



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS



AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIVIRAL DA ESPÉCIE VEGETAL
Tanacetum vulgare L. (Asteraceae)

THELMA ONOZATO

ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª TÂNIA UEDA-NAKAMURA

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. CELSO VATARU NAKAMURA

MARINGÁ
2007



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS



AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIVIRAL DA ESPÉCIE VEGETAL
Tanacetum vulgare L. (Asteraceae)

THELMA ONOZATO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos.

MARINGÁ
2007

Dedico este trabalho aos meus pais,
Toneo e Rita.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos do Departamento de Análises Clínicas e no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho, em especial:

Aos meus pais, Toneo e Rita e minhas irmãs Erika e Raquel pelo apoio e amor incondicional;

À minha orientadora, Professora Tania Ueda Nakamura pela confiança, incentivo e apoio para realização deste trabalho;

Aos professores Celso Vataru Nakamura, Diógenes Aparício Garcia Cortez e Benedito Prado Dias Filho pelas valiosas contribuições;

A todos meus amigos, por compartilharem comigo os momentos de alegria e por me confortarem nos momentos de tristeza durante a realização desta dissertação, em especial: Alessandra Zacarias dos Santos, Cleide Mara Faria, Ivens Camargo Filho, Heloísa Bressan Gonçalves, Erika Ravazzi Franco Ramos, Flaviano João Basílio Marçal, Jackeline Tiemi Guinoza, Mariele Caroline Puhl, Erika Izumi, Simone Evellin Daniel Hernandes, Patrícia Regina dos Santos, Kelly Ishida, Denise Scoaris e Jean Colacite;

Ao pessoal do apoio técnico, Zelita Rodrigues de Souza, Prisciliana M. da S. Carvalho, Maria Aparecida Manzotti e Marinete Martinez Vicentim, pela gentileza e disposição em ajudar sempre.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura esquemática do vírus herpes simplex.....	13
Figura 2: <i>Tanacetum vulgare</i> L. (Asteraceae).....	21
Figura 3A: CCD do extrato bruto EAE e suas frações.....	27
Figura 3B: CCD do extrato bruto EBL e suas frações.....	27
Figura 4: Espectro de RMN ¹ H da fração 17C (300 MHz, CDCl ₃).....	38
Figura 5: Espectro de RMN ¹³ C da fração 17C (75,45 MHz, CDCl ₃).....	39
Figura 6: DEPT 90° e 135° da fração 17C (75,45 MHz, CDCl ₃).....	39
Figura 7: Estrutura química do estigmasterol	39
Figura 8: Estrutura química do partenolídeo.....	43
Figura 9: Espectro de RMN ¹ H da substância 49-52D (300 MHz, CDCl ₃).....	43
Figura 10: Espectro de RMN ¹³ C da substância 49-52D (75,45 MHz, CDCl ₃).....	44
Figura 11: DEPT 90° e 135° da substância 49-52D (75,5 MHz, CDCl ₃).....	44
Figura 12: Espectro de COSY ¹ H – ¹ H da substância 49-52D em CDCl ₃	45
Figura 13: Espectro de HMQC da substância 49-52D em CDCl ₃	46
Figura 14: Espectro de HMBC da substância 49-52D em CDCl ₃	46
Figura 15: Atividade antiviral sobre o HSV-1 dos extratos brutos EAE e EBL.....	48
Figura 16: Atividade antiviral sobre o HSV-1 das frações do EAE.....	49
Figura 17: Atividade antiviral da substância purificada 49-52D (partenolídeo).....	49
Figura 18: Atividade antiviral do partenolídeo por ensaio de redução de placas.....	51

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1: Obtenção e fracionamento do extrato bruto EAE de <i>T. vulgare</i>	26
Fluxograma 2: Isolamento das substâncias 17C e 49-52D a partir da fração F2.....	31
Fluxograma 3: Obtenção e fracionamento do extrato bruto EBL de <i>T. vulgare</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Drogas que interferem nas diversas etapas de replicação viral.....	17
Tabela 2: Sistema eluente e frações obtidas do fracionamento do EAE de <i>T. vulgare</i>	25
Tabela 3: Sistema eluente e frações obtidas do fracionamento da fração F2.....	28
Tabela 4: Frações reunidas, e seus respectivos pesos, obtidas da fração F2.....	28
Tabela 5: Sistema eluente e frações obtidas do fracionamento da fração 72-74B	29
Tabela 6: Frações reunidas, e seus respectivos pesos, obtidas da fração 72-74B.....	29
Tabela 7: Sistema eluente e frações obtidas do fracionamento da fração 103-113C.....	30
Tabela 8: Frações reunidas, e seus respectivos pesos, obtidas da fração 103-113C	30
Tabela 9: Dados de RMN ¹ H (300MHz) em CDCl ₃ da substância 17 C comparados com os valores de deslocamento químico de hidrogênio para o estigmasterol.....	40
Tabela 10: Dados de RMN ¹³ C (75,45 MHz) em CDCl ₃ da substância 17 C comparados com os valores de deslocamento químico do estigmasterol.....	41
Tabela 11: Dados de RMN ¹ H (300MHz) em CDCl ₃ da substância 49-52D comparados com os valores de deslocamento químico de hidrogênio para o partenólídeo.....	42
Tabela 12: Dados de RMN ¹³ C (75,45 MHz) em CDCl ₃ da substância 49-52D comparados com os valores de deslocamento químico do partenólídeo..	47
Tabela 13: Concentração efetiva 50% (EC ₅₀), citotoxicidade (CC ₅₀) e índice de seletividade (IS) do EAE, suas frações, substâncias purificadas de <i>T. vulgare</i> e padrão aciclovir.....	50
Tabela 14: Concentração efetiva 50% (EC ₅₀), citotoxicidade (CC ₅₀) e índice de seletividade (IS) do EBL, suas frações e padrão aciclovir.....	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Vírus e infecções virais.....	11
1.2. Família Herpesviridae.....	11
1.3. Vírus Herpes Simplex.....	12
1.4. Quimioterapia antiviral.....	16
1.5. Produtos naturais com atividade antiviral.....	18
1.6. <i>Tanacetum vulgare</i>	20
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Estudo fitoquímico.....	24
3.1.1. Material vegetal.....	24
3.1.2. Método extrativo.....	24
3.1.3. Purificação e isolamento das substâncias de <i>T. vulgare</i>	25
3.1.3.1. Fracionamento do extrato bruto EAE.....	25
3.1.3.2. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	26
3.1.3.3. Purificação da fração F2.....	27
3.1.3.4. Fracionamento do extrato bruto EBL.....	31
3.1.4. Identificação das substâncias purificadas de <i>T. vulgare</i>	32
3.2. Estudo da atividade biológica.....	32
3.2.1. Cultura de células.....	32

3.2.2. Vírus.....	33
3.2.3. Drogas.....	33
3.2.4. Citotoxicidade.....	34
3.2.5. Atividade antiviral pelo método colorimétrico da sulforodamina B.....	35
3.2.6. Atividade antiviral por ensaio de redução de placas.....	36
3.2.7. Análise estatística.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1. Identificação da fração 17C.....	38
4.2. Identificação da substância 49-52D.....	41
4.3. Citotoxicidade.....	47
4.4. Atividade antiviral pelo método colorimétrico da sulforodamina B.....	48
4.5. Atividade antiviral por ensaio de redução de placas.....	51
5. ANEXO: <i>Tanacetum vulgare</i>: anti-herpesvirus activity of crude extract and the purified compound parthenolide.....	53
6. CONCLUSÕES.....	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. Vírus e infecções virais

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, causadores de inúmeras doenças humanas, tão simples quanto um resfriado comum ou fatais como o Ebola (JASSIM; NAJI, 2003). Eles são constituídos de genoma viral (DNA ou RNA) envolvidos por uma capa protéica, denominada capsídeo. O conjunto genoma + capa protéica constitui a nucleocápside. Alguns deles possuem também um envelope constituído por lipídeos, proteínas e carboidratos que, assim como o capsídeo, possuem receptores de ligação à célula hospedeira (HARRISON, 2002).

As doenças virais afetam o homem desde a formação dos primeiros assentamentos. O primeiro relato de infecção viral, causada pelo vírus da varíola, data de 2000 anos a.C. na China e leste da Ásia. Outras doenças virais são conhecidas desde a Antiguidade, entre elas a caxumba, a poliomielite, a influenza e a febre amarela (MIRANDA, 2002).

Com o advento da vacina, muitas doenças virais estão controladas, porém outras ainda estão sem tratamento eficaz, provocando mortes, seqüelas e afetando a qualidade de vida da população. Mudanças no meio ambiente (devastação de florestas e mudanças climáticas) e avanços na velocidade do transporte global criam um ambiente propício para a emergência e re-emergência de doenças virais (NICHOL *et al.*, 2000).

1.2. Família Herpesviridae

A família Herpesviridae tem ampla distribuição na natureza, cerca de 130 membros desta família já foram isolados de diversas espécies animais, mas somente nove deles têm o homem como hospedeiro natural. Os herpesvírus são classificados, com base nas propriedades biológicas, em três subfamílias (ROIZMAN; PELLET, 2002):

a) *Alphaherpesvirinae*: possuem uma vasta gama de hospedeiros, ciclo reprodutivo relativamente curto, se espalham rapidamente em cultura, destroem eficientemente células infectadas e têm capacidade de estabelecer infecções latentes principalmente nos gânglios sensoriais. São membros desta subfamília os vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2), causadores do herpes oral e genital, entre outras síndromes clínicas, e vírus da varicella-zoster (VZV), causador da varicela e do herpes-zoster.

b) *Betaherpesvirinae*: possuem uma gama de hospedeiros restrita, ciclo reprodutivo longo e em cultura progridem lentamente. Eles têm capacidade de estabelecer infecções latentes em glândulas secretórias, células linforeticulares, rins e outros tecidos. As células infectadas freqüentemente apresentam aumento de tamanho (citomegalia). São membros desta subfamília citomegalovírus humano (HCMV), agente etiológico da doença de inclusão citomegálica, herpesvírus humano 6A e 6B (HHV-6A e HHV-6B), causadores do exantema súbito (*roseola infantum*) e herpesvírus humano 7 (HHV-7), isolado em associação com o HHV-6 de pacientes com exantema súbito).

c) *Gammaherpesvirinae*: possuem uma gama de hospedeiros muito restrita e os vírus latentes são freqüentemente demonstrados em tecido linfóide. São membros desta subfamília vírus Epstein-Barr (EBV), agente etiológico da mononucleose infecciosa, e herpesvírus humano 8 (HHV-8), associado ao sarcoma de Kaposi.

