



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

PRISCILLA BITTENCOURT DE ALMEIDA FIGUEIREDO

ANÁLISE *IN VITRO* DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL DO ÓLEO DE
ANDIROBA (*CARAPA GUIANENSIS AUBL.*) FRENTE AO HERPES SIMPLEX
VÍRUS -TIPO 1 (HSV-1)

BELÉM

2024

PRISCILLA BITTENCOURT DE ALMEIDA FIGUEIREDO

Análise *in vitro* da potencial atividade antiviral do óleo de andiroba (*Carapa guianensis*
Aubl.) frente ao Herpes Simples Vírus -Tipo 1 (HSV-1)

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Doutor em clínica odontológica, área de concentração Radiologia odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Mesquita Tuji

BELÉM

2024

PRISCILLA BITTENCOURT DE ALMEIDA FIGUEIREDO

Análise *in vitro* da potencial atividade antiviral do óleo de andiroba (*Carapa guianensis*
Aubl.) frente ao Herpes Simples Vírus -Tipo 1 (HSV-1)

Tese de doutorado apresentado ao Programa
de Pós-graduação em Odontologia da
Universidade Federal do Pará como
requisito para obtenção do título de Doutor
em clínica odontológica.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

_____ - Presidente

Prof. Dr. Fabricio Mesquita Tuji

FACULDADE DE ODONTOLOGIA – UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ (UFPA)

_____ - Membro interno

Prof. Dr. João de Jesus Viana Pinheiro

FACULDADE DE ODONTOLOGIA – UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ (UFPA)

_____ - Membro externo

Prof. Dr. Rodrigo Vellasco Silvestre

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

_____ - Membro externo

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

_____ - Membro externo

Profª. Dra. Clarissa Mendes Lobato de Oliveira

CENTRO UNIVERSITÁRIO DA AMAZÔNIA (UNIESAMAZ)

Agradecimentos

À Deus, por ter possibilitado esta oportunidade de aprendizado e ter me concedido vida e saúde ao longo desta jornada.

Ao meu filho amado Arilson Segundo, luz da minha vida, que me inspira todos os dias. Que você sempre siga em frente com coragem, sabedoria e o coração cheio de sonhos. Este trabalho é para você, a maior realização da minha vida.

Ao meu esposo Arilson, pelo companheirismo em todos os momentos, pela paciência, por acreditar em mim e por estar sempre ao meu lado. Obrigada pelos sonhos que plantamos no jardim das nossas vidas e pelas flores que colhemos e que ainda iremos colher. Amo você!

Aos meus pais Mário e Eliana, o meu muito obrigada pelo amor incondicional em todas as fases de minha vida, pela presença constante e pelo exemplo de vida. Amo vocês!

Aos meus irmãos Mário Jr. e Eric, as flores do meu jardim Alicia e Julia, a minha cunhada Priscilla, gratidão por todos os momentos vividos juntos em família.

Ao meu orientador Professor Dr. Fabricio Mesquita Tuji por todos os ensinamentos. Obrigada pela confiança, persistência, paciência, e tempo dedicados à minha orientação. Obrigada por ter acreditado em mim.

Aos professores Dr. Rodrigo Vellasco Silvestre e Dr. Edivaldo Herculano Corrêa de Oliveira, do Instituto Evandro Chagas, Belém-PA, e também ao professor Dr. Rommel Rodrigues Burbano, do Hospital Ophir Loyola, pela parceria junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGO-UFPA) durante a realização deste estudo, os meus mais sinceros agradecimentos. A experiência e o conhecimento compartilhados por vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós graduação em odontologia, pela possibilidade de ingressar e concluir mais uma etapa de minha formação.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGO-UFPA) por todo o ensinamento adquirido nas disciplinas do curso e por toda a dedicação e doação que tornaram possível a existência do programa e qualidade de nossa formação.

Aos colegas do grupo de pesquisa em radiologia odontológica do PPGO-UFGA, Ana Cristina, Jéssica, Jeovanna e Fabrício, por terem compartilhado comigo este período tornando os dias mais alegres e divertidos sem tirar do foco a seriedade e responsabilidade do objetivo final.

À minha querida amiga e dupla nas disciplinas deste doutorado Suely Mendes Ribeiro, você sempre foi inspiração para mim na odontopediatria, e estar ao seu lado nesta caminhada com certeza tornou ela mais leve e especial.

À todos que, cruzaram meu caminho e de alguma maneira, contribuíram para a realização desta tese.

Deus tem sempre o melhor para mim!

Autor desconhecido

RESUMO

As infecções causadas pelo Vírus Herpes Simples tipo 1 (HSV-1) representam um sério problema de saúde pública global, afetando uma parcela significativa da população. Embora fármacos convencionais como aciclovir e penciclovir ainda sejam a terapia padrão, a emergência de cepas resistentes demonstra a necessidade urgente de alternativas eficazes de tratamento. Nesse contexto, produtos de origem natural emergem como opções terapêuticas promissoras. Dentro da rica biodiversidade brasileira, a *Carapa guianensis Aubl.* (andiroba), da família Meliaceae, destaca-se como uma planta medicinal de grande importância na Amazônia. O óleo extraído de suas sementes possui várias propriedades medicinais reconhecidas como anti-inflamatória, anti-fúngicas e antibacterianas. Este estudo propõe uma avaliação *in vitro* da atividade antiviral do óleo de andiroba frente o HSV-1. Foram realizados triagem antiviral em diferentes concentrações do óleo de andiroba por meio do ensaio de titulação viral, avaliação da inibição do efeito citopático viral, avaliação quantitativa por PCR em tempo real (q-PCR), avaliação do efeito protetor do tratamento com o óleo de andiroba (AO) antes da infecção com HSV-1, além da comparação entre o tratamento com óleo de andiroba e o medicamento de uso convencional contra o HSV-1, aciclovir. A análise dos dados foi realizada no *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 24.0. Os resultados foram calculados pelos valores originais e expressos pela média. Foram analisados estatisticamente pelo teste t-Student com correção de Welch e pelo teste ANOVA. Valores com p inferior a 5% ($\alpha = 0,05$) foram considerados significativos. A redução do efeito citopático após o uso do AO sugere uma possível ação antiviral, especialmente nas concentrações mais altas (100 ng/mL). A análise da curva dose-resposta demonstra clareza entre o aumento da concentração do AO e a diminuição da replicação viral do HSV-1. Na análise de qPCR, em concentração de 10 ng/mL de AO, observa-se uma leve diminuição nos valores de ΔC_t à medida que a diluição do HSV-1 aumenta, o que sugere uma eficácia antiviral modesta. Para 100 ng/mL de AO, os valores de ΔC_t são mais baixos do que na concentração de 10 ng/mL, sugerindo uma maior atividade antiviral com o aumento da dosagem do óleo. Esses resultados sugerem que o AO possui atividade antiviral *in vitro*, com maior eficácia em concentrações mais altas e com cargas virais mais baixas, embora ainda menos eficaz que o aciclovir. A partir desses resultados inéditos e promissores,

futuros trabalhos utilizando doses maiores de andiroba devem ser realizados para avaliar a sua ação anti-viral.

Palavras-Chave: *Carapa guianensis*; Herpes simples; fitoterapia, antivirais, Reação em cadeia da polimerase, plantas medicinais

ABSTRACT

Infections caused by Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) represent a serious global public health concern, affecting a significant portion of the population. Although conventional drugs like acyclovir and penciclovir remain the standard therapy, the emergence of resistant strains highlights the urgent need for effective alternative treatments. In this context, natural products emerge as promising therapeutic options. Within Brazil's rich biodiversity, *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba), from the Meliaceae family, stands out as a medicinal plant of great importance in the Amazon. The oil extracted from its seeds possesses several recognized medicinal properties, including anti-inflammatory, antifungal, and antibacterial effects. This study proposes an *in vitro* evaluation of the antiviral activity of andiroba oil (AO) against HSV-1. Antiviral screening was conducted at different concentrations of AO through viral titration assays, evaluation of viral cytopathic effect inhibition, quantitative assessment via real-time PCR (qPCR), analysis of the protective effect of AO treatment before HSV-1 infection, and comparison between treatment with andiroba oil and the conventional drug against HSV-1, acyclovir. Data analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 24.0. Results were calculated from the original values and expressed as means. Statistical analysis was conducted using the Student's *t*-test with Welch's correction and ANOVA. Values with *p* less than 0.05 ($\alpha = 0.05$) were considered significant. The reduction of the cytopathic effect following the use of AO suggests potential antiviral activity, particularly at higher concentrations (100 ng/mL). The dose-response curve analysis clearly demonstrates a correlation between increased concentrations of AO and reduced HSV-1 replication. In the qPCR analysis, at a concentration of 10 ng/mL AO, a slight decrease in ΔC_t values was observed as HSV-1 dilution increased, indicating modest antiviral efficacy. At 100 ng/mL AO, ΔC_t values were lower than those observed at 10 ng/mL, suggesting greater antiviral activity with higher oil concentrations. These results indicate that AO exhibits *in vitro* antiviral activity, with greater efficacy at higher concentrations and lower viral loads, although it remains less effective than acyclovir. Based on these novel and promising findings, future studies using higher doses of andiroba oil should be conducted to further evaluate its antiviral activity.

Keywords: *Carapa guianensis*; Herpes simplex; Phytotherapy; Antivirals; Polymerase Chain Reaction; Medicinal plants

Esta Tese de Doutorado é organizada em dois capítulos constituídos de artigos científicos, escritos de acordo com as normas de publicação dos periódicos *Journal of Biological Research and Biotechnology (Bio-Research)* (artigo 1) e *Phytotherapy Research* (artigo 2). Após a última correção, a formatação final será realizada e os artigos serão submetidos para publicação.

Capítulo 1: Avaliação da ação antiviral do óleo de andiroba (*Carapa guianensis Aubl.*) em um modelo *in vitro* de infecção pelo HSV-1.

Capítulo 2: - Avaliação da inibição da replicação viral em células infectadas pelo HSV-1 e tratadas com óleo de andiroba (*Carapa guianensis Aubl.*) através de q-PCR.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1: Esquema de imagem do HSV-1.....19

CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIVIRAL DO ÓLEO DE ANDIROBA (*CARAPA GUIANENSIS AUBL.*) EM UM MODELO *IN VITRO* DE INFECÇÃO PELO HSV-1.

Figura 1: Disposição da placa de microtitulação para avaliação da atividade antiviral das diferentes concentrações de andiroba, em relação às diferentes diluições de HSV-1, em células VERO, por inibição do efeito citopático viral.....41

Figura 2: Análise da Cromatografia GC-MS do óleo *Carapa guianensis*. Número de componentes (RT) de acordo com a tabela 1.....44

Figura 3: Imagens que representam o CPE do HSV-1 em células Vero E6.....45

Figura 4: Médias do CPE do HSV-1 em células vero E6 frente ao uso do AO, em função das concentrações comparadas aos grupos controle.....49

Figura 5: Intervalo de médias do CPE do HSV-1 em células vero E6 após o uso do óleo de andiroba na concentração de 10ng/mL.....50

Figura 6: Teste t de *Student* para comparação de médias do CPE do HSV-1 em células vero E6 após o uso do óleo de andiroba na concentração de 100ng/mL.....51

Figura 7: Curva dose resposta da ação antiviral do AO em células vero E6 infectadas com HSV-1 nas concentrações de 10ng/mL e de 100ng/mL do óleo.....52

CAPÍTULO 2: - AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL EM CÉLULAS INFECTADAS PELO HSV-1 E TRATADAS COM ÓLEO DE ANDIROBA (*CARAPA GUIANENSIS AUBL.*) ATRAVÉS DE q-PCR.

Figura 1: Disposição da placa de microtitulação para avaliação da atividade antiviral das diferentes concentrações de andiroba, em relação às diferentes diluições de HSV-1, em células VERO para posterior análise por q-PCR.....65

Figura 2: Comparação dos valores de ciclo limiar (ΔCt) do HSV-1 frente ao uso do óleo de andiroba, em função das concentrações para os grupos pré-tratamento e tratamento..70

Figura 3: Comparação dos valores de ciclo limiar (ΔC_t) do HSV-1 frente ao uso do óleo de andiroba, em função das concentrações para os grupos controle positivo e pré-tratamento.....72

Figura 4: Comparação dos valores de ciclo limiar (ΔC_t) do HSV-1 frente ao uso do óleo de andiroba, em função das concentrações para os grupos pré-tratamento e Aciclovir...73

Figura 5: Comparação dos valores de delta ciclo limiar (ΔC_t) do HSV-1 frente ao uso do óleo de andiroba em função das concentrações para os grupos tratamento e controle positivo.....74

Figura 6: Comparação dos valores valores de delta ciclo limiar (ΔC_t) do HSV-1 frente ao uso do óleo de andiroba em função das concentrações para os grupos tratamento e Aciclovir.....75

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIVIRAL DO ÓLEO DE ANDIROBA (*CARAPA GUIANENSIS AUBL.*) EM UM MODELO *IN VITRO* DE INFECÇÃO PELO HSV-1.

Tabela 1: Composição lipídica do óleo de andiroba-*Carapa guianensis*.....43

Tabela 2: Efeito citopático viral (CPE) do HSV-1 em células Vero E6 frente o uso do óleo de andiroba em diferentes concentrações em 24, 48 e 72hs.....47

Tabela 3: Teste t de *Student* para comparação de médias em 24h, 48h e 72h do CPE do HSV-1 em células vero E6 frente ao uso do AO, em função das concentrações comparadas aos grupos controle.....48

Tabela 4: Teste t de *Student* para comparação de médias do CPE do HSV-1 em células vero E6 após o uso do óleo de andiroba na concentração de 10ng/mL.....49

Tabela 5: Teste t de *Student* para comparação de médias do CPE do HSV-1 em células vero E6 após o uso do óleo de andiroba na concentração de 100ng/mL.....50

CAPÍTULO 2: - AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL EM CÉLULAS INFECTADAS PELO HSV-1 E TRATADAS COM ÓLEO DE ANDIROBA (*CARAPA GUIANENSIS AUBL.*) ATRAVÉS DE q-PCR.

Tabela 1: Comparação dos valores de Delta ciclo limiar (ΔCt) nos efeitos pré-tratamento e tratamento do óleo de andiroba em um modelo *in vitro* de infecção pelo HSV-1 através de q-PCR.....68

Tabela 2: Comparação dos valores de delta ciclo limiar (ΔCt) do HSV-1 frente ao uso do óleo de andiroba, em função das concentrações para os grupos pré-tratamento, tratamento, controle positivo, aciclovir e controle.....69

Tabela 3: Comparação dos valores valores de delta ciclo limiar (ΔCt) do HSV-1 frente ao uso do óleo de andiroba em função das concentrações para os grupos tratamento, controle positivo e aciclovir.....71

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
1 Considerações clínicas, diagnósticas e terapêuticas sobre o herpes simples vírus tipo 1 (HSV-1).....	17
2 O uso de fitoterápicos como agentes antivirais.....	21
3 O óleo de andiroba e suas propriedades terapêuticas.....	22
4 Metodologias utilizadas para diagnóstico e avaliação da ação antiviral de medicamentos frente o HSV-1.....	24
OBJETIVOS.....	27
REFERÊNCIAS.....	28
CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIVIRAL DO ÓLEO DE ANDIROBA (CARAPA GUIANENSIS AUBL.) EM UM MODELO <i>IN VITRO</i> DE INFECÇÃO PELO HSV-1.....	35
Resumo.....	35
Introdução.....	36
Metodologia.....	38
Aspectos éticos.....	38
Delineamento do estudo.....	38
Obtenção do óleo de andiroba.....	38
Análise de cromatografia gasosa (GC-MS).....	39
Linhagem de células e vírus.....	39
Manutenção e expansão da linhagem	39
Preparo das suspensões - estoques virais.....	39
Testes de viabilidade celular.....	40
Avaliação da ação anti-viral da andiroba frente ao HSV-1.....	40
Análise estatística.....	43

Resultados.....	43
Discussão.....	52
Conclusão.....	56
Referências.....	56

CAPÍTULO 2: - AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL EM CÉLULAS INFECTADAS PELO HSV-1 E TRATADAS COM ÓLEO DE ANDIROBA (*CARAPA GUIANENSIS AUBL.*) ATRAVÉS DE q-PCR.....60

Resumo.....	60
Introdução.....	60
Materiais e métodos.....	62
Aspectos éticos.....	62
Delineamento do estudo.....	62
Obtenção do óleo de andiroba	62
Linhagem de células e vírus.....	63
Manutenção e expansão da linhagem	63
Preparo das suspensões - estoques virais.....	63
Avaliação da ação anti-viral da andiroba frente ao HSV-1.....	64
Extração do DNA e quantificação da carga viral do HSV-1.....	66
Análise estatística.....	67
Resultados.....	67
Discussão	75
Conclusão.....	78
Referências	79

ANEXOS.....	84
--------------------	-----------

INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

1 CONSIDERAÇÕES CLÍNICAS, DIAGNÓSTICAS E TERAPÊUTICAS SOBRE O HERPES SIMPLEX VÍRUS TIPO 1 (HSV-1)

As doenças virais infecciosas continuam sendo um desafio significativo para a saúde global. Entre os muitos vírus de relevância clínica, destaca-se o Herpes simplex vírus (HSV), pertencente à família Herpesviridae e à subfamília Alphaherpesvirinae. Esse patógeno é responsável por um amplo espectro de infecções, afetando milhões de pessoas ao redor do mundo. Os dois genótipos de maior destaque são o HSV tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2), ambos com um ciclo reprodutivo rápido e a capacidade de estabelecer infecções latentes. O HSV-1 está associado principalmente a lesões orofaciais, enquanto o HSV-2 é o principal agente de lesões genitais. No entanto, o HSV-1 também pode provocar infecções genitais, e, embora menos comum, o HSV-2 pode causar lesões orofaciais (Bhatta et al., 2018; Ayoub et al., 2019; Yan et al., 2020).

A apresentação dos sintomas da doença se dá de forma cíclica, o período de incubação do HSV-1 pode variar de 4 a 5 dias e a transmissão ocorre pessoa a pessoa, geralmente, pelo contato íntimo e compartilhamento de fluidos contendo os vírus (Geller et al., 2012; Deethae et al., 2018). A primo-infecção pelo HSV-1 é caracterizada por gengivite, estomatite e faringite, enquanto as reativações são responsáveis por lesões labiais e ulcerações intraorais, boca ou pele facial externa (Zupin et al., 2018).

As manifestações clínicas estão intrinsecamente ligadas ao sorotipo viral, ao local anatômico da infecção, à resposta imunológica e à predisposição genética do indivíduo. As lesões cutâneas se caracterizam predominantemente pela presença de vesículas claras sobre uma base eritematosa, as quais se rompem, originando erosões ou ulcerações. Os sintomas prodrômicos incluem ardor e parestesia local, linfadenopatia, febre, mal-estar, mialgia, perda de apetite e dores de cabeça. Em seguida, iniciam-se formações de máculas e pápulas e o ciclo de replicação do vírus torna-se intenso (Crimi et al., 2019; Lemos et al., 2023; Benedetti et al., 2023). As lesões iniciais evoluem para pústulas e rompem após 2 dias, expondo, desta forma, as lesões à fatores externos. Após 96 horas, as lesões já se

apresentam com crostas. As infecções primárias apresentam um curso clínico que pode variar entre 10 e 17 dias. (Levin; Weinberg; Schmid, 2016).

Em indivíduos imunocomprometidos, as infecções são clinicamente mais graves e progressivas. Outras manifestações que podem ocorrer com frequência nesses pacientes são: encefalite, pneumonia, esofagite, hepatite e colite (Marcocci et al., 2020; Knipe, Whitley, 2021). Além disso, pacientes imunocomprometidos sofrem mais com resistência as drogas utilizadas no tratamento do HSV-1 (Steiner, Benninger, 2018).

Além das infecções cutâneas, o HSV possui a capacidade de infectar as terminações nervosas sensoriais que inervam a pele e a mucosa, onde permanece em estado latente. Posteriormente, o vírus pode se reativar, desencadeando novas infecções facilitadas por essa latência (Levin et al., 2016). Após a fase aguda, a infecção alterna entre períodos de latência e reativação. Fatores como mudanças ambientais, exposição à luz ultravioleta e estresse estão diretamente associados à reativação do HSV-1 (Ives, Bertke, 2017).

A latência do HSV-1 desempenha um papel crucial no sucesso da infecção. De forma geral, a reativação do vírus é assintomática em cerca de 65% dos casos registrados, e a frequência desses eventos diminui ao longo do tempo. Essa reativação permite a disseminação do vírus para novos hospedeiros, mantendo o indivíduo infectado como portador vitalício (Schiffer et al., 2011; Cole, 2020; Stempel et al., 2019; Yan et al., 2020).

O diagnóstico do HSV-1 baseia-se na avaliação clínica das lesões cutâneas, confirmada por testes laboratoriais. Dentre as técnicas mais usadas estão as moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que se destaca por sua alta sensibilidade na detecção do vírus, tanto em pacientes sintomáticos quanto assintomáticos. Em casos em que os pacientes relatam desconforto genital ou labial sem a presença de lesões visíveis, testes sorológicos tipo-específicos, como o *Western blot*, são recomendados para a detecção de anticorpos IgG. Embora esses testes sejam altamente sensíveis e específicos, permitindo a diferenciação entre infecções por HSV-1 e HSV-2, algumas limitações surgem na prática clínica devido a resultados falso-positivos. Isso é especialmente relevante em indivíduos infectados por ambas as espécies virais ou em populações de baixa prevalência, onde o valor preditivo positivo pode ser reduzido (Penello et al., 2010; Geller et al., 2012; Johnston, Corey, 2016; Johnston et al., 2016).

A partícula do HSV-1, com cerca de 150nm de tamanho, tem uma estrutura básica composta por um núcleo de DNA em dupla hélice compactado (Figura1). Esse genoma viral é envolto por uma camada proteica chamada capsídeo, que, por sua vez, é circundado por um envelope lipídico. Nesse envelope, encontram-se as glicoproteínas virais (como gB, gC, gD, gH e gL) e algumas proteínas que inibem o sistema complemento. . Essas glicoproteínas interagem com receptores específicos nas células hospedeiras, permitindo a fusão do envelope viral com a membrana celular e a entrada do genoma viral na célula. Abaixo do envelope lipídico, há um material proteico amorfo conhecido como tegumento. O tegumento contém proteínas responsáveis pela degradação do RNAm celular, desagregação de polissomas e formação do complexo de pré-iniciação, iniciando o processo de transcrição viral. Os genes α , β e γ expressos controlam, respectivamente, a transcrição do genoma viral, a tradução de proteínas essenciais para a síntese do DNA viral e a liberação das partículas virais da célula infectada (Diefenbach et al., 2015; Miranda-Saksena et al., 2018; Dai, Zhou, 2018; Polpitiya Arachchige, et al., 2019; Koujah et al., 2019).

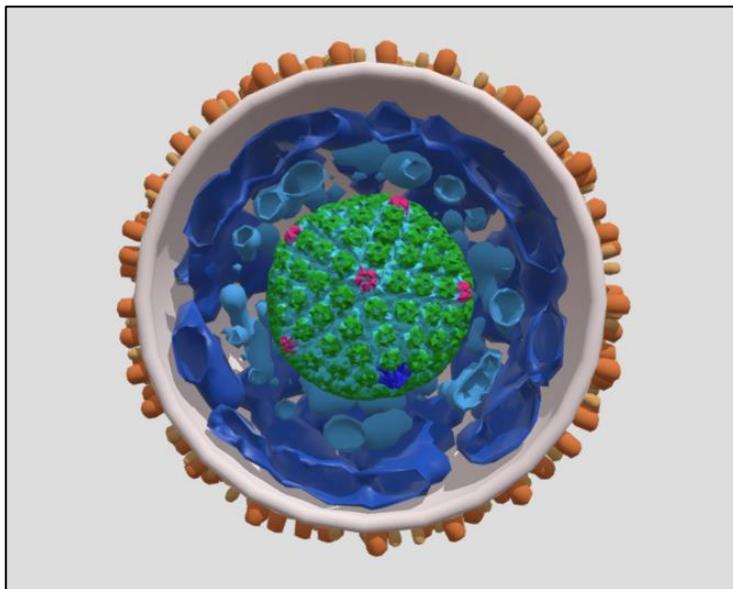


Figura 1: Esquema de imagem do HSV-1 (fonte: <https://sketchfab.com/3d-models/herpes-simplex-virus-sectioned-57d70f09825f437595f51ae6cf7d4e6e>)

A nível celular, o ciclo de replicação viral é dividido em cinco etapas: 1) entrada dos vírus nas células hospedeiras; 2) expressão de genes virais; 3) replicação

propriamente dita; 4) montagem das partículas virais; e 5) liberação da nova geração de partículas virais. Para iniciar a infecção, os vírus se ligam aos receptores de superfície celular. Em seguida, ocorre rapidamente a fusão do envelope com a membrana plasmática e a liberação do capsídeo no citoplasma, o qual é transportado para os poros nucleares, pelos quais o DNA é introduzido no núcleo. Isso resulta na transcrição gênica e replicação do DNA viral bem como na montagem dos novos capsídeos (Connolly et al., 2011; Kukhanova et al, 2014).

Em se tratando de epidemiologia, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2016, fez estimativas globais e regionais de prevalência e incidência de infecção oral por HSV-1 e verificou que em indivíduos entre 0-49 anos de idade, esta infecção atinge aproximadamente 67% da população mundial. Foram observados padrões diferentes por idade, sexo e região geográfica (Looker et al., 2015; James et al, 2020). A soroprevalência de HSV-1 aumenta linearmente com a idade e é maior no sexo feminino. No Brasil, a soroprevalência de anticorpos para HSV-1 por idade, foi 67,2%, sem diferença quanto ao sexo e maior na região Norte (Clemens, Farhat, 2010). Além disso, estima-se que as recidivas herpéticas decorrentes do HSV ocorrem dentro de uma ampla gama de frequências que varia entre os 20-50% para infecções por HSV-1. Isso significa que 50-80% dos indivíduos com infecção por HSV-1 não apresentaram sintomas clínicos. No geral, estima-se atualmente que 10-25% dos infetados com HSV manifestam sintomas da doença, em particular lesões cutâneas em várias formas de herpes (Abrenates, 2021).

