

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Maria Antônia Cabral Monteiro

**Avaliação da atividade anti-herpética
do exsudato de *Salvia uliginosa* e do
diterpeno icetexona**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2023**

Maria Antônia Cabral Monteiro

Avaliação da atividade anti-herpética do exsudato de *Salvia uliginosa* e do diterpeno icetexona

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dr. Luiz Carlos Rodrigues Júnior
Coorientador: Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão

Porto Alegre
2023

Ficha Catalográfica

Catálogo na Publicação

Monteiro, Maria Antonia Cabral

Avaliação da atividade anti-herpética do exsudato de *Salvia uliginosa* e do diterpeno icetexona / Maria Antonia Cabral Monteiro. -- 2024.

47 f. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2024.

Orientador(a): Luis Carlos Rodrigues Junior ;
coorientador(a): Pedro Roosevelt Torres Romão.

1. Herpes genital. 2. Antiviral. 3. *Salvia*. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

INTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunovirologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) e no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Recebeu auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e da UFCSPA.

Dedicatória



Ao meu pai Mario Piffero Monteiro Filho, meu avô Mario Piffero Monteiro e minha tia Maria Cristina Monteiro Schenini, que começaram essa jornada ao meu lado, mas hoje me acompanham de longe

Agradecimentos

Agradeço a minha família e meus amigos que me ajudaram a não desistir e comemoram comigo a finalização de mais uma jornada.

Aos meus colegas e professores, devo um agradecimento especial. Suas lições e orientações foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Em particular, quero estender minha gratidão a Alexia e Diogo, que me proporcionaram a oportunidade de compartilhar meu conhecimento, orientá-los e transmitir tanto teoria quanto prática ao longo deste percurso e ao Paulo, por toda paciência e auxílio!

Sumário

1	Introdução	13
2	HSV-2	15
2.1	Resposta Imune ao HSV-2	19
3	gênero <i>Salvia</i>	21
3.1	Atividade Antiviral de espécies de <i>Salvia</i>	22
4	OBJETIVOS	25
5	ARTIGO CIENTÍFICO	26
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	42
9	REFERÊNCIAS	42

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

µg - Micrograma

µM – Micromolar

µL – Microlitros

A_{AM} – Absorbâncias das amostras

A_{CC} – Absorbâncias dos controles celulares

ACV – Aciclovir

ANOVA – Análise de variância

CC₅₀ - Concentração citotóxica da droga que reduz o número celular viável em 50%

CD – Domínio Cluster

Células NK – Células natural killer

CO₂ – Dióxido de carbono

DC – Célula dendrítica

DMEM – Meio de Eagle Modificado por Dulbecco

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EC₅₀ – Concentração que promove metade da resposta máxima

FURG – Universidade Federal do Rio Grande

g – glicoproteína

H1N1 – Gripe Suína

HCF-1 – Fator celular do hospedeiro

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HLA – Sistema antígeno leucocitário humano

HPV – Vírus do Papiloma humano

HSPG – 3-O proteoglicano sulfato de heparano

HSV – Herpes Simplex Vírus

HSV-1 – Herpes Simplex Vírus tipo 1

HSV-2 – Herpes Simplex Vírus tipo 2

HVEM – Receptor mediador de entrada do herpesvirus

ICP – Proteína infectada celular

ICT – Icetexona

IC₅₀ – Concentração de um inibidor em que a resposta é reduzida pela metade

IFN – Interferon

Ig - Imunoglobulina
IL - Interleucina
IKK ϵ – Inibidor de NF κ B epsilon
IRF – Fator regulador de Interferon
IsoICT – Isoicetexona
IST – Infecção sexualmente transmissível
LAT – Transcritos associados à latência
M₅₂₂ – Ácido litospermico
M₅₃₂ – Ácido litospermico B
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
mL – Mililitros
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio
NF κ B – Fator nuclear kappa B
nm – Nanômetros
OCT-1 – Octâmero 1
PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos
PBS – Tampão fosfato-salino
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PFU – Unidade formadora de placas
PMNs – Neutrófilos polimorfonucleares
PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões
RAW 264.7 – Linhagem celular de macrófagos
RNA – Ácido ribonucleico
RNA_m – RNA mensageiro
SFB – Soro Fetal Bovino
SI – Índice seletivo
TBK-1 – Tank binding kinase 1
TCD – Linfócito T CD
TCM – Células T de memória central
Te – Células T efectoras
Th – Células T helper
TLR – Receptor do tipo toll like
TM – Células de memória
TMC – Células de memória circulantes

TK – Timidina quinase

TRM – Células T residentes de memória

UL – Sequências não traduzidas

UFCSPA – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

US – Segmento único curto

UV – Luz ultravioleta

VERO – Células epiteliais renais extraídas de um macaco verde africano

VP – Proteína viral

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VÍRION DO HSV-2.	16
FIGURA 2 - MECANISMO DE ADSORÇÃO E PENETRAÇÃO DOS HSV.	17
FIGURA 3 - CICLO LÍTICO DA REPLICAÇÃO DO HSV EM UMA CÉLULA.	18
FIGURA 4 - LATÊNCIA DO HSV-2.	19
FIGURA 5 - PLANTA <i>SALVIA ULIGINOSA</i>	23
FIGURA 6 - GLÂNDULAS (TRICOMAS) PRESENTE NAS FOLHAS DE <i>SALVIA ULIGINOSA</i>	35

Apresentação

Prezado leitor,

Essa dissertação será apresentada no formato de artigo científico. A primeira parte é constituída por uma revisão bibliográfica dos aspectos epidemiológicos e imunopatológicos dos Herpes Simples Vírus. Na segunda parte foi adicionado o manuscrito *Anti-herpetic activity evaluation of Salvia uliginosa exudate and Icetexone diterpene*, conforme normas estruturais da revista científica JOURNAL OF APPLIED PHARMACOGNOSY AND PHYTOCHEMISTRY (normas no link abaixo). A terceira parte é constituída pela discussão com informações adicionais, não apresentadas no artigo, e conclusão final.

Link para normas da Revista JOURNAL OF APPLIED PHARMACOGNOSY AND PHYTOCHEMISTRY:

<https://www.joapponline.com/index.php/joapp/about/submissions>

Resumo

Herpes Simples Virus-2 (HSV-2) é um vírus dermatotrópico. Estudos recentes indicam que a porcentagem de indivíduos infectados pelo HSV-2 no Brasil é em média 11,3% e estima-se que cerca de 90% da população mundial possui sorologia positiva por um ou ambos os vírus. O HSV-2 também é uma infecção sexualmente transmissível que ocasiona sérios problemas em indivíduos com sistema imunológico debilitado ou sob tratamento imunossupressor, ou ainda quando é transmitido durante o parto. Os antivirais já existentes para o tratamento não atuam na latência do vírus e já existem cepas resistentes ao aciclovir, principal fármaco utilizado. Tratamentos com derivados de plantas têm apresentado eficácia contra o herpes, em modelos *in vitro* e *in vivo*. Algumas espécies de *Salvia* já foram estudadas frente a vírus e outros microrganismos. Análises publicadas pelo nosso grupo demonstraram que *Salvia uliginosa* apresenta uma atividade significativa frente a *Leishmania amazonensis*, um parasita intracelular responsável por causar leishmaniose. Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar o possível efeito anti-herpético de *Salvia uliginosa* frente ao HSV-2 *in vitro*. *Salvia uliginosa* foi coletada e identificada por um botânico. O exsudato da planta e o composto majoritário, o diterpeno icetexona (ICT), foram obtidos no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A ICT foi isolada no mesmo laboratório, por cromatografia em coluna de gel de sílica. A técnica de MTT foi utilizada na linhagem celular VERO para a análise da citotoxicidade dos extratos e composto isolado, determinando os valores de IC₅₀ e CC₅₀. O efeito virucida das amostras no HSV-2 foi avaliado por ensaio de placa. Os resultados indicaram que o exsudato de *S. uliginosa* possui atividade anti-herpética *in vitro*, com CC₅₀ de 193,5µg/mL, embora a ICT não. São necessários experimentos adicionais *in vitro* para elucidar o mecanismo de ação, e *in vivo* para testar a hipótese anti-herpética da *Salvia uliginosa* no hospedeiro infectado.

Palavras-chaves: Herpes genital. Antiviral. *Salvia*. Citotoxicidade.

Abstract

Herpes Simplex Virus-2 (HSV-2) is a dermatropic virus. Recent studies indicate that the percentage of HSV-2 infections in Brazil averages 11.3%, and it is estimated that about 90% of the world's population has positive serology for one or both viruses. HSV-2 is a sexually transmitted infection that leads to serious problems in individuals with a weakened immune system or undergoing immunosuppressive treatment. Furthermore, primo-infection or recurrence infections present a high risk of transmission from mother to child during delivery. The existing antiviral treatments are not effective during the latency phase and some strains are already resistant to the primarily used drug acyclovir. Therapies with plant derivatives have proven to be effective in the treatment of herpes. Some species of *Salvia* have already been studied and demonstrated efficacy against viruses and other microorganisms. Analyses published by our group demonstrated that *Salvia uliginosa* exhibits significant activity against *Leishmania amazonensis*, an intracellular parasite responsible for causing Leishmaniasis. Our objective was to evaluate and characterize the possible anti-herpetic effect of *Salvia uliginosa* against HSV-2 *in vitro*. *Salvia uliginosa* was collected and identified by a botanist. The plant exudate and the major compound, the diterpene icetexone (ICT), were obtained in the Pharmacognosy Laboratory of the Federal University of Rio Grande do Sul. The ICT was isolated in the same laboratory by column chromatography in silica gel. The MTT technique was used on the VERO cell line to analyze the cytotoxicity of the extracts and isolated compound, determining the IC₅₀ and CC₅₀ values. A plaque assay was used to evaluate the virucidal effect of the plant exudate and ICT on HSV-2. The results indicated that the exudate of *S. uliginosa* has anti-herpetic activity, with CC₅₀ of 193,5µg/mL, although ICT doesn't. Additional experiments are needed *in vitro* to elucidate the mechanism of action, and *in vivo* to test the antiherpetic hypothesis of *Salvia uliginosa* in the infected host.