1.3. Vírus herpes simplex

Estrutura

O vírus herpes simplex (HSV), pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Simplexvirus*. Sua estrutura compreende um cerne esférico e central de ácido desoxirribonucléico (DNA) linear, de fita dupla. Recobrimo o material genético há o capsídeo protéico, de simetria icosaédrica, constituído por 162 capsômeros.

Entre o capsídeo e o envelope há o tegumento, uma camada de material amorfo que contém proteínas e enzimas que auxiliam no início da replicação viral. O envelope, que recobre todo o vírion, é derivado da membrana da célula hospedeira, tem natureza lipoprotéica e glicoproteínas inseridas em sua superfície (Figura 1). As dimensões da partícula viral completa variam de 120 a 300 nm de diâmetro (MURRAY *et al.*, 2006 ; WHITLEY, 2002).

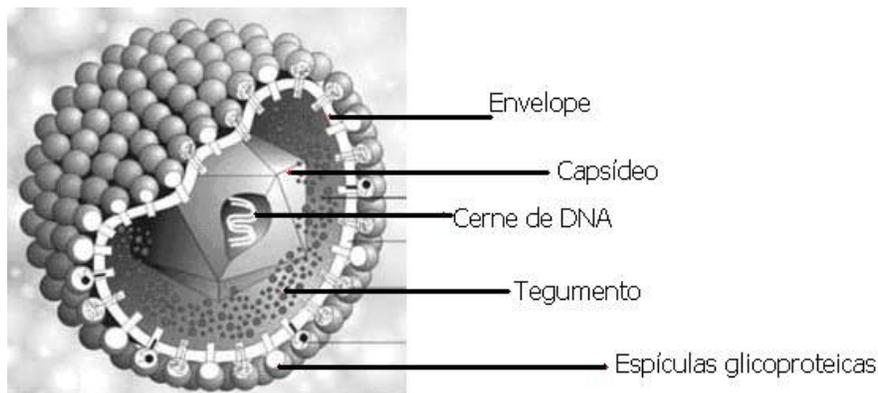


Figura 1. Estrutura esquemática do vírus herpes simplex. Fonte: www.primer.ru/std/gallery_std/hsv.htm, acesso em 03/11/2006.

Por ser um vírus envelopado, o HSV é susceptível ao tratamento químico com detergentes, solventes orgânicos e proteases, e ao tratamento físico com calor, radiação ionizante e não-ionizante e ao ressecamento (MEHNERT; CANDEIAS, 2004; WHITLEY, 2002).

Os dois tipos sorológicos (HSV-1 e HSV-2) compartilham muitas características (homologia do DNA, determinantes antigênicos, tropismo tecidual e manifestações clínicas), podendo ser distinguidos por diferenças nessas propriedades (MURRAY *et al.*, 2006).

Replicação

Receptores no envelope viral promovem a adsorção dos vírions ao heparan-sulfato, um proteoglicano encontrado no lado externo de muitos tipos celulares (por isso heparina,

e outros polissacarídeos sulfatados podem impedir, reversivelmente, a adsorção e conseqüentemente a infecção viral) (DULBECCO; GINSBERG, 1980; MURRAY *et al.*, 2006).

A penetração das partículas do HSV ocorre principalmente por fusão do envelope viral com a membrana plasmática celular, permitindo a entrada da nucleocápside. No citoplasma o capsídeo separa-se do cerne viral, que é transportado para o núcleo da célula hospedeira.

A multiplicação viral inicia-se com a transcrição dos genes precoces imediatos, que codificam proteínas capazes de estimular a síntese do DNA e promover a transcrição dos genes virais precoces. As proteínas precoces são principalmente enzimas relacionadas à produção e cisão de DNA (inibição da síntese e início da degradação do RNA mensageiro e DNA celulares e síntese do DNA viral). O genoma viral inicia sua replicação logo após a síntese da polimerase DNA-dependente (proteína precoce), deflagrando a transcrição dos genes tardios, que codificam as proteínas estruturais.

A seguir, as proteínas do capsídeo são transportadas para o núcleo e envolvem o DNA viral. As glicoproteínas são sintetizadas e difundem-se para a membrana nuclear, onde ocorre o brotamento das nucleocápsides (apesar da maioria das partículas virais ter envelope originado de membrana nuclear, algumas partículas podem obtê-lo a partir de membranas citoplasmáticas). O vírion é então transportado para o citoplasma através do retículo endoplasmático e complexo de Golgi e liberado por exocitose ou lise celular (WHITLEY, 1996; MURRAY *et al.*, 2006).

Patogenia e síndromes clínicas

O HSV é transmitido de pessoa a pessoa através de soluções de continuidade e penetram o organismo susceptível pelas mucosas ou pele lesionada. A primeira replicação ocorre nas células epiteliais locais, seguida do transporte das partículas virais pelos axônios

dos nervos sensitivos periféricos até os gânglios sensitivos regionais, onde permanecem em latência. As drogas utilizadas atualmente afetam a síntese de DNA viral e não são efetivas na eliminação do vírus latente, pois, nesta fase não há replicação viral (ROIZMAN; KNIPE, 2002; WHITLEY, 2002).

A recidiva pode ser estimulada por fatores diversos, tais como: estresse, excesso de radiação ultravioleta, imunodepressão e traumatismos. Nestes casos, os vírus são reativados, migram de volta às células epiteliais, onde ocasionam lesões. Entretanto, as infecções recorrentes normalmente são menos graves, mais localizadas e de menor duração em relação aos episódios primários (MURRAY, *et al.*, 2006; MEHNERT; CANDEIAS, 2004).

A imunidade humoral e celular são necessárias para o controle da infecção pelo HSV. Interferons, células *natural killer*, macrófagos ativados, células T e anticorpos específicos, causam lise das células infectadas e resolução da doença. Entretanto, a imunopatologia causada pelas respostas inflamatórias é, também, responsável por parte dos sintomas (MURRAY *et al.*, 2006; WHITLEY, 2002).

As manifestações clínicas mais freqüentes da infecção primária do HSV-1 são ceratoconjuntivite, eczema variceliforme de Kaposi, paroníquia herpética (infecção do dedo), herpes gladiatorum (lesão cutânea disseminada), gengivoestomatite e meningoencefalite. O sorotipo 2 está normalmente relacionado ao herpes genital e neonatal. A reativação do vírus latente, após a infecção primária, pode se manifestar sob a forma de herpes labial ou genital e, ainda, sob as formas mais graves e raras do herpes generalizado e a meningoencefalite recidivante (WHITLEY, 1996; MEHNERT; CANDEIAS, 2004).

Em pacientes imunocompetentes as manifestações clínicas do HSV são usualmente auto-limitadas, mas são severas e prolongadas em pacientes imunocomprometidos.

Manifestações da infecção por HSV nestes indivíduos incluem pneumonia, esofagite, hepatite, colite e lesão cutânea disseminada (DE LOGU *et al.*, 2000; WHITLEY, 1996).

Os efeitos citopáticos (CPE) característicos da infecção por HSV incluem a formação de sincícios (células gigantes multinucleadas), citoplasma em balão e corpúsculos de inclusão intranucleares (WHITLEY, 2002).

Epidemiologia

A infecção causada pelo HSV é uma das infecções virais mais comuns em humanos, ela tem distribuição mundial e já foi descrita tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (MEHNERT; CANDEIAS, 2004).

O HSV-1 é transmitido, principalmente, através do contato oral ou do uso de objetos recém contaminados. Mais de 90% da população que vive em regiões subdesenvolvidas apresentam anticorpos contra o HSV-1 aos 2 anos de idade. A transmissão do HSV-2 ocorre, principalmente, por contato sexual ou de uma mãe infectada para o lactente durante o parto normal. A infecção inicial por HSV-2 ocorre mais tardiamente quando comparada ao HSV-1 e está correlacionada com o aumento da atividade sexual. As mulheres apresentam taxas de infecção maiores que os homens (MURRAY *et al.*, 2006; MEHNERT; CANDEIAS, 2004).

1.4. Quimioterapia antiviral

Devido à íntima associação da multiplicação viral com a celular, o desenvolvimento de drogas específicas ficou estagnado por muito tempo. Com a melhor compreensão dos processos de replicação viral, vários eventos específicos do vírus se mostraram susceptíveis à quimioterapia seletiva (DE CLERCQ, 2001).

O ciclo de replicação viral pode ser dividido basicamente em cinco etapas: adsorção, penetração, síntese dos componentes virais, maturação, e liberação (HARRISON, 2002).

Todas essas etapas são alvos potenciais de intervenção quimioterápica, conforme a tabela 1.

Tabela 1: Drogas que interferem nas diversas etapas de replicação viral (HAYDEN, 1996).

<i>Estágio de replicação</i>	<i>Classes de inibidores seletivos</i>
Adsorção / Penetração	Bloqueadores do receptor, anticorpos anti-receptor
Desnudamento	Bloqueadores de canal de cálcio, estabilizadores dos capsídeos, inibidores da fusão protéica.
Transcrição RNAm viral	Inibidores de DNA polimerase viral, RNA polimerase, transcriptase reversa, helicase, primase ou integrase virais.
Tradução de proteínas virais	Oligonucleotídeos de sentido inverso, ribozimas, inibidores das proteínas de regulação.
Maturação	Inibidores das proteases
Montagem	Interferons, inibidores da montagem protéica.
Liberação	Anticorpos antivirais, linfócitos citotóxicos.

Apesar dos alvos para terapia antiviral serem etapas da replicação comuns a todos os vírus, as diferenças na estrutura do vírion e na biossíntese do genoma viral, devem ser consideradas na procura por novas drogas antivirais específicas.

Segundo De Clercq (2004), o tratamento farmacológico das infecções virais conta com um arsenal de cerca de 40 drogas licenciadas, a maioria utilizada para o tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Para o tratamento das infecções causadas pelo HSV são utilizados os análogos nucleosídeos: aciclovir, valaciclovir, penciclovir, famciclovir, cidofovir, idoxuridina, trifluridina, brivudina, vidarabina e também um análogo inorgânico dos pirofosfatos: foscarnet. Sendo que o aciclovir é a droga de escolha no tratamento das infecções causadas por HSV em pacientes ambulatoriais, por ser mais seletivo e menos tóxico (DE CLERCQ, 2004; HAYDEN, 1996).