O tratamento anti-herpético frequentemente empregado é por meio de fármacos análogos de nucleosídeo, como o aciclovir, um pró-fármaco que causa bloqueio no ciclo de replicação do vírus, utilizado para controle da doença e para prevenir recorrências. O ideal é que a utilização do medicamento ocorra antes da formação da pápula, ou seja, no período de pródomo (Alvarez et al., 2020). Outros medicamentos foram desenvolvidos para melhorar a absorção e a biodisponibilidade do aciclovir, tais como o valaciclovir, penciclovir, famciclovir e foscarnet. Alguns associados a efeitos adversos consideráveis como nefrotoxicidade, neutropenia, mielossupressão, confusão mental, ansiedade, febre, diarreia, náuseas (Crimi et al., 2019; Alvarez, et al., 2020).

Além dos medicamentos antivirais já comumente utilizados, a terapia com laser de baixa intensidade tem conquistado espaço na prática clínica devido às suas

propriedades reparadoras de tecido, analgésicas e anti-inflamatórias. A literatura científica mostra que o tratamento dessa infecção por meio do laser de baixa potência têm se mostrado promissor, uma vez que a aceleração do reparo de feridas e o abreviamento do ciclo da doença é comprovado (Correia Molina Cabra et al, 2022; Rocha et al., 2024).

A pesquisa por agentes antivirais seletivos tem sido intensa nos últimos anos, contudo, a necessidade de novas terapias antivirais persiste. Isso se deve a desafios enfrentados no tratamento de infecções herpéticas, como o surgimento de cepas virais resistentes, alta toxicidade sistêmica e baixa eficácia em pacientes imunocomprometidos (Hanna et al., 2022). Normalmente, o curso clínico da doença pode ser facilmente controlado com os protocolos terapêuticos disponíveis. No entanto, a situação torna-se mais grave quando o paciente é imunocomprometido como recém-nascidos, pacientes HIV positivos, indivíduos submetidos a tratamento imunossupressor, transplantados e diabéticos, podendo resultar em infecções sistêmicas e risco de vida (Rollenhagen et al., 2014; Okonko, Cookey, 2015).

2 O USO DE FITOTERÁPICOS COMO AGENTES ANTIVIRAIS

Fitoterápicos são produtos formulados exclusivamente com matérias-primas ativas de origem vegetal, cuja segurança e eficácia são respaldadas por evidências clínicas ou por dados de uso seguro e eficaz documentados em literatura técnico-científica há, no mínimo, 30 anos (Brasil, 2014).

A utilização de produtos naturais para finalidades medicinais de tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade. O conhecimento empírico associado ao conhecimento científico permitiu grandes avanços no tratamento de doenças, através do uso de fármacos extraídos de plantas (Owen et al., 2017). O mercado global de produtos de origem natural tem crescido e estima-se que o planeta abrigue mais de 300.000 espécies de plantas, consideradas recursos importantes para as indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética e de perfumaria (Swamy et al., 2016). Nos países em desenvolvimento, 65 a 80% da população faz uso de plantas medicinais para fins terapêuticos (Bilia et al., 2017). Nesse contexto, os produtos naturais

têm sido uma fonte de interesse para a pesquisa de novos fármacos antivirais, podendo atuar em várias fases da replicação viral, desde a adsorção à célula hospedeira até a liberação de novas partículas virais (Li et al. 2018; Akran et al., 2018).

Já há alguns anos, cientistas têm dedicado extensiva atenção ao estudo dos metabólitos das plantas, observando atividades farmacológicas e aplicações clínicas de extratos, frações purificadas e compostos isolados de plantas medicinais. O metabolismo primário das plantas é responsável pela produção de componentes vitais, como celulose, ligninas, proteínas, lipídios e açúcares. Adicionalmente, o metabolismo secundário desempenha um papel crucial na biossíntese de moléculas estruturalmente diversas, como alcaloides, terpenóides e derivados de fenilpropanóides, que protegem as plantas contra microorganismos patogênicos, insetos e animais herbívoros, emergindo como fontes promissoras na busca por novos fármacos com propriedades biológicas (Hussein, El-Anssary, 2018; Medjeldi et al., 2018).

Na literatura, estudos com extratos de plantas têm demonstrado várias atividades antivirais, atribuídas a grupos distintos de metabólitos secundários. Esses metabólitos, como alcaloides, conhecidos por suas propriedades antivirais, como a inibição da replicação viral; taninos e flavonoides que têm efeito inibitório sobre diversas enzimas virais e são capazes de interferir na entrada e replicação dos vírus; terpenos e saponinas que atuam como moduladores do sistema imunológico e antivirais diretos; cumarinas e quinonas: possuem atividades que incluem a inibição de polimerases virais e outros processos essenciais para a replicação viral (Seyedi et al., 2016; Michelini et al., 2018; Orłowski et al., 2018; Szymanska et al., 2018; Hussein, El-Anssary, 2018; Elkousy et al., 2021; Ben-Amor et al., 2021; Cometa et al., 2022; Pavi et al., 2023; Pezzotti et al., 2023; Tarbeeva et al., 2023; Pennisi et al., 2023).

3 O ÓLEO DE ANDIROBA E SUAS PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS

O Bioma Amazônico é reconhecido por ser a maior floresta do mundo, abrigar a maior bacia hidrográfica e possuir nove tipos de vegetação. Partindo disso, a riqueza de espécies endêmicas comporta um elevado potencial biotecnológico para o desenvolvimento de fármacos. A *Carapa guianensis* (Aublet) é uma grande árvore

neotropical pertencente à família *Meliaceae* que pode ser encontrada no norte da América do Sul, América Central, Caribe, e na África Subsariana. No Brasil, é conhecida como andiroba, ocorrendo principalmente em terras baixas e áreas inundadas em toda a região amazônica. Praticamente todas as partes dessa árvore são utilizadas, incluindo o óleo da semente, que é utilizado para tratar inflamação e infecções (Nascimento et al., 2019; Santos et al., 2021, Machado, Mendes, 2021; Soares et al., 2021; Amorim, et al., 2022).

Estudos tem demonstrado diversas atividades produzidas pela *Carapa guianensis* usado na medicina popular, como o tratamento antitérmico, antialérgico, analgésico e anti-inflamatórios, bem como ação acaricida e repelente de insetos (Henriques; Penido, 2014; Nardi et al., 2016; Nonato et al., 2018; Araújo-Lima et al., 2018; Meneguetti et al., 2019). Os efeitos terapêuticos da *C. guianensis* são decorrentes das propriedades fitoquímicas presentes em toda a planta. O principal produto retirado da planta é o óleo, que possui princípios ativos como glicerídeos, ácidos graxos e tetranortriterpenoides (TNTPS) (Meccia et al., 2013; Moya et al., 2015; Henriques, Penido, 2014; Wanzeler et al., 2018; Oliveira et al., 2018; Nascimento et al., 2019; Amorim et al., 2020; Sousa et al., 2022). Recentemente, foram descritos limonóides do tipo phragmalina andirolídeos, gedunina e Carapanosina C foram isolados de *C. guianensis* (Sakamoto et al., 2015; Higuchi et al., 2017; Inoue et al., 2018; Kikuchi et al., 2020).

A OMS reconhece o reino vegetal como importante instrumento para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, encorajando a pesquisa exploratória de plantas medicinais no Brasil e políticas públicas que definem as normas de registro, estimulam o consumo e incentivam o desenvolvimento de tecnologias e inovações na área vêm sendo elaboradas pelo Ministério da Saúde. A “Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS” orienta pesquisas que contribuem com a relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com propriedades promissoras para a obtenção de fármacos menos tóxicos e mais efetivos no controle de doenças (Brasil, 2014) e a andiroba está incluída nesta lista de plantas (Allahverdiyev et al., 2013; Akthar et al, 2014).

O estágio atual do conhecimento sobre a química e a farmacologia das espécies da família *Meliaceae*, com destaque para a andiroba, sugere um considerável potencial para o desenvolvimento de medicamentos e fitoterápicos. Apesar do status oficial de

Carapa guianensis Aublet. no Brasil, os estudos relacionados a essa espécie são notavelmente limitados, tanto em termos químicos quanto farmacológicos. Nesse contexto, torna-se imperativo realizar novas pesquisas científicas para identificar fontes promissoras de compostos bioativos e funcionais, destinados ao uso medicinal, visando a promoção da saúde humana.

4 METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIVIRAL DE MEDICAMENTOS FRENTE O HSV-1

Um grande avanço na pesquisa de novos fármacos foi a implementação de sistemas biológicos *in vitro* em larga escala. Esses sistemas permitem testar rapidamente a atividade de diversos compostos, facilitando a repetição dos experimentos e a análise estatística dos resultados. De modo geral, os métodos frequentemente empregados para avaliar a atividade antiviral *in vitro* se baseiam na variação da habilidade dos vírus em se replicar em células cultivadas (Lemos et al., 2023; Bar Ilan et al., 2023). Alguns vírus podem desencadear efeitos citopáticos ou formar placas de lise, enquanto outros realizam funções especializadas ou provocam transformações nas células. A replicação viral em culturas de células pode ser acompanhada pela detecção de elementos virais específicos, como DNA ou RNA viral, ou polipeptídeos, especialmente quando os vírus não induzem efeito citopático nas células (El-Sheekh et al., 2020; Zangoie et al., 2024).

Diversos métodos são descritos para avaliar a atividade antiviral. O ensaio de redução de placas é um dos mais comuns, onde células infectadas são tratadas com um antiviral, e a formação de placas virais (áreas de lise celular) é quantificada. Esse método permite determinar a eficácia do composto em reduzir a replicação viral. Outro método é o ensaio de imunofluorescência, que utiliza anticorpos específicos contra proteínas virais para detectar e quantificar a presença de vírus nas células tratadas. A diminuição na expressão de proteínas virais indica a eficácia do antiviral em inibir a replicação viral (Lopez-Alvarez, et al. 2016).

A TCID₅₀ (tissue culture infectious dose 50%) é um método quantitativo no qual são realizadas diluições seriadas do vírus a ser titulado (10^{-1} a 10^{-12}), que são, em seguida,

inoculadas em tubos ou placas de microtitulação contendo quantidades equivalentes de células. O objetivo desse procedimento é determinar a dose viral capaz de infectar 50% da cultura celular inoculada (Reed; Muench, 1938).

Durante a replicação, alguns vírus podem alterar morfológicamente ou destruir a célula hospedeira, infectando novas células. Essas alterações visíveis são denominadas efeito citopático ou citopatogênico viral (CPE), e podem ser observadas ao microscópio. Essas mudanças podem incluir a alteração no formato e no tamanho celular, o descolamento das células da monocamada, ou até mesmo a destruição total das células infectadas. Essas manifestações são frequentemente utilizadas como indicadores para monitorar a replicação viral *in vitro* e a eficácia de tratamentos antivirais (Payne, 2017; Roy et al., 2022; Wang et al., 2023; Andronova et al., 2024). O CPE dos vírus herpéticos, como o HSV-1, geralmente aparece entre 24 e 72 horas após a infecção, tendo como principais características: 1) Arredondamento celular: As células, que normalmente possuem uma forma alongada ou fusiforme, começam a se arredondar logo após a infecção; 2) Desprendimento Celular: As células infectadas perdem a adesão ao substrato e se destacam da superfície em que estão crescendo; 3) Fusão celular e formação de sincícios: O HSV-1 pode induzir a fusão de células adjacentes, formando sincícios ou células gigantes multinucleadas; 4) Inclusões intracelulares: Corpos de inclusão no núcleo, indicando replicação viral; 5) Alterações nucleares: O núcleo da célula pode mostrar condensação da cromatina, além de alterações no tamanho e forma do núcleo; 6) Lise celular: Destruição completa da célula, liberando novas partículas virais. 7) Perda de confluência celular: À medida que as células morrem ou se desprendem, a camada contínua de células (tapete celular) começa a se fragmentar, deixando áreas vazias (Mccarthy et al., 2009; Roy et al., 2022). Para os vírus que causam efeitos citopáticos perceptíveis microscopicamente, o escore de inibição do CPE é frequentemente utilizado por ser um método rápido, permitindo avaliar vários compostos simultaneamente. No entanto, esse tipo de análise apresenta certa subjetividade (Watanabe et al., 2021; Higgins et al. 2022).

Além dos ensaios antivirais *in vitro*, os ensaios prévios de citotoxicidade, genotoxicidade e viabilidade celular (como o MTT) são fundamentais pois avaliam a viabilidade das células tratadas com determinado composto, garantindo que a redução da

replicação viral não seja resultado da toxicidade do mesmo sobre as células hospedeiras (Lopez-Alvarez, et al. 2016).

Métodos mais recentes para a avaliação da atividade antiviral incluem a detecção de antígenos virais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), que separa proteínas virais com base em seu peso molecular. A análise quantitativa do DNA ou RNA viral por reação em cadeia da polimerase (PCR), também é amplamente utilizada para medir a replicação viral com maior precisão. Esses métodos são normalmente reservados para a caracterização detalhada de compostos antivirais previamente identificados em ensaios mais rápidos, como os de inibição do CPE ou colorimétricos, sendo especialmente úteis em casos onde o vírus não causa alterações citopáticas perceptíveis (Diefenbach; Fraefel, 2020)

A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é uma técnica amplamente usada em laboratórios de pesquisa para o diagnóstico molecular, devido à sua capacidade de amplificar sequências específicas de DNA de maneira eficiente. O processo envolve a replicação enzimática do DNA utilizando uma enzima termoestável, como a Taq DNA polimerase, permitindo a amplificação *in vitro* de segmentos-alvo de DNA (Diefenbach, Fraefel, 2020; Ishikawa et al., 2023). A versão mais avançada, a PCR em tempo real (qPCR), permite o monitoramento da amplificação do DNA em tempo real, oferecendo resultados qualitativos (detecção da presença ou ausência de uma sequência específica) ou quantitativos (quantificação de cópias de um fragmento de DNA). A qPCR emprega sistemas de fluorescência, como SYBR® Green ou sondas específicas, como o sistema TaqMan®, que são detectados à medida que a amplificação progride. Além disso, o termociclador da qPCR possui um sistema de detecção de fluorescência e software que permitem a visualização simultânea da amplificação. Essa técnica é amplamente usada para quantificar a carga viral em pesquisas que envolvem virologia, como na avaliação de tratamentos antivirais, medindo a inibição da replicação do DNA viral após o tratamento (Lemos, 2023; Perse da Silva et al., 2015; Tavakoli et al., 2017; Diefenbach; Fraefel, 2020).

OBJETIVOS

1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a potencial atividade antiviral do óleo de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) frente ao HSV-1.

2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Verificar a ação antiviral do óleo de andiroba, em um modelo *in vitro* de infecção pelo HSV-1;
- Quantificar a inibição da replicação viral em células infectadas pelo HSV-1 e tratadas com óleo de andiroba;
- Comparar o efeito pré-tratamento e tratamento concomitante com óleo de andiroba em um modelo *in vitro* de infecção pelo HSV-1;
- Avaliar a ação anti-viral do óleo de andiroba comparando-o a um medicamento padrão (aciclovir) contra a infecção com HSV-1.

REFERÊNCIAS

AKHTAR, N.; KHAN, A.; ZAFAR, S.; KHAWAJA, A. Pharmacological activities of *Carapa guianensis* (Andiroba): A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, n. 1, p. 33-45, 2014.

AKRAM, M.; TAHIR, I. M.; SHAH, S. M. A. Antiviral potential of medicinal plants against HIV, HSV, influenza, hepatitis, and coxsackievirus: a systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 5, p. 811-822, 2018.

ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. Development of new antiherpetic drugs based on plant compounds. In: RAI, M. K.; KON, K. V. **Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components**. 1. ed. Estados Unidos: Elsevier Inc., 2013. cap. 17, p. 245-259.

AMORIM, M. F. et al. Ethnopharmacological study of medicinal plants used by the population of the state of Pará, Brazil. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 3033-3052, 2022. DOI: 10.34117/bjdv8n1-200. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv8n1-200>.

AMORIM, S. L. de et al. Phytochemical prospecting of *Carapa guianensis* (Meliaceae) and *Uncaria guianensis* (Rubiaceae) aiming at the antihelminthic activity on gastrointestinal nematodes of small ruminants. **Scientia Naturalis, Rio Branco**, v. 2, n. 1, p. 133-142, 2020.

ANDRONOVA, V. L. et al. Combined effect of basic antiherpetic drugs with a new inhibitor of the terminase complex of herpes simplex virus type 1 in Vero cell cultures. **Doklady Biological Sciences**, v. 517, n. 1, p. 55-58, ago. 2024. DOI: 10.1134/S0012496624701035.

ARAÚJO-LIMA, C. F. et al. Antioxidant activity and genotoxic assessment of crabwood (*Andiroba*, *Carapa guianensis* Aublet) seed oils. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2018. DOI: 10.1155/2018/3246719.

AYOUB, H. H.; CHEMAITELLY, H.; ABU-RADDAD, L. J. Caracterizando a epidemiologia de transição do vírus herpes simplex tipo 1 nos EUA: previsões baseadas em modelos. **BMC Medicine**, v. 17, p. 57, 2019. DOI: 10.1186/s12916-019-1285-x.

BAR ILAN, M. et al. Virucidal effect of mouthwash on acyclovir-resistant herpes simplex virus. **Oral Diseases**, 27 dez. 2023. DOI: 10.1111/odi.14843.

BEN-AMOR, I. et al. Phytochemical characterization of *Olea europea* leaf extracts and assessment of their anti-microbial and anti-HSV-1 activity. **Viruses Basel**, v. 13, n. 6, p. 1085, 7 jun. 2021. DOI: 10.3390/v13061085. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34200316/>.

BENDETTI, J.; COREY, L.; ASHLEY, R. Herpes simplex virus: Pathophysiology, clinical presentation, and treatment strategies. **Clinical Infectious Diseases**, v. 74, n. Supl. 2, p. S134-S142, 2023.

BHATTA, A. K.; KEYAL, U.; LIU, Y.; GELLEN, E. Transmissão vertical do vírus herpes simplex: uma atualização. JDDG: **Journal German Dermatology Society**, v. 16, p. 685-692, 2018. DOI: 10.1111/ddg.13529.

BILIA, A. et al. Plants extracts loaded in nanocarriers: An emergent formulating approach. **Natural Product Communications**, v. 13, p. 1097-1234, 2018.

BRASIL. **Resolução RDC nº 26**, de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf.

COMETA, S. et al. Natural formulations based on *Olea europaea* L. fruit extract for the topical treatment of HSV-1 infections. **Molecules**, v. 27, n. 13, p. 4273, 2022. DOI: 10.3390/molecules27134273. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35807518>.

CORREIA MOLINA CABRAL, L. F. ., DOS SANTOS PEIXOTO, M. E. ., CARDOSO MACHADO, F. ., OLIVEIRA DE ARRUDA, M. C. ., & GURGEL FERNANDES, M. H. (2022). TRATAMENTO DE HERPES SIMPLEX POR MEIO DE LASER TERAPIA DE BAIXA INTENSIDADE – REVISÃO DE LITERATURA. **Caderno De Graduação - Ciências Biológicas E Da Saúde - UNIT - PERNAMBUCO**, v., n.1, 49. Disponível em: <https://periodicos.set.edu.br/unitsaude/article/view/9558>

CRIMI, S. et al. Herpes Virus, Oral Clinical Signs and QoL: Systematic Review of Recent Data. **Viruses**, v. 11, n. 5, p. 463, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/artigos/PMC6563194/>.

DAI, X.; ZHOU, Z. H. Structure of the herpes simplex virus 1 capsid with associated tegument protein complexes. **Science**, v. 360, n. 6384, eaa07298, 06 abr. 2018. DOI: 10.1126/science.aao7298. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29622628/>.

DIEFENBACH, R. J.; FRAEFEL, C. **Herpes Simplex Virus: Methods and Protocols**. 2. ed. New York: Springer, 2020.

ELKOUSY, R. H. et al. Antiviral activity of castor oil plant (*Ricinus communis*) leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 271, p. 113878, 2021. DOI: 10.1016/j.jep.2021.113878. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33515683>.

EL-SHEEKH, M. M. et al. Antiviral activity of algae biosynthesized silver and gold nanoparticles against Herpes Simplex Virus (HSV-1) *in vitro* using cell-line culture technique. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 32, n. 3, p. 616-627, 2022. DOI: 10.1080/09603123.2020.1789946.

GELLER, M. et al. Herpes simplex: atualização clínica, epidemiologia e terapêutica. **DST**, v. 24, n. 4, p. 260-266, 2012.

DE SOUSA, R. L. et al. Perfil químico do óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) extraído manualmente na comunidade Mamangal, localizada em Igarapé-Miri, Pará, Brasil. **Scientia Plena**, v. 17, n. 12, 2022. DOI: 10.14808/sci.plena.2021.127201. Disponível em: <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2021.127201>.

HANNA, H. S.; SCHALKWIJK, R.; SNOECK, R.; ANDREI, G. Acyclovir resistance in herpes simplex viruses: Prevalence and therapeutic alternatives. **Biochemical Pharmacology**, v. 206, 2022. DOI: 10.1016/j.bcp.2022.115322.

HENRIQUES, M. D.; PENIDO, C. The therapeutic properties of *Carapa guianensis*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 6, p. 850-856, 2014.

HIGGINS, C. A. et al. Screening for antiviral compounds against herpes simplex virus using a microscopy-based CPE assay. **Journal of Virology Methods**, v. 299, p. 114319, 2022.

HIGUCHI, K. et al. Carapanosins A-C from seeds of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae) and their effects on LPS-activated NO production. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 502, 2017. DOI: 10.3390/molecules22030502.

HUSSEIN, A.; EL-ANSSARY, A. A. Plantas metabólitos secundários: os principais motores das ações farmacológicas de plantas medicinais. In: *Medicina Herbal*. **IntechOpen**, 2019. DOI: 10.5772/intechopen.76139.

INQUE, T. et al. Carapanosins D-F from the seeds of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae) and their effects on LPS-activated NO production. **Molecules**, v. 23, n. 7, p. 1778, 2018. DOI: 10.3390/molecules23071778.

IVES, A. M.; BERTKE, A. S. Stress hormones epinephrine and corticosterone selectively modulate herpes simplex virus 1 (HSV-1) and HSV-2 productive infections in adult sympathetic, but not sensory, neurons. **Journal of Virology**, v. 91, n. 13, p. e00582-17, 2017. DOI: 10.1128/JVI.00582-17. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28404850/>.

ISHIKAWA, H. et al. Herpes simplex virus: diagnostic advances and clinical implications. **Journal of Clinical Virology**, v. 150, p. 105093, 2023.

KIKUCHI, T. et al. Carapanins A-C: new limonoids from andiroba (*Carapa guianensis*) fruit oil. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 18, n. 45, p. 9268-9274, 2020. DOI: 10.1039/d0ob01872d. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33155007/>.

KOJAH, L.; SURYAWANSHI, R. K.; SHUKLA, D. Processos patológicos ativados pela infecção pelo vírus herpes simplex-1 (HSV-1) na córnea. **Célula. Mol. Life Sci.**, v. 76, p. 405-419, 2019.

LI, J. et al. Efficacy of sodium polyanethol sulfonate on herpes simplex virus-1 infection *in vitro*. **Molecular Vision**, v. 28, p. 516-525, 2022. PMID: 37089702; PMCID: PMC10115364.

LEMOS, E. R. S. et al. (Eds.). **Topics in Virology [online]**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2023. 306 p. BIO collection. ISBN: 978-65-5708-151-8. Disponível em: <https://doi.org/10.7476/9786557082119>.

LOPEZ-ALVAREZ, Y., et al. Methods for determining the antiviral activity of compounds *in vitro*. **Journal of Virological Methods**, v. 238, p. 196-204, 2016.

MACHADO, I. R.; MENDES, K. R. Ethnobotanical, medical, therapeutical and pharmacological study of *Carapa guianensis* Aublet—A review. **BioBrasil**, v. 11, n. 1, p. 1-24, 2021. doi: 10.37002/biobrasil.v11i1.1695.

MARCOCCI, M. E. et al. Herpes simplex virus-1 in the brain: the dark side of a sneaky infection. *Trends in Microbiology*, v. 28, n. 10, p. 808-820, 2020. DOI: 10.1016/j.tim.2020.03.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32386801/>.