Keywords: Genital herpes. Antiviral. *Salvia*. Cytotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

Os Vírus Herpes Simples (HSV), HSV-1 e o HSV-2, pertencem a família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e do gênero *Simplexvirus*. A prevalência das infecções causadas por HSV-1 é cerca de 60% a 80% na população mundial, variando conforme alguns fatores como a idade, etnia, localização geográfica e situação socioeconômica da população estudada (1,2). De acordo com Xu et al., cerca de 90% da população mundial possui sorologia positiva para um ou ambos os vírus. Após a primo-infecção, o HSV permanece em estado de latência, sendo reativado em situações como estresse, exposição à radiação ultravioleta (UV), imunodepressão entre outras (3,4). Clemens e Fahart em 2010 mostraram que a taxa de infecção pelo HSV-2 no Brasil é em média 11,3%, e em 2013 uma pesquisa realizada na Fundação Universidade de Rio Grande (FURG) mostrou que de 158 mulheres que haviam recebido assistência na Unidade Básica de Saúde e 144 que foram atendidas na FURG, a prevalência de HSV-2 nestes grupos foi de 10,8 e 20,8%, respectivamente (5,6). O HSV-2 é uma infecção sexualmente transmissível (IST) bastante comum, e apresenta alto risco de infecção da mãe para o filho durante o nascimento, além de aumentar o risco da infecção pelo HIV (3,7).

Atualmente, não existe nenhuma vacina disponível para prevenção dos HSVs. Os antivirais já existentes para o tratamento, como o aciclovir e panciclovir, não atuam na latência do vírus e muitas vezes acabam sendo ineficazes em pacientes que possuem imunodepressão e nos quais o vírus desenvolve resistência ao fármaco (8). Na literatura encontra-se que o uso contínuo de aciclovir, além de poder resultar na resistência, pode causar problemas renais. Os medicamentos tópicos como o ganciclovir são alternativas, mas mostram baixo tempo de retenção na córnea e na mucosa vaginal, demandando que o paciente reaplique diversas vezes o produto (9).

Salvia é o gênero de plantas da família *Lamiaceae* mais abundante, com mais de 900 espécies. Muitas espécies de *Salvia* já foram estudadas, inúmeras dessas demonstraram atividade antimicrobiana, incluindo a antiviral (10). No caso de HSV-1 e HSV-2, Nolkemper et al. analisaram o efeito da *Salvia officinalis* L. contra esses dois vírus *in vivo*. Eles adicionaram os extratos aquosos durante o período de adsorção do vírus, e observaram que o número de unidades de formação de placas diminuiu em ambos os vírus (11). Já em 2016, Cagno et al., publicaram o efeito antiviral do óleo

essencial de *Salvia desoleana* Atzei & V. Picci frente ao HSV-2, ocorrendo uma supressão significativa da replicação HSV-2 (8).

Diante disso, é de grande importância o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento aos HSVs, principalmente aqueles baseados em produtos de origem vegetal, que podem apresentar baixa toxicidade e custo para uso da população. Assim, no presente trabalho foi avaliado o efeito antiviral do exsudato da espécie *Salvia uliginosa* e da icetexona, composto majoritário, frente ao HSV-2, utilizando modelo *in vitro*.

2 HSV-2

A infecção por HSV-2 apresenta transmissão comunitária, assim como também é uma IST, sendo normalmente associada a lesões genitais ou orais, além de uma maior susceptibilidade para contrair outras infecções, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o papiloma vírus humano (HPV) (9,12). O indivíduo infectado pode sentir ardor, prurido e formigamento antes das erupções na pele, esses sintomas aparecem em média 4 a 7 dias após o contato, ou na reativação (13).

O tropismo do HSV-2 é, inicialmente, células epiteliais e, posteriormente, os neurônios, entretanto, de forma não preferencial, também podendo infectar outros tipos celulares, como fibroblastos e linfócitos. A presença dos vírions no citoplasma induz uma fusão e integração entre células vizinhas e adjacentes, que formam estruturas multinucleadas gigantes, característica da análise citopatológica, danificando-as e fazendo com que formem "abscessos" preenchidos com debris celulares, células inflamatórias e vírions (14).

O HSV-2 é um vírus envelopado, de DNA fita dupla, que é protegido por um capsídeo icosaédrico, envolto pelo tegumento. O genoma é dividido em dois segmentos conectados covalentes, chamados longos (L) e curtos (S), ambos contém sequências únicas (U_L e U_S respectivamente), o mais externo possui um envelope lipoproteico proveniente das membranas plasmáticas das células infectadas, glicoproteínas virais (g), diversas proteínas não glicosiladas, lipídios e poliaminas (Figura 1) (15,16).

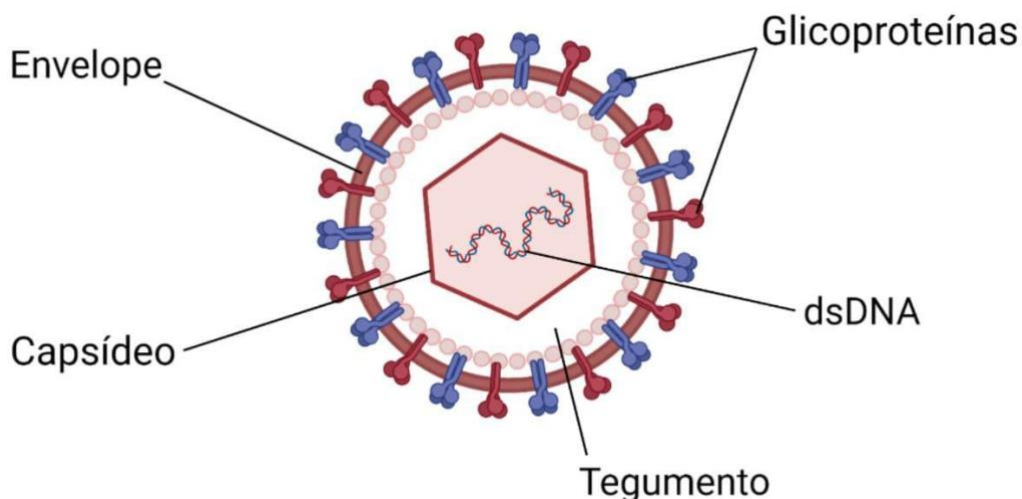


Figura 1 - Representação esquemática do vírion do HSV-2. O material genético é uma dupla fita de DNA (dsDNA, que é revestida por nucleocapsídeo e tegumento, na parte externa está o envelope viral que ancora glicoproteínas do vírus. Fonte: (16) Criado com <https://biorender.com>

As funções de ligação do receptor de entrada e fusão de membranas são realizadas pelas glicoproteínas virais multifuncionais. A ligação a um receptor de entrada aciona alterações conformacionais nas glicoproteínas (g) que sinalizam a proteína de fusão gB para fazer a fusão na membrana (12). Inicialmente, a gB adere ao sulfato do heparano, seguido da adsorção de gD, gH e gL com o mediador de entrada do vírus (HVEM), nectina 1, nectina 2 e 3-O proteoglicano sulfato de heparano (HSPG) resultando em mudanças conformacionais, que permitem a fusão da membrana (Figura 2).

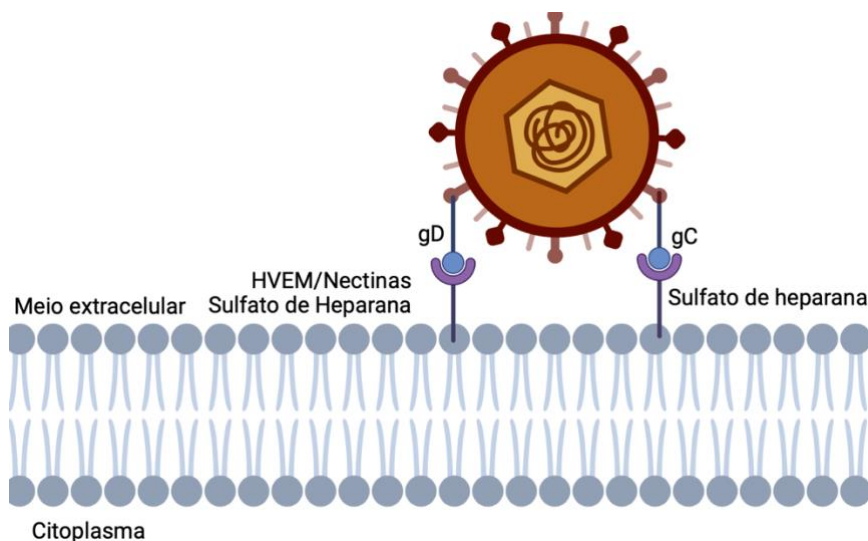


Figura 2 - Mecanismo de adsorção e penetração dos HSV.

Fonte: (4) Criado com <https://biorender.com>

No citoplasma, complexos de proteínas virais utilizam a tubulina para transferir o nucleocapsídeo ao núcleo, que se liga ao poro nuclear e libera o seu genoma, nesse momento ocorre a reorganização do núcleo, aumentando o tamanho, rompimento do nucléolo e condensação da cromatina (17,18).

A transcrição das proteínas virais ocorre de forma sequencial, sendo transcritos os genes imediatamente iniciais (alfa), após os iniciais ou de (beta) e por último os tardios (gama) (Figura 3). A proteína viral (VP) 16 se liga aos fatores de transcrição celular *host cell factor 1* (HCF-1) e octâmero 1 (OCT-1) e penetra no núcleo, produzindo seis proteínas: *Infected cell protein* (ICP)0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 e US1.5. Esses genes estão relacionados com a reorganização dos processos celulares, beneficiando a replicação viral (3,18). As proteínas formadas pelos RNAm ICP4, ICP0 e ICP27 ativam a expressão dos genes virais durante. Quando as proteínas alfa já estão acumuladas elas retornam ao núcleo e ativam a transcrição e tradução dos genes beta, quando os níveis de proteínas beta são suficientes, ocorre a replicação do DNA viral, sendo elas importantes para a síntese de novas moléculas de DNA e regulação de genes correlacionados com sua expressão completa (13).