O aciclovir (ACV) é um análogo do nucleosídeo guanosina, que possui ação seletiva contra o HSV e VZV. Sua ação antiviral depende da fosforilação inicial pela timidina-quinase viral, seguindo-se a introdução de mais dois radicais fosfato pelas timidina-quinases celulares. Na forma trifosfatada o ACV compete com o trifosfato de guanosina, produzindo interrupção do alongamento da cadeia de DNA e inativando a DNA polimerase viral. A seletividade e toxicidade mínima do ACV resulta da utilização de enzimas virais (timidina-quinase e DNA polimerase virais) para inibir a infecção (MURRAY *et al.*, 2006).

Apesar dos análogos nucleosídeos serem usualmente efetivos no tratamento das infecções por herpes simples, existem relatos de cepas resistentes ao aciclovir (timidina-quinase ou DNA polimerase mutantes), principalmente em pacientes imunocomprometidos (CHIBO *et al.*, 2004).

O número reduzido de drogas utilizadas na terapêutica antiviral, cepas resistentes e os efeitos colaterais causados por estas drogas justificam a procura de novos agentes antivirais mais eficazes e menos tóxicos (VLIETINCK; BERGHE, 1991).

1.5. Produtos naturais com atividade antiviral

O reino vegetal é uma das fontes mais importantes de produtos biologicamente ativos. Nas últimas décadas, o estudo de plantas popularmente utilizadas no tratamento de enfermidades tem sido estimulado pela OMS. Além da comprovação científica da atividade biológica e o mecanismo de ação de substâncias extraídas de plantas, o conhecimento dos riscos (efeito tóxico, utilização de dosagens inadequadas, interação com medicamentos e alimentos, caracterização e qualidade físico-química e microbiológica da droga) são fatores importantes para validar a utilização destas como fitoterápico (WHO, 1999). Alcalóides, polissacarídeos, flavonóides, terpenóides, compostos fenólicos e

peptídeos são alguns exemplos de compostos encontrados em plantas que apresentam atividade antiviral e podem ser estudados para o desenvolvimento de novos fármacos (JASSIM; NAJI, 2003).

Vários grupos de pesquisadores têm se dedicado ao estudo de produtos naturais com potencial antiviral. Abad *et al.* (2000) testaram o extrato etanólico e aquoso de dez plantas medicinais da Península Ibérica contra o HSV-1 (vírus DNA envelopado), o vírus da estomatite vesicular – VSV – (vírus RNA envelopado) e o poliovírus tipo 1 – PV-1 – (vírus RNA não-envelopado). Somente os extratos aquosos apresentaram atividade antiviral. Os extratos de *Nepeta nepetella*, *N. coerulea*, *N. tuberosa*, *Dittrichia viscosa* e *Sanguisorba minor magnolii* inibiram a replicação do HSV-1 e VSV, apenas o extrato de *D. viscosa* exibiu atividade contra o PV-1.

Em “screening” para atividade antiviral *in vitro*, o extrato metanólico de 36 plantas medicinais da Ilha de La Réunion, França, foram testados contra o HSV-1 e o PV-2. *Citrus hystrix*, *Erythroxylum laurifolium*, *Lomatophyllum macrum* e *Obetia ficifolia* foram ativos contra o HSV-1. *Olax psittacorum*, *Pachypodium geayi*, *Psiadia dentat* e *Psiadia retusa* foram ativos contra o PV-2. Apenas o extrato de *Senecio ambavilla* foi ativo contra ambos os vírus (FORTIN *et al.*, 2002).

Extratos e óleos essenciais de 18 plantas utilizadas pela população da Índia foram submetidos a uma triagem para verificar suas atividades contra o HSV-1. Os extratos metanólicos de *Hypericum mysorens* e *H. hookerianum*, e acetônico de *Usnea complanta* apresentaram atividade antiherpética, com proteção de 100% nos testes de inibição dos CPE. Outros extratos apresentaram atividade parcial contra o vírus (VIJAYAN *et al.*, 2004).

No Brasil, estudos *in vitro* mostraram a atividade de seis plantas medicinais da Mata Atlântica brasileira contra o HSV-1 e o PV-2. *Cuphea carthagenensis*, *Tillandsia*

usneoides, *A. angustifolia*, *Wilbrandia ebracteata* e *Lippia alba* apresentaram atividade antiherpética. E apenas o extrato de *L. alba* mostrou atividade contra o PV (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2005).

A atividade antiviral de produtos purificados de plantas também tem sido relatada. No trabalho realizado por Kurokawa *et al.* (1999) o ácido morônico purificado do extrato aquoso de *Rhus javanica* apresentou atividade *in vitro* e *in vivo* contra quatro cepas de herpesvírus, sendo duas aciclovir-resistente, evidenciando que o modo de ação deste composto é diferente do apresentado pelo aciclovir.

Kuo *et al.* (2006) isolaram a lignana yatein da espécie vegetal chinesa *Chamaecyparis obtusa*, que se mostrou eficiente na inibição do vírus HSV-1 em células HeLa, sem citotoxicidade aparente (concentração efetiva 50% (EC₅₀) = 30,6 µM e concentração citotóxica 50% (CC₅₀) > 100µM). O mecanismo de ação antiviral do yatein parece estar relacionado com a inibição da expressão dos genes precoces imediatos.

1.6. *Tanacetum vulgare*

Tanacetum vulgare, conhecido popularmente como Tanaceto, Catinga de mulata, Atanásia, Erva dos vermes e em inglês como “Tansy”, tem como sinonímia científica *Chrysantemun vulgare* L. Bernh. Pertencente à família Asteraceae, é um subarbusto perene, caracterizado por apresentar caule ereto, com altura de 0,7 a 1,2 m., formando uma pequena touceira. Suas folhas são pecioladas, alternas, compostas pinadas, glabras, com cerca de 25 cm de comprimento. Possui inflorescências em capítulos dispostos em corimbos terminais, com flores de cor amarela. Seus frutos são do tipo aquênio. Multiplica-se por sementes (Figura 2). Nativo de terrenos úmidos da Europa e Ásia, é cultivado como planta ornamental no sul do Brasil. As partes aéreas são utilizadas popularmente como anti-helmíntico, carminativo, inseticida, emenagogo, digestivo, anti-espasmódico, para

aliviar dor de dente e afecções de pele. Popularmente são utilizadas as partes aéreas, principalmente as sumidades florais na forma de infusão e extrato hidroalcoólico (ALONSO, 1998; LORENZI; MATOS, 2002; NEWALL *et al.*, 2002).



Figura 2. *Tanacetum vulgare* L. (Asteraceae). Fonte: http://www.co.olmsted.mn.us/upload_dir/parkflora/tanacetum_vulgare.jpg, acesso em 03/11/2006.

Na composição química do *T. vulgare* podem ser encontrados vários grupos de compostos com atividade biológica comprovada cientificamente, sendo os terpenóides, flavonóides e lactonas sesquiterpênicas os mais importantes (ALONSO, 1998).

Flavonóides isolados de *T. vulgare* apresentaram atividade antiinflamatória *in vitro*, inibindo as enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase em leucócitos de ratos (WILLIAMS *et al.*, 1999). Em outro estudo, a lactona sesquiterpênica partenolídeo, isolada do *T. vulgare*, demonstrou atividade antiinflamatória superior àquelas alcançadas pelos flavonóides isolados da mesma planta. No teste de edema de orelha realizado em camundongos, o partenolídeo apresentou dose capaz de inibir o edema em 50% (ID₅₀) de 0,18 µmol/orelha, enquanto que a flavona mais ativa, metoxiflavona jaceosidin, apresentou um ID₅₀ de 0,50 µmol/orelha (SCHINELLA *et al.*, 1998).

O extrato clorofórmico de *T. vulgare* e a substância purificada partenolídeo também apresentaram atividade antiulcerogênica no teste de inibição de úlcera gástrica induzida pela administração oral de etanol. Os resultados mostraram uma inibição dose-dependente em concentrações variando entre 2,5 e 80 mg/kg do extrato clorofórmico e de 5 a 40 mg/kg para o partenolídeo (TOURNIER *et al.*, 1999).

Chiasson *et al.* (2001), descreveram propriedades acaricidas para o óleo essencial de *T. vulgare*, quando extraído por destilação. Análises cromatográficas indicaram que a beta-thujona é o componente majoritário e provavelmente está envolvida na atividade acaricida do óleo essencial desta espécie vegetal.

Ensaio realizados com várias espécies vegetais no Laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos da Universidade Estadual de Maringá revelaram que o extrato bruto hidroalcoólico obtido das partes aéreas de *T. vulgare* foi capaz de inibir o CPE causado por herpesvírus bovino e PV em células de carcinoma de laringe humana (Hep-2) (dados não publicados). Considerando a necessidade de se encontrar novas substâncias efetivas no combate às infecções causadas por vírus, a planta popularmente conhecida como Erva-dos-vermes, muito utilizada na medicina popular no tratamento de diversas enfermidades, foi escolhida para o estudo fitoquímico e da atividade antiviral. Os dados obtidos neste trabalho poderão ser utilizados também para validar o uso desta planta como fitoterápico no tratamento de doenças causadas pelo vírus herpes simplex.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar o estudo fitoquímico e avaliar a atividade antiviral das partes aéreas da espécie vegetal *Tanacetum vulgare*.

2.2. Objetivos específicos

- Efetuar os processos de extração, fracionamento, isolamento e identificação química de substâncias com atividade antiviral a partir das partes aéreas de *T. vulgare*;
- Realizar ensaios biológicos *in vitro* para avaliar a atividade antiviral do extrato bruto, frações e substâncias isoladas das partes aéreas da planta, utilizando cultura de células Vero e o vírus herpes simplex tipo 1;
- Realizar ensaios de citotoxicidade do extrato bruto, frações e substâncias isoladas em células Vero;
- Verificar o possível mecanismo de ação da substância isolada ativa sobre o vírus herpes simplex tipo 1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Estudo fitoquímico

3.1.1. Material vegetal

As partes aéreas da espécie vegetal *Tanacetum vulgare* L. (Asteraceae) foram coletadas no Horto Didático de Plantas Medicinais Professora Irenice Silva da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em janeiro de 2004, e uma exsicata foi depositada como documento taxonômico no Herbário da UEM, sob o número 10.070. Após lavagem em água corrente para retirada de sujidades, o material vegetal foi seco em estufa de ar circulante (Quimis[®], modelo Q-31) a 40 °C, sobre folha de papel, pardo durante 4 dias. Quando a planta apresentou-se quebradiça ao toque, o material seco foi moído em moinho de facas rotativas (Tecnal Marconi[®], modelo TE 048) para obtenção de um pó fino, que foi acondicionado e armazenado em local seco, fresco e ao abrigo da luz.