- MCCARTHY, K. M.; TANK, D. W.; RUBINSZTEIN, D. C. Herpes Simplex Virus Type 1 Induces Cell Death via Apoptosis and Necrosis. **Journal of General Virology**, v. 90, n. 5, p. 1253-1262, 2009.
- MECCIA, G.; QUINTERO-RINCÓN, P.; ROJAS, L.; ALFREDO, U.; VELASCO, J.; et al. Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Carapa guianensis* collected from Venezuelan Guayana and the antimicrobial activity of the oil and crude extracts. **Natural Product Communications**, v. 8, p. 1641-1642, 2013. DOI: 10.1177/1934578X1300801135.
- MENEGUETTI, N. F. S. P.; MENEGUETTI, D. U. O.; SIVIERO, A. Biotechnological potential of the *Carapa guianensis*, *Bertholletia excelsa* and *Copaifera* spp. oils. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 13, n. 17, p. 413-422, 2019.
- MEDJELDI, S.; BOUSLAMA, L.; BENABDALLAH, A.; ESSID, R.; HAOU, S.; ELKAHOUI, S. Biological activities and phytochemicals of northwest Algeria *Ajuga reptans* (L.) extracts: Partial identification of the antibacterial fraction. **Microbial Pathogenesis**, v. 121, p. 173-178, 2018. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.05.022.
- MICHELINI, F.; ALCHE, L.; BUENO, C. Virucidal, antiviral and immunomodulatory activities of β -escin and *Aesculus hippocastanum* extract. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, 2018. DOI: 10.1111/jphp.13002.
- MOYA, R.; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, A.; VEGA-BAUDRIT, J.; ÁLVAREZ, A. Effects of adding nano-clay (montmorillonite) on performance of polyvinyl acetate (PVAc) and urea-formaldehyde (UF) adhesives in *Carapa guianensis*, a tropical species. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 59, p. 62-70, 2015. DOI: 10.1016/j.ijadhadh.2015.02.004.
- NARDI, M.; LIRA-GUEDES, A. C.; CUNHA, H. F.; GUEDES, M. C.; MUSTIN, K.; GOMES, S. C. P. Artisanal extraction and traditional knowledge associated with medicinal use of crabwood oil (*Carapa guianensis* Aublet.) in a peri-urban várzea environment in Amazon Estuary. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, p. 1-12, 2016.
- NASCIMENTO, G. O.; SOUZA, D. P.; SANTOS, A. S.; BATISTA, J. F.; RATHINASABAPATHI, B.; GAGLIARDI, P. R.; et al. Lipidomic profiles from seed oil of *Carapa guianensis* Aubl. and *Carapa vasquezii* Kenfack and implications for the control of phytopathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 67-73, 2019. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.11.069.
- NONATO, O. C. S.; et al. Identificando os usos terapêuticos da *Carapa guianensis*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 15, n. 28, 2018. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2018B/BIO/identificando.pdf>.
- OLIVEIRA, I. S. S.; TELLIS, C. J. M.; CHAGAS, M. S. S.; BEHRENS, M. D.; CALABRESE, K. S.; ABREU-SILVA, A. L.; et al. *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) seed oil: Chemical composition and antileishmanial activity of limonoid-rich fractions. **Biomed Research International**, 2018. DOI: 10.1155/2018/5032816.
- ORŁOWSKI, P.; KOWALCZYK, A.; TOMASZEWSKA, E.; RANOSZEK-SOLIWODA, K.; WĘGRZYN, A.; GRZESIAK, J.; et al. Antiviral activity of tannic acid

modified silver nanoparticles: Potential to activate immune response in herpes genitalis. **Viruses**, v. 10, n. 10, p. 524, 2018. DOI: 10.3390/v10100524.

OWEN, L.; GROOTVELD, M.; ARROO, R.; RUIZ-RODADO, V.; PRICE, P.; LAIRD, K. A multifactorial comparison of ternary combinations of essential oils in topical preparations to current antibiotic prescription therapies for the control of acne vulgaris-associated bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 31, p. 410-417, 2017. DOI: 10.1002/ptr.5762.

PAVI, Catielen Paula et al. Amazonian medicinal plants efficiently inactivate Herpes and Chikungunya viruses. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 167, p. 115476, 2023. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115476. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115476>.

PAYNE, S. *Viruses: From Understanding to Investigation*. Academic Press, 2017.

PENNISI, R.; TRISCHITTA, P.; TAMBURELLO, M. P.; BARRECA, D.; MANDALARI, G.; SCIORTINO, M. T. Mechanistic understanding of the antiviral properties of pistachios and zeaxanthin against HSV-1. **Viruses, Basel**, v. 15, n. 8, p. 1651, 29 jul. 2023. DOI: 10.3390/v15081651. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37631995/>.

PERSE DA SILVA, A.; OLIVEIRA, M. L.; FERREIRA, T. A. Herpes simplex virus: Clinical manifestations and treatment approaches. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p. 385-392, 2015.

PEZZOTTI, G. et al. Instantaneous inactivation of herpes simplex virus by silicon nitride bioceramics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 16, p. 12657, 2023. DOI: 10.3390/ijms241612657. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms241612657>.

POLPITIYA ARACHCHIGE, S.; HENKE, W.; KALAMVOKI, M. Análise de gB, gD e gH/gL do herpes simplex tipo 1 na produção de HIV-1 infeccioso: HSV-1 gD restringe o HIV-1 pela exclusão do HIV-1 Env das partículas virais em maturação. **Retrovirology**, v. 16, p. 9, 2019.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

ROCHA, N.D.B.; FILGUEIRAS, G.V.; URBANO, K.L.; CORTES, B.F.; ANTUNES, L.C.; MANUEL, C.C.; FALABELLA, M.E.V. O laser de baixa potência para o tratamento de herpes labial: relato de caso clínico. **Revista Brasileira de Revisão de Saúde**, [S. l.], v. 2, pág. e68110, 2024. DOI: 10.34119/bjhrv7n2-135. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/68110>.

ROY, S.; SUKLA, S.; DE, A.; et al. Vírus herpes simplex não citopático tipo 1 isolado de pacientes tratados com aciclovir com infecções recorrentes. **Scientific Reports**, v. 12, p. 1345, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-05188-w.

SAKAMOTO, A.; TANAKA, Y.; YAMADA, T.; KIKUCHI, T.; MURAOKA, O.; NINOMIYA, K.; et al. Andiroliodes W-Y from the flower oil of andiroba (Carapa

guianensis, Meliaceae). **Fitoterapia**, v. 100, p. 81-87, 2015. DOI: 10.1016/j.fitote.2014.09.003.

SANTOS, K. I. P.; BENJAMIM, J. K. F.; COSTA, K. A. D.; REIS, A. S.; PINHEIRO, W. B. S.; SANTOS, A. S.; et al. Metabolomics techniques applied in the investigation of phenolic acids from the agro-industrial by-product of *Carapa guianensis* Aubl. **Arabian Journal of Chemistry**, 2021. DOI: 10.1016/j.arabjc.2021.103421.

SEYEDI, S.; SHUKRI, M.; HASSANDARVISH, P.; et al. Computational approach towards exploring potential anti-Chikungunya activity of selected flavonoids. **Scientific Reports**, v. 6, p. 24027, 2016. DOI: 10.1038/srep24027.

SZYMAŃSKA, E.; ORŁOWSKI, P.; WINNICKA, K.; TOMASZEWSKA, E.; BAŚKA, P.; CELICHOWSKI, G.; et al. Multifunctional tannic acid/silver nanoparticle-based mucoadhesive hydrogel for improved local treatment of HSV infection: *In vitro* and *in vivo* studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 387, 2018.

SOARES, A. S.; WANZELER, A. M. V.; CAVALCANTE, G. H. S.; BARROS, E. M. S.; CARNEIRO, R. C. M.; TUJI, F. M. Therapeutic effects of andiroba (*Carapa guianensis* Aubl) oil, compared to low power laser, on oral mucositis in children underwent chemotherapy: a clinical study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, art. 113365, 2021. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113365.

DE SOUSA, R. L., SILVA, S. G., COSTA, J. M., DA COSTA, W. A., MAIA, A. A. B., DE OLIVEIRA, M. S., ANDRADE, E. H. DE A. Perfil químico do óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) extraído manualmente na comunidade Mamangal, localizada em Igarapé-Miri, Pará, Brasil. **Scientia Plena**, v. 17, n. 12, 2022. DOI: 10.14808/sci.plena.2021.127201. Disponível em: <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2021.127201>.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIAH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2016, p. 3012462, 2016. DOI: 10.1155/2016/3012462. Epub 2016 Dec 20. PMID: 28090211; PMCID: PMC5206475.

TARBEEVA, D. V. et al. Neuroprotective and antiherpetic properties of polyphenolic compounds from *Maackia amurensis* heartwood. **Molecules**, v. 28, n. 6, p. 2593, 2023. DOI: 10.3390/molecules28062593

TAVAKOLI, N. P.; MOHAMMADI, M.; EBRAHIMI, S. Herpes simplex virus: molecular biology and pathogenesis. **Journal of Virology Research**, v. 9, p. 45-58, 2017.

WANG, X. et al. Dysregulated metabolism of the late herpes simplex virus 1 transcriptome through the vhs-VP22 axis uncouples virus cytopathic effect and virus production. **PLOS Pathogens**, v. 19, n. 4, p. e1011184, 2023. DOI: 10.1371/journal.ppat.1011184.

WANZELER, A. M. V.; JÚNIOR, S. M. A.; GOMES, J. T.; GOUVEIA, E. H. H.; HENRIQUES, H. Y. B.; CHAVES, R. H.; SOARES, B. M.; SALGADO, H. L. C.; SANTOS, A. S.; TUJI, F. M. Therapeutic effect of andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl.) against oral mucositis: an experimental study in golden Syrian hamsters. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, p. 2069-2079, 2018. DOI: 10.1007/s00784-017-2300-2.

WATANABE, H. et al. A high-throughput screening platform for the identification of antiviral compounds using a cell-based cytopathic effect assay. **Antiviral Research**, v. 190, p. 105068, 2021.

Yan C., Luo Z., Li W., Li X., Dallmann R., Kurihara H., et al. (2020). Equilíbrio Yin-Yang perturbado: o estresse aumenta a suscetibilidade a infecções primárias e recorrentes do vírus herpes simplex tipo 1. **Acta Pharm. Sin. B** 10 383–398. 10.1016/j.apsb.2019.06.005

ZANGOIE, S.; GHANBARI, R.; JALILIAN, F. A.; MAHMOUDVAND, S.; TEIMOORI, A. Antiviral potential of phenolic compounds against HSV-1: in-vitro study. **Antiviral Therapy**, v. 29, n. 5, p. 13596535241271589, 2024. DOI: 10.1177/13596535241271589. PMID: 39311585.

REVISTA: JOURNAL OF BIOLOGICAL RESEARCH AND BIOTECHNOLOGY (BIO-RESEARCH), QUALIS A2, FI 4.3

CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIVIRAL DO ÓLEO DE ANDIROBA (*CARAPA GUIANENSIS AUBL.*) EM UM MODELO *IN VITRO* DE INFECÇÃO PELO HSV-1.

RESUMO

As infecções causadas pelo Vírus Herpes Simples tipo 1 (HSV-1) representam um sério problema de saúde pública global, afetando uma parcela significativa da população e a emergência de cepas resistentes destaca a necessidade urgente de alternativas eficazes de tratamento. Nesse contexto, produtos de origem natural emergem como opções terapêuticas promissoras. Dentro da rica biodiversidade brasileira, a *Carapa guianensis Aubl.* (andiroba), da família Meliaceae, destaca-se como uma planta medicinal de grande importância na Amazônia. O óleo extraído de suas sementes possui várias propriedades medicinais reconhecidas. Este estudo propõe uma avaliação *in vitro* da atividade antiviral do óleo de andiroba (AO) em células Vero E6 infectadas com HSV-1. O óleo foi analisado através de cromatografia gasosa (GC-MS) e foi realizada avaliação antiviral em diferentes concentrações do óleo de andiroba por meio do ensaio de titulação viral através da redução do efeito citopático viral. A análise dos dados foi realizada no *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 24.0. Os resultados foram calculados pelos valores originais e expressos pela média. Foram analisados estatisticamente pelo teste t-Student com correção de Welch e pelo teste ANOVA. A redução do efeito citopático viral após o uso do óleo AO sugere uma possível ação antiviral, demonstrando uma resposta antiviral maior nas diluições virais mais altas do HSV-1 quando tratadas com a dose maior de andiroba (100 ng/mL). A análise da curva dose-resposta demonstra clareza entre o aumento da concentração do AO e a diminuição da replicação viral do HSV-1. Esses achados iniciais fornecem suporte para a continuidade das investigações sobre o uso do óleo de andiroba como uma alternativa terapêutica frente o HSV-1.

PALAVRAS-CHAVE: *Carapa guianensis*; Herpes simples; fitoterapia, antivirais, plantas medicinais

INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas virais são um importante problema de saúde no mundo. Dentre os inúmeros vírus de importância clínica, destaca-se o Herpes simplex vírus, que é um vírus de DNA de cadeia dupla, responsável por um amplo espectro de infecções na população mundial. O Herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1) é um dos genótipos mais expressivos e principal agente etiológico das lesões na região orofacial (Tognarelli et al., 2019; Madavarajau et al., 2020; Mondal et al., 2021). Trata-se de um vírus citolítico, com ciclo reprodutivo relativamente curto e capacidade de estabelecer infecções latentes. A apresentação dos sintomas da doença se dá de forma cíclica e a transmissão ocorre de pessoa a pessoa, geralmente, pelo contato íntimo e compartilhamento de fluidos contendo o vírus (Zupin et al., 2018 Diefenbach, Fraefel, 2020).

Em se tratando de epidemiologia, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2016, fez estimativas globais e regionais de prevalência e incidência de infecção oral por HSV-1 e verificou que em indivíduos entre 0-49 anos de idade, esta infecção atinge aproximadamente 67% da população mundial. Foram observados padrões diferentes por idade, sexo e região geográfica (Looker et al., 2015; James et al, 2020).

O tratamento anti-herpético frequentemente empregado é por meio de fármacos análogos de nucleosídeos como o aciclovir, penciclovir, valaciclovir. Esta classe de medicamentos geralmente requer reações bioquímicas guiadas por enzimas do vírus e do hospedeiro. Considerando que a infecção por HSV-1 é geralmente recorrente, o tratamento repetido aumenta o risco de desenvolvimento de cepas resistentes (Gabaglio et al., 2021; Pennisi et al., 2023; Kuo et al., 2023), tornando-se essencial a busca por novos agentes antivirais, que tem sido intensa nos últimos anos, principalmente em virtude dos desafios enfrentados no tratamento de infecções herpéticas, como o surgimento de cepas virais resistentes, alta toxicidade sistêmica e baixa eficácia em pacientes imunocomprometidos (Jiang et al., 2016) , onde as infecções são clinicamente mais graves e progressivas, podendo evoluir para quadros de infecção sistêmica e risco de vida (Steiner e Benninger, 2018; Sem e Eroğul, 2024).

A utilização de produtos naturais para finalidades medicinais de tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade (Owen et al., 2017). Nesse contexto, esses produtos têm sido uma fonte de interesse para

a pesquisa de novos fármacos antivirais, podendo atuar em várias fases da replicação viral, desde a adsorção à célula hospedeira até a liberação de novas partículas virais (Newman e Cragg, 2016; Akran et al., 2018; Moya et al., 2020; Li et al., 2022).

O Bioma Amazônico é reconhecido por ser a maior floresta do mundo, abrigar a maior bacia hidrográfica e possuir nove tipos de vegetação. Partindo disso, a riqueza de espécies endêmicas comporta um elevado potencial biotecnológico para o desenvolvimento de fármacos. A *Carapa guianensis* (Aublet) é uma grande árvore neotropical pertencente à família *Meliaceae* que pode ser encontrada no norte da América do Sul, América Central, Caribe, e na África Subsariana. No Brasil, é conhecida como andiroba, ocorrendo principalmente em terras baixas e áreas inundadas em toda a região amazônica. Estudos tem demonstrado diversas atividades produzidas pelo óleo da semente de *Carapa guianensis* usados na medicina popular, como o tratamento antitérmico, antialérgico, analgésico e anti-inflamatórios, bem como ação acaricida e repelente de insetos (Jesus et al., 2017; Araújo-lima et al., 2018; Soares et al., 2021; Amorim et al., 2022). Os efeitos terapêuticos da *C. guianensis* são decorrentes das propriedades fitoquímicas presentes em toda a planta. O principal produto retirado da planta é o óleo, que possui princípios ativos como glicerídeos, ácidos graxos e tetranortriterpenoides (TNTPS) (Silva e Almeida; 2014; Meccia et al., 2013; Moya et al., 2020; Oliveira et al., 2018; Inoue et al., 2018, Soares et al.; 2021).

Com base nos fatores mencionados que ressaltam o potencial medicinal do óleo de andiroba, demonstrando requisitos em sua composição para uma possível ação antiviral, e considerando a escassez de estudos que avaliem a eficácia desse fitoterápico no tratamento de lesões causadas por vírus herpéticos, neste artigo avaliou-se *in vitro* a potencial ação antiviral do óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) frente a infecção por HSV-1 em cultura de células.

METODOLOGIA

Aspéctos éticos

Este estudo, baseado nos preceitos da Declaração de Helsinque e do Código de Nuremberg, respeitando as Normas de Pesquisa em Saúde, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, sob parecer número 6.055.046.

Delineamento do estudo

Este estudo se caracterizou como um estudo laboratorial experimental, executado através de parceria entre a Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará, o Laboratório de Papilomavírus e Retrovírus - Seção de Virologia – SAVIR e o Laboratório de Citogenômica e Mutagênese Ambiental, SAMAM ambos do Instituto Evandro Chagas, Belém-PA.

Obtenção do óleo de andiroba

O óleo da andiroba (AO) utilizado na pesquisa foi advindo da uma empresa privada do município de Belém, a qual forneceu certificado de pureza do óleo (ANEXO 1), assim como localização, clima, tipo de solo, dentre outras características importantes a compreensão da qualidade do mesmo. As amostras de andiroba foram obtidas na região nordeste do estado do Pará, Brasil, com as seguintes coordenadas: 1 43' 04,0" S e 48 52' 58,0" W.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) forneceu a composição do óleo de andiroba em moléculas mais densas, as quais não são possíveis de serem observadas através da cromatografia gasosa, possibilitando a compreensão de quais substâncias presentes na andiroba proporcionam sua eficácia ou não frente ao tratamento proposto. Para isso, as análises foram realizadas no Sistema Waters Breeze equipado com bomba Waters 1525 binary HPLC e sistema de detecção UV/VIS Waters 2489. Foi utilizada uma coluna SupelcoNucleosil® C18 (250 x 3,2 mm, 5 µm), com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, detecção UV275nm e eluição isocrática (H₂O-MeOH 53:47). A quantificação do óleo da andiroba foi feita através do software instalado no programa, que forneceu a concentração pura específica do composto.

Análise de cromatografia gasosa (GC-MS)

O óleo foi analisado através da GC-MS, utilizando um cromatógrafo de gás (modelo Varian CP 3380) equipado com um detector de íons e com uma coluna capilar CP-Sil 88 (comprimento 60 m, diâmetro interno 0,25 mm, espessura da película 0,25 µm; Varian Inc., EUA). Essa etapa teve como finalidade converter os ácidos graxos contidos no óleo em ácidos ésteres metílicos. Foi utilizado o software Varian Star 3.4.1 para a quantificação dos ácidos graxos, com confecção de cromatogramas e misturas de ácidos graxos padrão (Nu-check-prep, Inc., EUA). Os valores dos ácidos graxos foram quantificados em percentagens relativas de ácidos totais.

Linhagem de células e vírus

Foram utilizadas células VERO E6, células comerciais, que são culturas contínuas de fibroblastos de rins do macaco verde da África (*Chlorocebus sabaues*), fornecidas pela Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas, PA. Essas células foram escolhidas porque são permissivas à infecção do vírus herpético.

A cepa viral isolada do HSV-1 (amostra 2033-001561) foi proveniente do laboratório de Enterovírus e Herpes vírus do Instituto Evandro Chagas.

Manutenção e expansão da linhagem

Para a manutenção e expansão, as células foram descongeladas e centrifugadas a 1500rpm por 5 min. O meio foi desprezado e o pellet ressuspendido em 5ml de meio **Meio Dulbecco's Modified Eagle Medium** (DMEM). O material foi novamente centrifugado, o sobrenadante desprezado, e o pelet ressuspendido em DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e combinação de penicilina (10U/MI) e estreptomicina (10µg/MI). O material foi transferido para garrafas de cultivo de 75cm² e armazenadas em estufa a 5% de CO₂ e 37 até seu uso.

Preparo das suspensões - estoques virais

As células Vero (aproximadamente 3x10⁵ células/mL) foram lavadas com PBS, transferidas para placas de microtitulação e inoculadas com o HSV-1 em uma série de diluições virais (entre 10⁻³ a 10⁻⁷). Cada suspensão viral (cepas de HSV-1) foi inoculada em placas de microtitulação (100µL por poço), cultivadas em 10 ml de

meio DMEM, suplementado com 5% de SFB e antibióticos/antifúngico, tendo sido tripsinizadas 24 h antes da infecção viral. Primeiramente, o meio de cultura DMEM foi aspirado da garrafa e a monocamada celular lavada 3X com tampão salina fosfato (PBS); após esse procedimento, foi inoculado 100 µL de cada diluição viral do HSV-1 e incubada, durante 1 h, a 37° C, em estufa com 5% de CO₂, para permitir a adsorção e penetração viral.

A linhagem de células VERO sem a inoculação do HSV-1 foi utilizada como controle, auxiliando na determinação da concentração e tempo de exposição tóxicas para células normais.

Teste de viabilidade celular

Previamente, foram avaliadas as propriedades citotóxicas do óleo de Andiroba (*Carapa guianenses*) em relação as células VERO E6. Para testar a viabilidade celular foram utilizados, o método de exclusão do corante azul de Trypan e ensaio colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium). As concentrações testadas do AO (10ng/mL e 100ng/mL), quando comparados ao controle positivo não interferiram na viabilidade celular.

Avaliação da ação anti-viral da andiroba frente ao HSV-1

A avaliação da ação anti-viral do óleo de andiroba foi realizada através de titulação viral baseada na redução do efeito citopático viral (CPE), sendo uma técnica eficaz para avaliar a ação antiviral de um medicamento contra o HSV-1, utilizando a observação e quantificação da inibição do dano causado às células pelo vírus (Yin et al., 2019).

Em placas de microtitulação, imediatamente, após o período de adsorção viral (1h), as células Vero foram novamente lavadas com PBS e o óleo de andiroba, dissolvido em dimatilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 10ng/mL e 100ng/mL, foi adicionado a poços contendo células e HSV-1 nas diluições entre 10^{-3} a 10^{-7} , em triplicata, conforme descrito a seguir:

1) Grupos andiroba: Células com infecção e com uso de AO nas concentrações de 10ng/mL e 100 ng/mL;

- 2) Controle negativo: Células sem infecção e sem uso de AO (controle de células);
- 3) Controle positivo: células infectadas com HSV-1 e sem uso do AO (controle de vírus).

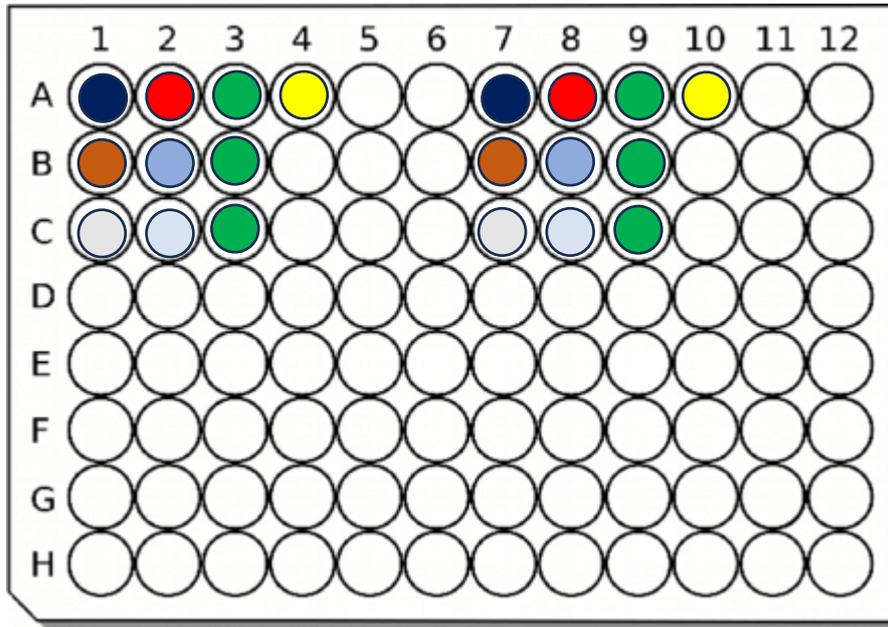
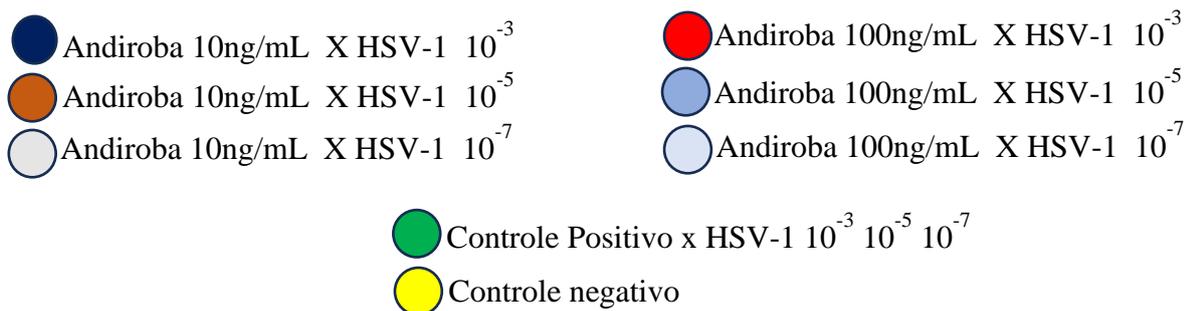


Figura 1: Disposição da placa de microtitulação para avaliação da atividade antiviral das diferentes concentrações de andiroba, em relação às diferentes diluições de HSV-1, em células VERO, por inibição do efeito citopático viral.



Após inoculação do vírus e tratamento com a andiroba, as placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C. Foram feitas leituras diárias em tempos de 24h, 48h e 72h para observação CPE característico do vírus (+) ou não (-). As leituras foram realizadas ao microscópio invertido e a inibição do CPE foi comparada com os controles. O efeito citopático observado para o vírus da herpes compreende alterações que se caracterizam

pelo arredondamento celular, desorganização do tapete, formando, algumas vezes, focos de aglomerados celulares arredondados ou mesmo destruindo completamente o tapete celular. Para reduzir o nível de subjetividade da análise, as imagens observadas em microscópio foram capturadas e padronizadas (mesmo aumento, iluminação) e utilizou-se o software ImageJ para contagem das células infectadas e definição do percentual do tapete celular infectado para posterior classificação do CPE.