A expressão dos genes tardios/gama ocorre depois da síntese de DNA viral, sendo responsáveis por formar as proteínas estruturais do vírion, como as proteínas do tegumento, capsídeo e espículas glicoproteicas (Figura 3) (3).

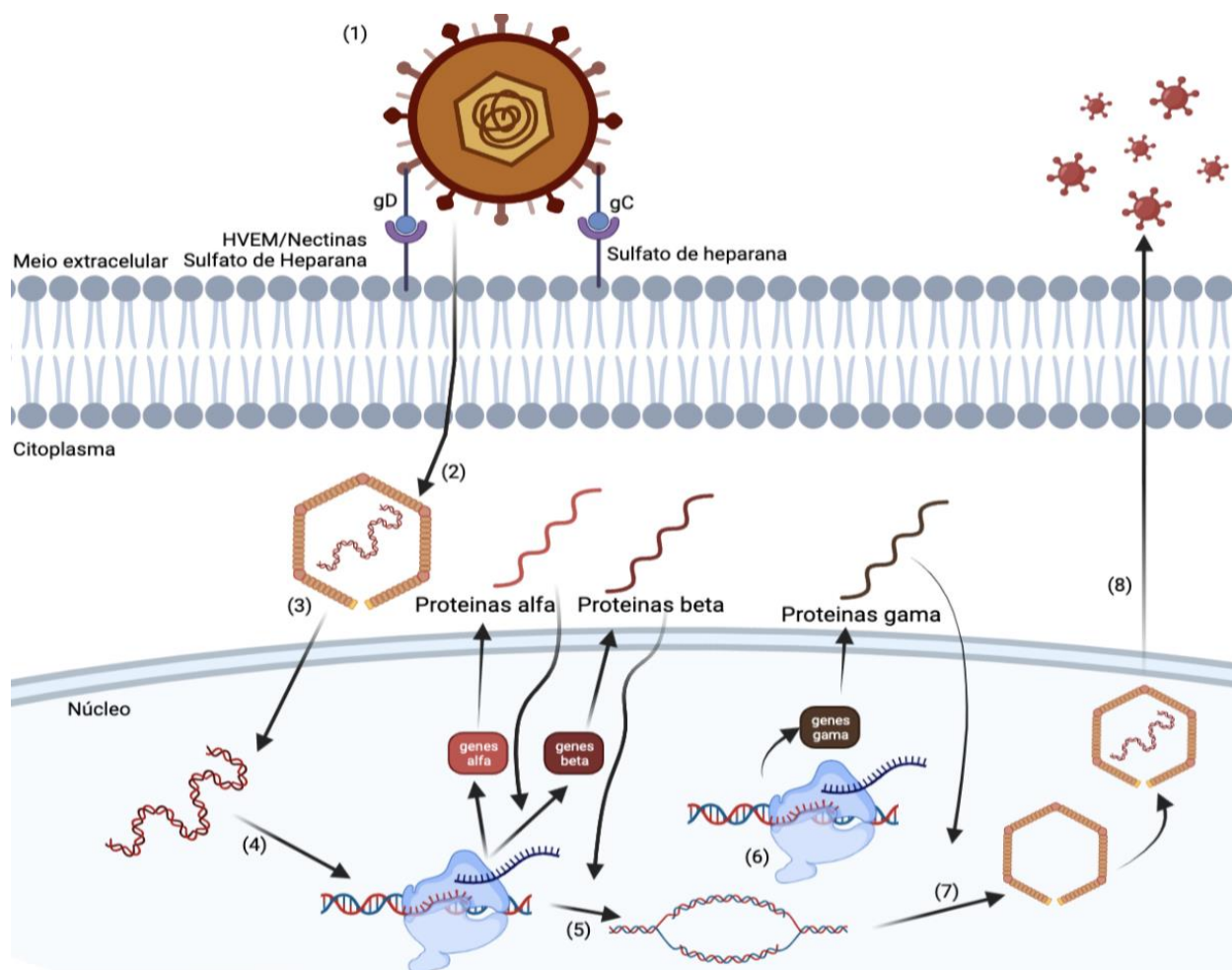


Figura 3 - Ciclo lítico da replicação do HSV em uma célula.

Os estágios de infecção: (1) Ligação ao receptor e fusão com a membrana; (2) Liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma celular e transporte do nucleocapsídeo ao poro nuclear; (3) Liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma celular e transporte do nucleocapsídeo ao poro nuclear; (3) Liberação do DNA viral dentro do núcleo; (4) Transcrição e tradução dos genes α e β ; (5) Síntese do DNA viral; (6) Transcrição e tradução dos genes γ ; (7) montagem do capsídeo e empacotamento do DNA (8) saída da progênie viral. Fonte: (15) Criado com <https://biorender.com>

No início da infecção, o vírion penetra nas terminações nervosas, é transportado pelo axônio para os neurônios do gânglio sensorial onde ocorre a latência. Durante a latência, todos os genes que codificam proteínas estruturais e líticas estão reprimidos, de forma que não há produção de partículas virais. Nesse mecanismo o DNA viral migra para o núcleo dos neurônios, fica circularizado na forma de epissoma (molécula

de DNA capaz de se replicar autonomamente no citoplasma da célula hospedeira) que fica associado às histonas por interações químicas, quando ocorre alguma alteração fisiológica resultante de estresse, exposição à radiação ultravioleta, menstruação ou mesmo uso de alguma substância que altere o padrão de metilação da histona, o epissoma se desprende e inicia a transcrição de genes iniciais, primários e tardios. A partir disso, o vírion é formado e um novo ciclo se inicia, esse é liberado do nervo, sem destruí-lo, e faz o caminho anterógrado pelas células adjacentes até a região da primo-infecção (Figura 4) (3,16).

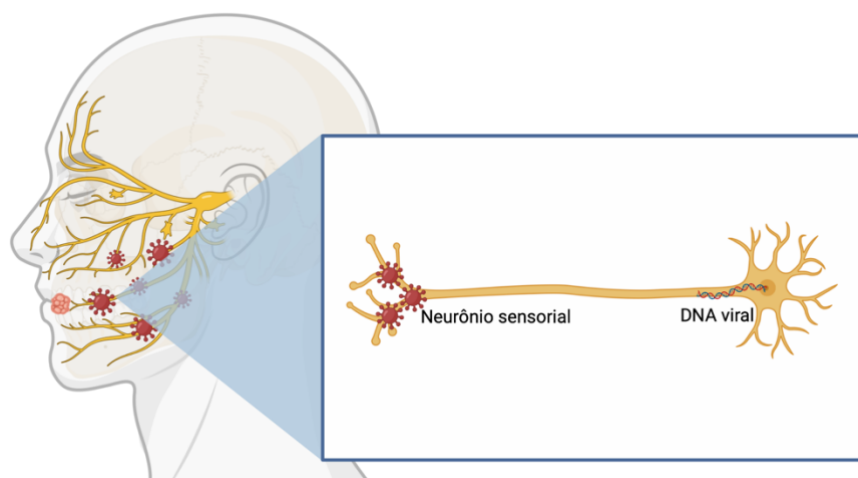


Figura 4 - Latência do HSV-2.

Após a infecção nas células da mucosa ou epiderme, os vírus penetram pelas terminações nervosas e são transportados pelos axônios, sentido retrógrado ao estímulo nervoso, para os neurônios do gânglio sensorial. O DNA viral é encontrado no núcleo de alguns neurônios até que sinais de reativação sejam recebidos e ele retorne ao sítio inicial de infecção, causando a reativação da doença. Durante a latência o DNA viral não está completamente silenciado, alguns RNAs denominados LAT, que promovem a latência, podem ser encontrados nessas células. LAT = transcritos associados à latência. Fonte: (3) Criado com <https://biorender.com>

Existem três classes de medicamentos aprovados para o tratamento de infecções por HSV e todas elas inibem a replicação viral: análogos de guanossina acíclica, análogos acíclicos de nucleotídeos e análogo de pirofosfato. O aciclovir (ACV), um é análogo de nucleotídeo que é fosforilado em derivado de monofosfato dentro das células infectadas pela timidina quinase (TK), e depois em trifosfato pelas enzimas celulares. O trifosfato de ACV interfere a replicação do DNA viral, resultando na terminação da replicação. A resistência do vírus ao fármaco em pacientes imunocomprometidos se deve principalmente pela utilização a longo prazo que pode induzir a seleção de cepas resistentes ao fármaco. Existe uma baixa prevalência (de 0,1% a 0,6%) de resistência tanto do HSV -1 e HSV-2 ao ACV, relatada em pacientes

imunocompetentes, todavia a resistência dos HSVs ao ACV é mais comum em pacientes imunocomprometidos variando entre e varia de 3,5% a 10% dos casos (19).

2.1 Resposta Imune ao HSV-2

O HSV-2 infecta inúmeras células do organismo, inclusive as do sistema imunológico, o que resulta na modulação da resposta favorável à replicação viral (20). Quando o vírus entra na célula o DNA viral é reconhecido pelo *toll like receptor* (TLRs) 9, receptor intracelular, o que leva a ativação de uma cascata de fosforilação intracelular e a translocação nuclear de fatores de transcrição. O resultado desse processo é a expressão de citocinas inflamatórias e interferons (IFN) do tipo I (alfa e beta), a produção do estado antiviral, a maturação de células dendríticas (DC) e a ativação de linfócitos TCD8 e células NK. As DCs também utilizam TLRs para o reconhecimento de patógenos, fagocitam e apresentam antígenos pelas proteína MHC classe I (via citosólica) e classe II (via endocítica) para linfócitos T CD8 ou T CD4 virgens, respectivamente, nos linfonodos (21,22). O reconhecimento de antígenos leva a sinalização de conversão da ativação do Tank binding kinase 1 (TBK-1), do Inibidor de NFkB epsilon (IKKε) e a ativação dessas quinases leva a ativação do fator regulador 3 do IFN (IRF-3) um fator de transcrição que é importante para a expressão de IFN tipo I (23).