3.1.2. Método extrativo

O extrato bruto hidroalcoólico foi obtido pelo processo de remaceração, descrito por Sonaglio *et al.* (2003). Para cada parte do pó da planta (554,63 g) foram adicionadas duas partes de uma solução hidroalcoólica 90%. Após 4 horas de agitação à temperatura ambiente, em agitador mecânico, o líquido extrator foi filtrado em papel de filtro com auxílio de um funil de Büchner, acoplado a um kitasato ligado a uma bomba de vácuo. O macerado passou pelo mesmo processo até o esgotamento dos princípios ativos da planta. O filtrado obtido foi concentrado em rotaevaporador (Büchi[®], modelo R-114) a 40 °C, até completa eliminação do solvente. Posteriormente, foi adicionada água ao extrato obtido e a parte hidrossolúvel, denominada extrato bruto liofilizado (EBL), foi congelada em nitrogênio líquido e liofilizada (liofilizador: modelo 1-2 Christ[®] alpha), obtendo-se 67,14 g. A parte insolúvel em água, denominada extrato bruto acetato de etila (EAE), foi

solubilizada em acetato de etila e o solvente removido posteriormente por evaporação. Os extratos foram acondicionados em frascos hermeticamente fechados e armazenados a -20°C.

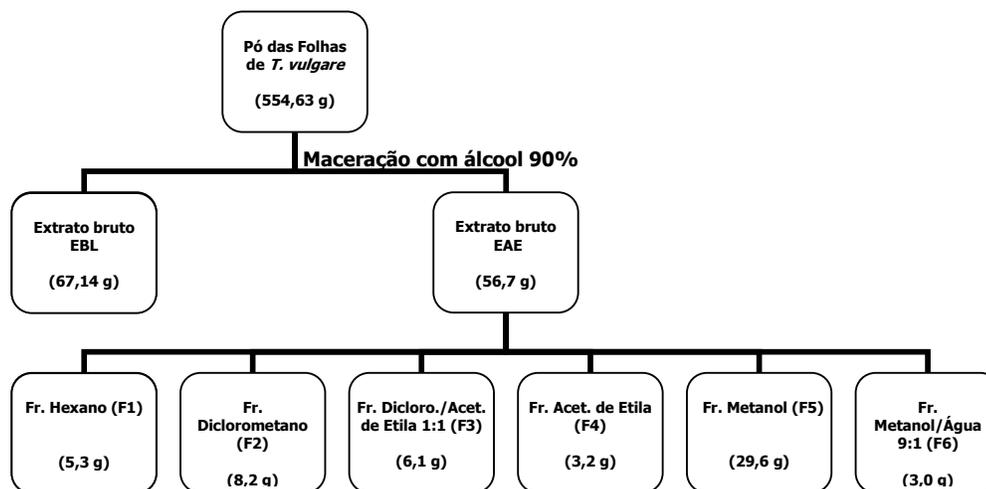
3.1.3. Purificação e isolamento das substâncias de *T. vulgare*

3.1.3.1. Fracionamento do extrato bruto EAE

O extrato bruto EAE foi fracionado através de coluna cromatográfica. Para este procedimento foi utilizada coluna cromatográfica de vidro (6,5 cm de diâmetro interno), acoplada a um Kitasato e este conectado a uma bomba de vácuo. A amostra (56,7 g) foi incorporada a 116 g de sílica gel e empacotada na coluna. Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (230-400 mesh ASTM - Merck®) (até a altura de 45 cm) e como fase móvel, solventes grau p.a. (Synth®) em gradiente de polaridade crescente: hexano; diclorometano (DCM); diclorometano/acetato de etila (1:1 v/v); acetato de etila (AcOEt); metanol (MeOH); metanol/água (9:1 v/v) (Tabela 2). Foram obtidas seis frações, denominadas de F1 a F6, que foram concentradas em rotaevaporador (Büchi®, modelo R-114) a 40 °C até a completa eliminação do solvente e submetidas aos ensaios biológicos. O fluxograma 1 ilustra a obtenção destas frações.

Tabela 2. Sistema eluente e frações obtidas do fracionamento do EAE de *T. vulgare*

Sistema eluente	Volume utilizado	Fração	Peso
Hexano	1 L	F1	5,3 g
Diclorometano	1 L	F2	8,2 g
Diclorometano / Acetato de etila (1:1)	1 L	F3	6,1 g
Acetato de etila	1 L	F4	3,2 g
Metanol	1 L	F5	29,6 g
Metanol / Água (9:1)	1 L	F6	3,0 g



Fluxograma 1. Obtenção e fracionamento do extrato bruto EAE de *T. vulgare*.

3.1.3.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)

O monitoramento das frações foi feito através de cromatografias em camada delgada. Para isto foram utilizadas placas de vidro 5 x 10 cm preparadas com uma espessura de 0,5 mm de sílica gel GF₂₅₄ (Merck®) ativadas a 105°C por 30 minutos ou cromatoplaças de alumínio com espessura de 0,2 mm de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck®).

O sistema eluente foi escolhido de acordo com as características químicas das substâncias presentes. A observação foi feita através da utilização de irradiação com luz UV (254 e 366 nm) e posterior revelação com reativo de Godin ou reagente natural, dependendo das características das substâncias. A figura 3 ilustra as cromatografias em camada delgada dos extratos brutos e frações de *T. vulgare*.

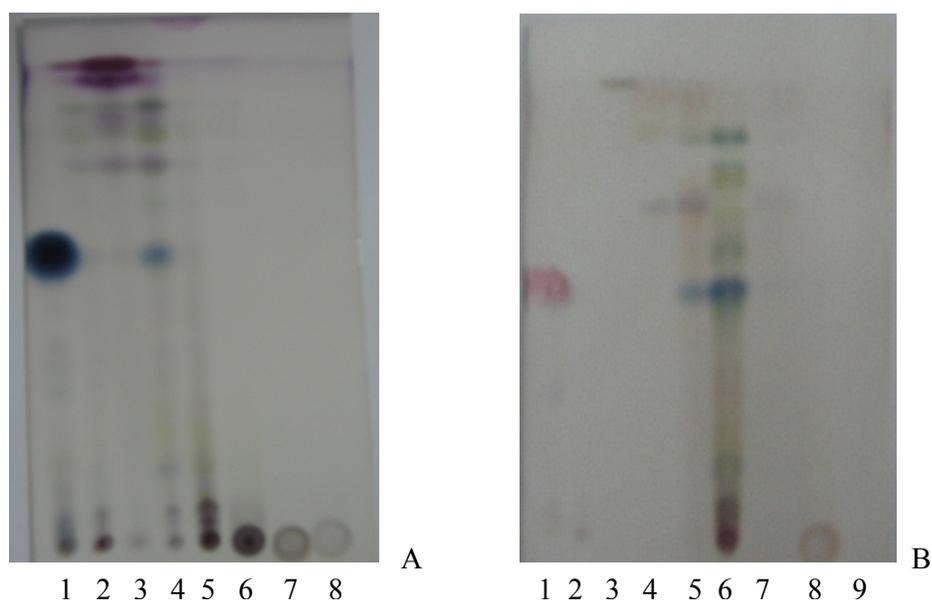


Figura 3. A – Cromatografia em camada delgada do extrato bruto EAE e suas frações: padrão de partenólídeo (1); extrato bruto EAE (2); fração F1 (3); fração F2 (4); fração F3 (5); fração F4 (6); fração F5 (7); fração F6 (8). B – Cromatografia em camada delgada do extrato bruto EBL e suas frações: padrão de partenólídeo (1); extrato bruto EBL (2); fração LF1 (3); fração LF2 (4); fração LF3 (5); fração LF4 (6); fração LF5 (7); fração LF6 (8); fração LF7 (9). Eluente: hexano/acetato de etila (7:3); revelador: reativo de Godin.

3.1.3.3. Purificação da Fração F2

Com base no rendimento e nos resultados dos testes biológicos descritos nos itens 3.4.4 e 3.2.5, a fração F2 foi escolhida para purificação por cromatografia de adsorção em coluna, utilizando coluna de vidro. A amostra (6g) foi incorporada em sílica gel e empacotada na coluna (diâmetro interno = 2,7 cm). Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 (230-400 mesh ASTM - Merck[®]) até a altura de 17,5 cm, e como fase móvel foram utilizados hexano, diclorometano e acetato de etila (Synth[®]) em várias proporções (Tabela 3). As 91 frações obtidas, denominadas de 1B a 91B, foram submetidas à cromatografia em camada delgada, as que apresentaram características semelhantes foram reunidas e concentradas até a completa eliminação do solvente orgânico, resultando em 22 frações (Tabela 4).

Tabela 3. Sistema eluente e frações obtidas do fracionamento da fração F2.

Sistema eluente	Volume utilizado	Fração	Volume recolhido / fração
Hexano	300 ml	1B	250 ml
Hex. / DCM (95:5)	400 ml	2B	150 ml
		3B – 13B	20 ml
Hex. / DCM (90:10)	300 ml	14B – 26B	20 ml
Hex. / DCM (85:15)	300 ml	27B – 37B	20 ml
Hex. / DCM (80:20)	400 ml	38B – 54B	20 ml
Hex. / DCM (50:50)	250 ml	55B – 65B	20 ml
DCM / AcOEt (95:5)	200 ml	66B – 73B	20 ml
DCM / AcOEt (90:10)	100 ml	74B – 77B	20 ml
DCM / AcOEt (85:15)	100 ml	78B – 82B	20 ml
DCM / AcOEt (80:20)	100 ml	83B – 87B	20 ml
DCM / AcOEt (50:50)	100 ml	88B – 91B	20 ml

Tabela 4. Frações reunidas, e seus respectivos pesos, obtidas da fração F2.

Frações reunidas	Peso das frações (mg)
1-2 B	14,2
3-9 B	2,6
10-16 B	2,8
17-19 B	1,6
20-22 B	2,6
23-28 B	11,5
29-31 B	12,2
32-34 B	16,3
35-37 B	21,1
38-40 B	22
41-44 B	36,8
45-46 B	15,1
47-53 B	28,5
54-59 B	77,4
60-66 B	566,8
67-68 B	209,4
69-71 B	2434,6
72-74 B	688,1
75-78 B	313,5
79-81 B	569,8
82-85 B	362,5
86-91 B	575,1

A fração 72-74B (615 mg) foi recromatografada em coluna de vidro com 2,7 cm de diâmetro interno e, utilizando como fase fixa sílica gel 60 (230-400 Mesh) (Merck®) até a altura de 19 cm e como fase móvel hexano, diclorometano e acetato de etila em várias proporções (Tabela 5). Foram obtidas 173 frações, denominadas de 1C a 173C, que foram submetidas à CCD e reunidas conforme suas características cromatográficas, resultando em 15 frações (Tabela 6). A fração 17C (20 mg) que apresentou perfil de pureza na CCD foi encaminhada para análise espectroscópica.