O CPE causado pelo vírus HSV-1 foi estimado em escores, numa escala variando de 1 a 5, conforme o grau de destruição do tapete celular (Fritz, et al. 2007):

1. Nenhum CPE (0%): O tapete celular permanece intacto, sem sinais de destruição ou alteração;
2. CPE leve (1-25%): Pequena quantidade de células arredondadas ou lisadas, mas a maioria do tapete celular ainda está intacto.
3. CPE moderado (25-50%): Arredondamento e lise celular mais significativos, mas parte do tapete celular ainda parcialmente preservado.
4. CPE extenso (50-75%): Grande parte do tapete celular destruído, com áreas de células arredondadas e muitas células já lisadas com áreas significativas de destacamento.
5. CPE total (acima de 75%): Destruição quase completa ou completa do tapete celular, com poucas ou nenhuma célula intacta

De posse dos valores do CPE também foi obtido o percentual de inibição viral (% IV) com base na seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{CPE teste} - \text{CPE cv}}{\text{CPE cc} - \text{CPE cv}} \times 100$$

Onde CPE teste é o efeito citopático viral dos grupos tratamento nas diferentes concentrações do óleo de andiroba, CPE cv é o efeito citopático viral do controle de vírus e CPE cc é o efeito citopático viral do controle de células.

Análise estatística

A análise dos dados foi realizada no *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 24.0 (IBM). Os dados foram analisados por meio da estatística descritiva, sendo que para as variáveis categóricas utilizamos frequências absolutas e relativas e, para as variáveis numéricas contínuas medidas de tendência central e variabilidade. Os resultados foram calculados pelos valores originais e expressos pela média. Foram analisados estatisticamente pelo teste t-Student com correção de Welchs e pelo teste ANOVA. Valores com p inferior a 5% ($\alpha = 0,05$) foram considerados significativos.

RESULTADOS

Análise da cromatografia gasosa (GC-MS)

A tabela 1 e figura 2 retratam a análise de cromatografia gasosa do óleo de andiroba a 50% com sua composição e valores relativos. Cem por cento dos compostos foram identificados. O ácido oleico é o componente mais presente com 47,33%, seguido do ácido palmítico com 31,46%.

Tabela 1: Composição lipídica do óleo de andiroba-*Carapa guianensis*.

Óleo Carapa Guianensis		
TR	Componentes	Composição (%)
7,199	Ác. Heptanóico	0,3989
13,674	Ác Laúrico	1,1572
15,883	Ác. Mirístico	0,6394
17,982	Ác. Palmítico	31,4641
18,193	Ác Palmitoleico	0,9184
18,862	Ác Margárico	0,1154
19,845	Ác. Esteárico	7,1279
20,064	Ác. Oleico	47,3356
20,428	Ác Linoleico	8,9869
20,966	Ác Linolênico	0,2501
21,530	Ác. Araquídico	1,0897
23,562	Ác Behênico	0,5164

TR: Tempo de retenção

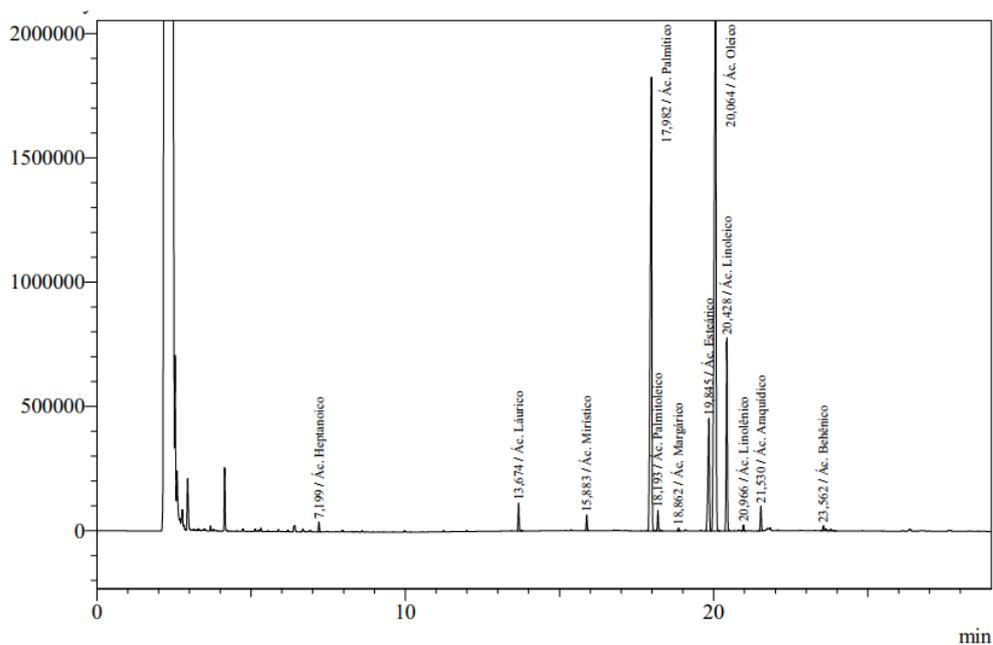


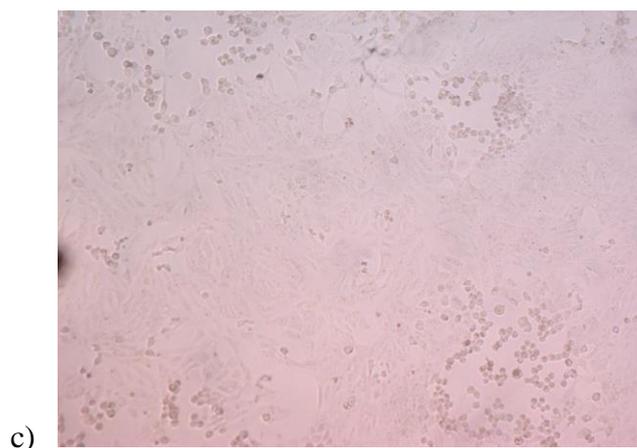
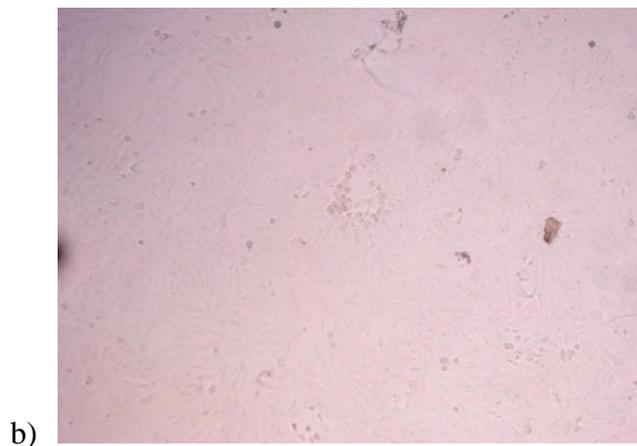
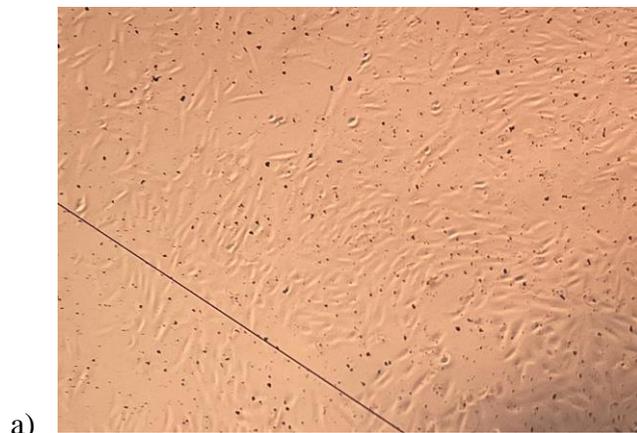
Figura 2: Análise da Cromatografia GC-MS do óleo *Carapa guianensis*. Número de componentes (RT) de acordo com a tabela 1.

Avaliação da ação anti-viral da andiroba frente ao HSV-1

Com base nos resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade previamente realizados, foi avaliada a atividade antiviral em concentrações não citotóxicas de andiroba em diferentes diluições virais. As concentrações analisadas foram, respectivamente, 10ng/mL e 100 ng/mL de AO e nas diluições do HSV-1 entre 10^{-3} a 10^{-7} , em tempos de 24h, 48h e 72h. Foram utilizadas neste estudo controle de células (células vero E6, sem infecção pelo HSV-1 e sem tratamento) e controle de vírus (Células vero E6 infectadas pelo HSV-1 sem tratamento). Os resultados foram analisados qualitativamente e quantitativamente através de titulação viral por meio da redução do efeito citopático (CPE).

O efeito citopático viral do vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) em células Vero é caracterizado por uma série de alterações morfológicas típicas causadas pela infecção viral como células em arredondamento e descolamento celular, fusão celular formando sincícios, perda de confluência, sendo que à medida que as células morrem ou se desprendem, a camada contínua de células (tapete celular) começa a se fragmentar,

deixando áreas vazias. A figura 3 representa os escores de 1 a 5 utilizados para classificação do CPE do HSV-1 em células Vero E6 no estudo.



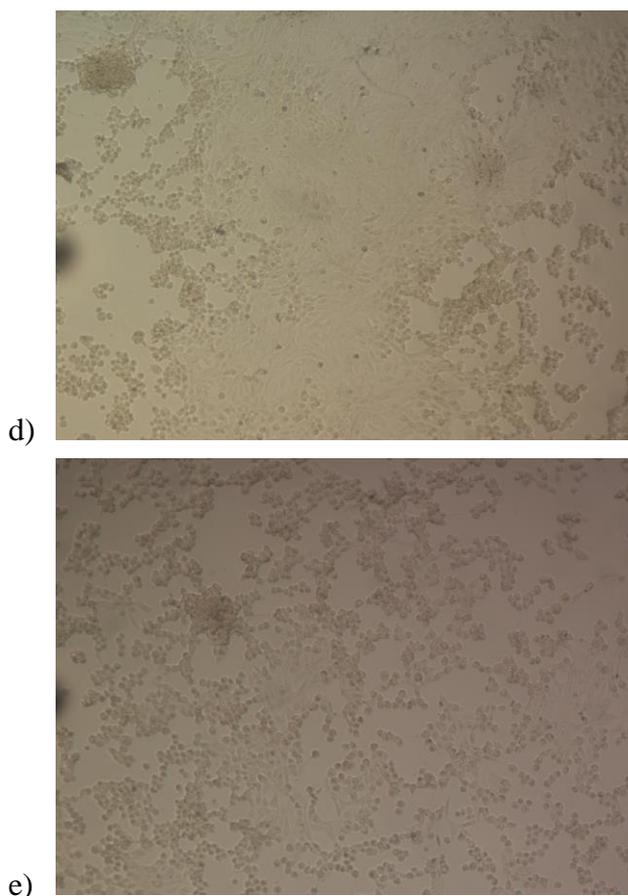


Figura 3: Imagens que representam o CPE do HSV-1 em células Vero E6. a) Escore 1 (Nenhum CPE): O tapete celular permanece intacto com monocamada de células Vero confluentes, sem sinais de destruição ou alteração; b) Escore 2 (CPE leve): Efeito citopático viral do HSV-1 entre 1 e 25% da monocamada de células Vero infectada. Percebe-se pequena quantidade de células arredondadas ou lisadas, mas a maioria do tapete celular ainda está intacto. c) Escore 3 (CPE moderado): Efeito citopático viral do HSV-1 entre 25 e 50% da monocamada de células Vero infectada. Observa-se arredondamento e lise celular mais significativos, mas parte do tapete celular ainda parcialmente preservado. d) Escore 3 (CPE extenso): Efeito citopático viral do HSV-1 entre 50% e 75% da monocamada de células Vero infectadas. Grande parte do tapete celular destruído, com áreas de células arredondadas e muitas células já lisadas com áreas significativas de destacamento. e) Escore 5 (CPE extenso): Efeito citopático viral do HSV-1 com acima de 75% da monocamada de células Vero infectadas. Destruição quase completa ou completa do tapete celular, com poucas ou nenhuma célula intacta. (Fotos do autor). (Imagem 10x)

A tabela 2 apresenta os valores do CPE do HSV-1 em células Vero E6 após o tratamento com óleo de andiroba e dos controles. O AO (10 ng/mL e 100 ng/mL) parece reduzir o CPE em relação ao controle positivo, especialmente nas diluições mais altas de HSV-1 (10^{-5} e 10^{-7}). O controle positivo apresenta um CPE crescente, confirmando a

replicação viral, enquanto o controle negativo tem ausência de efeito citopático. O AO apresenta uma possível atividade antiviral na concentração mais altas (100 ng/mL) tendo um efeito um pouco mais estável e possivelmente mais eficaz na inibição do CPE ao longo do tempo.

Tabela 2: Efeito citopático viral (CPE) do HSV-1 em células Vero E6 frente o uso do óleo de andiroba em diferentes concentrações em 24, 48 e 72hs.

Grupo	CPE Dia 1	CPE Dia 2	CPE Dia 3
HSV-1 10^{-3} x AO 10ng/mL	3	4	4
HSV-1 10^{-5} AO x 10ng/mL	2	4	4
HSV-1 10^{-7} x AO 10ng/mL	2	3	3
HSV-1 10^{-3} x AO 100ng/mL	2	3	3
HSV-1 10^{-5} x AO 100ng/mL	2	2	3
HSV-1 10^{-7} x AO 100ng/mL	2	2	3
Controle positivo - célula e HSV-1 10^{-3}	3	4	5
Controle positivo - célula e HSV-1 10^{-5}	3	4	5
Controle positivo - célula e HSV-1 10^{-7}	3	4	4
Controle Negativo (cel)	1	1	1

Fonte: Elaboração própria (2024).

A tabela 3 mostram o resultado do teste t de *Student* para comparação de médias de 24h, 48h e 72h do CPE do HSV-1 em células Vero tratadas com óleo de andiroba, em função das concentrações comparadas aos grupos controle. Observa-se que há diferença significativa ($p < 0.05$). Há diferença significativa ($p < 0.05$) entre as médias de HSV-1 10^{-5} x AO 100ng/mL ($\mu = 2,33 \pm 0,577$) versus Controle positivo - célula e HSV-1 10^{-5} ($\mu = 4,000 \pm 1,000$), de maneira que a média é menor no grupo HSV-1 10^{-5} x AO 100ng/mL.

Tabela 3: Teste t de *Student* para comparação de médias em 24h, 48h e 72h do CPE do HSV-1 em células vero E6 frente ao uso do AO, em função das concentrações comparadas aos grupos controle.

Variável	N	Média	Mediana	Desvio padrão	Erro padrão	Diferença média	P-Valor ⁽¹⁾
HSV-1 10 ⁻³ x AO 10ng/mL	3	3.67	4.00	0.577	0.333		
Controle positivo - célula e HSV-1 10 ⁻³	3	4.00	4.00	1.000	0.577	-0.333	0.423 _{ns}
HSV-1 10 ⁻⁵ AO x 10ng/mL	3	3.33	4.00	1.155	0.667		
Controle positivo - célula e HSV-1 10 ⁻⁵	3	4.00	4.00	1.000	0.577	-0.667	0.184 _{ns}
HSV-1 10 ⁻⁷ x AO 10ng/mL	3	2.67	3.00	0.577	0.333		
Controle positivo - célula e HSV-1 10 ⁻⁷	3	3.67	4.00	0.577	0.333	-	-
HSV-1 10 ⁻³ x AO 10ng/mL	3	3.67	4.00	0.577	0.333		
Controle Negativo (cel)	3	1.00	1.00	0.000	0.000	2.667	0.015*
HSV-1 10 ⁻⁵ AO x 10ng/mL	3	3.33	4.00	1.155	0.667		
Controle Negativo (cel)	3	1.00	1.00	0.000	0.000	2.333	0.073 _{ns}
HSV-1 10 ⁻⁷ x AO 10ng/mL	3	2.67	3.00	0.577	0.333		
Controle Negativo (cel)	3	1.00	1.00	0.000	0.000	1.667	0.038*
HSV-1 10 ⁻³ x AO 100ng/mL	3	2.67	3.00	0.577	0.333		
Controle positivo - célula e HSV-1 10 ⁻³	3	4.00	4.00	1.000	0.577	-1.333	0.057 _{ns}
HSV-1 10 ⁻⁵ x AO 100ng/mL	3	2.33	2.00	0.577	0.333		
Controle positivo - célula e HSV-1 10 ⁻⁵	3	4.00	4.00	1.000	0.577	-1.667	0.038*
HSV-1 10 ⁻⁷ x AO 100ng/mL	3	2.33	2.00	0.577	0.333		
Controle positivo - célula e HSV-1 10 ⁻⁷	3	3.67	4.00	0.577	0.333	-1.333	0.057 _{ns}
HSV-1 10 ⁻³ x AO 100ng/mL	3	2.67	3.00	0.577	0.333		
Controle Negativo (cel)	3	1.00	1.00	0.000	0.000	1.667	0.038*
HSV-1 10 ⁻⁵ x AO 100ng/mL	3	2.33	2.00	0.577	0.333		
Controle Negativo (cel)	3	1.00	1.00	0.000	0.000	1.333	0.057 _{ns}
HSV-1 10 ⁻⁷ x AO 100ng/mL	3	2.33	2.00	0.577	0.333		
Controle Negativo (cel)	3	1.00	1.00	0.000	0.000	1.333	0.057 _{ns}

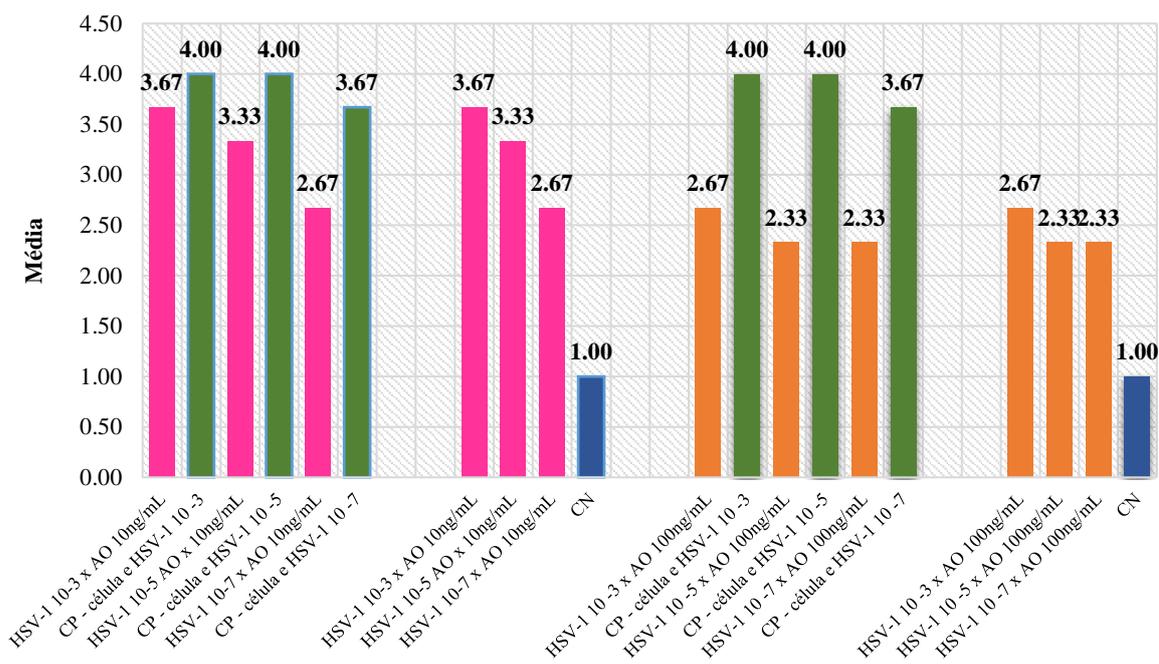
Fonte: Elaboração própria (2024).

EPD = Erro padrão da diferença; DM = Diferença média;

Nota. H₀ μ Medida 1 - Medida 2 ≠ 0

^a Dados são essencialmente constantes.

A figura 4 mostra a comparação de médias do CPE do HSV-1 em células Vero tratadas com óleo de andiroba, em função das concentrações comparadas aos grupos controle positivo e negativo. Observa-se que em todas as comparações com o controle positivo, as médias do CPE com uso do óleo de andiroba ficaram abaixo das médias dos controles, exceto quando comparadas com o controle negativo, onde os valores das médias de tratamento ficaram mais elevadas. Porém, verifica-se que as médias são decrescentes conforme a estratificação HSV-1 10⁻³ (3,67), HSV-1 10⁻⁵ (3,33) e HSV-1 10⁻⁷ (2,67) no grupo 10ng/mL e HSV-1 10⁻³ (2,67), HSV-1 10⁻⁵ (2,33) e HSV-1 10⁻⁷ (2,33) no grupo 100ng/mL.



Nota: CP = Controle Positivo; CN = Controle Negativo.

Figura 4: Médias do CPE do HSV-1 em células vero E6 frente ao uso do AO, em função das concentrações comparadas aos grupos controle. As barras na cor rosa e laranja representam os tratamentos com andiroba, nas concentrações de 10ng/mL e 100ng/mL respectivamente, comparados aos controle positivo (verde) e negativo (azul).

A tabela 4 e figura 5 mostram a comparação das médias do CPE do HSV-1 em células vero E6 após o uso do óleo de andiroba na concentração de 10ng/mL, nas diferentes diluições virais. Observa-se que a menor média obtida foi na diluição HSV-1 10⁻⁷ x concentração de AO 10ng/mL ($\mu = 2,667 \pm 0,577$). Esta média indica um CPE moderado (25-50%), ou seja, arredondamento e lise celular mais significativos, mas parte do tapete celular ainda parcialmente preservado. Contudo não há diferença significativa entre as médias em função dos dias de coleta (24h, 48h ou 72h).

Tabela 4: Teste t de *Student* para comparação de médias do CPE do HSV-1 em células vero E6 após o uso do óleo de andiroba na concentração de 10ng/mL.

Fator	N (dias)	Média	DesvPad	IC de 95%	P-Valor ⁽¹⁾
HSV-1 10 ⁻³ x AO 10ng/mL	3	3,667	0,577	(2,513; 4,820)	0.373 _{ns}
HSV-1 10 ⁻⁵ x AO 10ng/mL	3	3,333	1,155	(2,180; 4,487)	
HSV-1 10 ⁻⁷ x AO 10ng/mL	3	2,667	0,577	(1,513; 3,820)	

DesvPad Combinado = 0,816497

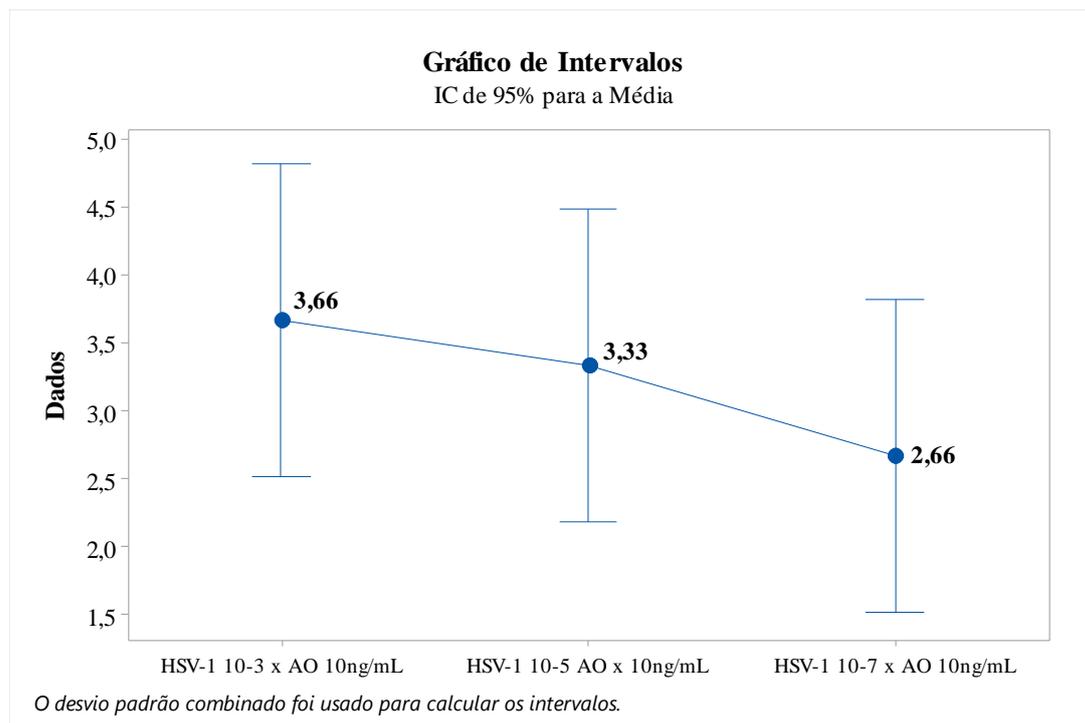


Figura 5: Intervalo de médias do CPE do HSV-1 em células vero E6 após o uso do óleo de andiroba na concentração de 10ng/mL.

Fonte: Elaboração própria (2024).

A tabela 5 e figura 6 mostram a comparação das médias do CPE do HSV-1 em células vero E6 após o uso do óleo de andiroba na concentração de 100ng/mL, nas diferentes diluições virais. Observa-se que a menor média obtida foi nas diluições HSV-1 10⁻⁵ x AO 100ng/mL ($\mu = 2,33 \pm 0,577$) e HSV-1 10⁻⁷ x AO 100ng/mL ($\mu = 2,33 \pm 0,577$). Esta média indica um CPE leve (1-25%), ou seja, uma pequena quantidade de células arredondadas ou lises, com a maioria do tapete celular ainda intacta. Contudo não há diferença significativa entre as médias em função dos dias de coleta (24h, 48h ou 72h).

Tabela 5: Teste t de *Student* para comparação de médias do CPE do HSV-1 em células vero E6 após o uso do óleo de andiroba na concentração de 100ng/mL .