O controle da infecção por HSV-2 não tem sucesso na imunidade inata. Quando as DCs ou macrófagos que fagocitaram o vírus apresentam antígenos virais aos linfócitos T, ocorre a secreção de interleucina-12 (IL-12) e esse linfócito auxiliar diferencia-se no subtipo Th1, que secreta IFN-γ. O IFN-γ também induz a troca de subclasse para a IgG1 e/ou IgG3, subclasses de anticorpos com funções efetoras antivirais. Os linfócitos Th1 secretam a citocina IL-2, que promove a proliferação deles mesmos e de outros linfócitos. As células B produzem IgG e IgA, que neutralizam partículas de HSV-2 assim como opsonizam antígenos livres (24).

No que tange o término da resposta, as células T reguladoras liberam citocinas IL-10, IL-14 e TGF-β, e induzem a expressão de Fas/FasL (CD95) que levam a apoptose das células infectadas. Contudo, estudos mostraram que o HSV-2 consegue prevenir a apoptose semelhante ao modo do HSV-1, a proteína quinase viral US3 e o ribonucleotídeo redutase participam nesse processo que bloqueia o processo de

apoptose. A proteína ICP10PK encontrada no HSV-2 atua no estabelecimento da latência viral e reativação, inibindo a ativação da caspase-3 pela habilidade de ativar Ras (25). Por fim, a latência é estabelecida no nervo mais próximo e os linfócitos T CD8 e TCD4 ficam justapostos ao nervo regulando imunologicamente o retorno ou não do vírus ao sítio da lesão.

3 GÊNERO SALVIA

Algumas espécies da família *Lamiaceae* e do gênero *Salvia* são conhecidas por apresentarem efeito antiviral. Entre elas, *Salvia officinalis*, uma planta utilizada na medicina popular contra dor de garganta e infecções das membranas mucosas orais, foi bastante explorada quanto aos seus efeitos antivirais (26–28). Inúmeras ações biológicas já foram observadas com extratos de diferentes espécies de *Salvia*, como ante epilepsia, alívio de sintomas de resfriados, tratamento de bronquite e até mesmo a tuberculose. Essas ações se relacionam com as atividades antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antidiabéticas, antitumorais, anticânceres e antivirais (29). Entretanto, o uso de plantas medicinais podem apresentar reações adversas (30). No caso de *S. officinalis* foi observado que o consumo não induz efeitos colaterais severos, apenas o uso prolongado ou até uma overdose pode levar a salivação excessiva, taquicardia, vertigens entre outros sintomas (6).

Salvia uliginosa Benth. (Figura 5) é uma planta nativa da América do Sul, é encontrada, principalmente no Brasil, região nordeste da Argentina e Uruguai (31,32). Essa planta caracteriza-se como uma espécie ainda pouco estudada, principalmente quanto ao seu possível efeito antiviral. Na medicina popular é utilizada por suas propriedades carminativas (recurso terapêutico usado para redução de gases intestinais), tônica e estimulante (33). Em 2019, Cezarotto et al., apresentaram a ação leishmanicida e efeito anti-quimotático dos diterpenos icetexona (ICT) e isoicetexona (IsoICT). Os autores observaram o potencial anti-inflamatório, que reside principalmente nos produtos isolados ICT e IsoICT, os quais inibiram totalmente a migração de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), além do aumento da ação leishmanicida de macrófagos, *in vitro*. Esses compostos também provocaram a morte da forma promastigota da *L. amazonenses* de maneira dose-dependente e induziram a fragmentação do DNA indicando a perda da integridade da membrana – sugerindo morte celular por necrose (10).



Figura 5 - Planta *Salvia uliginosa*. Flores azuladas e glândulas de cor laranja onde se acumulam diterpenos. Fonte: (32)

3.1 Atividade Antiviral de espécies de Salvia

Salvia spp. demonstrou efeitos antivirais positivos frente a diferentes vírus, tais como: Influenza, HIV-1, HSV-1 e 2, HIV, Sars-CoV-2, Hepatite B, entre outros (11,33–36). Em 2023 foi publicado um estudo computacional e experimental com o ácido salvianólico A no modelo de infecção por Enterovírus 71 (EV71), responsável pela forma mais exacerbada e letal da doença Mão-pé-boca. O ácido salvianólico A é polifenólico e foi isolado a partir de *Salvia miltiorrhiza* Bunge, apresentando efeito inibitório frente ao vírus EV71 de maneira dose-dependente. Os resultados indicam que a atividade antiviral é maior que a de outros polifenóis naturais reportados. O modo de ação proposto é através do ancoramento do ácido na proteína E71, que faz parte da tríade enzimática catalítica, que induz a H40 a se afastar do centro catalítico, diminuindo a eficácia da proteína viral 3C, envolvida na hidrólise de todas as 7 proteínas não-estruturais do EV71 e na supressão da sinalização do receptor RIG-I (37).

O ácido litospérmico, um polifenol isolado das raízes de *Salvia miltiorrhiza*, apresentou atividade frente ao vírus da Hepatite B, inibindo a replicação de DNA em células e camundongos C57BL-6 de uma maneira dose e tempo-dependente (36). O ácido litospérmico aumentou a expressão da proteína LC3-II, utilizada para o monitoramento da autofagia (38), número de autolisossomos/autofagossomos. Os pesquisadores confirmaram a ação do ácido na proteína LC3 *in vitro* com o knockdown dos genes relacionados à autofagia, e a administração *in vivo* do 3-methyladenine, um inibidor de autofagia, que apresentou a desativação da eficácia do efeito inibitório do ácido na replicação do DNA do vírus.

A partir das raízes de *Salvia miltiorrhiza* foram isolados compostos de tansinonas (39), incluindo 7 compostos lipofílicos como quinolonas diterpeno e fenóis hidrofílicos como o ácido salvianólico B. Foi analisada a atividade antiviral frente as cisteíno proteases (3CLpro e PLpro) do SARS-CoV-2, todos apresentaram-se como inibidoras tempo-dependente do PLpro. A análise do mecanismo cinético mostrou que todas as tansinonas exceto o composto rosmariquinona foram identificadas como inibidoras da isomerização enzimática não competitiva, rosmariquenona apresentou um mecanismo cinético diferente por meio da inibição de ligação lenta reversível simples de tipo misto. Eles confirmaram que as inibições eram seletivas quando testaram frente a outras proteases como a quimotripsina, pepsina, e protease do HIV (40).

Os efeitos antivirais de dois compostos solúveis em água de *Salvia miltiorrhiza* foram testados frente ao HIV-1. Nesse estudo os compostos fenólicos denominados M522 (ácido litospérmico) e M532 (ácido litospérmico B) apresentaram significativa ação anti-HIV. Mecanicamente, os compostos inibiram a atividade catalítica da integrase desse vírus, inibindo a infecção em células H9 (41). Outro membro da família que apresentou atividade antiviral foi *Salvia plebeia*, demonstrando efeito anti-influenza. Nesse estudo foram avaliadas as atividades inibitórias do extrato metanólico e seus compostos contra o vírus H1N1 *in vitro*. Observou-se que o efeito anti-influenza dos compostos 7-O- β -d-glicosídeo e a neprina foi maior em concentrações menores (50 μ M) do que com o oseltamivir (100 μ M) utilizado como controle positivo (42).

O *screening in silico* de flavonóides frente ao Sars-CoV-2 (33) indicou que os compostos luteolina-7-glucoside, apigenina, hispidulin e rutina presentes em *Salvia officinalis* têm a capacidade de interação de forma seletiva com a principal protease do vírus. Essa ligação parece ser maior que alguns fármacos disponíveis para o tratamento da COVID-19.

Schnitzler et al., em 2008, realizaram um estudo comparativo *in vitro* sobre o efeito anti-herpético dos extratos aquosos e etanólicos de *Salvia officinalis* cultivados em dois locais diferentes, Garden e Montanhas Suábias região do sudoeste da Alemanha, baseados na diferença de compostos que podem ser expressos ou não devido a alterações climáticas. Ambos os extratos apresentaram uma forte atividade antiviral contra o HSV-1 e o HSV-2. Os dados experimentais mostraram uma sensibilidade significativamente maior do HSV quando extratos derivados de Garden cultivados em um clima quase mediterrâneo e com 449 m de altitude foram utilizados, em comparação com os das Montanhas Suábias, mais frio e com 757 m de altitude. Ambos os extratos mostraram resultados positivos quando os vírus foram pré-tratados com eles e em seguida utilizados para infectar células. A proposta dos autores é um efeito inibidor na ligação do vírus no seu receptor. O extrato etanólico da planta do Garden reduziu a formação das placas para 6% para o HSV-2, enquanto o extrato etanólico do material das Montanhas Suábias reduziu para 1%, ambos em relação ao controle. A hipótese seria de que os extratos interagem com estruturas do envelope do vírion, necessárias para adsorção ou entrada em células. Especula-se que atividade antiviral observada se deve principalmente à quantidade e composição de componentes fenólicos nas plantas, e que o mecanismo antiviral seria antes ou durante a adsorção do vírus na superfície da célula (26).

Salvia pebleia R. Br. (SP) mostrou um bom efeito anti-RSV (Vírus Sincicial Respiratório) tanto *in vitro* em células Hep-2 quanto *in vivo* em camundongos Balb/c (43). A atividade antiviral das frações com peso molecular ≥ 10.000 possui atividade antiviral mais potente do que outras frações. A *Sálvia*, quando utilizada em modelos animais, mostrou-se capaz de inibir a proliferação do RSV, e reduziu as lesões pulmonares induzidas por ele. O mecanismo de ação envolve a inibição dos receptores de reconhecimento de padrão TLR-3 e TLR-4 nos pulmões, aumento da quantidade do IFN- γ e IL-2, e redução da quantidade do TNF- α no soro.

Utilizando análise computacional, observou-se que constituintes fitoquímicos de *Salvia plebeia* apresentam maior afinidade de ligação com a principal protease do SARS-CoV-2, e os isolados rutina e plebeiosidase B mostraram maior potência de inibição dessa protease. A análise da dinâmica molecular foi realizada para os complexos proteína-ligante selecionados para confirmar sua estabilidade. (44)

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar a atividade antiviral do exsudato de *Salvia uliginosa* e da icetexona frente ao HSV-2 em modelo *in vitro*.