Tabela 5. Sistema eluente e frações obtidas do fracionamento da fração 72-74B.

Sistema eluente	Volume utilizado	Fração	Volume recolhido / fração
Hex / DCM (80:20)	200 ml	1C	200 ml
Hex / DCM (50:50)	300 ml	2C	250ml
Hex / DCM (30:70)	400 ml	3C	125 ml
DCM	350 ml	4C – 13C	20 ml
		14C – 24C	20 ml
		25C – 42C	6 ml
DCM / AcOEt (99:1)	400 ml	43C – 106C	6 ml
DCM / AcOEt (98: 2)	200 ml	107C – 139C	6 ml
DCM / AcOEt (95:5)	300 ml	140C – 173C	6 ml

Tabela 6. Frações reunidas, e seus respectivos pesos, obtidas da fração 72-74B.

Frações reunidas	Peso das frações (mg)
1-2 C	15,1
3-13 C	29,7
14-16 C	35,1
17 C	20
18-34 C	61,2
35-38 C	8,2
40-60 C	59,7
61-102 C	204,6
103-113 C	23,6
114-122 C	16,1
123-131 C	17,9
132-146 C	12,3
147-158 C	27,8
159-167 C	31,6
168-173 C	27,4

A fração 103-113C (23,6 mg) foi recromatografada em coluna de vidro com 1,3 cm de diâmetro interno, utilizando como fase fixa sílica gel 60 (230-400 Mesh) (Merck®) até a altura de 30 cm, e como fase móvel hexano e acetato de etila em várias proporções (Tabela 7). Foram obtidas 65 frações, denominadas de 1D a 65D, que foram submetidas à CCD e reunidas conforme suas características cromatográficas obtendo-se 8 frações (Tabela 8). A fração 49-52D (9 mg) que apresentou perfil de pureza na CCD foi encaminhada para análise espectroscópica.

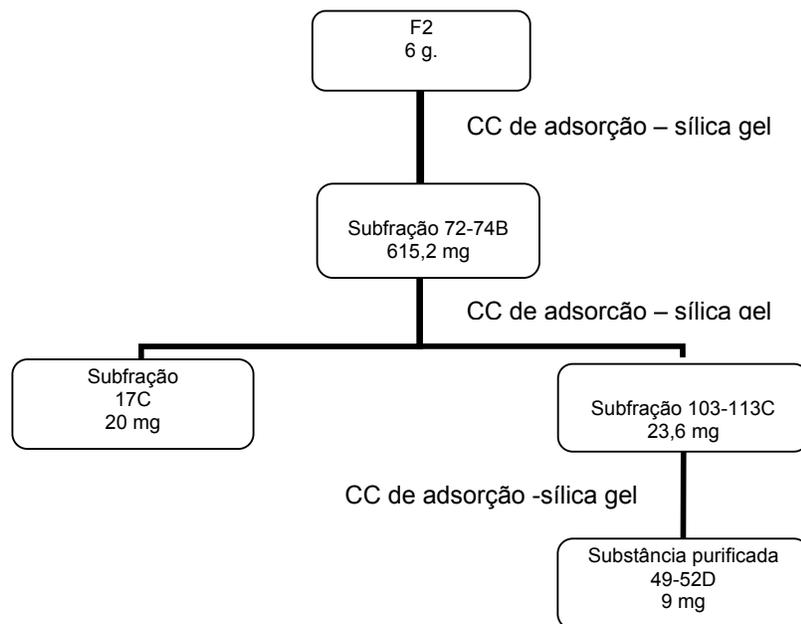
O fluxograma 2 ilustra a obtenção das duas substâncias purificadas da fração F2.

Tabela 7. Sistema eluente e frações obtidas do fracionamento da fração 103-113C

Sistema eluente	Volume utilizado	Fração	Volume recolhido / fração
Hex / AcOEt (80:20)	200 ml	1D – 3D	6 ml
		4D – 10D	4 ml
		11D – 43D	2 ml
		44D – 57D	6 ml
Hex / AcOEt (50:50)	200 ml	58D – 65D	20 ml

Tabela 8. Frações reunidas, e seus respectivos pesos, obtidas da fração 103-113C.

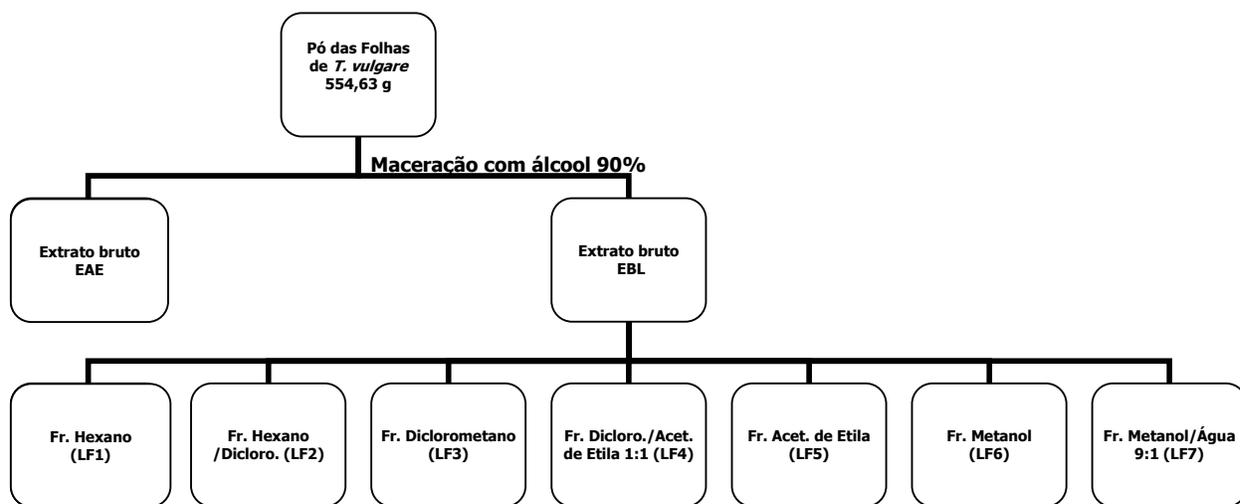
Frações reunidas	Peso das frações (mg)
1-21 D	1,7
22-34 D	2,1
35-41 D	2
42-47 D	1,4
48 D	1,7
49-52 D	9,7
53-56 D	2,5
57-65 D	1,8



Fluxograma 2. Isolamento das substâncias 17C e 49-52D a partir da fração F2.

3.1.3.4. Fracionamento do extrato bruto EBL

O extrato bruto EBL foi fracionado através de coluna cromatográfica. Para este procedimento foi utilizada coluna cromatográfica de vidro, acoplada a um Kitasato e este conectado a uma bomba de vácuo. A amostra (10 g) foi incorporada a 150 g de sílica gel 60 (230-400 mesh ASTM - Merck®) e empacotada na coluna. Como fase móvel foram utilizados solventes grau p.a. (Synth®) em gradiente de polaridade crescente: hexano; hexano/DCM (1:1); DCM; DCM/AcOEt (1:1); AcOEt; MeOH; MeOH/água (9:1). Foram obtidas sete frações, denominadas de LF1 a LF7, que foram concentradas em rotaevaporador (Büchi®, modelo R-114) a 40 °C até a completa eliminação do solvente e submetidas aos ensaios biológicos. O fluxograma 3 ilustra a obtenção destas frações.



Fluxograma 3. Obtenção e fracionamento do extrato bruto EBL de *T. vulgare*.

3.1.4. Identificação das substâncias purificadas de *T. vulgare*

A determinação estrutural das substâncias purificadas foi feita com base nas análises dos espectros de RMN unidimensionais de ^1H , ^{13}C , DEPT e bidimensionais de COSY (correlated spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) e HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence).

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em espectrômetro VARIAN, modelo GEMINI 2000 BB, 300 MHz (300,06 MHz para ^1H e 75,45 MHz para ^{13}C), utilizando-se solventes deuterados apropriados e tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

3.2. Estudo da atividade biológica

3.2.1. Cultura de células

Para os experimentos foram utilizadas células Vero (ATCC) cultivadas em DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium- (Gibco[®]) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco[®]) e 50µg/ml de gentamicina. A cultura de células foi mantida a 37 °C em estufa úmida (Fischer Scientific[®], modelo Isotemp) com tensão de 5% de CO₂, em garrafas para cultura celular (TPP[®]). As células foram observadas em microscópio

invertido (Zeiss®, modelo Axiovert 25) diariamente e o meio trocado quando o pH apresentava-se ácido.

A fim de promover a manutenção das células de linhagem contínua, elas são subcultivadas sempre que há a formação de uma monocamada de células confluentes. Para isto o meio é retirado, adiciona-se solução de tripsina 0,25% (Gibco®) a 37 °C por 1 minuto e após a dispersão das células, estas são ressuspensas em DMEM e subcultivadas nas mesmas condições acima descritas.

3.2.2. *Vírus*

O vírus herpes simplex tipo 1, isolado clínico cedido pelo laboratório de Virologia da Universidade Estadual de Londrina, foi utilizado para os experimentos de atividade antiviral.

Para a obtenção da suspensão de HSV-1, células infectadas com o vírus (monocamada apresentando efeitos citopáticos em mais de 80% das células) foram centrifugadas e o sobrenadante distribuído em alíquotas e mantido a -20 °C com 10% de glicerol (Synth®).

3.2.3. *Drogas*

O partenolídeo, utilizado nos testes de interação virus-célula, e o aciclovir foram adquiridos da Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA. Foram preparadas soluções estoque de aciclovir em PBS na concentração de 1 mg/ml e de partenolídeo em DMSO (1% v/v) e PBS, na concentração de 1 mg/ml.

3.2.4. Citotoxicidade

Os extratos brutos, frações e substâncias purificadas foram avaliados quanto ao potencial citotóxico *in vitro*, segundo a técnica colorimétrica da sulforodamina B, descrita por Skehan *et al.* (1990), com algumas modificações. O corante sulforodamina B se liga às proteínas celulares propiciando uma avaliação colorimétrica diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Células Vero cultivadas em DMEM acrescido de 10% de SFB e 50 µg/ml de gentamicina, foram distribuídas em microplaca de 96 poços (TPP[®]) na concentração de 2,5 x 10⁴ células / poço. As células foram incubadas em estufa úmida a 37 °C com tensão de 5 % de CO₂ até a formação da monocamada confluenta.