Fator	N	Média	DesvPad	IC de 95%	P-Valor ⁽¹⁾
HSV-1 10 ⁻³ x AO 100ng/mL	3	2,667	0,577	(1,851; 3,482)	0.729 _{ns}
HSV-1 10 ⁻⁵ x AO 100ng/mL	3	2,333	0,577	(1,518; 3,149)	
HSV-1 10 ⁻⁷ x AO 100ng/mL	3	2,333	0,577	(1,518; 3,149)	

DesvPad Combinado = 0,577350

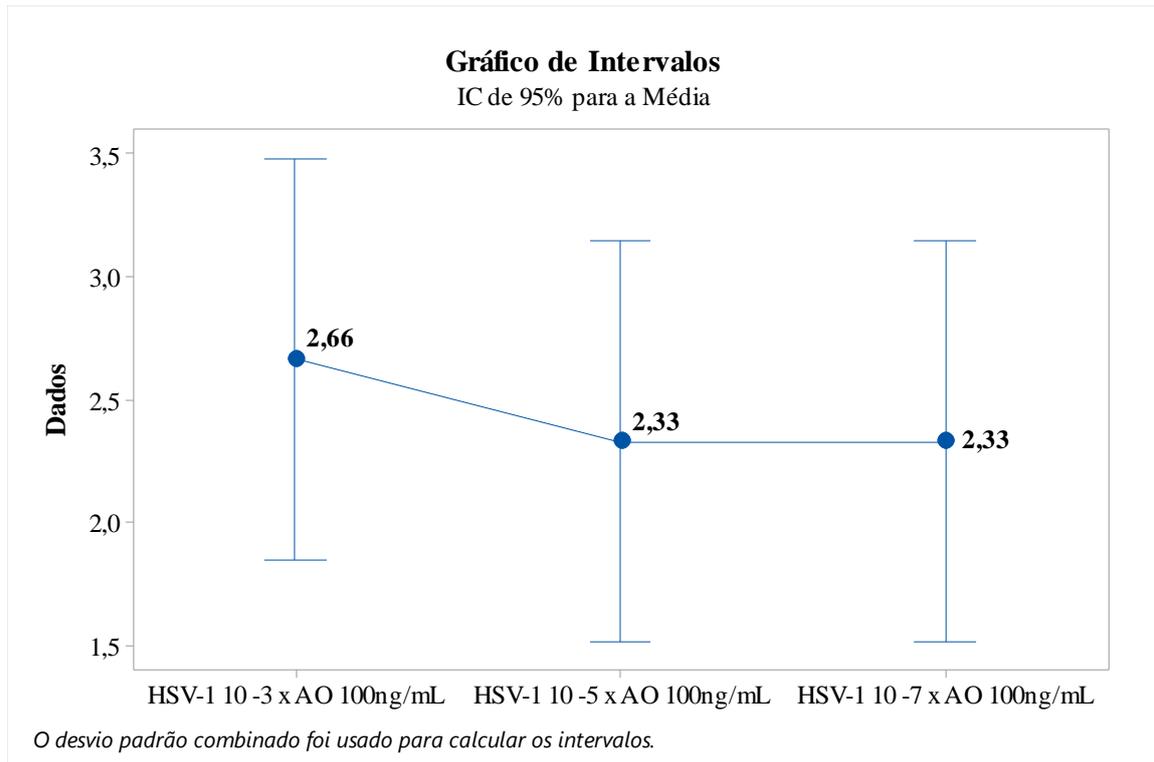


Figura 6: Teste t de *Student* para comparação de médias do CPE do HSV-1 em células vero E6 após o uso do óleo de andiroba na concentração de 100ng/mL

Fonte: Elaboração própria (2024).

A figura 7 representam a curva dose-resposta do óleo de andiroba frente ao HSV-1, baseada nas concentrações de 10 ng/mL e 100 ng/mL. Podemos observar que a inibição viral aumenta com uma dose de 100 ng/mL em comparação com a de 10 ng/mL. A resposta antiviral parece ser melhor nas diluições virais mais altas quando tratadas com a dose maior de andiroba (100 ng/mL).

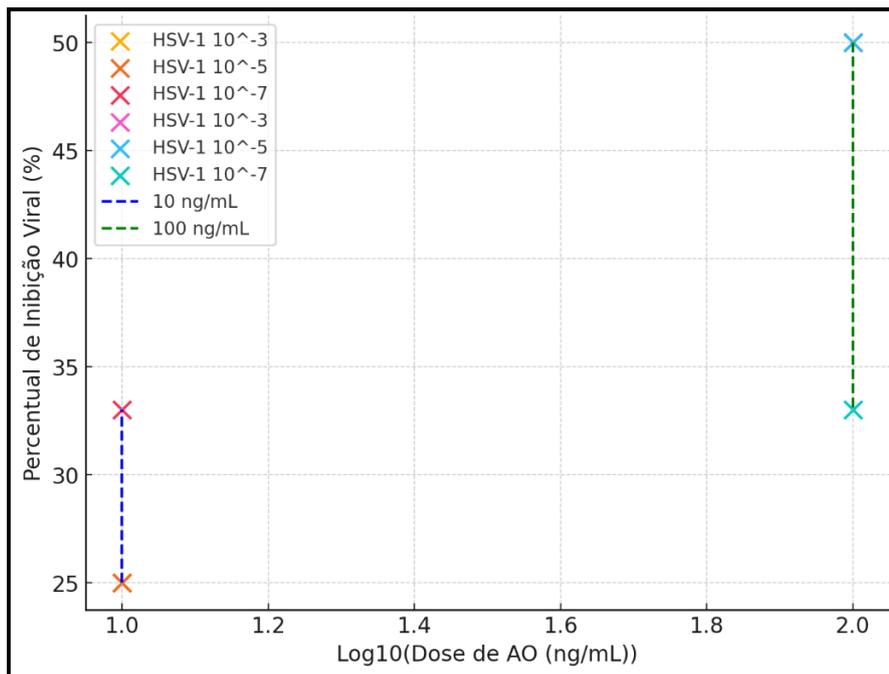


Figura 7: Curva dose resposta da ação antiviral do AO em células vero E6 infectadas com HSV-1 nas concentrações de 10ng/mL e de 100ng/mL do óleo. O gráfico mostra o percentual de inibição viral (*eixo y*) em função do logaritmo das doses de andiroba em ng/mL (*eixo x*).

DISCUSSÃO

Diversas plantas medicinais foram a base para a criação de medicamentos amplamente utilizados na medicina moderna. A morfina, por exemplo, é derivada do ópio extraído da *Papaver somniferum* (papoula), usada historicamente para aliviar dores e tratar insônia. O isolamento da morfina no início do século XIX marcou o início da farmacologia moderna. Outros exemplos incluem a aspirina, desenvolvida a partir da salicina da casca de salgueiro (*Salix spp.*), utilizada desde a antiguidade para tratar febres e dores. A quinina, extraída da casca da árvore de cinchona, foi um marco no tratamento da malária. Mais recentemente, compostos de plantas como o *Taxus brevifolia* (teixo) levaram à criação do paclitaxel (taxol), um potente quimioterápico utilizado contra o câncer (Almeida, 2011; Alves, 2013).

Na busca por novas alternativas terapêuticas contra infecções virais, como o Herpes Simplex Vírus tipo 1 (HSV-1), o interesse por compostos naturais com potencial

antiviral tem crescido significativamente (Hussein, El-Anssary, 2018). A biodiversidade e a riqueza de plantas da Amazônia desempenham um papel crucial na descoberta e produção de fitoterápicos antivirais, oferecendo um vasto repositório de compostos bioativos com potencial terapêutico, uma abordagem promissora para o tratamento de infecções por HSV-1. Dentre esses compostos, o óleo de andiroba (*Carapa guianensis*), amplamente utilizado na medicina tradicional, tem atraído atenção por suas propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e cicatrizantes (Silva, 2018; Ribeiro et al., 2021; Amorim et al., 2022), não sendo encontrados na literatura estudos avaliando sua capacidade antiviral frente ao Herpes vírus humano.

Neste estudo avaliou-se o perfil cromatográfico do óleo de andiroba, que revelou uma composição lipídica dominada por ácidos graxos essenciais e saturados, os mesmos achados descritos por Silva (2018). A presença predominante de ácido oleico (47,33%) e ácido palmítico (31,46%), é um ponto notável, visto que são ácidos graxos conhecidos por suas propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, o que poderia contribuir para a atividade antiviral observada no estudo (Souza et al., 2022). As composições de ácidos graxos vêm sendo estudadas ao longo destes anos e diversos estudos já foram realizados quanto ao perfil dos ácidos graxos do óleo de andiroba (Milhomem-Paixão et al., 2016) e a presença desses ácidos graxos, tornam o mesmo interessante do ponto de vista medicinal e fitoterápico (Silva, 2018).

As plantas medicinais contêm uma ampla gama de compostos secundários, como flavonoides, terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos, que têm demonstrado atividade antiviral. Essas substâncias podem atuar de diferentes maneiras, inibindo a replicação viral, bloqueando a entrada do vírus nas células hospedeiras ou modulando a resposta imunológica, tornando-os alternativas eficazes aos antivirais tradicionais (Hussein, El-Anssary, 2018). Na literatura, estudos com extratos de plantas têm demonstrado várias atividades antivirais, atribuídas a grupos distintos de metabólitos secundários. Esses metabólitos, como alcaloides, conhecidos por suas propriedades antivirais, como a inibição da replicação viral; taninos e flavonoides que têm efeito inibitório sobre diversas enzimas virais e são capazes de interferir na entrada e replicação dos vírus; terpenos e saponinas que atuam como moduladores do sistema imunológico e antivirais diretos; cumarinas e quinonas: possuem atividades que incluem a inibição de polimerases virais e outros processos essenciais para a replicação viral (Cometa et al.,

2022; Pavi et al., 2023; Pennisi et al., 2023). Neste estudo não foi avaliado o perfil fitoquímico do óleo de andiroba, porém Amorim et al., 2022 e Kikuchi et al., 2020, em seus estudos avaliaram este perfil fitoquímico, e observaram a presença de metabólitos químicos como fenóis e taninos, saponinas, esteróides e triterpenóides e açúcares redutores em sua composição.

Silva (2018) relatou em seu trabalho que a atividade biológica do AO está relacionada à presença de limonoides, os quais são comumente encontrados nas plantas da família Meliaceae. Os limonoides presentes no óleo de Andiroba são abundantes, representando cerca de 2% a 5% do teor do óleo, demonstrando as características peculiares desse óleo que despertam interesses de pesquisadores, com algumas propriedades fitoterápicas já documentadas na literatura científica, entre as quais antialérgica e anti-inflamatória.

Reis (2007), ao avaliar o efeito imunomodulador e antiviral de plantas medicinais na infecção *in vitro* de monócitos humanos infectados pelo vírus DENGUE-2 (cepa 16681), demonstrou que os TNTPs isolados de *C. guianensis* diminuíram de modo significativo a produção de TNF- α e IL-10. Resultados referente a atividade antiviral não foram apresentados para monócitos infectados tratados com TNTPs isolados.

Neste estudo, a redução do efeito citopático viral (CPE) observado nas células Vero tratados com AO sugere uma possível ação antiviral, especialmente nas concentrações mais altas (100 ng/mL). A análise da curva dose-resposta demonstra clareza entre o aumento da concentração do AO e a diminuição da replicação viral do HSV-1. Observou-se que, com uma dose de 100 ng/mL, há uma inibição mais significativa da replicação viral em comparação à dose de 10 ng/mL, especialmente nas concentrações virais de 10^{-5} e 10^{-7} . Esse comportamento sugere uma ação dose-dependente do AO, em que o aumento da concentração proporciona uma resposta antiviral maior.

Quando comparou-se o AO ao controle positivo, houve um aumento progressivo do CPE devido à replicação viral, já o tratamento com AO, particularmente em diluições mais altas do HSV-1 (10^{-5} e 10^{-7}), foi capaz de atenuar os danos citopáticos. Essa inibição foi mais pronunciada na concentração de 100 ng/mL. Em contrapartida, o controle negativo, sem infecção, apresentou ausência de CPE, confirmando a integridade das

células sem a presença viral. Esses achados sugerem que o óleo de andiroba, especialmente em concentrações de 100ng/mL, pode ser promissor para impedir a replicação do HSV-1, embora a atividade do AO em doses menores (10ng/mL) também apresente um discreto grau de eficácia..

A avaliação da atividade antiviral do óleo neste estudo foi realizada através da titulação viral por meio da redução do CPE, sendo uma das abordagens mais comuns, e que se baseia na observação visual da destruição celular causada pela infecção viral. A redução desse efeito após o tratamento com um fitoterápico sugere uma inibição da replicação viral, indicando a atividade antiviral do mesmo. Este método é amplamente utilizado por ser direto e fornecer resultados visuais claros, mas apresenta a limitação de ser, em parte, subjetivo e dependente da sensibilidade das células hospedeiras à infecção e do observador (Yin et al., 2019; Watanabe et al., 2021). Com o intuito de minimizar esse viés, neste estudo as imagens do CPE foram evidenciadas de forma quantitativa utilizando o software ImageJ. Essa abordagem conjunta incluiu uma avaliação mais objetiva e precisa, reduzindo a interferência da observação manual e aumentando a confiabilidade dos resultados. Dessa forma, o uso do ImageJ contribuiu para uma análise mais consistente da redução do CPE.

O efeito citopático viral causado pelo HSV-1 em células hospedeiras é um indicador-chave da replicação viral e da progressão da infecção. Portanto, a inibição ou redução desse efeito é um parâmetro crucial para avaliar o potencial antiviral de substâncias em estudo (Yin et al., 2019). Neste contexto, este estudo buscou verificar se o tratamento com óleo de andiroba poderia diminuir os danos celulares causados pela infecção com HSV-1, sugerindo uma ação antiviral direta ou indireta, sendo necessários estudos adicionais que avaliem o mecanismo de ação do AO.

Outra técnica amplamente utilizada é a quantificação da carga viral por meio de ensaios de plaqueamento. Este método permite uma quantificação precisa da redução no número de partículas virais infecciosas após o tratamento com o fitoterápico. No entanto, é um processo demorado e laborioso, exigindo condições rigorosas de manuseio. Foi demonstrado que tanto os ensaios baseados na redução de placas quanto na redução do CPE são métodos de referência para a avaliação da sensibilidade aos fármacos. (Lopez-Alvarez, et al. 2016).

CONCLUSÃO

Os resultados inéditos deste estudo indicam que o óleo de andiroba pode interferir no ciclo de replicação do HSV-1, diminuindo significativamente o efeito citopático na cultura de células Vero E6. Esses achados sugerem o potencial promissor do óleo como candidato para o desenvolvimento de novos agentes antivirais, que poderiam complementar ou até oferecer alternativas aos tratamentos antivirais convencionais. No entanto, é importante ressaltar que este é um estudo preliminar e que futuras investigações são necessárias para aprofundar a compreensão do provável mecanismo de ação antiviral do óleo de andiroba frente o HSV-1.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores não tem conflitos de interesse a declarar.

REFERÊNCIAS

- Akram, M, Tahir, IM, Shah, SMA. (2018). Antiviral potential of medicinal plants against HIV, HSV, influenza, hepatitis, and coxsackievirus: a systematic review. *Phytother Res.* 32(5):811-822. doi: 10.1002/ptr.6024.
- Almeida, MZ. Plantas medicinais: abordagem histórico-contemporânea. In: Plantas Medicinais [online]. 3rd ed. Salvador: EDUFBA, 2011, pp. 34-66. ISBN 978-85-232-1216-2. Available from SciELO Books .
- Alves, LF. (2013) Simpósios de Plantas Medicinais do Brasil: 40 anos de História. *Revista Fitos.* 4(1):18-36. ISBN 2652-4775.
- Amorim, MF, Almeida, WLS., Sousa, JC, Bandeira, JMA., Júnior, MRO., Andrade, SM, Taminato, RL, Oliveira, E.H. (2022). Ethnopharmacological study of medicinal plants used by the population of the state of Pará, Brazil. *Brazilian Journal of Development.* 8(1), 3033–3052. <https://doi.org/10.34117/bjdv8n1-200>
- Araújo-Lima, CF, Fernandes, AS, Gomes, EM, Oliveira, LG, Macedo AF. (2018). Antioxidant activity and genotoxic assessment of crabwood (*Andiroba, Carapa guianensis Aublet*) seed oils. *Oxid Med Cell Longev.* doi: 10.1155/2018/3246719.
- Cometa, S, Zannella, C, Busto, F, De Filippis, A, Franci, G, Galdiero, M, De Giglio, E. (2022). Natural Formulations Based on *Olea europaea* L. Fruit Extract for the Topical

Treatment of HSV-1 Infections. *Molecules*. 27(13):4273. doi: 10.3390/molecules27134273.

Diefenbach, R.J.; Fraefel, C. 2020. *Herpes Simplex Virus: Methods and Protocols*. 2. ed. New York: Springer.

Fritz, BN, Venturi, CR, Cargni, S, Schripsema, J, Roehe, PM, Montanha, JA, Von Poser, GL. (2007) Herpes vírus inhibitory substances from *Hypericum connatum*, a plant used in southern Brazil to treat oral lesions. *Journal of Ethnopharmacology*. 25(3):517-20. doi: 10.1016/j.jep.2007.07.013. 113:517-20.

Gabaglio S, Alvarenga N, Cantero-González G, Degen R, Ferro, EA, Langjahr P, Chnaiderman J, Sotelo PH. (2021). A quantitative PCR assay for antiviral activity screening of medicinal plants against Herpes simplex 1. *Nat Prod Res*. 35(17):2926-2930. doi: 10.1080/14786419.2019.1675064.

IBM. (2012). *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 28.0*. Armonk, NY: IBM Corp.

IMAGEJ. (2024) Software de processamento de imagens. Bethesda, MD: National Institutes of Health. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij>. Acesso em: [12.08.24].

Inque T, Ohmori S, Kikuchi T, Yamada T, Tanaka R. (2018). Carapanosins D-F from the seeds of andiroba (*Carapa guianensis*, *Meliaceae*) and their effects on LPS-activated NO production. *Molecules*. 23(7):1778. doi: 10.3390/molecules23071778.

Hussein, A, El-Anssary, A. (2019). Plantas metabólitos secundários: os principais motores das ações farmacológicas de plantas medicinais. In: *Medicina Herbal*. **IntechOpen**. DOI: 10.5772/intechopen.76139.

James C, Harfouche M, Welton NJ, Turner KM, Abu-Raddad LJ, Gottlieb SL, Looker K.J. (2020). Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ*. 98(5):315-329. doi: 10.2471/BLT.19.237149.

Jesus FLM, Almeida FB, Duarte J., Oliveira AEMFM, Cruz RAS. (2016). Preparation of a nanoemulsion with *Carapa guianensis* Aublet (*Meliaceae*) oil by a low-energy/solvent-free method and evaluation of its preliminary residual larvicidal activity. *Biomed Res Int*. 6756793. doi: 10.1155/2017/6756793.

Jiang YC, Feng H, Lin YC, Guo XR. (2016). New strategies against drug resistance to Herpes simplex virus. *Int J Oral Sci*. 8(1):1-6. doi: 10.1038/ijos.2016.3.

Kikuchi T, Akita K, Koike H, In Y, Yamada T, Tanaka R. (2020). Carapanins A-C: New limonoids from andiroba (*Carapa guianensis*) fruit oil. *Org Biomol Chem*. 8(45):9268-9274. doi: 10.1039/d0ob01872d.

Kuo JY, Yeh CS, Wang SM, et al. (2023). Acyclovir-resistant HSV-1 isolates among immunocompromised patients in southern Taiwan: low prevalence and novel mutations. *J Med Virol*. 95(8):e28985. doi: 10.1002/jmv.28985.

Li J, Cheng C, Lin T, Xue R, Liu X, Wu K. (2022). Efficacy of sodium polyanethol sulfonate on herpes simplex virus-1 infection *in vitro*. *Mol Vis*. 28:516-525. PMID: 37089702.

- Looker KJ, Magaret AS, May MT, Turner KM, Vickerman P, Gottlieb SL, Newman LM. (2015). Global and regional estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 1 infections in 2012. *PLoS One*. 10(10). doi: 10.1371/journal.pone.0140765.
- Lopez-Alvarez Y, et al. (2016). Methods for determining the antiviral activity of compounds *in vitro*. **Journal of Virological Methods**, 238: 196-204, 2016.
- Madavarajau K, Koganti R, Volet Y, Yadavalli TE, Shukla D. (2020). Herpes simplex virus cell entry mechanisms: an update. *Front Cell Infect Microbiol*. 18(10):617578. doi: 10.3389/fcimb.2020.617578.
- Meccia G, Quintero-Rincón P, Rojas L, Alfredo U, Velasco J, et al. (2013). Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Carapa guianensis* collected from Venezuelan Guayana and the antimicrobial activity of the oil and crude extracts. *Nat Prod Commun*. 8:1641-1642. doi: 10.1177/1934578X1300801135.
- Milhomem-Paixão SSR, Fascineli ML, Roll MM, Longo JPF, Azevedo RB, Pieczarka JC, Salgado HLC, Santos AS & Grisolia CK. (2016). The lipidome, genotoxicity, hematotoxicity and antioxidant properties of andiroba oil from the Brazilian Amazon. *Genetics and Molecular Biology*. 39(2):248-256. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/gmb/a/5p8rm5DBkTnC3B9cwCvg3GP/?lang=en>. A
- Moya S, Taha M, Makeen H, Alhazmi H, Bratty M, Sultana S, Ahsan W, Najmi A, Kalid A. (2020). Bioactive natural antivirals: an updated review of the available plants and isolated molecules. *Molecules*. 25:4878.
- Mondal J, Das Mahapatra A, Mandal KC, Chattopadhyay D. (2021). An extract of *Stephania hernandifolia*, an ethnomedicinal plant, inhibits herpes simplex virus 1 entry. *Arch Virol*. 166(8):2187-2198. doi: 10.1007/s00705-021-05093-z.
- Newman, DJ, Cragg, GM. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. 79(3):629-661. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055.
- Oliveira IDSDS, Moragas Tellis CJ, Chagas MDSDS, Behrens MD, Calabrese KDS, Abreu-Silva AL, Almeida-Souza F. (2018). *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) Seed Oil: Chemical Composition and Antileishmanial Activity of Limonoid-Rich Fractions. *Biomed Research International*. doi: 10.1155/2018/5032816. Article ID 5032816.
- Pavi CP, Pra ID, Cadamuro RD, Kanzaki I, Lacerda JWF, Sandjo LP, Bezerra RM, Segovia JFO, Fongaro G, Silva IT. (2023). Amazonian medicinal plants efficiently inactivate Herpes and Chikungunya viruses. *Biomed Pharmacother*. 167:115476. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115476.
- Pennisi R, Trischitta P, Tamburello MP, Barreca D, Mandalari G, Sciortino MT. (2023). Mechanistic Understanding of the Antiviral Properties of Pistachios and Zeaxanthin against HSV-1. *Viruses*, 15(8):1651. doi: 10.3390/v15081651.
- Reis SRNI. Efeito imunomodulador e antiviral de plantas medicinais na infecção *in vitro* de monócitos humanos pelo vírus DENGUE-2. (2007). [Tese]: Fundação Oswaldo Cruz.

- Ribeiro CDB, Costa PA, Lima SRV, Silva MT. (2021). The medicinal use of *Carapa guianensis* Aubl. (Andiroba). *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 10, n. 15, p. e391101522815, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i15.22815.
- Sen M, Eroğul Ö. (2024). Retinoic Acid Neutralizes the Effects of Herpes Simplex Virus Type 1-Infected Cell Protein 0 (ICP0) in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Cureus*, 16(5). doi: 10.7759/cureus.61089.
- Silva FRP, Almeida SSMS. (2014). Análise fitoquímica e microbiológica da atividade do extrato bruto etanólico da Andiroba, *Carapa guianensis* Aubl. *Biota Amazônia*, 4(4), 10-14. doi: 10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v4n4p10-14.
- Silva L. (2018). Propriedades físico-químicas e perfil dos ácidos graxos do óleo da andiroba. *Nativa*. 6:147. Doi:10.31413/nativa.v6i2.4729.
- Soares ADS, Wanzeler AMV, Cavalcante GHS, Barros EMDS, Carneiro RCM, Tuji FM. (2021). Therapeutic effects of andiroba (*Carapa guianensis* Aubl) oil, compared to low power laser, on oral mucositis in children undergoing chemotherapy: A clinical study. *Journal of Ethnopharmacology*, 264, 113365. doi: 10.1016/j.jep.2020.113365.
- Sousa RL, Silva SG, Costa JM, Costa WA, Maia AAB, Oliveira MS, Andrade EHA. (2022). Chemical profile of manually extracted andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) from Mamangal community, located in Igarapé-Miri, Pará, Brazil. *Scientia Plena*. 17. 10.14808/sci.plena.2021.127201.
- Steiner I, Benninger F. (2018). Manifestations of Herpes Virus Infections in the Nervous System. *Neurologic Clinics*. 36(4):725-738. doi: 10.1016/j.ncl.2018.06.005.
- Tognarelli E, Palomino T, Corrales N, Bueno S, Kaleris A, González P. (2019). Herpes simplex Virus evasion of early host antiviral responses. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 30(9):127. doi: 10.3389/fcimb.2019.00127.
- Zupin L, Caracciolo I, Tricarico PM, Ottaviani G, D'Agaro P, Crovella S. (2018). Propriedades antivirais do laser azul em um modelo *in vitro* de infecção por HSV-1. *Microbiologia e Imunologia*, 62:477-479. doi: 10.1111/1348-0421.12600
- Watanabe H. et al. (2021). A high-throughput screening platform for the identification of antiviral compounds using a cell-based cytopathic effect assay. *Antiviral Research*. 190:105068, 2021.
- Yin Y, Xu Y, Ou Z, Yang X, et al. (2019). Um sistema de triagem de medicamentos antivirais para enterovírus 71 com base em um ensaio de placa aprimorado: um método potencial de alto rendimento. *J Med Virol*. 91(8):1440–7. doi: 10.1002/jmv.25463.

REVISTA: PHYTOTHERAPY RESEARCH, QUALIS A1, FI 6,1

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL EM CÉLULAS INFECTADAS PELO HSV-1 E TRATADAS COM ÓLEO DE ANDIROBA (*CARAPA GUIANENSIS*) ATRAVÉS DE q-PCR.