4.2 Específicos:

4.2.1 Avaliar se o exsudato de *S. uliginosa* e/ou a icetexona apresentam atividade anti-HSV-2 *in vitro*, em doses não citotóxicas.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Revista: JOURNAL OF APPLIED PHARMACOGNOSY AND PHYTOCHEMISTRY

Anti-herpetic activity evaluation of *Salvia uliginosa* exudate and Icetexone diterpene.

Maria Antônia Monteiro^{a*}. Alexia Grismino^a. Diogo Alves^a. Gilsane von Poser^b. Pedro Roosevelt Torres Romão^c. Luiz Carlos Rodrigues Júnior^a

^a Laboratory of Immunology and Virology. Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences. Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^cLaboratory of Cellular and Molecular Immunology. Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

*Corresponding authors:

Maria Antônia Monteiro. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. UFSCPA. R. Sarmiento Leite, 245. 90050-170. Porto Alegre - RS, Brasil. Phone++55(51)33039000.

E-mail address: maria.monteiro@ufcspa.edu.br

Abstract

Herpes Simplex Virus-2 (HSV-2) is a dermatropic virus. Recent studies indicate that the percentage of HSV-2 infections in Brazil is 11.3%, and it is estimated that approximately 90% of the world's population has a positive serology for one or both viruses. HSV-2 is a sexually transmitted infection that leads to serious problems in individuals with weakened immune systems or those undergoing immunosuppressive treatment. Furthermore, primo-infections or recurrent infections present a high risk of transmission from mother to child during delivery. Existing antiviral treatments are not effective during the latency phase, and some strains are already resistant to the primarily used drug acyclovir. Therapies using plant derivatives have proven effective in the treatment of herpes. Some species of *Salvia* spp. have already been studied and

have demonstrated efficacy against viruses and other microorganisms. Analyses published by our group have demonstrated that *Salvia uliginosa* exhibits significant activity against *Leishmania amazonensis*, an intracellular parasite responsible for causing leishmaniasis. Our objective was to evaluate and characterize the possible antiherpetic effects of *S. uliginosa* against HSV-2 *in vitro*. *S. uliginosa* was collected and identified by a botanist. The plant exudate and major compound, the diterpene Icetexone (ICT), were obtained from the Pharmacognosy Laboratory of the Federal University of Rio Grande do Sul. ICT was isolated in the same laboratory via column chromatography using silica gel. The results indicated that the exudate of *S. uliginosa* has anti-herpetic activity, with CC₅₀ of 193,5µg/mL, although ICT doesn't. Additional experiments are needed *in vitro* to elucidate the mechanism of action, and *in vivo* to test the antiherpetic hypothesis of *Salvia uliginosa* in the infected host.

Keywords: Genital herpes. Antiviral. *Salvia*. Cytotoxicity.

Introduction

The Simplex Herpes Viruses (HSV), HSV-1 and HSV-2, belong to the *Herpesviridae* family, Alphaherpesvirinae subfamily, and *simplexvirus* gender. Approximately 90% of the world's population has positive serology for one or both viruses (1), which remain in a latent state and are reactivated in situations such as stress, exposure to ultraviolet radiation (UV), and immunosuppression, among others. HSV-2 is a very common sexually transmitted infection (STI) (2). Antivirals already available for treatment, such as acyclovir and penciclovir, do not affect viral latency and are often ineffective in patients who are immunosuppressed and in whom the virus develops resistance to the drug (3). According to the literature, the continuous use of acyclovir can not only result in resistance but can also cause kidney problems. Topical drugs, such as ganciclovir, are alternatives but present low retention times in the cornea and vagina, requiring the patient to reapply the product several times (4). *Salvia* is the most abundant plant genus in the *Lamiaceae* family, with more than 900 species. Many species of *Salvia* have been studied and demonstrated effects against viruses and other microorganisms (5). We evaluated the possible antiviral effect of *Salvia uliginosa* exudate and the major compound, Icetexone (ICT) against HSV-2, using an *in vitro* model.

Materials and methods

Exudate production

The aerial parts of *Salvia uliginosa* were collected in September 2020 from the municipality of Segredo, Brazil. Dried leaves of the plant were placed in a beaker containing dichloromethane at the Pharmacognosy Laboratory of the Pharmacy School of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). The resulting liquid, containing the chemical components of the glands that were ruptured by the action of the solvent, was placed in a rotary evaporator. The exudate was dried, weighed, and diluted with DMSO to a final concentration of 550 µg/ml.

Icetexone isolation

After removing the solvent in the rotary evaporator, a portion of the exudate was subjected to silica gel column chromatography for compound isolation. One compound, which was pure in the thin-layer chromatography analysis, was analyzed by Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, which allowed the identification of the ICT molecule, the major compound of the exudate (5).

Cell and Virus

VERO E6 Cells ATCC1 1586 were grown to monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and 1% antibiotic-antimycotic solution (Zell Shield, Minerva Biolabs GmbH, Berlin, Germany), and The HSV-2 333 strain was produced in VERO cells and titrated by plaque reduction assay. The virus stocks were maintained at -80°C.

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was evaluated using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) cell viability assay. VERO cells were plated in 96-well microplates until a monolayer and exposed to different concentrations of the exudate and ICT, as previously described by Cezarotto et al. in 2018 (5). Exudate concentrations of 500, 250, 100, 50, 25, 15, 10, 5, 2.5 and 1.25 µg/mL were used; for ICT, concentrations of 2.5, 5, 10, 15, 25, 50, and 100 µM were used, respectively. Untreated cells and cells

treated with 2% dimethyl sulfoxide (DMSO) were used as viability controls. The cells were then incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere for 72h. Subsequently, 10 µL MTT (5 mg/mL in PBS) was added to each well and incubated for 4 h under the same conditions. The cells were resuspended in 100 µL DMSO, and the optical density was measured at 540 nm using a microplate reader spectrophotometer.

Antiviral Assays-Direct plaque assay

Inhibition of HSV-2 replication was examined using a plaque reduction assay (3). VERO cells were pre-plated 24 h before in 24-well plates at a density of 1×10^5 cells. Based on the cytotoxicity assay, concentrations of the exudate, ICT compound, and acyclovir were added to $6,5 \cdot 10^3$ PFU/mL of HSV-2 strain 333 for one hour at 4°C, and then incubated with cells at 37°C for one hour and 30 min for adsorption. The inoculum was removed, the cells were washed and overlaid with DMEM 2% FBS containing 1% agarose, and acyclovir control was added during the adsorption time and then diluted in the medium containing agarose. After further incubation at 37°C for 72 h, cells were fixed and stained with crystal violet and 0,4% paraformaldehyde to count the viral plaques. The concentration producing a 50% reduction in plaque formation (EC₅₀) was determined using Prism software by comparing the treated with untreated wells. Three independent experiments were performed in triplicates.

Data analysis

All results are presented as the mean values from three independent experiments performed in triplicate. The EC₅₀ and CC₅₀ values were calculated by regression analysis using GraphPad Prism (version 9.0; GraphPad Software, San Diego, California, U.S.A.) by fitting a dose—response curve. The selectivity index (SI) was calculated by dividing the CC₅₀ by the EC₅₀ value.

Results and discussion

Cytotoxicity of *Salvia uliginosa* exudate and ICT in VERO cells

The cytotoxicity results, as indicated by the CC₅₀ values (Figure 1, Table 1), diverged from those reported by Cezarotto et al. (5), who found a value of 81.56 (µM) (67 - 99.3) using RAW (macrophage) strain. However, such disparities in CC₅₀ values are not

uncommon across different cell strains, such as VERO (monkey kidney fibroblasts) and MDCK (dog kidney fibroblasts), owing to the inherent cellular variations (6).

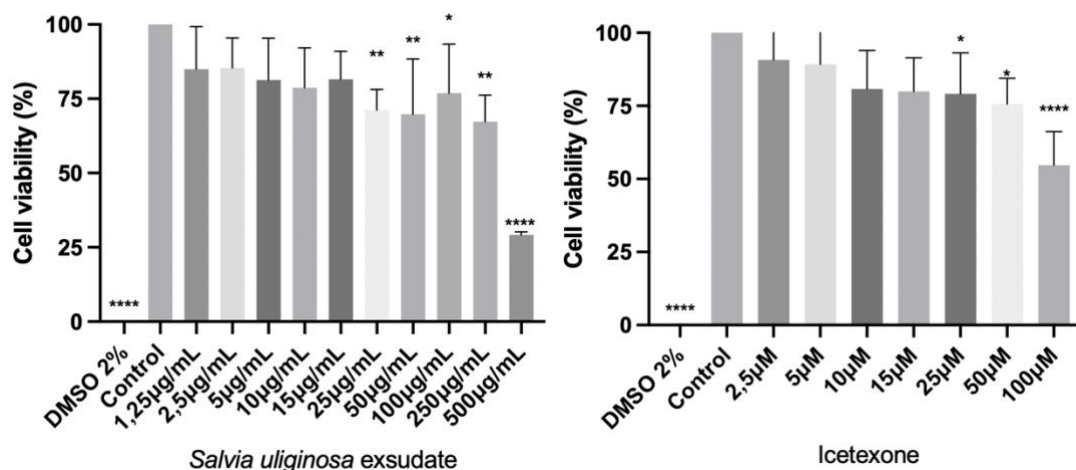


Figure 1: *Salvia uliginosa* exsudate and Icetexone cytotoxicity.

Table 1: Results of the cytotoxicity test carried out on VERO cells

Compound	CC ₅₀ ^a (CI 95% ^b)
Exudate (µg/mL)	193.50 (169.8-218.3)
Icetexone (µM)	49.43 (40.05-61.84)

^a CC₅₀: concentration of the compound that causes 50% mortality of Vero cells.

^b 95% CI: 95% confidence interval

In the antiviral assay (Figure 2) the exudate showed antiviral activity when added to the virus before cell infection, with the highest statistical significance at concentrations of 25 µg/mL. However, when the ICT was analyzed using the same tests, there was no concentration with statistical significance.