Após a formação da monocamada confluenta, o meio de cultura foi retirado e 100 µl das concentrações dos extratos, frações, e substâncias purificadas foram adicionados. As células foram incubadas por mais 72 horas. Controle de células (sem a adição de compostos) foi realizado.

Após este período, a monocamada celular foi lavada com salina tamponada (PBS) e as células viáveis fixadas com 50 µl de ácido tricloroacético (SYNTH[®]) 10% a 4°C por 1 hora. A placa foi lavada 5 vezes em água corrente e 50 µl de uma solução 4% de sulforodamina B (Sigma[®]) em ácido acético 1% foi adicionado. Após incubação de 30 minutos a 4°C, ao abrigo da luz, o corante foi removido por 4 lavagens com ácido acético 1%. O corante ligado às células viáveis foi dissolvido em 150 µl de solução Tris-base 10mM. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Bio-Tek[®], modelo Power Wave XS) em 530 nm.

Os experimentos foram realizados em triplicata, em dois momentos diferentes. Os resultados foram comparados com o controle de células e a citotoxicidade foi determinada pela toxicidade celular propiciada pelos compostos, calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de toxicidade celular} = 100 - (\text{DO tto} / \text{DO cc})$$

Onde: DO tto = densidade óptica das células tratadas
DO cc = densidade óptica do controle de células

3.2.5. Atividade antiviral pelo método colorimétrico da sulforodamina B

Culturas de células Vero foram estabelecidas em microplaca de 96 poços (TPP[®]), na concentração de $2,5 \times 10^4$ células / poço, até a confluência.

Após a formação da monocamada confluyente, o meio foi retirado e as células infectadas com 25µl de suspensão viral TCID 80 (Tissue Culture Infectious Dose) para extratos e frações e TCID 50 para substâncias purificadas por 1 hora a 37 °C. Após a adsorção viral e adição de 75 µl de meio suplementado com SFB e gentamicina, foram adicionados 100 µl das concentrações dos extratos, frações, substâncias purificadas e ACV; e as células foram acompanhadas até o aparecimento dos efeitos citopáticos, aproximadamente 72 horas pós-infecção. Controle de células não infectadas e não tratadas e controle de células infectadas foram realizados.

Os procedimentos de extração e leitura foram realizados conforme descrito no item 3.2.4. Os experimentos foram realizados em triplicata, em dois momentos diferentes. Os resultados foram comparados com os controles e a atividade antiviral foi determinada pela porcentagem de proteção celular propiciada pelos compostos, calculado segundo Semple *et al.*, 2001:

$$\% \text{ de proteção celular} = [(\text{DO tto} - \text{DO cv}) \div (\text{DO cc} - \text{DO cv})] \times 100$$

Onde: DO tto = densidade óptica do tratado
DO cv = densidade óptica do controle de vírus
DO cc = densidade óptica do controle de células

3.2.6. Atividade antiviral por ensaio de redução de placas

Na tentativa de verificar em qual estágio da interação vírus-célula a droga age, foram feitos ensaios de redução de placas com vários protocolos de tratamento. Para estes testes foi utilizado partenólídeo de origem comercial (Sigma®).

Atividade profilática

Células Vero cultivadas em placas de 24 poços, na concentração de 2×10^5 células por poço, até a confluência foram incubadas por uma hora, a 37 °C, com as soluções de partenólídeo. Após este período, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com o HSV-1 durante uma hora a 37 °C. O inóculo viral foi então substituído por meio de manutenção (DMEM contendo 0,5% de carboximetilcelulose) e as placas incubadas a 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Após 72 horas, as células foram fixadas com formaldeído 10% e coradas com cristal violeta 0,5%. Este experimento foi realizado em quadruplicata em dois momentos diferentes. As placas de lise foram contadas e a atividade profilática foi determinada como porcentagem de inibição da formação de placas de lise em relação ao controle (Kurokawa et al., 1995):

$$\% \text{ da inibição de placas} = 1 - \left(\frac{\text{n}^\circ \text{ de placas de lise do tratado}}{\text{n}^\circ \text{ de placas de lise do controle de células}} \right) \times 100$$

Efeito terapêutico

Após a formação da monocamada celular, esta foi incubada com HSV-1 por uma hora a 37 °C. O inóculo foi então substituído por carboximetilcelulose nutriente contendo concentrações da droga e após 72 horas de incubação as células foram fixadas, coradas e as placas de lise contadas. Os ensaios foram realizados em quadruplicata em dois momentos

diferentes. A porcentagem de inibição de placas foi determinada como descrito anteriormente.

Atividade virucida

Para verificar a atividade direta sobre o vírus, uma suspensão de HSV-1 foi incubada por uma hora, a 37 °C, com as concentrações da droga. Após este período, as amostras tratadas, não-tratada e meio de cultura sem vírus foram adicionados à monocamada de células por uma hora, a 37 °C. O inóculo foi então retirado, as células lavadas com PBS duas vezes e carboximetilcelulose nutriente adicionada. Após 72 horas de incubação as células foram fixadas, coradas e as placas de lise contadas. Os ensaios foram realizados em quadruplicata em dois momentos diferentes. A porcentagem de inibição de placas foi determinada como descrito anteriormente.

3.2.7. Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA seguido do teste de Dunnet, utilizando o *software* GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.A.). $P < 0,05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação da fração 17C

A fração 17 C (20 mg) foi isolada da fração F2 (Fluxograma 2) proveniente do extrato bruto EAE das partes aéreas de *Tanacetum vulgare*.

Comparando-se os valores de deslocamento químico de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para fração 17 C com os valores encontrados na literatura para estigmasterol (FORGO; KÖVER, 2004), (Tabelas 9 e 10) pode-se sugerir que se trata de uma mistura de esteróides, sendo o estigmasterol a substância majoritária (Figura 7).

Os espectros de RMN unidimensionais de ^{13}C , ^1H e DEPT estão representados nas figuras 4 a 6.

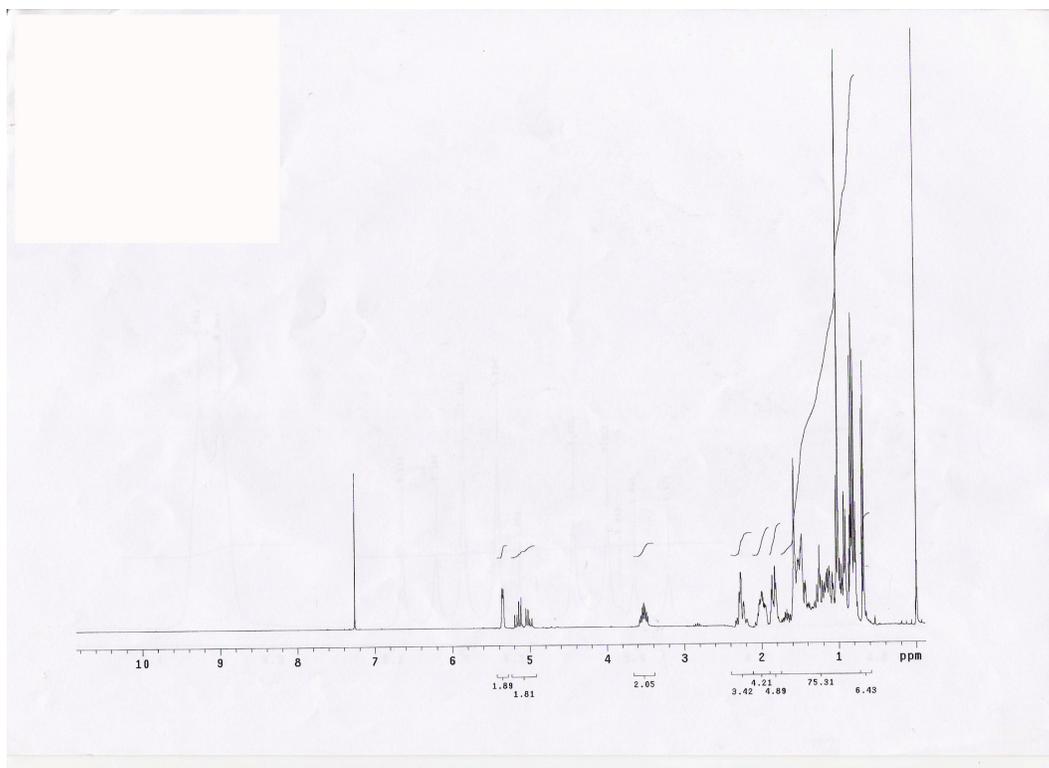


Figura 4. Espectro de RMN ^1H da fração 17C (300 MHz, CDCl_3).

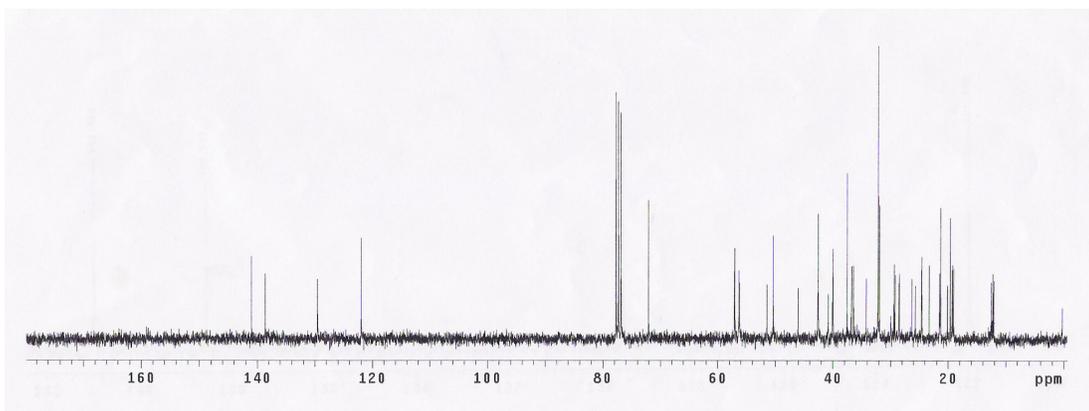


Figura 5. Espectro de RMN ^{13}C da fração 17C (75,45 MHz, CDCl_3).