RESUMO

Histórico e objetivo: O Herpes Simplex Vírus Tipo 1 (HSV-1) é um patógeno comum que causa infecções orais, oculares e genitais, além de doenças graves como encefalite. A resistência a antivirais tradicionais, como o aciclovir, tem impulsionado a busca por novos tratamentos. Nesse contexto, compostos naturais têm emergido como agentes antivirais e o óleo de andiroba (AO), destaca-se por suas propriedades medicinais. Este estudo avaliou *in vitro* a atividade antiviral do óleo de andiroba frente o HSV-1. **Métodos:** Trata-se de um estudo laboratorial experimental, com uso de cepas de HSV-1 tratadas em diferentes concentrações do AO e analisadas quantitativamente por meio de PCR em tempo real (q-PCR). Foi analisado também o efeito do tratamento com o óleo de andiroba antes da infecção com HSV-1, além da comparação do AO e o tratamento com aciclovir. A análise dos dados foi realizada no SPSS e os dados analisados estatisticamente pelo teste t-Student e teste ANOVA. **Resultados:** Na análise de qPCR, em concentração de 10 ng/mL de AO, observa-se uma leve diminuição nos valores de ΔC_t à medida que a diluição do HSV-1 aumenta, o que sugere uma eficácia antiviral modesta. Para 100 ng/mL de AO, os valores de ΔC_t são ainda mais baixos do que na concentração de 10 ng/mL, sugerindo uma maior atividade antiviral com o aumento da dosagem do óleo. **Conclusões:** Os resultados sugerem que o AO possui atividade antiviral, com maior eficácia em concentrações mais altas e com cargas virais mais baixas, embora ainda menos eficaz que o aciclovir.

PALAVRAS-CHAVE: *Carapa guianensis*; Herpes simples; fitoterapia, antivirais, Reação em cadeia da polimerase, plantas medicinais

1 INTRODUÇÃO

O vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) representa um problema de saúde pública. Estima-se que em 2016, o equivalente a 3,7 bilhões de pessoas ou 66,6% da população

mundial com idades abaixo de 50 anos tiveram infecção pelo HSV-1 (Looker et al. 2015; James et al., 2020), tendo um impacto considerável na sociedade independente da região geográfica ou da condição socioeconômica da população. Os sintomas causados pela infecção são geralmente autolimitantes em indivíduos imunocompetentes, mas podem ser graves e prolongados em pacientes imunocomprometidos (McCallister & Schleiss, 2014; Nascimento et al., 2017; Andrade et al., 2022, Lemos et al., 2023).

As terapias atualmente utilizadas para o tratamento da infecção por HSV são farmacológicas, tópicas, sistêmicas ou instrumentais, ocasionalmente com dispositivos a laser. Os medicamentos antivirais atuais usados para tratar o HSV-1 incluem aciclovir, valaciclovir e penciclovir. Esses medicamentos impedem a multiplicação dos vírus e, como resultado, dificultam a surgimento de sintomas graves de herpes. No entanto, a recorrência das lesões também contribui para problemas adicionais relacionados à saúde pública, notadamente em relação à resistência e a toxicidade. As drogas utilizadas como tratamento de primeira linha, quando administradas a longo prazo em pacientes imunossuprimidos, tem sido associado à seleção de cepas resistentes (Gabaglio et al, 2021; Piret & Boivin, 2016, Xu et al., 2022, Silva et al., 2023). Portanto, é imperativo buscar substâncias alternativas que possuam atividade antiviral, baixa toxicidade e alta eficiência inibitória (Altindis et al, 2020; Li et al., 2022).

Desde a antiguidade os produtos naturais derivados de plantas, animais, microrganismos e minerais exercem importante papel na prevenção e tratamento de diferentes doenças. O mercado global de produtos de origem natural tem crescido e estima-se que o planeta seja composto por mais de 300.000 espécies de plantas, consideradas recursos importantes para as indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética e de perfumaria (Swamyet al., 2016; Benassi-Zanqueta et al., 2019). Nos países em desenvolvimento, 65 a 80% da população faz uso de plantas medicinais para fins terapêuticos (Bilia et al., 2017). Neste cenário, a pesquisa de medicamentos de origem botânica pode representar tratamentos futuros para doenças herpéticas, com base na sua capacidade de conjugar alta segurança e eficácia, evitando efeitos tóxicos graves (Akram et al., 2018; Mohan et al., 2020; Pennisi et al., 2023).

A *Carapa guianensis*, popularmente conhecida no Brasil como andiroba, pertencente à família Meliaceae, pode ser encontrado na Amazônia, onde, há anos,

populações locais e indígenas utilizam o óleo para uso medicinal, incluindo ação antitérmica, antialérgica, analgésica, anti-inflamatória, além de atuar como agente acaricida e repelente de insetos. (Allahverdiyev et al., 2013, Meneguetti et al., 2019; Ribeiro et al., 2021; Amorim et al., 2022). As propriedades medicinais da *Carapa guianensis* têm sido atribuídas à presença de limonóides altamente oxigenados, que são tetranortriterpenóides. No óleo estão presentes também ácidos graxos essenciais, por exemplo, ácido palmítico, esteárico e linoleico (Silva, 2018; Oliveira et al., 2018; Kikuchi et al., 2020; Porfírio-Dias et al., 2022; Sousa et al., 2022). Este conjunto de características na composição da andiroba, despertou a atenção para uma possível ação antiviral, entretanto até o momento não existem estudos que avaliem o efeito antiviral da mesma. Este é um estudo pioneiro, onde o óleo de Andiroba (*Capara guianensis*) foi avaliado *in vitro* pela técnica de PCR em tempo real (qPCR), para verificação de seus efeitos frente ao Herpes Simplex Vírus – Tipo 1.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo, baseado nos preceitos da Declaração de Helsinque e do Código de Nuremberg, respeitando as Normas de Pesquisa em Saúde, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, sob parecer número 6.055.046.

2.2. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este estudo se caracterizou como um estudo laboratorial experimental, executado através de parceria entre a Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará e o Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Ophir Loyola.

2.3. OBTENÇÃO DO ÓLEO DE ANDIROBA

O óleo da andiroba (AO) utilizado na pesquisa foi advindo de uma a empresa privada especializada em óleos da amazônia, a qual forneceu certificado de pureza do óleo (ANEXO 1), assim como localização, clima, tipo de solo, dentre outras características importantes a compreensão da qualidade do mesmo. química. As amostras

de andiroba foram obtidas na região nordeste do estado do Pará, Brasil, com as seguintes coordenadas: 1 43' 04,0" S e 48 52' 58,0" W.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) forneceu a composição do óleo de andiroba em moléculas mais densas, as quais não são possíveis de serem observadas através da cromatografia gasosa, possibilitando a compreensão de quais substâncias presentes na andiroba proporcionam sua eficácia ou não frente ao tratamento proposto. Para isso, as análises foram realizadas no Sistema Waters Breeze equipado com bomba Waters 1525 binary HPLC e sistema de detecção UV/VIS Waters 2489. Foi utilizada uma coluna SupelcoNucleosil® C18 (250 x 3,2 mm, 5 µm), com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, detecção UV275nm e eluição isocrática (H₂O-MeOH 53:47). A quantificação do óleo da andiroba foi feita através do software instalado no programa, que forneceu a concentração pura específica do composto.

2.4 LINHAGEM DE CELULAS E VÍRUS

Foram utilizadas células VERO E6, células comerciais, que são culturas contínuas de fibroblastos de rins do macaco verde da África (*Chlorocebus sabaues*). Essas células foram escolhidas porque são permissivas à infecção do vírus herpético. E a cepa viral isolada do HSV-1 cedidos pelo INCT-INOVAR – RJ.

2.5 MANUTENÇÃO E EXPANSÃO DA LINHAGEM

Para a manutenção e expansão, as células foram descongeladas e centrifugadas a 1500rpm por 5 min. O meio foi desprezado e o pellet ressuspensionado em 5ml de meio Meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). O material foi novamente centrifugado, o sobrenadante desprezado, e o pelet ressuspensionado em DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e combinação de penicilina (10U/ML) e estreptomicina (10µg/ML). O material foi transferido para garrafas de cultivo de 75cm² e armazenadas em estufa a 5% de CO₂ a 37° até seu uso.

2.6 PREPARO DAS SUSPENSÕES - ESTOQUES VIRAIS

As células foram lavadas com PBS, transferidas para placas de microtitulação e inoculadas com o HSV-1 em uma série de diluições virais (entre 10⁻³ a 10⁻⁷). Cada suspensão viral (cepas de HSV-1) foi inoculada em placas de microtitulação (100µL por

poço), formando uma nova monocamada de células VERO E6, cultivadas em 10 ml de meio DMEM, suplementado com 5% de SFB e antibióticos/antifúngico, tendo sido tripsinizadas 24 h antes da infecção viral. Primeiramente, o meio de cultura DMEM foi aspirado da garrafa e a monocamada celular lavada 3X com tampão salina fosfato (PBS); após esse procedimento, foi inoculado 100 µL de cada diluição viral do HSV-1 e incubada, durante 1 h, a 37° C, em estufa com 5% de CO₂, para permitir a adsorção e penetração viral. e, então, o inóculo foi retirado por sucção a vácuo e 10 ml do meio DMEM sem SFB, foram adicionados.

A linhagem de células VERO sem a inoculação do HSV-1 foi utilizada como controle, auxiliando na determinação da concentração e tempo de exposição tóxicas para células normais

2.7 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTI-VIRAL DA ANDIROBA FRENTE AO HSV-1

A avaliação da ação anti-viral do óleo de andiroba foi realizada através da técnica de PCR em tempo real (qPCR) em diferentes situações de tratamento com uso da andiroba, em triplicata, conforme descrito a seguir:

1) Grupo pré tratamento com andiroba : Células vero sem infecção pré tratadas 3 horas antes com AO dissolvido em dimatilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 10ng/mL e 100 ng/mL, incubadas a 37°C, em estufa com 5% de CO₂. Após este período, o meio foi retirado, os poços foram lavados com PBS, em seguida foi adicionado aos poços meio de cultivo com HSV-1 nas diluições entre 10⁻³ à 10⁻⁷;

2) Grupos andiroba: Células vero com infecção e com uso de AO nas concentrações de 10ng/mL e 100 ng/mL. Em placas de microtitulação, imediatamente após o período de adsorção viral (1h), as células foram novamente lavadas com PBS e o óleo de andiroba, dissolvido em DMSO nas concentrações de 10ng/mL e 100ng/mL, foi adicionado poços com células e HSV-1 nas diluições entre 10⁻³ a 10⁻⁷;

3) Controle negativo: Células vero sem infecção e sem uso de andiroba (controle de células);

4) Controle positivo: Células vero infectadas pelo HSV-1 e sem uso da andiroba (controle de vírus);

5) Grupo aciclovir: Foi adicionado um novo grupo tratamento utilizando-se a droga aciclovir (5 µg/mL) no lugar do AO, por se tratar do medicamento padrão ouro contra o HSV-1. Essa concentração foi escolhida reembasada na literatura por ser um valor próximo à concentração normalmente efetiva (Piret & Boivin, 2016).

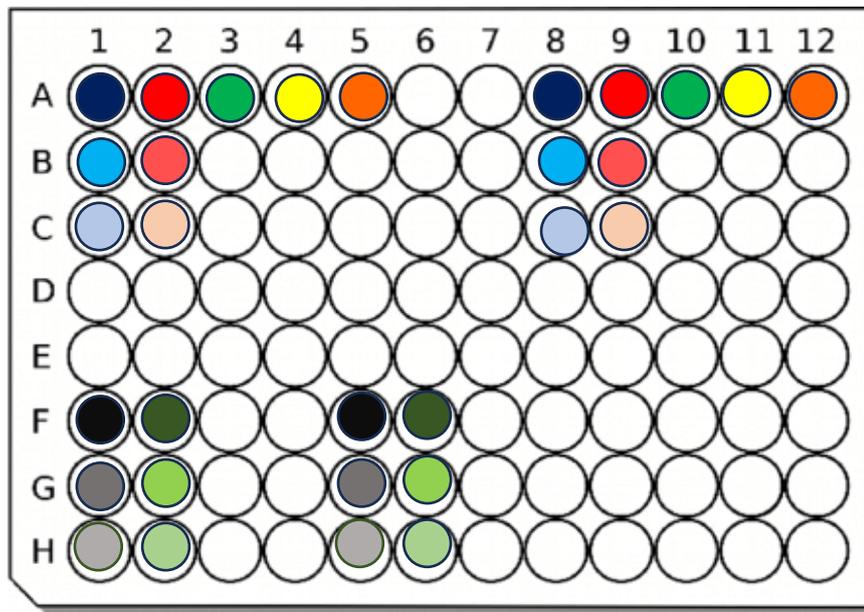
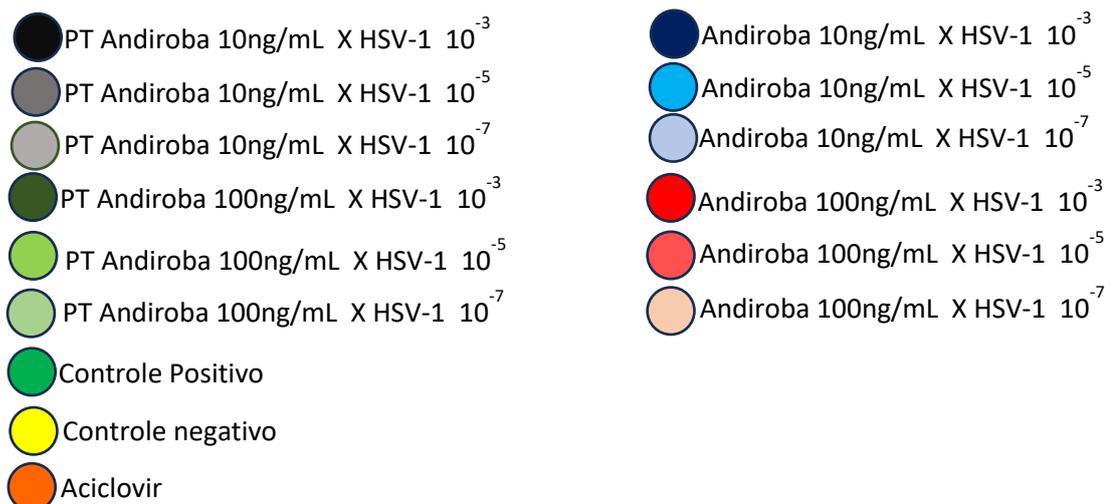


Figura 1: Disposição da placa de microtitulação para avaliação da atividade antiviral das diferentes concentrações de andiroba, em relação às diferentes diluições de HSV-1, em células VERO, para posterior análise por q-PCR.



Após inoculação do vírus e tratamento com a andiroba, as placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37°C. Foram feitas leituras diárias para acompanhamento do CPE em microscópio invertido. Após 72h de incubação de cada uma das condições os sobrenadantes foram coletados e congelados para posterior análise do tapete celular lisado por reação em cadeia da polimerase em tempo real (q-PCR).

2.8 EXTRAÇÃO DO HSV1-DNA E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HSV-1

As amostras de andiroba nas concentrações de 10ng/ml e 100ng /ml e dos controles foram submetidas a extração e purificação de DNA do HSV1 através do Biopur Kit Extração Mini Spin Plus (Mobius Life Science, PR, Brasil) de acordo com as normas do fabricante.

A quantificação viral foi realizada em amostras de DNA extraídas utilizando a metodologia de PCR em tempo real (qPCR), empregando o kit XGEN Master HSV-1 (Mobius Life Science, PR, Brasil). A detecção de HSV-I por este kit baseia-se na amplificação de uma região específica do genoma viral (DNA-alvo e gene-alvo), utilizando primers específicos para o vírus HSV-1. O produto da amplificação foi detectado por meio de uma sonda específica marcada com um corante fluorescente, direcionada a uma única sequência genômica do HSV-1. A quantificação foi realizada comparando os resultados com uma curva padrão, o que permitiu determinar a carga viral presente nas amostras. Por se tratar de um kit comercial pré-fabricado, o fabricante não divulga as sequências exatas dos primers e sondas utilizadas. A reação de PCR foi realizada sob as seguintes condições: 1 ciclo inicial a 37° por 2 minutos, 1 ciclo a 95°C por 10 minutos seguidos de 45 ciclos, a 95°C por 5 segundos, 60°C por 40 segundos e 72°C por 20 segundos. Uma amostra negativa foi usada como controle de amplificação para cada rodada. O número do ciclo limiar, Ct, foi medido como o ciclo de PCR em que a quantidade de alvo amplificado atingiu o valor de limiar. A redução nos níveis de DNA do HSV-1 nos sobrenadantes das culturas foi avaliada pela mudança no ciclo limiar (ΔCt).

O *delta Ct* (ΔCt) na PCR em tempo real é uma forma de análise que compara os níveis de expressão entre uma amostra tratada e uma amostra controle. No contexto de uma análise de carga viral do HSV-1 para avaliar a eficácia de um fitoterápico, o ΔCt ajuda a medir a inibição da replicação viral nas células tratadas (Rao et al. (2013). A PCR

em tempo real detecta e quantifica a quantidade de DNA viral presente nas amostras, e o C_t (ou ciclo limiar) é o ponto em que a fluorescência do DNA amplificado atinge um nível detectável. O ΔC_t é a diferença entre o C_t da amostra viral e o C_t de uma amostra de referência, normalmente uma amostra controle (não tratada) ou um gene constitutivo (endógeno) usado como normalizador. O limite de detecção (LOD) do ensaio foi determinado como 0,57 cópias/ μ L, garantindo a detecção do DNA viral com uma probabilidade de 95%.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada no *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 24.0. Os dados foram analisados por meio da estatística descritiva, sendo que para as variáveis categóricas utilizamos frequências absolutas e relativas e, para as variáveis numéricas contínuas medidas de tendência central e variabilidade. Os resultados foram calculados pelos valores originais e expressos pela média. Foram analisados estatisticamente pelo teste t-Student com correção de Welchs e pelo teste ANOVA. Valores com p inferior a 5% ($\alpha = 0,05$) foram considerados significativos.

3 RESULTADOS

Os resultados foram analisados quantitativamente através de titulação viral por meio de reação em cadeia em polimerase em tempo real (qPCR). Foi avaliada a atividade antiviral em concentrações não citotóxicas de andiroba em diferentes diluições virais. As concentrações analisadas foram, respectivamente, 10ng/mL e 100 ng/mL de AO e nas diluições do HSV-1 entre 10^{-3} a 10^{-7} . Foram utilizadas neste estudo controle negativo (células vero E6 sem infecção pelo HSV-1 e sem tratamento com AO) e controle positivo (Células vero E6 infectadas com HSV-1 sem tratamento com AO), além de um controle padrão com medicamento aciclovir. A redução nos níveis de DNA do HSV-1 nos sobrenadantes das culturas foi avaliada pela mudança no valor do delta ciclo limiar (ΔC_t).

A tabela 1 mostra a comparação de médias dos valores de ciclo limiar (ΔC_t) do HSV-1 para cada série de diluições virais (HSV-1 10^{-3} , HSV-1 10^{-5} e HSV-1 10^{-7}) frente ao pré tratamento e tratamento concomitante com óleo de andiroba. Observa-se que há diferença significativa na medida ΔC_t entre o pré-tratamento e o pós-tratamento para as

concentrações HSV-1 10^{-3} x AO 10ng/mL ($p = 0.046$), HSV-1 10^{-7} x AO 10ng/mL ($p = 0.029$) *versus* HSV-1 10^{-3} x AO 100ng/mL ($p = 0.046$). Além disso, há diferença significativa entre HSV-1 10^{-5} x AO 10ng/mL *versus* Aciclovir ($p = 0.040$).

Tabela 1: Comparação dos valores de Delta ciclo limiar (ΔCt) nos efeitos pré-tratamento e tratamento do óleo de andiroba em um modelo *in vitro* de infecção pelo HSV-1, em função das diluições virais, através de RT-qPCR.

Variável	DELTA CT	Grupo	p-valor ⁽¹⁾
HSV-1 10^{-3} x AO 10ng/mL	0,58	Pré tratamento	0.046*
HSV-1 10^{-3} x AO 10ng/mL	0,64	Tratamento	
HSV-1 10^{-5} x AO 10ng/mL	0,34	Pré tratamento	0.050ns
HSV-1 10^{-5} x AO 10ng/mL	0,29	Tratamento	
HSV-1 10^{-7} x AO 10ng/mL	0,21	Pré tratamento	0.029*
HSV-1 10^{-7} x AO 10ng/mL	0,23	Tratamento	
HSV-1 10^{-3} x AO 100ng/mL	0,19	Pré tratamento	0.046*
HSV-1 10^{-3} x AO 100ng/mL	0,22	Tratamento	
HSV-1 10^{-5} x AO 100ng/mL	0,14	Pré tratamento	0.076ns
HSV-1 10^{-5} x AO 100ng/mL	0,11	Tratamento	
HSV-1 10^{-7} x AO 100ng/mL	0,10	Pré tratamento	-
HSV-1 10^{-7} x AO 100ng/mL	0,10	Tratamento	
HSV-1 10^{-3} x AO 10ng/mL	0,58	Pré tratamento	0.165ns
Controle positivo (células Vero e HSV-1)	1,00	Controle	
HSV-1 10^{-7} x AO 10ng/mL	0,21	Pré tratamento	0.368ns
Controle positivo (células Vero e HSV-1)	1,00	Controle	
HSV-1 10^{-5} x AO 10ng/mL	0,34	Pré tratamento	0.148ns
Controle positivo (células Vero e HSV-1)	1,00	Controle	
HSV-1 10^{-3} x AO 100ng/mL	0,19	Pré tratamento	0.176ns
Controle positivo (células Vero e HSV-1)	1,00	Controle	
HSV-1 10^{-7} x AO 100ng/mL	0,14	Pré tratamento	0.411ns
Controle positivo (células Vero e HSV-1)	1,00	Controle	
HSV-1 10^{-5} x AO 100ng/mL	0,10	Pré tratamento	0.500ns
Controle positivo (células Vero e HSV-1)	1,00	Controle	
HSV-1 10^{-3} x AO 10ng/mL	0,58	Pré tratamento	0.196ns
Aciclovir	0,08	Aciclovir	
HSV-1 10^{-7} x AO 10ng/mL	0,21	Pré tratamento	0.111ns
Aciclovir	0,08	Aciclovir	
HSV-1 10^{-5} x AO 10ng/mL	0,34	Pré tratamento	0.040*
Aciclovir	0,08	Aciclovir	
HSV-1 10^{-3} x AO 100ng/mL	0,19	Pré tratamento	0.141ns
Aciclovir	0,08	Aciclovir	
HSV-1 10^{-7} x AO 100ng/mL	0,14	Pré tratamento	0.222ns
Aciclovir	0,08	Aciclovir	
HSV-1 10^{-5} x AO 100ng/mL	0,10	Pré tratamento	0.500ns
Aciclovir	0,08	Aciclovir	

Fonte: Elaboração própria (2024).

A tabela 2 mostra a comparação dos valores de delta ciclo limiar (ΔCt) do HSV-1 frente ao uso do óleo de andiroba em função das concentrações de AO (10ng/mL e

100ng/mL) para os grupos pré-tratamento, tratamento, controle positivo, negativo e a aciclovir. Observa-se que há diferença significativa no valor de ΔCt entre o pré-tratamento e o controle positivo, nas amostras de concentração **10ng/mL**, de maneira que a média é menor no grupo de pré-tratamento ($\mu = 0.377 \pm 0.188$). O mesmo ocorre na comparação entre o pré-tratamento e o controle positivo, nas amostras de concentração **100ng/mL**, de maneira que a média é menor no grupo de pré-tratamento ($\mu = 0.110 \pm 0.098$).

Tabela 2: Comparação dos valores de delta ciclo limiar (ΔCt) do HSV-1 frente ao uso do óleo de andiroba, em função das concentrações, para os grupos pré-tratamento, tratamento, controle positivo, negativo e aciclovir.

Grupo 10ng/ml	Pré tratamento	Tratamento	P-Valor⁽¹⁾
HSV-1 10^{-3} x AO 10ng/mL	0,58	0,64	0.785ns
HSV-1 10^{-5} x AO 10ng/mL	0,34	0,29	
HSV-1 10^{-7} x AO 10ng/mL	0,21	0,23	
Média (DP)	0.377 ± 0.188	0.387 ± 0.221	
Grupo 100ng/ml	Pré tratamento	Tratamento	
HSV-1 10^{-3} x AO 100ng/mL	0,19	0,22	1.000ns
HSV-1 10^{-5} x AO 100ng/mL	0,14	0,11	
HSV-1 10^{-7} x AO 100ng/mL	0,10	0,10	
Média (DP)	0.110 ± 0.098	0.110 ± 0.110	
Grupo 10ng/ml	Pré tratamento	CP	
HSV-1 10^{-3} x AO 10ng/mL	0,58	1,00	0.029*
HSV-1 10^{-5} x AO 10ng/mL	0,34	1,00	
HSV-1 10^{-7} x AO 10ng/mL	0,21	1,00	
Média (DP)	0.377 ± 0.188	1.00 ± 0.000	
Grupo 100ng/ml	Pré tratamento	CP	
HSV-1 10^{-3} x AO 100ng/mL	0,19	1,00	0.004*
HSV-1 10^{-5} x AO 100ng/mL	0,14	1,00	
HSV-1 10^{-7} x AO 100ng/mL	0,10	1,00	
Média (DP)	0.110 ± 0.098	1.00 ± 0.000	
Grupo 10ng/ml	Pré tratamento	Aciclovir	
HSV-1 10^{-3} x AO 10ng/mL	0,58	0,08	0.553ns
HSV-1 10^{-5} x AO 10ng/mL	0,34	0,08	
HSV-1 10^{-7} x AO 10ng/mL	0,21	0,08	
Média (DP)	0.377 ± 0.188	0.300 ± 0.000	
Grupo 100ng/ml	Pré tratamento	Aciclovir	
HSV-1 10^{-3} x AO 100ng/mL	0,19	0,08	0.079ns
HSV-1 10^{-5} x AO 100ng/mL	0,14	0,08	
HSV-1 10^{-7} x AO 100ng/mL	0,10	0,08	
Média (DP)	0.110 ± 0.098	0.300 ± 0.000	

Fonte: Elaboração própria (2024).