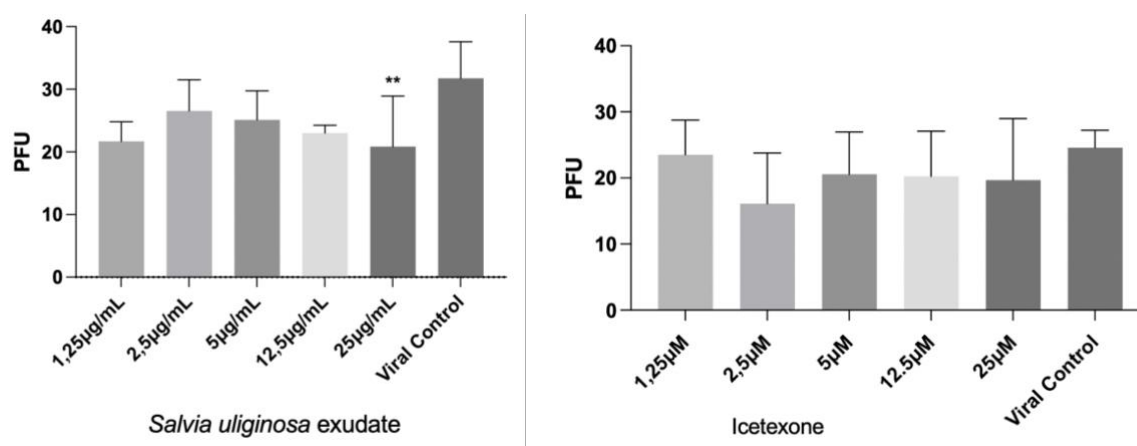


Figure 2: *Salvia uliginosa* exudate and Icetexone plaque reduction assay result.

The antiviral activity observed when the samples were incubated with the virus may be due to an interaction with virions and/or cell receptors, which reduces viral adhesion. The IC_{50} values of the samples were calculated and are shown in Table 2 with confidence intervals.

Table 2: Results of the direct antiviral assay carried out on VERO cells.

Compound	IC_{50}^a (CI 95% ^b)	SI ^c
Exudate (µg/mL)	3,81 (0,01-16,58)	50,7
Icetexone(µM)	27,87 (5,84-84,97)	1,77

^a IC_{50} : concentration of the compound that inhibits 50% of the viral infection.

^b 95% CI: 95% confidence interval

^c SI: selectivity index

The results revealed that the exudate had an IC_{50} of 3.81 µg/mL against HSV-2 virus. This indicates that a relatively low concentration of exudate is required to inhibit viral replication by 50%. The 95% confidence interval for IC_{50} (0.01-16.58) highlights the consistency and precision of this result, although there is some variation in the data. However, ICT showed an IC_{50} of 27.87 µM against HSV-2. Although its concentration was higher than that of the exudate, this difference can be attributed to the presence of other components in the exudate, which may have contributed to the observed antiviral activity. The 95% confidence interval for the IC_{50} of ICT (5.84-84.97) highlights the potential variability in the data.

Conclusion

The exudate from *Salvia uliginosa* exhibited a dose-dependent anti-HSV-2 effect in vitro. The phenomenon of polymorphism, characterized by the possibility of the same chemical substance adopting different crystalline arrangements, is a crucial consideration in the study of ICT, as discussed in different articles (7,8,9). These different crystalline forms can result in notable variations in physical properties, such as melting point, rotation index, and spectroscopic characteristics, which in turn can significantly affect their biological activity and behavior in assays. In the context of ICT, these molecules can exist in multiple polymorphic forms, each with specific properties. This intrinsic characteristic may explain the lack of reproducibility observed in the tests using ICT. Such structural variations can influence several aspects, including solubility, stability, and interactions with other molecules, whether in the viral or host cells. Consequently, these differences can trigger variations in the assay results, including IC₅₀ and CC₅₀ values, and directly impact the calculation of the selectivity index. Furthermore, it is crucial to investigate in depth the mechanisms underlying polymorphisms as well as their implications for biological interactions. Future research could shed light on these aspects, providing a robust foundation for a more in-depth understanding of ICT activities. Further studies are required to elucidate the mechanism of antiviral action and identify cellular and/or viral targets.

Acknowledgments

This study was funded by CAPES, CNPq, and FAPESP, Brazil.

References

- [1] Xu F, Schillinger JA, Sternberg MR, Johnson RE, Lee FK, Nahmias AJ, et al. Seroprevalence and co-infection with herpes simplex virus type 1 and type 2 in the United States, 1988–1994. J Infect Dis [Internet]. 2002 Apr 15 [cited 2021 Aug 25];185(8):1019–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11930310/>
- [2] Santos NS de O, Romanos MTV, Wigg MD. Virologia Humana terceira edição [Internet]. Vol. 3. 2015 [cited 2021 Aug 25]. 1308 p. Available from: <https://www.saraiva.com.br/virologia-humana-3-ed-2015-8869993/p>

- [3] Cagno V, Sgorbini B, Sanna C, Cagliero C, Ballero M, Civra A, et al. In vitro anti-herpes simplex virus-2 activity of *Salvia desoleana* Atzei & V. Picci essential oil. Schang LM, editor. PLoS ONE [Internet]. 2017 Feb 16 [cited 2021 Aug 25];12(2):e0172322. Available from: [HYPERLINK "https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28207861/"](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28207861/)
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28207861/>
- [4] Yadavalli T, Ames J, Agelidis A, Suryawanshi R, Jaishankar D, Hopkins J, et al. Drug-encapsulated carbon (DECON): A novel platform for enhanced drug delivery. Sci Adv [Internet]. 2019 Aug 2 [cited 2021 Aug 25];5(8):eaax0780. Available from: [HYPERLINK "https://advances.sciencemag.org/content/5/8/eaax0780"](https://advances.sciencemag.org/content/5/8/eaax0780)
<https://advances.sciencemag.org/content/5/8/eaax0780>
- [5] Cezarotto CS, Dorneles A, Baldissera FG, da Silva MB, Markoski MM, Júnior LCR, et al. Leishmanicidal and anti-chemotactic activities of icetexanes from *Salvia uliginosa* Benth. Phytomedicine [Internet]. 2019 May 12 [cited 2021 Aug 25];58:152748. Available from: [HYPERLINK "https://europepmc.org/article/med/31005722"](https://europepmc.org/article/med/31005722)
<https://europepmc.org/article/med/31005722>
- [6] Silva AH. Estratégias Para Avaliação Da Toxicidade De Sistemas Nanoestruturados [Internet]. UFSC; 2011. Available from: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/95628>
- [7] Cezarotto C. Isolamento e atividade anti-quimiotóxica in vitro de diterpenos de espécies de *Salvia* provenientes do sul do Brasil [Internet]. Vol. 1. UFRGS; 2018. Available from: [HYPERLINK "https://lume.ufrgs.br/handle/10183/188739"](https://lume.ufrgs.br/handle/10183/188739)
<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/188739>
- [8] Esquivel B, Burgueño-Tapia E, Bustos-Brito C, Pérez-Hernández N, Quijano L, Joseph-Nathan P. Absolute configuration of the diterpenoids Icetexone and conacytone from *Salvia ballotaeflora*. Chirality [internet]. 2018 Feb;30(2):177–88. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/chir.22781>
- [9] Domínguez XA, González H, Aragón R, Gutiérrez, marroquín JS, Watson W. Mexican medicinal plants XXIX. Three new diterpene quinones from *Salvia ballotaeflora*. Planta Med. 1976;30(3):237–41.

6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho caracterizam-se como o primeiro estudo para caracterizar a atividade antiviral da *Salvia uliginosa*, utilizando o HSV-2 como modelo, *in vitro*. Diferente da maioria dos trabalhos, que utiliza o extrato de plantas, foi inicialmente utilizado o exsudato, que é originado das glândulas (tricomas) (Figura 6) que são rompidas por ação do solvente, esse método de extração garante que apenas o material secretado seja obtido, evitando a extração de componentes da parede celular.



Figura 6 - Glândulas (tricomas) presente nas folhas de *Salvia uliginosa*.
Fonte: imagem da autora.

Antes da avaliação da atividade anti-herpética das amostras, é preciso que determine a faixa de concentração que não apresente toxicidade para as células hospedeiras. A análise de citotoxicidade é a capacidade de um composto em induzir dano ou morte celular (46). Um antiviral ideal é aquele que inibe uma ou mais etapas do ciclo de replicação viral sem interferir no metabolismo da célula hospedeira, permitindo que a mesma se recupere da infecção e mantenha sua atividade metabólica normal (47). A linhagem celular VERO é utilizada mundialmente para ensaios de citotoxicidade e ensaios antivirais (48–51) devido a característica de permissibilidade viral e rápido crescimento.

Os resultados obtidos permitiram a determinação do CC₅₀ (concentração tóxica para 50% das células) do exsudato e a icetexona. Os valores de CC₅₀ da icetexona (49,43µM) diverge dos achados previamente reportados por Cezarotto e seus colaboradores (10), os quais observaram um valor de 81.56 (µM) (67 – 99.3) ao empregar a linhagem RAW (macrófagos). Contudo, é pertinente ressaltar que essa

diferença pode ser considerada aceitável, uma vez que divergências nos resultados de CC_{50} de compostos já foram constatadas entre as linhagens VERO (fibroblasto de rim de macaco) e MDCK (fibroblasto de rim de cachorro) (52). Tais discrepâncias podem ser atribuídas, em grande parte, a variações inerentes às características das células, bem como possíveis diferenças nos métodos de ensaio, que podem variar no que diz respeito às condições de cultivo celular, concentrações de composto testadas, duração do ensaio e divergências nos lotes de células. Mesmo lotes pertencentes à mesma linhagem celular podem apresentar distintos níveis de sensibilidade a um composto específico.

É imprescindível ressaltar que o CC_{50} constitui um valor médio, e a sensibilidade individual das células a um dado composto pode manifestar variações substanciais, sendo de suma importância conduzir ensaios de CC_{50} para cada linhagem celular que será empregada em estudos de toxicidade. Após a determinação das concentrações citotóxicas da amostra foi produzido e titulado o vírus HSV-2. A concentração titulada foi de $1,3 \times 10^9$, um título alto para os ensaios de placa realizados, pois os efeitos citopáticos observados destruíram a monocamada de células VERO em menos de três dias, necessários para o ensaio. Assim, foi realizado um ensaio para determinar uma concentração em que não ocorresse a morte de todas as células em três dias. Foi padronizada a concentração de $6,5 \times 10^3$, na qual foi possível visualizar e contar as unidades formadoras de placas. No ensaio virucida direto, foi analisado o possível efeito dos compostos diretamente no vírus HSV-2, através do ensaio de inibição da formação das placas de lise, avaliando a redução do número dessas placas.

