINTZING FC, MESSERSCHMIDT S, MEYER U, SCHNITZLER P. Anti-herpetic properties of hydroalcoholic extracts and pressed juice from Echinacea pallida. **Planta Med**, 2009;76(3):265-72.
- SERKEDJIEVA J, IVANCHEVA S. Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant Geranium sanguineum L. **Journal of ethnopharmacology**, 1999;64(1):59-68.
- SHAIBU AM, AMINU M, MUSA BO, BUGAJE MA. Seroprevalence of IgG antibodies to herpes simplex virus type-1 in Nigerian children. **Niger J Med**, 2014;23(1):40-5.
- SILVA RR, DO ES, FONTES HR, ALVIANO CS, FERNANDES PD, ALVIANO DS. Antiinflammatory, antioxidant, and antimicrobial activities of Cocos nucifera var. typica. **BMC Complement Altern Med**, 2013;13(1):107.
- SIMMONS A. Clinical manifestations and treatment considerations of herpes simplex virus infection. **J Infect Dis**, 2002;186 Suppl 1:S71-7.
- SINHA S, ASTANI A, GHOSH T, SCHNITZLER P, RAY B. Polysaccharides from Sargassum tenerrimum: structural features, chemical modification and anti-viral activity. **Phytochemistry**, 2010;71(2-3):235-42.
- SOARES AR, ABRANTES JL, LOPES SOUZA TM, LEITE FONTES CF, PEREIRA RC, DE PALMER PAIXAO FRUGULHETTI IC, et al. In vitro antiviral effect of meroditerpenes isolated from the Brazilian seaweed Stypopodium zonale (Dictyotales). **Planta Med**, 2007;73(11):1221-4.
- SOUZA TM, ABRANTES JL, DE AER, LEITE FONTES CF, FRUGULHETTI IC. The alkaloid 4-methylaaptamine isolated from the sponge Aaptos aaptos impairs Herpes simplex virus type 1 penetration and immediate-early protein synthesis. **Planta Med**, 2007;73(3):200-5.

- SUZUTANI T, OGASAWARA M, YOSHIDA I, AZUMA M, KNOX YM. Anti-herpesvirus activity of an extract of Ribes nigrum L. **Phytother Res**, 2003;17(6):609-13.
- THOMPSON KD, DRAGAR C. Antiviral activity of Undaria pinnatifida against herpes simplex virus. **Phytother Res**, 2004;18(7):551-5.
- VIJU N, SATHEESH S, VINCENT SG. Antibiofilm activity of coconut (Cocos nucifera Linn.) husk fibre extract. **Saudi J Biol Sci**, 2013;20(1):85-91.
- WHITLEY RJ, KIMBERLIN DW, ROIZMAN B. Herpes simplex viruses. Clin Infect Dis, 1998;26(3):541-53; quiz 554-5.
- XIONG HR, LUO J, HOU W, XIAO H, YANG ZQ. The effect of emodin, an anthraquinone derivative extracted from the roots of Rheum tanguticum, against herpes simplex virus in vitro and in vivo. **Journal of ethnopharmacology**, 2011;133(2):718-23.
- XU F, STERNBERG MR, KOTTIRI BJ, MCQUILLAN GM, LEE FK, NAHMIAS AJ, et al. Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. **JAMA**, 2006;296(8):964-73.
- YANG CM, CHENG HY, LIN TC, CHIANG LC, LIN CC. The in vitro activity of geraniin and 1,3,4,6-tetra-O-galloyl-beta-D-glucose isolated from Phyllanthus urinaria against herpes simplex virus type 1 and type 2 infection. **Journal of ethnopharmacology**, 2007;110(3):555-8.
- ZHANG Y, BUT PP, OOI VE, XU HX, DELANEY GD, LEE SH, et al. Chemical properties, mode of action, and in vivo anti-herpes activities of a lignin-carbohydrate complex from Prunella vulgaris. **Antiviral Res**, 2007;75(3):242-9.

ANEXO A - Análise de compostos inorgânicos da substância CN342B

ELEMENTOS	CN342	DP
	$(\mu g/g)$	
Ca (Cálcio)	1674,091	341,242
Mg (Magnésio)	451,337	57,888
Fe (Ferro)	25,013	11,533
P (Fósforo)	11,087	3,906
K (Potássio)	231,119	9,738
Na (Sódio)	41820,241	898,146
Cu (Cobre)	47,658	0,052
Zn (Zinco)	287,184	1,218
Mn (Manganês)	14,258	0,297
Ni (Níquel)	1,359	0,012
Mo (Molibdênio)	0,048	0,009
Sm (Samário)	0,034	0,010
Tb (Térbio)	0.004	0,001
Tm (Túlio)	0,002	0,000
Yb (Itérbio)	0,016	0,001
La (Lantânio)	0,063	0,001
Ce (Cério)	0,235	0,001
Dy (Disprósio)	0,015	0,003
Er (Érbio)	0,016	0,002
Eu (Európio)	0,026	0,000
Gd (Gadolínio)	0,024	0,001
Ho (Hólmio)	0,004	0,001
Lu (Lutécio)	0,003	0,000
Nd (Neodímio)	0,069	0,005
Pr (Praseodímio)	0,014	0,001
Th (Tório)	0,021	0,001
Sb (Antimônio)	0,060	0,002
Sn (Estanho)	0,198	0,016
Cd (Cádmo)	0,051	0,002
Ba (Bário)	39,770	1,611
Pb (Chumbo)	8,134	0,349
Be (Berílio)	0,001	0,004
Bi (Bismuto)	0,179	0.003
Rb (Rubídio)	0,835	0,001
Se (Selênio)	0,460	0,145
Al (Alumínio)	31,325	0,827
Ag (Prata)	0,092	0,023
Co (Cobalto)	0,252	0,004
Tl (Tálio)	0,053	0,002
Sr (Estrôncio)	9,934	0,102
Li (Lítio)	0,148	0,002
As (Arsênio)	0,237	0,057
Pt (Platina)	0,001	0,000