A figura 2 mostra a comparação dos valores de ΔCt entre pré-tratamento e tratamento concomitante por concentração de AO, para diferentes diluições de HSV-1. O gráfico evidencia a eficácia do AO nas diferentes concentrações e diluições de HSV-1, tanto no pré quanto no tratamento concomitante. No entanto, comparando os valores de ΔCt no pré tratamento e tratamento não houve diferenças estatisticamente significantes.

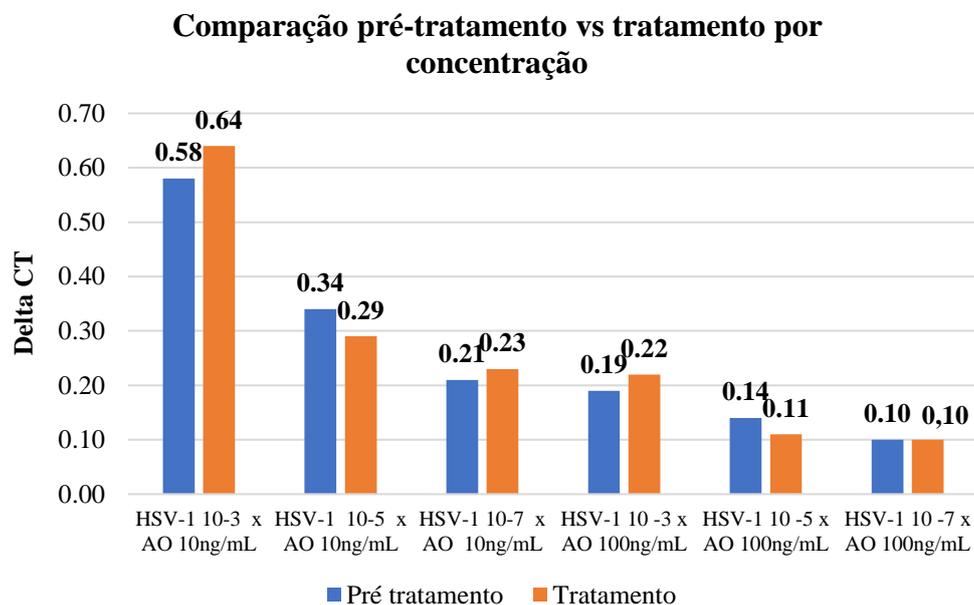


Figura 2: Comparação dos valores de ciclo limiar (ΔCt) do HSV-1 frente ao uso do óleo de andiroba, em função das concentrações para os grupos pré-tratamento e tratamento. Os dados são apresentados em barras azuis para o pré-tratamento e laranjas para o tratamento. **Fonte:** Elaboração própria (2024).

A tabela 3 mostra a comparação dos valores de delta ciclo limiar (ΔCt) do HSV-1 frente ao uso do óleo de andiroba, em função das concentrações para os grupos controle positivo e aciclovir somente com o grupo tratamento. Observa-se que há diferença significativa na medida ΔCt entre o tratamento e o controle positivo, nas amostras de concentração **10ng/mL**, de maneira que a média é menor no grupo de tratamento ($\mu = 0.387 \pm 0.221$). O mesmo ocorre na comparação entre o tratamento e o controle positivo, nas amostras de concentração **100ng/mL**, de maneira que a média é menor no grupo de tratamento ($\mu = 0.110 \pm 0.110$).

Tabela 3: Comparação dos valores de delta ciclo limiar (ΔCt) do HSV-1 frente ao uso do óleo de andiroba em função das concentrações para os grupos tratamento, controle positivo e aciclovir.

Grupo 10	Tratamento	CP (células Vero e HSV-1)	P-Valor⁽¹⁾
HSV-1 10 ⁻³ x AO 10ng/mL	0,64	1,00	0.041*
HSV-1 10 ⁻⁵ x AO 10ng/mL	0,29	1,00	
HSV-1 10 ⁻⁷ x AO 10ng/mL	0,23	1,00	
	0.387 ± 0.221	1.00 ± 0.000	
Grupo 100	Tratamento	CP (células Vero e HSV-1)	
HSV-1 10 ⁻³ x AO 100ng/mL	0,22	1,00	0.005*
HSV-1 10 ⁻⁵ x AO 100ng/mL	0,11	1,00	
HSV-1 10 ⁻⁷ x AO 100ng/mL	0,10	1,00	
	0.110 ± 0.110	1.00 ± 0.000	
Grupo 10	Tratamento	Aciclovir	
HSV-1 10 ⁻³ x AO 10ng/mL	0,64	0,08	0.568ns
HSV-1 10 ⁻⁵ x AO 10ng/mL	0,29	0,08	
HSV-1 10 ⁻⁷ x AO 10ng/mL	0,23	0,08	
	0.387 ± 0.221	0.300 ± 0.000	
Grupo 100	Tratamento	Aciclovir	
HSV-1 10 ⁻³ x AO 100ng/mL	0,22	0,08	0.096ns
HSV-1 10 ⁻⁵ x AO 100ng/mL	0,11	0,08	
HSV-1 10 ⁻⁷ x AO 100ng/mL	0,10	0,08	
	0.110 ± 0.110	0.300 ± 0.000	

Fonte: Elaboração própria (2024).

A figura 3 mostra a comparação do pré-tratamento com OA vs Controle positivo por concentração. O gráfico mostra uma tendência decrescente em ΔCt conforme a concentração de AO e o aumento das diluições do HSV-1, que diminuem conforme a concentração varia. A linha azul indica que os valores do tratamento prévio diminuem com o aumento da concentração de AO, sugerindo um efeito dose-dependente. Este gráfico ajuda a visualizar a eficácia do tratamento antiviral em diferentes concentrações e diluições, comparando com a linha de base fornecida pelo controle positivo.

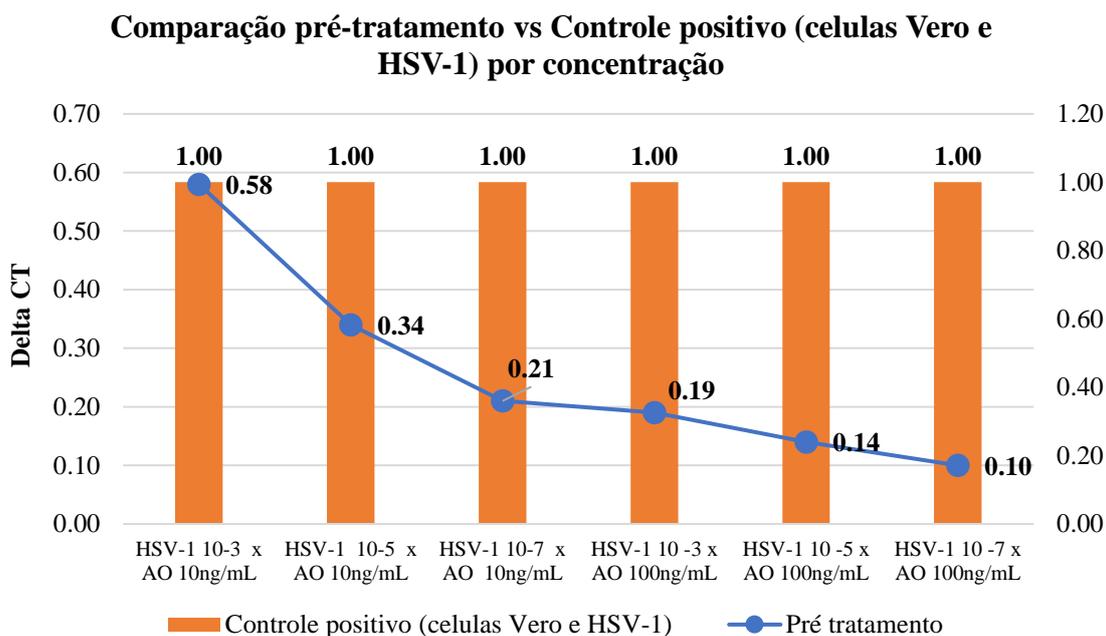


Figura 3: Comparação dos valores de ciclo limiar (ΔCt) do HSV-1 frente ao uso do óleo de andiroba, em função das concentrações para os grupos controle positivo e pré-tratamento. No eixo vertical (Y) está ΔCt . No eixo horizontal (X) há diferentes concentrações de AO e em diferentes diluições de HSV-1 (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7}). As barras laranjas representam o Controle positivo (células Vero e HSV-1 sem tratamento) com um valor constante de 1,00 em todas as concentrações. A linha azul representa o pré-tratamento. **Fonte:** Elaboração própria (2024).

A figura 4 mostra a comparação do pré-tratamento com OA vs Aciclovir por concentração. O gráfico mostra uma tendência decrescente em ΔCt conforme aumenta a concentração de AO e aumenta a diluição de HSV-1.

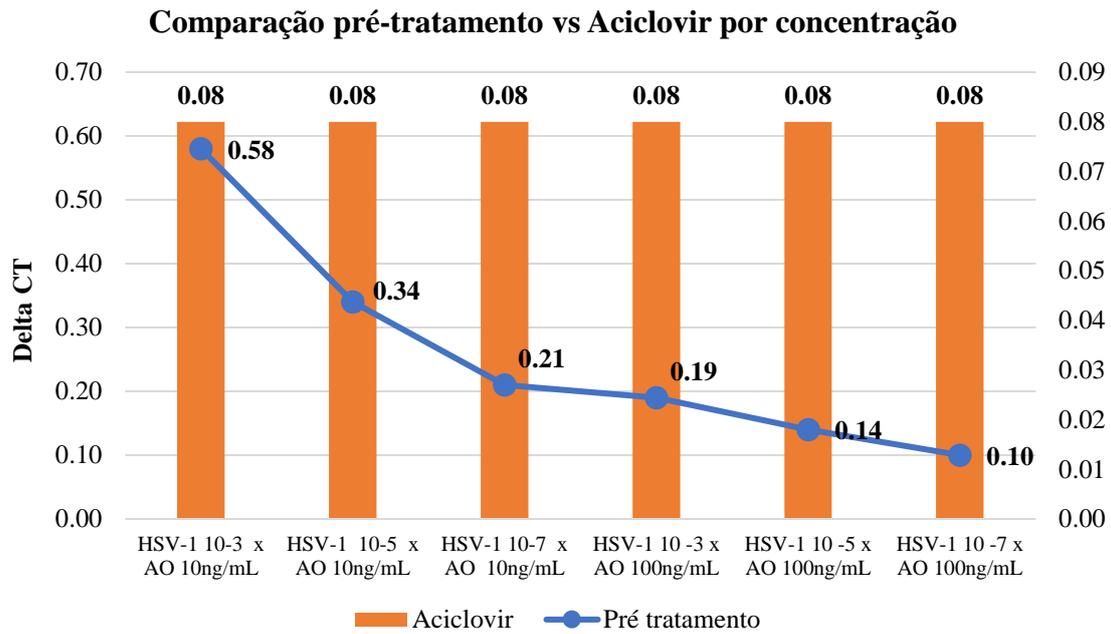


Figura 4: Comparação dos valores de ciclo limiar (ΔCt) do HSV-1 frente ao uso do óleo de andiroba, em função das concentrações para os grupos pré-tratamento e Aciclovir. No eixo vertical (Y) está ΔCt . No eixo horizontal (X) há diferentes concentrações de AO e em diferentes diluições do HSV-1 (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7}). As barras laranjas representam o aciclovir com um valor constante de 0.08 em todas as concentrações. A linha azul representa o pré-tratamento. **Fonte:** Elaboração própria (2024).

A figura 5 mostra a comparação do tratamento concomitante com AO vs Controle positivo por concentração. O gráfico mostra uma tendência decrescente em ΔCt conforme o aumento da concentração do óleo de andiroba e das diluições de HSV-1. Este gráfico ajuda a visualizar a eficácia do tratamento antiviral em diferentes concentrações e diluições, comparando com a linha de base fornecida pelo controle positivo.

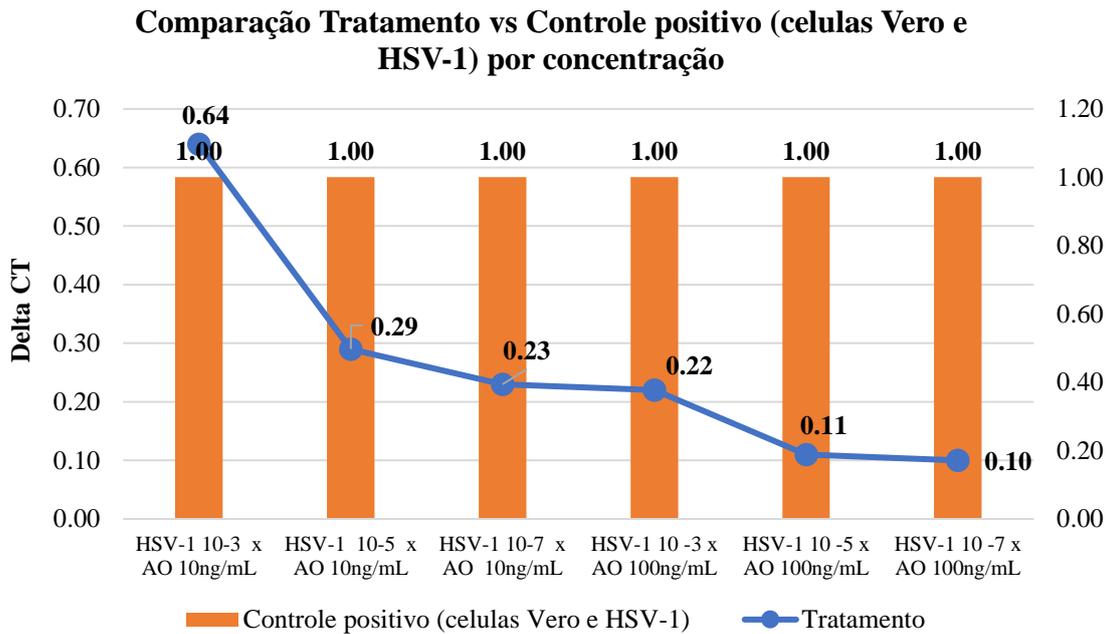


Figura 5: Comparação dos valores de delta ciclo limiar (ΔCt) do HSV-1 frente ao uso do óleo de andiroba em função das concentrações para os grupos tratamento e controle positivo. No eixo vertical (Y) está o ΔCt . No eixo horizontal (X) há diferentes concentrações de AO e em diferentes diluições do HSV-1 (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7}). As barras laranjas que representam o Controle positivo (células Vero e HSV-1 sem tratamento) com um valor constante de 1,00 em todas as concentrações. A linha azul representa o tratamento concomitante com AO. **Fonte:** Elaboração própria (2024).

A figura 6 mostra a comparação do tratamento concomitante com AO vs aciclovir. O gráfico mostra uma tendência decrescente em ΔCt conforme aumenta a concentração de AO e o aumento das diluições de HSV-1. O gráfico ilustra a comparação entre um novo tratamento e o aciclovir em termos de eficácia antiviral. O valor constante para o aciclovir ($\Delta Ct = 0.08$) serve como referência, enquanto os valores variáveis do novo tratamento (linha azul) mostram uma tendência de diminuição do ΔCt com concentrações mais altas, sugerindo que andiroba pode ser eficaz em maior concentração. Este gráfico é crucial para avaliar a eficácia potencial do AO em comparação com o aciclovir.

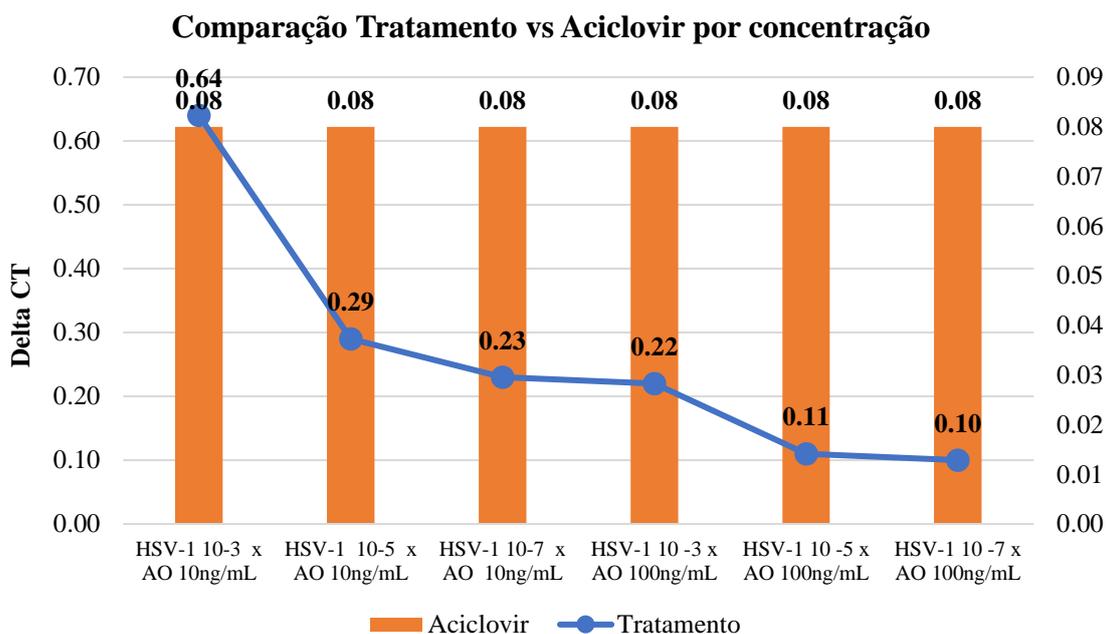


Figura 6: Comparação dos valores de delta ciclo limiar (ΔCt) do HSV-1 frente ao uso do óleo de andiroba em função das concentrações para os grupos tratamento e Aciclovir. No eixo vertical (Y) está ΔCt . No eixo horizontal (X) há diferentes concentrações de HSV-1 e em diferentes diluições (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7}) de HSV-1. As barras laranjas representam o aciclovir com valor constante de 0.08 em todas as concentrações. A linha azul representa o tratamento concomitante com AO. **Fonte:** Elaboração própria (2024).

4 DISCUSSÃO

A descoberta de fitoterápicos no combate ao vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) é de grande importância, especialmente diante dos desafios relacionados à resistência a medicamentos antivirais convencionais e à necessidade de tratamentos mais acessíveis e seguros. O HSV-1 é uma infecção viral altamente prevalente e atualmente, não existem medicamentos que curem infecções por HSV ou infecções latentes associadas (Crimi et al., 2019; Pavi et al., 2023).

A avaliação *in vitro* da ação antiviral de fitoterápicos é uma etapa essencial na validação do uso de compostos naturais como potenciais agentes terapêuticos contra infecções virais. Essas investigações abrangem uma variedade de metodologias, considerando técnicas laboratoriais que variam desde ensaios de prevenção viral direta até a avaliação de mecanismos imunomoduladores de substâncias naturais, fornecendo uma visão abrangente da eficácia e do potencial terapêutico desses compostos. Essas

metodologias são essenciais para a validação inicial, antes de avanços clínicos e possíveis aplicações terapêuticas mais amplas desses fitoterápicos (Parham et al., 2020; Lemos et al., 2023).

A *Carapa guianensis* (Aublet), popularmente conhecida como andiroba tem demonstrado diversas atividades terapêuticas e amplamente usado na medicina popular, como o tratamento antitérmico, antialérgico, analgésico e anti-inflamatórios, bem como ação acaricida e repelente de insetos (Nardi et al., 2016; Nonato et al., 2018; Araújo-Lima et al., 2018; Meneguetti et al., 2019; Nascimento et al., 2019; Santos et al., 2021; Soares et al., 2021; Amorim, et al., 2022). O principal produto retirado da planta é o óleo, que possui princípios ativos como glicerídeos, ácidos graxos e tetranortriterpenoides (TNTPS) (Meccia et al., 2013; Moya et al., 2015; Sousa et al., 2022). Na literatura, não existem dados avaliando a atividade do óleo de andiroba frente o Herpes vírus humano.

Este estudo avaliou a potencial ação antiviral do óleo de andiroba em células Vero E6 frente o HSV-1. Os resultados apresentados mostram uma análise, através de qPCR, do delta ciclo limiar (ΔCt) do HSV-1 em células Vero tratados com óleo de andiroba em duas concentrações (10 e 100 ng/mL), comparando-o com o controle positivo (células infectadas e não tratados). Para a concentração de 10 ng/mL, observe-se uma diferença significativa no ΔCt entre o grupo de tratamento com óleo de andiroba e o controle positivo, sendo que a média do ΔCt para o grupo tratado foi menor ($\mu = 0,387 \pm 0,221$). Esse valor indica que a expressão viral nas células tratadas com óleo de andiroba foi mais baixa do que nas células não tratadas, visando um possível efeito inibidor da replicação viral pelo óleo. O mesmo padrão é observado para a concentração de 100 ng/mL, onde o ΔCt do grupo de tratamento também foi significativamente menor em comparação ao controle positivo ($\mu = 0,110 \pm 0,110$). Esse valor mais baixo reflete uma ação antiviral mais eficaz do óleo de andiroba na redução da expressão viral, especialmente em concentrações mais altas. Além disso, a análise dos resultados de qPCR revelou que a atividade antiviral do óleo de andiroba foi dose-dependente, o que sugere que concentrações mais elevadas do extrato podem resultar em um efeito inibitório ainda mais significativo. Essa característica é particularmente importante, pois indica a possibilidade de otimização de dosagens para maximizar a eficácia terapêutica.

Reis (2007), ao avaliar o efeito imunomodulador e antiviral de plantas medicinais na infecção *in vitro* de monócitos humanos infectados pelo vírus DENGUE-2 (cepa 16681), demonstrou que os TNTPs isolados de *C. guianensis* diminuíram de modo significativo a produção de TNF- α e IL-10. Resultados referente a atividade antiviral não foram apresentados para monócitos infectados tratados com TNTPs isolados.

Ferraris et al. 2011 realizaram estudos *in vitro* utilizando uma fração combinada de tetranortriterpenoides (TNTPs) contendo 6 α -acetoxigedunina, 7-desacetoxi-7-oxogedunina, andirobina e metil angolensato isolados das sementes de *Carapa guianensis* com objetivo de elucidar o mecanismo de ação imunomodulatório do óleo de andiroba e os resultados demonstraram que TNTPs isolados de *C. guianensis* apresentaram efeitos inibitórios sobre os eosinófilos e linfócitos T, prejudicando diferentes mecanismos que medeiam a resposta alérgica ($p \leq 0,05$).

O uso de um controle nos ensaios de detecção da atividade antiviral permite demonstrar se esses foram realizados corretamente, sendo considerado, ainda, um padrão com o qual a atividade da amostra pode ser comparada. Idealmente, o controle positivo deve ser um fármaco anti-herpético usado clinicamente (Petersen et al., 2021). No presente estudo, o aciclovir foi utilizado como controle e apresentou o menor valor de ΔCt , porém o AO em concentrações mais altas e nas diluições virais maiores mostrou eficácia próxima dos valores do aciclovir.

Uma vantagem importante dos fitoterápicos no combate ao HSV-1 é o seu perfil de segurança, baixa toxicidade e baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência. O aciclovir, por exemplo, atua inibindo a DNA polimerase viral, uma enzima específica do HSV, e o uso prolongado ou inadequado pode levar ao surgimento de cepas resistentes (Rollenhagen et al., 2014; Hanna et al., 2022). em contraste, os compostos presentes nos fitoterápicos costumam atuar em múltiplos alvos, dificultando o desenvolvimento de resistência viral e, ao mesmo tempo, potencializando os efeitos antivirais (Li et al. 2022; Akran et al., 2018). Muitos extratos de plantas, bem como seus constituintes bioativos, demonstraram atividade antiviral sem os efeitos tóxicos marcantes dos medicamentos sintéticos (Seyedi et al., 2016; Michelini et al., 2018; Orłowski et al., 2018; Szymanska et al., 2018; Hussein & El-Anssary, 2018; Elkousy et al., 2021; Ben-Amor et al., 2021;

Cometa et al., 2022; Pavi et al., 2023; Pezzotti et al., 2023; Tarbeeva et al., 2023; Pennisi et al., 2023).

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam o potencial antiviral do óleo de andiroba (*Carapa guianensis*) contra o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), demonstrando uma significativa inibição da replicação viral em células infectadas. O uso da técnica de qPCR para quantificar a produção de DNA viral permitiu uma avaliação da atividade antiviral do óleo de andiroba, fornecendo dados quantitativos que corroboram sua eficácia. A reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) tem se destacado como uma ferramenta poderosa e amplamente utilizada para a avaliação da atividade antiviral de compostos fitoterápicos. Essa técnica, considerada o "padrão ouro" para a quantificação de ácidos nucleicos virais, oferece várias vantagens em relação a métodos tradicionais, como a alta sensibilidade, especificidade e a capacidade de detectar e quantificar diretamente o material genético viral em amostras infectadas. (Lemos, 2023; Perse da silva et al., 2015; Tavakoli et al., 2017; Diefenbach & Fraefel, 2020).

Uma das principais vantagens do qPCR em relação a métodos como a avaliação do efeito citopático ou ensaios de plaqueamento é sua rapidez e precisão. Enquanto outras técnicas podem ser limitadas pela necessidade de longos períodos de incubação e pela subjetividade na interpretação de resultados visuais, o qPCR fornece dados quantitativos confiáveis em um curto período de tempo. No entanto, embora o qPCR seja amplamente reconhecido como o "padrão ouro" para a quantificação de vírus como o HSV-1 em estudos antivirais com fitoterápicos, é fundamental seu uso em combinação com outras metodologias para uma avaliação abrangente da atividade antiviral. A integração do qPCR com técnicas como ensaios de viabilidade celular e plaqueamento garante uma análise robusta, permitindo que tanto a quantidade de vírus quanto sua infectividade sejam devidamente avaliadas (Diefenbach & Fraefel, 2020; Ishikawa et al., 2023).

5 CONCLUSÃO

Considerando o cenário atual de resistência viral, a pesquisa de alternativas baseadas em produtos naturais, como o óleo de andiroba, é de extrema relevância. O potencial desse óleo como possível agente antiviral pode não apenas oferecer novas

opções de tratamento, mas também contribuir para a formulação de terapias combinadas que ampliem a eficácia dos antivirais existentes.