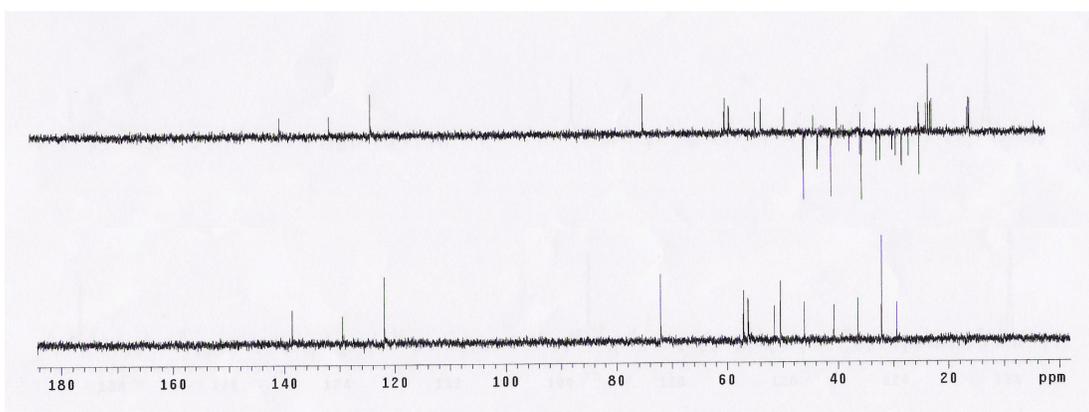


Figura 6. DEPT 90° e 135° da fração 17C (75,45 MHz, CDCl_3).

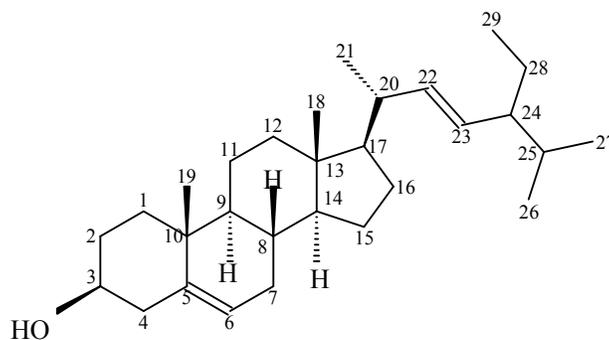


Figura 7. Estrutura química do estigmasterol.

Tabela 9. Dados de RMN ^1H (300MHz) em CDCl_3 da substância 17 C comparados com os valores de deslocamento químico de hidrogênio para o estigmasterol (500 MHz) em CDCl_3 , descritos na literatura (FORGO; KÖVER, 2004)

Hidrogênio	(17C) δ_{H}	(Estigmasterol) δ_{H}
1 α	1,1 (m)	1,08 (m)
1 β	1,84 (m)	1,84 (m)
2 α	1,50 (m)	1,51 (m)
2 β	1,83 (m)	1,83 (m)
3	3,52 (m)	3,51 (m)
4 α	2,26 (m)	2,23 (m)
4 β	2,3 (m)	2,3 (m)
5	-	-
6	5,35 (d, $J = 5,1$)	5,34 (m)
7 α	1,5 (m)	1,5 (m)
7 β	1,99 (m)	1,97 (m)
8	1,44 (m)	1,46 (m)
9	0,92 (m)	0,94 (m)
10	-	-
11	1,5 (m)	1,5 (m)
12 α	1,18 (m)	1,18 (m)
12 β	1,9 (m)	2,0 (m)
13	-	-
14	0,9 (m)	1,01 (m)
15 α	1,56 (m)	1,56 (m)
15 β	1,05 (m)	1,06 (m)
16 α	1,68 (m)	1,72 (m)
16 β	1,26 (m)	1,28 (m)
17	1,15 (m)	1,15 (q, $J = 9,9$)
18	0,69 (s)	0,7 (s)
19	1,01 (s)	1,01 (s)
20	2,0 (m)	2,06 (m)
21	1,1 (d, $J = 5,1$)	1,03 (d)
22	5,15 (dd, $J = 15$)	5,17 (dd, $J = 15,2$)
23	5,01 (dd, $J = 8,6$)	5,04 (dd, $J = 8,6$)
24	1,54 (m)	1,54 (m)
25	1,55 (m)	1,55 (m)
26	0,92 (d, $J = 6,6$)	0,85 (d)
27	0,83 (m)	0,80 (m)
28 α	1,48 (m)	1,43 (m)
28 β	1,2 (m)	1,18 (m)
29	0,82 (t)	0,81 (t)

Deslocamento químico (δ_{H}) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.

Tabela 10. Dados de RMN ^{13}C (75,45 MHz) em CDCl_3 da substância 17 C comparados com os valores de deslocamento químico do estigmasterol (125 MHz) em CDCl_3 , descritos na literatura (FORGO; KÖVER, 2004).

Carbono	(17C) Padrão de hidrogenação	(17C) δ_{C}	(Estigmasterol) δ_{C}
1	CH ₂	37,5	37,6
2	CH ₂	31,8	31,9
3	CH	72	72
4	CH ₂	42,5	42,5
5	C	140,9	140,8
6	CH	121,9	121,8
7	CH ₂	32,1	32,1
8	CH	32,1	32,2
9	CH	50,3	50,5
10	C	36,7	36,5
11	CH ₂	20	21,2
12	CH ₂	39,9	40
13	C	42,4	42,2
14	CH	57,1	57,1
15	CH ₂	24,5	24,5
16	CH ₂	28,5	28,9
17	CH	56,2	56,3
18	CH ₃	12,2	12,2
19	CH ₃	19,6	19,5
20	CH	40,7	40,4
21	CH ₃	21,4	21,4
22	CH	138,5	138,3
23	CH	129,4	129,7
24	CH	51,5	51,5
25	CH	32,1	32,2
26	CH ₃	21,3	21,2
27	CH ₃	19,2	19,2
28	CH ₂	25,6	25,4
29	CH ₃	12,2	12,2

Deslocamento químico (δ_{H}) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.

4.2. Identificação da substância 49-52D

A substância 49-52D (9 mg) foi isolada da fração F2 (Fluxograma 2) proveniente do extrato bruto EAE das partes aéreas de *Tanacetum vulgare*.

Comparando-se os dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C da substância 49-52D com dados descritos na literatura (TIUMAN *et al.*, 2005) (Tabelas 11 e 12), além da interpretação conjunta dos espectros de RMN DEPT e bidimensionais de COSY, HMQC e

HMBC, foi atribuída à substância 49-52D a estrutura da lactona sesquiterpênica do tipo germacrolídeo denominada de 4 α , 5 β -epoxigermacra-1(10),11(13)-dien-12,6 α -olido ou partenolídeo, que está demonstrada na figura 8.

Os espectros de RMN unidimensionais de ^1H , ^{13}C e DEPT e bidimensionais de COSY, HMQC e HMBC da substância 49-52D estão representados nas figuras 9 a 14.

Tabela 11. Dados de RMN ^1H (300MHz) em CDCl_3 da substância 49-52D comparados com os valores de deslocamento químico de hidrogênio para o partenolídeo (300 MHz) em CDCl_3 , descritos na literatura (TIUMAN *et al.*, 2005).

Hidrogênio	(49-52D) δ_{H}	(Partenolídeo) δ_{H}
1	5,22 (dd, $J = 3,8$ e 13)	5,21 (dd, $J = 2,7$ e 12)
2 α	2,1 – 2,22 (m)	2,11 – 2,21 (m)
2 β	2,32 – 2,49 (m)	2,32 – 2,49 (m)
3 α	1,21 – 1,30 (m)	1,20 – 1,28 (m)
3 β	2,1 – 2,21 (m)	2,11 – 2,21 (m)
4	-	-
5	2,79 (d, $J = 9$)	2,79 (d, $J = 9$)
6	3,86 (t, $J = 8,7$)	3,86 (t, $J = 8,4$)
7	2,74 – 2,81 (m)	2,74 – 2,82 (m)
8 α	2,1 – 2,22 (m)	2,11 – 2,21 (m)
8 β	1,69 – 1,79 (m)	1,70 – 1,77 (m)
9 α	2,1 – 2,22 (m)	2,11 – 2,21 (m)
9 β	2,32 – 2,45 (m)	2,32 – 2,44 (m)
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13 α	6,34 (d, $J = 3,6$)	6,34 (d, $J = 3,6$)
13 β	5,63 (d, $J = 3,3$)	5,62 (d, $J = 3,0$)
14	1,71 (s)	1,72 (s)
15	1,30 (s)	1,31 (s)

Deslocamento químico (δ_{H}) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.

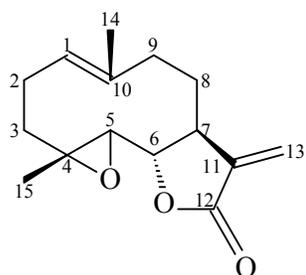


Figura 8. Estrutura química do partenolídeo.

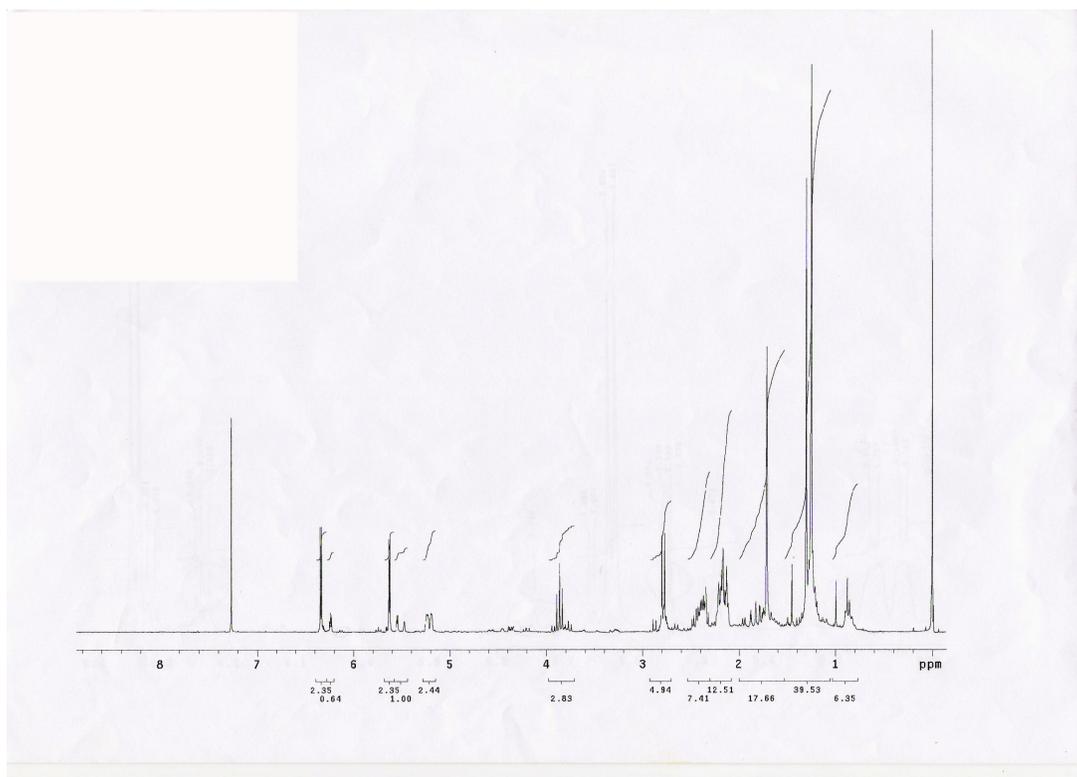


Figura 9. Espectro de RMN ^1H da substância 49-52D (300 MHz, CDCl_3).