O exsudato apresentou atividade antiviral quando adicionado ao vírus antes de infectar as células, tendo maior significância estatística a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$. O teste de análise estatística realizado no gráfico de PFU foi o ANOVA/Dunnett comparando cada concentração com o controle viral. Entretanto, quando foi analisada a amostra da ICT, realizando os mesmos testes para a análise, não houve concentração com significância estatística. A atividade antiviral observada pode ser decorrente de uma interação com os vírions e/ou com os receptores celulares, o que diminui a adesão viral. O exsudato possui um IC_{50} de 3,81 $\mu\text{g/mL}$ frente ao vírus HSV-2, indicando que uma concentração relativamente baixa do exsudato é necessária para inibir 50% da replicação viral. O intervalo de confiança de 95% para o IC_{50} (0,01-16,58) reforça a consistência desse resultado.

O fenômeno do polimorfismo, caracterizado pela possibilidade de uma mesma substância química adotar diferentes arranjos cristalinos, é uma consideração importante no estudo da ICT, conforme é discutido em diferentes artigos (45,53,54). Essas distintas formas cristalinas podem resultar em variações notáveis nas propriedades físicas, como ponto de fusão, índice de rotação e características espectroscópicas, as quais, por sua vez, podem afetar significativamente sua atividade biológica e comportamento em ensaios. No contexto da ICT, esta molécula pode existir em diferentes formas polimórficas, cada uma com propriedades específicas. Essa característica intrínseca poderia talvez explicar a falta de reprodutibilidade observada nos ensaios utilizando-a. Tais variações estruturais podem influenciar diversos aspectos, incluindo solubilidade, estabilidade e as interações com outras moléculas. Conseqüentemente, essas diferenças podem desencadear variações nos resultados dos ensaios, incluindo os valores de IC_{50} e CC_{50} , assim como impactar diretamente o cálculo do índice de seletividade.

A relação entre o IC_{50} e o CC_{50} é uma indicação importante da seletividade do exsudato e da ICT, ou seja, sua capacidade de inibir o vírus sem causar danos significativos às células saudáveis. No caso do exsudato, o índice de seletividade é aproximadamente 50,7, enquanto para a ICT, é cerca de 1,77. Isso sugere que o exsudato possui uma seletividade mais favorável, com uma maior margem de segurança entre sua atividade antiviral e a toxicidade para as células hospedeiras, em comparação com a ICT. Esses resultados são apenas um ponto de partida, e estudos futuros são necessários para compreender os mecanismos subjacentes a essas atividades, explorar possíveis sinergias com outros compostos e investigar a aplicabilidade desses compostos em contextos clínicos.

O trabalho realizado apresentou algumas limitações experimentais relaciona a disponibilidade de outros compostos isolados do exsudato e não reprodutibilidade dos resultados relacionados ao objetivo de investigar se o exsudato e/ou icetexona apresentam atividade anti-HSV-2 por ação direta no vírus, na ligação à célula ou na replicação viral. Houve algumas questões experimentais as quais impediram de se obter culturas de células VERO viáveis para a repetição dos testes em tempo hábil antes do término do prazo de finalização do estudo. Entretanto, as análises continuam em andamento, de forma a responder as lacunas ainda deixadas por esse estudo.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos concluímos que o exsudato e a ICT retirados da planta *Salvia uliginosa* podem ser utilizados em doses seguras quanto a citotoxicidade, em ensaios de atividade antiviral. O exsudato parece apresentar uma forte atividade inibitória para o vírus HSV-2 *in vitro*, observada no tratamento do vírus. Esse dado indica que o exsudato pode agir por um mecanismo diferente do aciclovir, fármaco de escolha para o tratamento do HSV, havendo a possibilidade de uma proposta futura de uso combinado. A ICT não apresentou atividade inibitória sobre o HSV-2, mesmo sendo o constituinte majoritário do exsudato. É possível que esse composto não seja o responsável pela atividade antiviral, ou necessite estar combinado a outro composto também presente no exsudato, para apresentar a ação inibitória ao vírus. Estudos adicionais, incluindo a experimentação em modelo *in vivo*, necessitam ser realizados para elucidar esses pontos.

Como perspectiva serão testados outros compostos isolados do exsudato, incluindo a isoicetexona. Também será realizada a análise da atividade antiviral quando o exsudato ou compostos isolados forem combinados com o aciclovir, ou entre eles. Também serão realizados ensaios para a determinação da ação anti-inflamatória e resolutiva da infecção viral genital *in vivo*, utilizando modelos de camundongos.

8 REFERÊNCIAS

1. Wald A, Corey L. Persistence in the population: epidemiology, transmission [Internet]. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. 2007 [cited 2021 Aug 25]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21348128/>
2. Fatahzadeh M, Schwartz RA. Human herpes simplex labialis. Clin Exp Dermatol [Internet]. 2007 Nov [cited 2021 Aug 25];32(6):625–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17953630/>
3. Santos NS de O, Romanos MTV, Wigg MD. Virologia Humana terceira edição [Internet]. Vol. 3. 2015 [cited 2021 Aug 25]. 1308 p. Available from: <https://www.saraiva.com.br/virologia-humana-3-ed-2015-8869993/p>
4. Xu F, Schillinger JA, Sternberg MR, Johnson RE, Lee FK, Nahmias AJ, et al. Seroprevalence and Coinfection with Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 in the United States, 1988–1994. J Infect Dis [Internet]. 2002 Apr 15 [cited 2021 Aug 25];185(8):1019–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11930310/>
5. Caldeira TDM, Gonçalves CV, de Oliveira GR, da Fonseca TV, Gonçalves R, do Amaral CT, et al. Prevalência do herpes vírus tipo 2 e fatores de risco associados a sua infecção em mulheres do sul do Brasil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo [Internet]. 2013 Sep [cited 2022 Jan 4];55(5):315–21. Available from: <http://www.scielo.br/j/rimts/a/NFLh3JtrXyymbF3dVdtjFfn/?lang=en>
6. Clemens SAC, Farhat CK. Soroprevalência de anticorpos contra vírus herpes simples 1-2 no Brasil. Rev Saude Publica [Internet]. 2010 Aug [cited 2021 Aug 25];44(4):726–34. Available from: www.abep.org/novo
7. Looker KJ, Elmes JAR, Gottlieb SL, Schiffer JT, Vickerman P, Turner KME, et al. Effect of HSV-2 infection on subsequent HIV acquisition: an updated systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2023 Jun 15];17(12):1303–16. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S147330991730405X/fulltext>
8. Cagno V, Sgorbini B, Sanna C, Cagliero C, Ballero M, Civra A, et al. In vitro anti-herpes simplex virus-2 activity of Salvia desoleana Atzei & V. Picci essential oil. Schang LM, editor. PLoS One [Internet]. 2017 Feb 16 [cited 2021 Aug 25];12(2):e0172322. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0172322>

9. Yadavalli T, Ames J, Agelidis A, Suryawanshi R, Jaishankar D, Hopkins J, et al. Drug-encapsulated carbon (DECON): A novel platform for enhanced drug delivery. *Sci Adv* [Internet]. 2019 Aug 2 [cited 2021 Aug 25];5(8):eaax0780. Available from: <https://advances.sciencemag.org/content/5/8/eaax0780>
10. Cezarotto CS, Dorneles A, Baldissera FG, da Silva MB, Markoski MM, Júnior LCR, et al. Leishmanicidal and antichemotactic activities of icetexanes from *Salvia uliginosa* Benth. *Phytomedicine* [Internet]. 2019 May 12 [cited 2021 Aug 25];58:152748. Available from: <https://europepmc.org/article/med/31005722>
11. Nolkemper S, Reichling J, Stintzing FC, Carle R, Schnitzler P. Antiviral Effect of Aqueous Extracts from Species of the Lamiaceae Family against Herpes simplex Virus Type 1 and Type 2 in vitro. *Planta Med* [Internet]. 2006 Dec 7 [cited 2021 Aug 25];72(15):1378–82. Available from: <http://www.thieme-connect.de/products/ejournals/html/10.1055/s-2006-951719>
12. Connolly SA, Jardetzky TS, Longnecker R. The structural basis of herpesvirus entry. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2021 Feb 21 [cited 2021 Aug 25];19(2):110–21. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00448-w>
13. Herpes genital - Doenças infecciosas - Manuais MSD edição para profissionais [Internet]. [cited 2021 Aug 25]. Available from: <https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/doencas-infecciosas/herpes-virus/herpes-genital>
14. Gupta R, Warren T, Wald A. Genital herpes. *Lancet* [Internet]. 2007 Dec 22 [cited 2022 May 11];370(9605):2127–37. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673607619084/fulltext>
15. Watanabe D. Medical application of herpes simplex virus. *J Dermatol Sci* [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2023 Jun 15];57(2):75–82. Available from: <http://www.jdsjournal.com/article/S0923181109003077/fulltext>
16. Zhu S, Viejo-Borbolla A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence* [Internet]. 2021 [cited 2023 Jun 15];12(1):2670. Available from: </pmc/articles/PMC8923070/>
17. Liu Z, Niu F, Xie Y, Xie S, Liu Y, Yang Y, et al. A review: Natural polysaccharides from medicinal plants and microorganisms and their anti-herpetic mechanism. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Aug 25];129:110469. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32768956/>