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo fornecem evidências inéditas e promissoras sobre a atividade antiviral do óleo de andiroba contra o HSV-1, ressaltando a necessidade de mais estudos que esclareçam os mecanismos de ação envolvidos serão essenciais para o avanço deste óleo no campo da farmacologia antiviral.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores não tem conflitos de interesse a declarar.

REFERÊNCIAS

- Akram, M., Tahir, I.M., Shah, S.M.A., Mahmood, Z., Altaf, A., Ahmad, K., Munir, N., Daniyal, M., Nasir, S., Mehboob, H. (2018). Antiviral potential of medicinal plants against HIV, HSV, influenza, hepatitis, and coxsackievirus: A systematic review. *Phytother Res.* 32(5),811-822.
- Allahverdiyev, A.M., Bagirova, M., Yaman, S, Koc, R.C., Abamor, E.S., Ates, S.C., Baydar, S.Y., Elcicek, S., Oztel, O.N. (2013). Development of New antiherpetic drugs based on plant compounds. In: ____ RAI, M.K.; KON, K.V. Fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils and their components. 1 ed. Estados Unidos: Elsevier Inc. 2013. 291p. cap. 17, p. 245-259.
- Altındış, M., Aslan, F.G., Uzuner, H., Ünal, H., Köroğlu, M., Kulaç, S., Karadenizli, A. (2020). Comparison of Antiviral Effect of Olive Leaf Extract and Propolis with Acyclovir on Herpes Simplex Virus Type 1. *Mikrobiyol Bul.* 4(1),79-94.
- Amorim, M. F., Almeida, W. L. dos S., Sousa, J. C. de, Bandeira, J. M. A., Júnior, M. da R. O., Andrade, S. M. de, Taminato, R. L., Oliveira, E. H.. (2022). Estudo etnofarmacológico de plantas medicinais utilizadas pela população do estado do Pará, Brasil / Ethnopharmacological study of medicinal plants used by the population of the state of Pará, Brazil. *Brazilian Journal of Development*, 8(1), 3033–3052.
- Andrade, S.M., Costa, P.R.C., Rosa, L.M.V., Pires, L.G.F., Rodrigues Ítalo, S.M., Taminato, R.L., Oliveira, E.H. (2022). Hospitalizações e óbitos associados à infecção pelo vírus Herpes Simplex (HSV) no Brasil de 2012 a 2021. 11(4):e58511427737.
- Araújo-Lima, C.F. et al. (2018). Antioxidant activity and genotoxic assessment of crabwood (Andiroba, *Carapa guianensis* Aublet) seed oils. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. ID 3246719.

- Benassi-Zanqueta, E., Marques, C.F., Valone, L.M., Pellegrini, B.L., Bauermeister, A., Ferreira, I.C.P., Lopes, N.P., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., Natali, M.R.M., Ueda-Nakamura, T. (2018). Evaluation of anti-HSV-1 activity and toxicity of hydroethanolic extract of *Tanacetum parthenium* (L.) Sch.Bip. (Asteraceae). *Phytomedicine*. 1(55),249-254.
- Ben-Amor, I. et al. (2021). Phytochemical characterization of *Olea europea* leaf extracts and assessment of their anti-microbial and anti-HSV-1 activity. *Viruses Basel*. 13(6), 1085.
- Bilia, A.R., Vanti, G., Bergonzi, M.C., Risaliti, L., Asprea, M., Piazzini, V. (2018). Plants Extracts Loaded in Nanocarriers: An Emergent Formulating Approach. *Natural product communications*. 13, 1097-1234.
- Cometa, S. et al. Natural formulations based on *Olea europaea* L. fruit extract for the topical treatment of HSV-1 infections. *Molecules*. 27(13), 4273, 2022.
- Crimi, S., Fiorillo, L., Bianchi, A., D'Amico, C., Amoroso, G., Gorassini, F., Mastroieni, R., Marino, S., Scoglio, C., Catalano, F., Campagna, P., Bocchieri, S., De Stefano, R., Fiorillo, M.T., Cicciù, M. (2019). Herpes Virus, Oral Clinical Signs and QoL: Systematic Review of Recent Data. *Viruses*. 11(5),463.
- Diefenbach, R. J.; Fraefel, C. (2020). *Herpes Simplex Virus: Methods and Protocols*. 2. ed. New York: Springer.
- Elkousy, R. H. et al. Antiviral activity of castor oil plant (*Ricinus communis*) leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 271, 113878.
- Ferraris, F.K., Rodrigues, R., da Silva, V.P., Figueiredo, R., Penido, C., Henriques, M. (2021). Modulation of T lymphocyte and eosinophil functions *in vitro* by natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet. *Int Immunopharmacol*. 11(1),1-11.
- Gabaglio, S., Alvarenga, N., Cantero-González, G., Degen, R., Ferro, E.A., Langjahr, P., Chnaiderman, J., Sotelo, P.H. (2021). A quantitative PCR assay for antiviral activity screening of medicinal plants against Herpes simplex 1. *Nat Prod Res*. 35(17):2926-2930.
- Hanna, H. S.; Schalkwijk, R.; Snoeck, R.; Andrei, G. Acyclovir resistance in herpes simplex viruses: Prevalence and therapeutic alternatives. (2022). *Biochemical Pharmacology*. 206.
- Hussein, A., El-Anssary, A. A. (2019). Plantas metabólitos secundários: os principais motores das ações farmacológicas de plantas medicinais. In: *Medicina Herbal. IntechOpen*. DOI: 10.5772/intechopen.76139.
- IBM. (2012). *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 28.0*. Armonk, NY: IBM Corp.
- Ishikawa, H. et al. Herpes simplex virus: diagnostic advances and clinical implications. *Journal of Clinical Virology*. 150, 105093.
- James, C., Harfouche, M., Welton, N.J., Turner, K.M., Abu-Raddad, L.J., Gottlieb, S.L., Looker, K.J. (2016) Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates. *Bull World Health Organ*. 2020. 98(5):315-329.

- Kikuchi, T., Akita, K., Koike, H., Yasuko, E., Yamada, Y., Tanaka, R. (2020). Carapanins A–C: new limonoids from andiroba (*Carapa guianensis*) fruit oil. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 18, 9268-9274.
- Lemos, E. R. S., Villar, L. M., Leon, L. A. A., Guimarães, M. L., Teixeira, S. L. M., Paula, V. S. (2023). *Tópicos em Virologia [online]*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 306 p. BIO collection. ISBN: 978- 65-5708-151-8.
- Li, J., Cheng, C., Lin, T., Xue, R., Liu, X., Wu, K. (2022). Efficacy of sodium polyanethol sulfonate on herpes simplex virus-1 infection *in vitro*. *Mol Vis*. 28,516-525.
- Looker, K.J., Magaret, A.S., May, M.T., Turner, K.M., Vickerman, P., Gottlieb, S.L., Newman, L.M. (2015). Global and regional estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 1 infections in 2012. *PLoS One*. 10,10.
- McAllister, S.C., Schleiss, M.R (2014). Prospects and perspectives for development of a vaccine against herpes simplex virus infections. *Expert Rev Vaccines*. 13(11),1349-60.
- Meccia, G., Quintero-Rincón, P., Rojas, L., Alfredo, U., Velasco, J., et al. (2013). Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Carapa guianensis* collected from Venezuelan Guayana and the antimicrobial activity of the oil and crude extracts. *Nat Prod Commun*. 8,1641-1642.
- Meneguetti, N.F.S.P., Meneguetti, D.U.O., Siviero, A. (2019). Biotechnological potential of the *Carapa guianensis*, *Bertholletia excelsa* and *Copaifera spp*. *Oils Journal of Medicinal Plants Research*. 13(17), 413-422.
- Mohan, S., Elhassan Taha, M.M., Makeen, H.A., Alhazmi, H.A., Al Bratty, M., Sultana, S., Ahsan, W., Najmi, A., Khalid, A. (2020). Bioactive Natural Antivirals: An Updated Review of the Available Plants and Isolated Molecules. *Molecules*. 25(21),4878.
- Moya, S., Taha, M., Makeen, H., Alhazmi, H., Bratty, M., Sultana, S., Ahsan, W., Najmi, A., Kalid, A. (2020). Bioactive natural antivirals: an updated review of the available plants and isolated molecules. *Molecules*. 25, 4878.
- Nascimento, H., Watanabe, A., Vieira, A.C.C., Pelegri, A., Yu, M.C., Bispo, P.J.M., Granato, C.F.H., Höfling-Lima, A.L. (2017). Detection of herpes simplex-1 and -2 and varicella zoster virus by quantitative real-time polymerase chain reaction in corneas from patients with bacterial keratitis. *Arq Bras Oftalmol*. 80(2):84-87.
- Nardi, M., Lira-Guedes, A. C., Cunha, H. F., Guedes, M.C., Mustin, K., Gomes, S.C.P. (2016). Artisanal extraction and traditional knowledge associated with medicinal use of crabwood oil (*Carapa guianensis* Aublet.) in a peri-urban várzea environment in Amazon Estuary. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*. 1-12.
- Nontato, O.C,S, et al. (2018). Identificando os usos terapêuticos da *Carapa guianensis*. *Enciclopédia Biosfera*. 15(28).
- Oliveira, I.D.S.D.S., Moragas Tellis, C.J., Chagas, M.D.S.D.S., Behrens, M.D., Calabrese, K.D.S., Abreu-Silva, A.L., Almeida-Souza, F. (2018). *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) Seed Oil: Chemical Composition and Antileishmanial Activity of Limonoid-Rich Fractions. *Biomed Res Int*. 6, 5032816.

- Orłowski, P., Kowalczyk, A., Tomaszewska, E., Ranhoszek-Soliwoda, K., Węgrzyn, A., Grzesiak, J., et al. (2018). Antiviral activity of tannic acid modified silver nanoparticles: Potential to activate immune response in herpes genitalis. *Viruses*. 10(10), 524.
- Parham, S., Kharazi, A.Z., Bakhsheshi-Rad, H.R., Nur, H., Ismail, A.F., Sharif, S., RamaKrishna, S., Berto, F. (2020). Antioxidant, Antimicrobial and Antiviral Properties of Herbal Materials. *Antioxidants (Basel)*. 9(12),1309.
- Pavi, C.P., Pra, I.D., Cadamuro, R.D., Kanzaki, I., Lacerda, J.W.F., Sandjo, L.P., Bezerra, R.M., Segovia, J.F.O., Fongaro, G., Silva, I.T. (2023). Amazonian medicinal plants efficiently inactivate Herpes and Chikungunya viruses. *Biomed Pharmacother*. 167:115476.
- Pennisi, R., Trischitta, P., Tamburello, M.P., Barreca, D., Mandalari, G., Sciortino, M.T. Mechanistic Understanding of the Antiviral Properties of Pistachios and Zeaxanthin against HSV-1. 15(8), 1651.
- Perse da Silva, A., Oliveira, M. L., Ferreira, T. A. (2015). Herpes simplex virus: Clinical manifestations and treatment approaches. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 19(4), 385-392.
- Petersen, E.J., Nguyen ,A., Brown, J., Elliott, J.T., Clippinger, A., Gordon, J., Kleinstreuer, N., Roesslein, M. (2021). Characteristics to consider when selecting a positive control material for an *in vitro* assay. *ALTEX*. 38(2), 365-376.
- Pezzotti, G., et al. (2023). Instantaneous inactivation of herpes simplex virus by silicon nitride bioceramics. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(16), 12657.
- Piret, J., Boivin, G. (2016). Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections: diagnosis and management. *Curr Opin Infect Dis*. 29(6), 654-662.
- Porfírio-Dias, C.L., Melo, K.M., Bastos, C.E.M.C., Ferreira, T.A.A., Azevedo, L.F.C., Salgado, H.L., Santos, A.S., Rissino, J.D., Nagamachi, C.Y., Pieczarka, J.C. (2020). Andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl) shows cytotoxicity but no mutagenicity in the ACPP02 gastric cancer cell line. *J Appl Toxicol*. 40(8), 1060-1066.
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., Lin, X. (2013). An improvement of the 2^{-delta delta CT} method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*. 3(3), 71-85.
- Reis, S.R.N.I. (2017). Efeito imunomodulador e antiviral de plantas medicinais na infecção *in vitro* de monócitos humanos pelo vírus DENGUE-2 [Tese]: Fundação Oswaldo Cruz.
- Ribeiro, C.D.B., Costa, P.A., Lima, S.R.V., Silva, M.T. Marcos. (2021). O uso medicinal de *Carapa guianensis* Abul. (Andiroba). *Research, Society and Development*. 10(15), e391101522815.
- Santos, K. I. P., Benjamim, J. K. F., Costa, K. A. D., Reis, A. S., Pinheiro, W. B. S., Santos, A. S., et al. (2021). Metabolomics techniques applied in the investigation of phenolic acids from the agro-industrial by-product of *Carapa guianensis* Aubl. *Arabian Journal of Chemistry*. 11, 103421.

- Seyedi, S., Shukri, M., Hassandarvish, P., et al. (2016). Computational approach towards exploring potential anti-Chikungunya activity of selected flavonoids. *Scientific Report*. 6, 24027.
- Silva, L.R. (2018). Propriedades físico-químicas e perfil dos ácidos graxos do óleo da andiroba. *Nativa*. 6, 147.
- Soares, A.D.S., Wanzeler, A.M.V., Cavalcante, G.H.S., Barros, E.M.D.S., Carneiro, R.C.M., Tuji, F.M. (2021). Therapeutic effects of andiroba (*Carapa guianensis* Aubl) oil, compared to low power laser, on oral mucositis in children undergoing chemotherapy: A clinical study. *Journal of Ethnopharmacology*. 264, 113365.
- Sousa, R.L., Silva, S.G., Costa, J.M., Costa, W.A., Maia, A.A.B., Oliveira, M.S., Andrade, E.H.A. (2022). Chemical profile of manually extracted andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl., *Meliaceae*) from Mamangal community, located in Igarapé-Miri, Pará, Brazil. *Scientia Plena*. 17(12).
- Swamy, M.K., Akhtar, M.S., Sinniah, U.R. (2016). Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. *Evid Based Complement Alternat Med*. 3012462.
- Szymańska, E., Orłowski, P., Winnicka, K., Tomaszewska, E., Bąska, P., Celichowski, G., et al. (2018). Multifunctional tannic acid/silver nanoparticle-based mucoadhesive hydrogel for improved local treatment of HSV infection: *In vitro* and *in vivo* studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 19, 387.
- Tavakoli, N. P., Mohammadi, M., Ebrahimi, S. (2017). Herpes simplex virus: molecular biology and pathogenesis. *Journal of Virology Research*. 9, 45-58.
- Xu, L., Zhong, X.L., Xi, Z.C., Li, Y., Xu, H.X. (2022). Medicinal plants and natural compounds against acyclovir-resistant HSV infections. *Front Microbiol*. 10(3), 1025605.

ANEXO 1 – Certificado de análise

AmazonOil
The Rain Forest Company

Preserving the future
Amazon Oil Industry

CERTIFICADO DE ANÁLISE (CDA)

OLEO VIRGEM DE ANDIROBA

Nome científico: <i>Carapa guianensis</i>	Código do produto: 019
Origem da matéria prima: Floresta Amazônica / Brasil	Número do lote: AAO 019 - 010/07/2022
Parte utilizada da planta: polpa da fruta	Data de fabricação: 01/07/2022
Processo produtivo: prensado a frio	Número de análise: 255/07/2022
Conservantes: ausente	Validade: 24 meses
Extração com solvente: ausente	Rastreabilidade: Garantida
Origem das espécies vegetais: controlada	

ITEM	UNIDADE	ESPECIFICAÇÕES	MÉTODOS	RESULTADOS
COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA				
Aparência (25°C)	---	Líquido	Organoléptico	De acordo
Cor	---	Amarillo para naranjas	Organoléptico	De acordo
Odor	---	Característico	Organoléptico	De acordo
Índice de acidez	mg KOH/g	< 30	AOCS CD1D-63	9,42
Índice de peróxido	mg O ₂ /kg	< 15	AOCS CD8 - 53	4,78
Índice de sódio	g/100g	55 - 80	AOCS TG2A - 64	70
Índice de saponificação	mg KOH/g	190 - 210	AOCS CD5 - 25	191,7
Densidade(25°C)	g/mL	0,900 - 0,930	AOCS 18C-95	0,917
Matéria insolubilizável	%	3 - 5	AOCS CA 6A - 43	De acordo
Ponto de fusão	°C	22	AOCS CC1 - 25	De acordo
MICROBIOLOGIA				
Bactérias totais	Ufc/ml	<10 ⁷	NF ISO 4833	Ausente
Fungos e leveduras	Ufc/ml	<2.10 ⁷	NF V 08-036	Ausente
RESULTADOS: (X) APROVADO () REPROVADO				

Sérgio F. Moreira

SÉRGIO FERNANDO LOBATO MOREIRA
Eng. Químico Perito/ Gestor e Avaliador
CREA 12035 D/PA CRQ 06380056-IV REG

ANEXO 2 – Parecer CEP UFPA

<p>UFPA - INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ</p> 																
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP																
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA																
Título da Pesquisa: Avaliação in vitro do potencial de atividade antiviral do extrato de Andiroba (<i>Carapa guianensis</i>) frente ao Herpes Simples vírus - Tipo 1 (HSV-1). Prospectivas de uso clínico.																
Pesquisador: Fabrício Mesquita Tuji																
Área Temática:																
Versão: 2																
CAAE: 63953622.9.0000.0018																
Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará																
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio																
DADOS DO PARECER																
Número do Parecer: 6.055.046																
Apresentação do Projeto:																
<p>O herpes simples é uma infecção causada pelo vírus herpes humano (HSV), e é uma das infecções mais comuns aos seres humanos. O HSV-1 é geralmente responsável por infecções na face e no tronco. A saliva contaminada constitui um veículo eficiente para a transmissão do HSV-1, além do eventual contato com as secreções herpéticas em pessoas que apresentem clinicamente a doença. A <i>Carapa guianensis</i>, conhecida popularmente como Andiroba, é uma árvore da família Meliaceae de grande porte, encontrada na região Amazônica. O óleo de Andiroba é extraído através da prensagem de suas sementes e possui as principais substâncias biologicamente ativas e proporcionam inúmeros efeitos, em especial os efeitos anti-inflamatórios. Este conjunto de características despertou a atenção de alguns pesquisadores para estudar a ação da Andiroba em diversos tratamentos, entretanto até o momento não há nenhuma pesquisa que busque como uma opção alternativa para lesões orais por HSV-1 e o uso de fitoterápicos, e nenhum estudo evidenciou o efeito e a eficácia do uso do óleo de andiroba nestas lesões, sendo assim, esse trabalho seria o pioneiro a avaliar estas características antivirais e a viabilidade celular. O objetivo deste estudo é avaliar a potencial atividade antiviral do extrato de Andiroba (<i>Carapa guianensis</i> Aubl.) frente ao HSV-1. Trata-se de um estudo laboratorial experimental, com coleta de 5 amostras (esfregaço) de pacientes que possuam lesão labial herpética em estágio inicial ativa (primeiras 24h do início dos sintomas até</p>																
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="4">Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01- Campus do Guamá, UFPA- Faculdade de Enfermagem do ICS - sala 13 - 2º and.</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Bairro: Guamá</td> <td colspan="2">CEP: 66.075-110</td> </tr> <tr> <td>UF: PA</td> <td>Município: BELEM</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (91)3201-7735</td> <td>Fax: (91)3201-6028</td> <td colspan="2">E-mail: cepccs@ufpa.br</td> </tr> </table>	Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01- Campus do Guamá, UFPA- Faculdade de Enfermagem do ICS - sala 13 - 2º and.				Bairro: Guamá		CEP: 66.075-110		UF: PA	Município: BELEM			Telefone: (91)3201-7735	Fax: (91)3201-6028	E-mail: cepccs@ufpa.br	
Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01- Campus do Guamá, UFPA- Faculdade de Enfermagem do ICS - sala 13 - 2º and.																
Bairro: Guamá		CEP: 66.075-110														
UF: PA	Município: BELEM															
Telefone: (91)3201-7735	Fax: (91)3201-6028	E-mail: cepccs@ufpa.br														
<small>Página 01 de 04</small>																

UFPA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARÁ



Continuação do Parecer: 8.055.048

antes da lesão crônica), as quais passarão por extração de DNA do vírus e PCR para identificação do HSV-1. Em seguida será avaliado a toxicidade aguda (LC50) e efeitos comportamentais da Andiroba (Carapa Guianenses) frente ao Herpes Vírus Simples- tipo 1, avaliação da ação virucida direta do óleo de andiroba frente ao HSV-1 em cultivo celular permissivo a infecção por HSV-1 e avaliação do efeito anti-viral do óleo de andiroba nas fases iniciais da infecção, adsorção, pós-adsorção e penetração viral e por fim a interferência das amostras selecionadas na expressão proteica do HSV-1. Os dados serão analisados e tabulados, e passarão por análise estatística considerando nível de significância em 5% (p0.05) e poder de 80% .

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a potencial atividade antiviral do extrato de Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) frente ao HSV-1.

Objetivo Secundário:

- Avaliar as propriedades citotóxicas e efeitos comportamentais do extrato de andiroba, através determinação da LC 50 em um modelo in vitro de infecção pelo HSV-1;- Avaliar as propriedades citotóxicas e efeitos comportamentais do extrato de andiroba, determinando o potencial citotóxico de dosagens subletais do mesmo em um modelo in vitro de infecção pelo HSV-1;- Verificar se as propriedades citotóxicas do extrato de andiroba que apresentam diferenças entre células infectadas com HSV-1 em relação a células não infectadas; - Realizar a triagem antiviral em diferentes concentrações do óleo de andiroba, frente ao vírus HSV-1, por meio do ensaio de redução do número das placas de lise; - Avaliar a ação virucida direta do óleo de andiroba frente ao HSV-1 em cultivo celular permissivo a infecção por HSV-1; - Avaliar o efeito anti-viral do óleo de andiroba nas fases iniciais da infecção, adsorção, pós-adsorção e penetração viral; - Avaliar os efeitos do tempo de adição do óleo de andiroba na atividade anti-herpética (pré-tratamento e tratamento simultâneo); - Avaliar a interferência das amostras selecionadas na expressão proteica do HSV-1;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Dos riscos da pesquisa, elege-se como principal a quebra de sigilo dos pacientes da amostra que, por mais que a colheita da amostra seja indolor, pode estar passivo de vazamentos de dados.

Benefícios:

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01- Campus do Guamá ,UFPA- Faculdade de Enfermagem do ICS - sala 13 - 2º and.
Bairro: Guamá CEP: 66.075-110
UF: PA Município: BELEM
Telefone: (91)3201-7735 Fax: (91)3201-8028 E-mail: cepccs@ufpa.br

**UFPA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARÁ**



Continuação do Parecer: 8.055.048

Dos benefícios propostos, cita-se como possível vantagem (se caso obtivermos resultados positivos do extrato de Andiroba em relação ao HSV-1), a futura realização da etapa clínica desta pesquisa, passível de comprometimento na criação de um fármaco para tratamentos de doenças relacionadas ao vírus na Odontologia. No entanto, também como vantagem (se caso os resultados não sejam positivos do extrato de Andiroba em

relação ao HSV-1), apresentaremos resultados inéditos obtidos com esta pesquisa de um potencial fitoterápico e o Herpes Vírus, assim sendo serão as informações fornecidas, aos profissionais da saúde, em especial para a medicina e odontologia trazendo, conhecimento acerca do assunto como possíveis novas pesquisas no ramo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo encaminhado dispõe de metodologia e critérios definidos conforme a resolução 466/12 do CNS/MS. Trata ainda em resolver pendências citadas no parecer nº5.761.060, que depois de ser avaliado por este colegiado entende-se como, pendências resolvidas e aceitas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados, nesta versão, contemplam os sugeridos pelo sistema CEP/CONEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, somos pela aprovação do protocolo. Este é nosso parecer, SMJ.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1702426.pdf	30/01/2023 10:54:10		Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_MODIFICADA.pdf	30/01/2023 10:53:07	ANA CRISTINA CARDOSO SANTOS	Aceito
Outros	DECLARCAO_DE_ISENCAO_DE_ONUS.pdf	30/01/2023 10:52:19	ANA CRISTINA CARDOSO SANTOS	Aceito
Solicitação registrada pelo CEP	CARTA_DE_ENCAMINHAMENTO.pdf	30/01/2023 10:51:25	ANA CRISTINA CARDOSO SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_MODIFICADO.pdf	30/01/2023 10:49:08	ANA CRISTINA CARDOSO SANTOS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_ACEITE_MODIFICADO.pdf	30/01/2023 10:48:36	ANA CRISTINA CARDOSO SANTOS	Aceito

Endereço: Rua Augusto Corrêa nº 01- Campus do Guamá, UFPA- Faculdade de Enfermagem do ICS - sala 13 - 2º and.
Bairro: Guamá CEP: 66.075-110
UF: PA Município: BELEM
Telefone: (91)3201-7735 Fax: (91)3201-8028 E-mail: cepccs@ufpa.br

**UFPA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARÁ**



Continuação do Parecer: 6.055.048

Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_COMPROMISSO_MODIFICADO.pdf	30/01/2023 10:48:04	ANA CRISTINA CARDOSO SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTA_DE_ANUENCIA_MODIFICADA.pdf	30/01/2023 10:47:35	ANA CRISTINA CARDOSO SANTOS	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_MODIFICADO.pdf	30/01/2023 10:47:17	ANA CRISTINA CARDOSO SANTOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DE_PESQUISA.pdf	30/01/2023 10:47:01	ANA CRISTINA CARDOSO SANTOS	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	26/08/2022 18:42:04	ANA CRISTINA CARDOSO SANTOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELEM, 11 de Maio de 2023

Assinado por:

Wallace Raimundo Araujo dos Santos
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Augusto Cordeiro nº 01- Campus do Guamá ,UFPA- Faculdade de Enfermagem do ICS - sala 13 - 2º and.
Bairro: Guamá CEP: 66.075-110
UF: PA Município: BELEM
Telefone: (91)3201-7735 Fax: (91)3201-8028 E-mail: cepccs@ufpa.br