18. Rodrigues Pinto Lima L. Diagnóstico, epidemiologia e caracterização molecular do Herpesvírus humano 2 (HHV-2) em mulheres profissionais do sexo e gestantes [Internet]. Fundação Oswaldo Cruz; 2017 [cited 2021 Aug 25]. Available from: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/24195>
19. Jiang Y-CC, Feng H, Lin Y-CC, Guo X-RR. New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. *Int J Oral Sci* [Internet]. 2016 Mar 25 [cited 2021 Sep 8];8(1):1–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/ijos20163>
20. Krummenacher C, Baribaud F, Ponce De Leon M, Baribaud I, Whitbeck JC, Xu R, et al. Comparative usage of herpesvirus entry mediator A and nectin-1 by laboratory strains and clinical isolates of herpes simplex virus. *Virology* [Internet]. 2004 May 1 [cited 2021 Sep 10];322(2):286–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15110526/>
21. Yan Y, Hu K, Deng X, Guan X, Luo S, Tong L, et al. Immunization with HSV-2 gB-CCL19 Fusion Constructs Protects Mice against Lethal Vaginal Challenge. *J Immunol* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2022 Mar 16];195(1):329–38. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/195/1/329>
22. Yan Y, Chen R, Wang X, Hu K, Huang L, Lu M, et al. CCL19 and CCR7 Expression, Signaling Pathways, and Adjuvant Functions in Viral Infection and Prevention. *Front Cell Dev Biol*. 2019 Oct 1;7:212.
23. Chew T, Taylor KE, Mossman KL. Innate and adaptive immune responses to herpes simplex virus. *Viruses* [Internet]. 2009 Nov 18 [cited 2022 Mar 18];1(3):979–1002. Available from: [/pmc/articles/PMC3185534/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22143115/)
24. AJ L, AA A. Herpes simplex virus-2 in the genital mucosa: insights into the mucosal host response and vaccine development. *Curr Opin Infect Dis* [Internet]. 2012 Feb [cited 2021 Sep 21];25(1):92–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22143115/>
25. Krzyzowska M, A Shestakov A, K Eriksson K, F Chiodi F. Role of Fas/FasL in regulation of inflammation in vaginal tissue during HSV-2 infection. *Cell Death Dis* [Internet]. 2011 Mar 17 [cited 2021 Sep 21];2(3):e132–e132. Available from: <https://www.nature.com/articles/cddis201114>
26. Schnitzler P, Nolkemper S, Stintzing FCC, Reichling J. Comparative in vitro study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations. *Phytomedicine*

[Internet]. 2008 Jan 25 [cited 2021 Aug 25];15(1–2):62–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18068963/>

27. KIVRAK Ş, GÖKTÜRK T, KIVRAK İ, KAYA E, KARABABA E. Investigation of phenolic profiles and antioxidant activities of some *Salvia* species commonly grown in Southwest Anatolia using UPLC-ESI-MS/MS. *Food Sci Technol* [Internet]. 2019 Jun 19 [cited 2021 Aug 25];39(2):423–31. Available from: <http://www.scielo.br/j/cta/a/YxPKBR6nkk7vqQ6njBtjMBh/?lang=enLamia>

28. Zhang J, Onakpoya IJ, Posadzki P, Eddouks M. The Safety of Herbal Medicine: From Prejudice to Evidence. *Evidence-Based Complement Altern Med* [Internet]. 2015 [cited 2021 Aug 25];2015:1–3. Available from: </pmc/articles/PMC4370194/>

29. O'Leary N, Moroni P. Las especies de *Salvia* (Lamiaceae) para Argentina. *Darwiniana* [Internet]. 2016 Jul 31 [cited 2021 Sep 29];4(1):91–131. Available from: <http://www.ojs.darwin.edu.ar/index.php/darwiniana/article/view/694/698>

30. Giuliani C, Ascriczzi R, Tani C, Bottoni M, Maleci Bini L, Flamini G, et al. *Salvia uliginosa* Benth.: Glandular trichomes as bio-factories of volatiles and essential oil. *Flora Morphol Distrib Funct Ecol Plants*. 2017 Aug 1;233:12–21.

31. Pinto PS. Terpenóides em espécies do gênero *salvia* (lamiaceae) [Internet]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012 [cited 2021 Sep 29]. Available from: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/62081>

32. Bordignon S. *Salvia uliginosa* Benth. [Internet]. 2013 [cited 2021 Dec 17]. Available from: https://floradigital.ufsc.br/open_sp.php?img=10471

33. Moezzi MS. Comprehensive in silico screening of flavonoids against SARS-CoV-2 main protease. *J Biomol Struct Dyn* [Internet]. 2022 [cited 2023 Mar 30]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36342071/>

34. Mori M, Ciaco S, Mély Y, Karioti A. Inhibitory Effect of Lithospermic Acid on the HIV-1 Nucleocapsid Protein. *Molecules*. 2020;

35. Moreno RP, Rhodes A, Chiche J-D. The ongoing H1N1 flu pandemic and the intensive care community: challenges, opportunities, and the duties of scientific societies and intensivists. *Intensive Care Med*. 2009 Dec;35(12):2005–8.

36. Zhu S, Wen H, Wang W, Chen Y, Han F, Cai W. Anti-hepatitis B virus activity of lithospermic acid, a polyphenol from *Salvia miltiorrhiza*, in vitro and in vivo by autophagy regulation. *J Ethnopharmacol*. 2023 Feb 10;302:115896.

37. Shi S, Xie L, Ma S, Xu B, An H, Ye S, et al. Computational and experimental studies of salvianolic acid A targets 3C protease to inhibit enterovirus 71 infection. *Front Pharmacol*. 2023 Mar 2;14:543.
38. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2008 [cited 2023 Mar 30];445:77–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18425443/>
39. Yang F, Jiang X lan, Tariq A, Sadia S, Ahmed Z, Sardans J, et al. Potential medicinal plants involved in inhibiting 3CLpro activity: A practical alternate approach to combating COVID-19. *J Integr Med* [Internet]. 2022 Nov 1 [cited 2023 Apr 3];20(6):488. Available from: </pmc/articles/PMC9359926/>
40. Park JY, Kim JH, Kim YM, Jeong HJ, Kim DW, Park KH, et al. Tanshinones as selective and slow-binding inhibitors for SARS-CoV cysteine proteases. *Bioorg Med Chem* [Internet]. 2012 Oct 10 [cited 2023 Apr 3];20(19):5928. Available from: </pmc/articles/PMC7127169/>
41. Abd-Elazem IS, Chen HS, Bates RB, Huang RCC. Isolation of two highly potent and non-toxic inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integrase from *Salvia miltiorrhiza*. *Antiviral Res* [Internet]. 2002 Jul [cited 2021 Aug 25];55(1):91–106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12076754/>
42. Bang S, Li W, Ha TKQ, Lee C, Oh WK, Shim SH. Anti-influenza effect of the major flavonoids from *Salvia plebeia* R.Br. via inhibition of influenza H1N1 virus neuraminidase. *Nat Prod Res* [Internet]. 2018 May 19 [cited 2021 Aug 25];32(10):1224–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28504013/>
43. Liang Y yu, Li K wei, Niu F jv, Li Y, Wei H cheng, Dai Y lei, et al. *Salvia plebeia* R. Br. polysaccharides (SPP) against RSV (respiratory syncytial virus) infection: Antiviral effect and mechanisms of action. *Biomed Pharmacother*. 2021;141(June):111843.
44. Zackria AA, Pattabiraman R, Murthy TPK, Kumar SB, Mathew BB, Biju VG. Computational screening of natural compounds from *Salvia plebeia* R. Br. for inhibition of SARS-CoV-2 main protease. *Vegetos* [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2023 Apr 4];35(2):345. Available from: </pmc/articles/PMC8523934/>
45. Cezarotto C. Isolamento e atividade antiqumiotóxica in vitro de diterpenos de espécies de *Salvia* provenientes do sul do Brasil [Internet]. Vol. 1. UFRGS; 2018. Available from: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/188739>

46. Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, et al. Methods of in vitro toxicology. *Food Chem Toxicol*. 2002 Feb 1;40(2–3):193–236.
47. El Sayed KA. Natural products as antiviral agents. In: *Studies in Natural Products Chemistry* [Internet]. Elsevier; 2000 [cited 2023 Jul 4]. p. 473–572. Available from: [/pmc/articles/PMC7147881/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21046755/)
48. Cao C, Liu B, Shen W, Wang H, Li Y. [Research on antiproliferative effect of flavones isolated from *Laggera pterodonta*]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* [Internet]. 2010 Aug [cited 2023 Aug 24];35(16):2171–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21046755/>
49. Wang Y, Yuan MM, Zhou J, Zheng XH, Yuan CJ, Chen S, et al. [Anti-herpes simplex virus type I of tectorigenin derivative and effect on Toll-like receptors in vitro]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* [Internet]. 2022 Aug 15 [cited 2023 Aug 24];47(16):4428–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36046872/>
50. Luo R, Dong Y, Fang F. [The experimental study of the anti-enterovirus effects of drugs in vitro]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* [Internet]. 2001 Jun [cited 2023 Aug 24];15(2):135–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11444254/>
51. Cui GZ, Zhou QS, Cheng QQ, Rao FQ, Cheng YM, Tian Y, et al. [Transcriptomic analysis of the Δ PaLoc mutant of *Clostridioides difficile* and verification of its toxicity]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* [Internet]. 2022 May 6 [cited 2023 Aug 24];56(5):601–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35644974/>
52. Silva AH. Estratégias Para Avaliação Da Toxicidade De Sistemas Nanoestruturados [Internet]. UFSC; 2011. Available from: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/95628>
53. Esquivel B, Burgueño-Tapia E, Bustos-Brito C, Pérez-Hernández N, Quijano L, Joseph-Nathan P. Absolute configuration of the diterpenoids icetexone and conacytone from *Salvia ballotaeflora*. *Chirality* [Internet]. 2018 Feb;30(2):177–88. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/chir.22781>
54. Domínguez XA, González H, Aragón R, Gutiérrez, marroquín JS, Watson W. Mexican medicinal plants XXIX. Three new diterpene quinones from *Salvia ballotaeflora*. *Planta Med*. 1976;30(3):237–41.
55. Lozano E, Barrera P, Salinas R, Vega I, Nieto M, Tonn C, et al. Sesquiterpene lactones and the diterpene 5-epi-icetexone affect the intracellular and extracellular stages of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Int* [Internet]. 2012

Dec;61(4):628–33.

Available

from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383576912000906>

56. Sanchez AM, Jimenez-Ortiz V, Sartor T, Tonn CE, García EE, Nieto M, et al. A novel icetexane diterpene, 5-epi-icetexone from *Salvia gilliessi* is active against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* [Internet]. 2006 May;98(2):118–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X06000453>