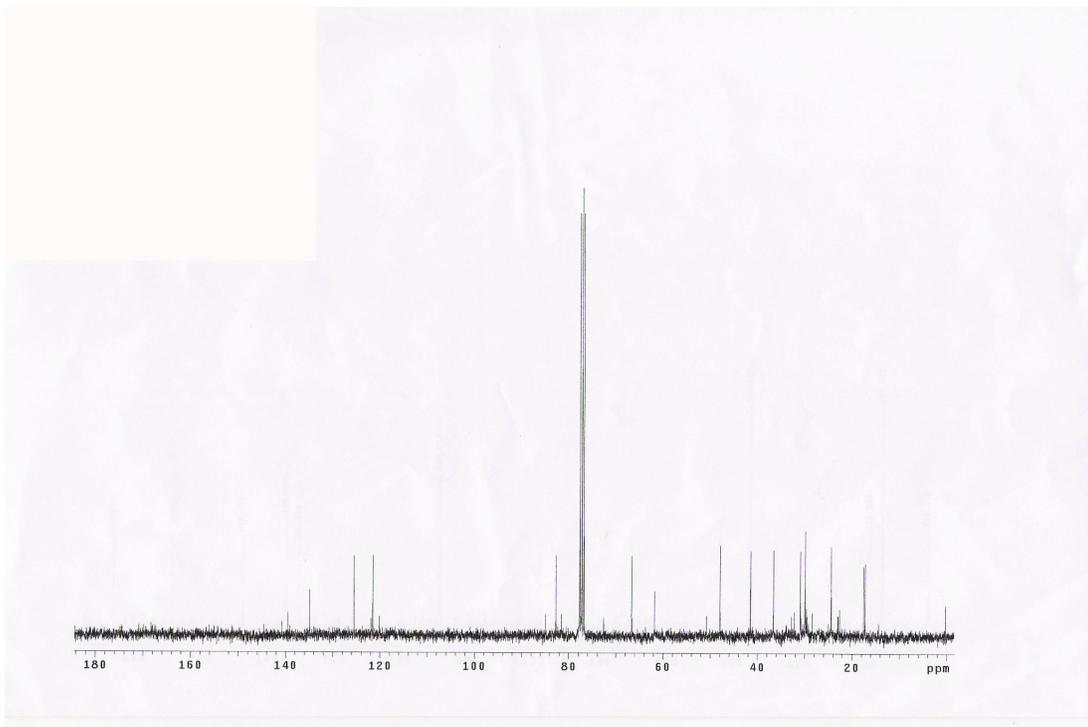


Figura 10. Espectro de RMN ^{13}C da substância 49-52D (75,45 MHz, CDCl_3).

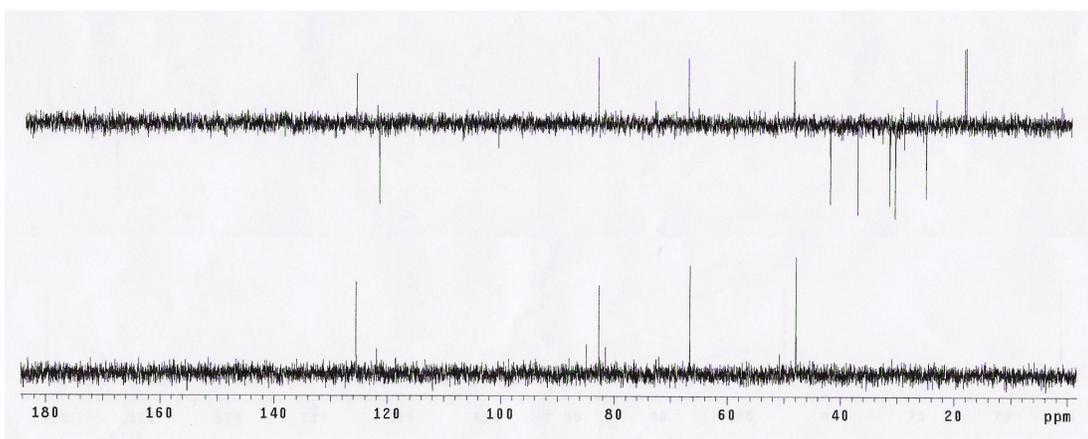


Figura 11. DEPT 90° e 135° da substância 49-52D (75,45 MHz, CDCl_3).

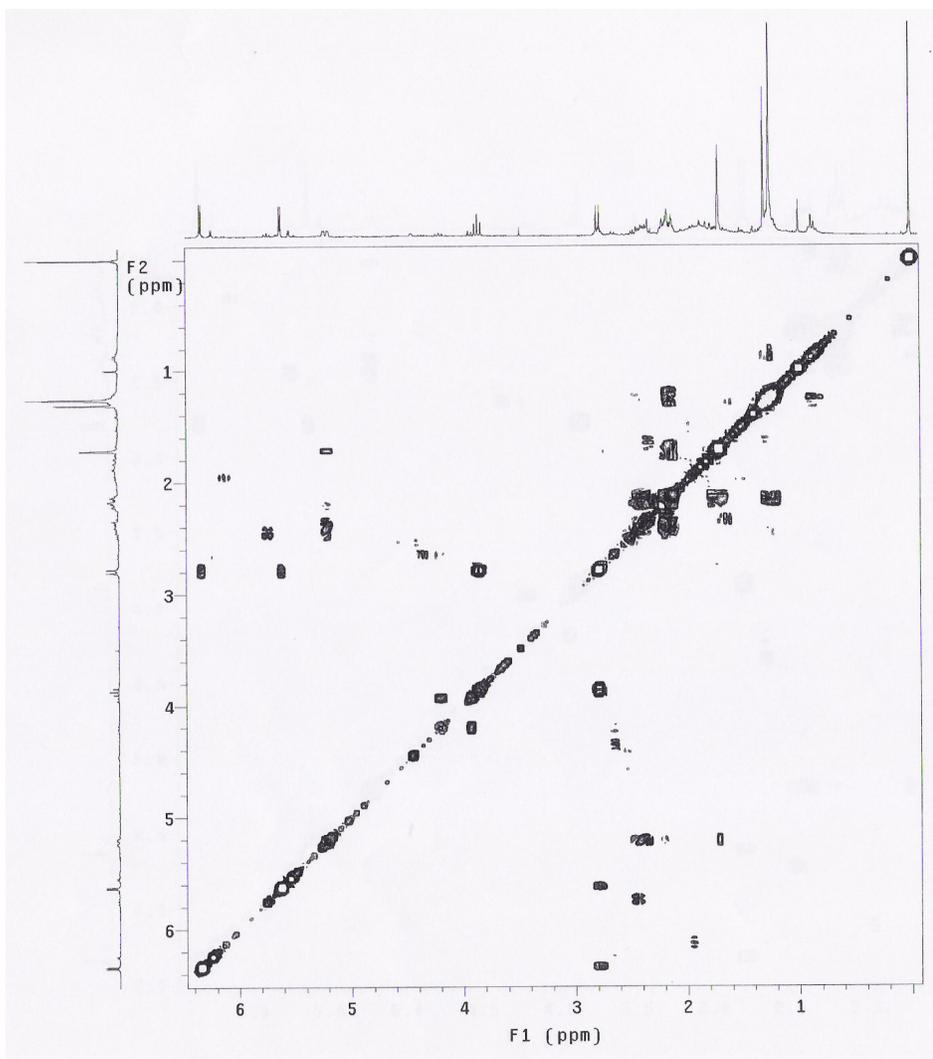


Figura 12. Espectro de COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ da substância 49-52D em CDCl_3 .

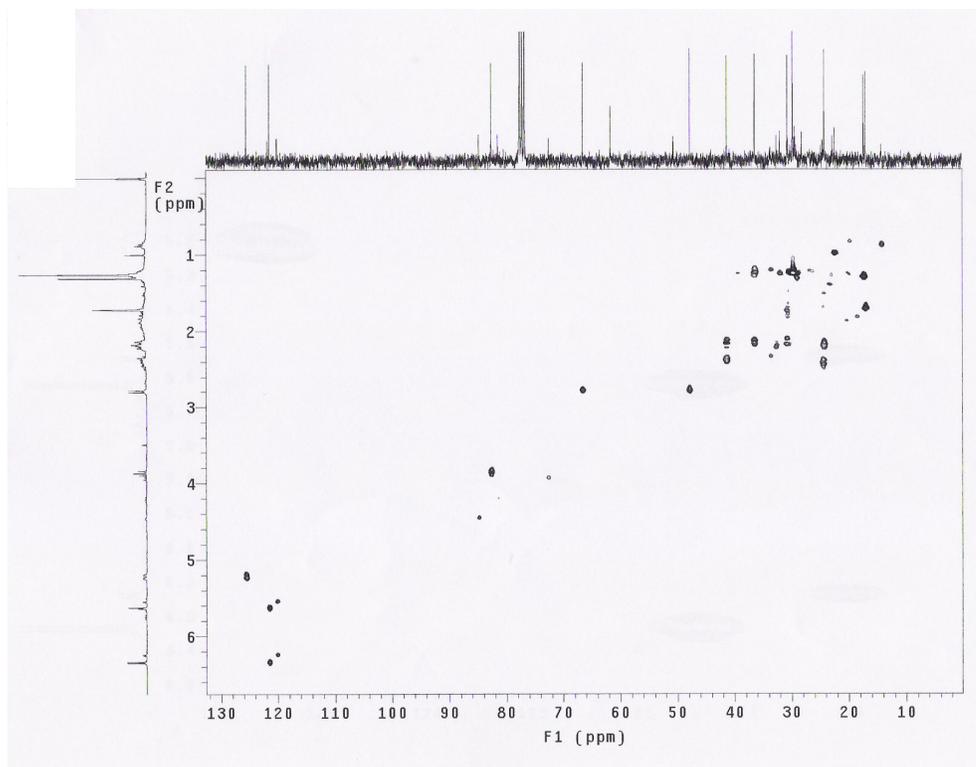


Figura 13. Espectro de HMQC da substância 49-52D em CDCl_3 .

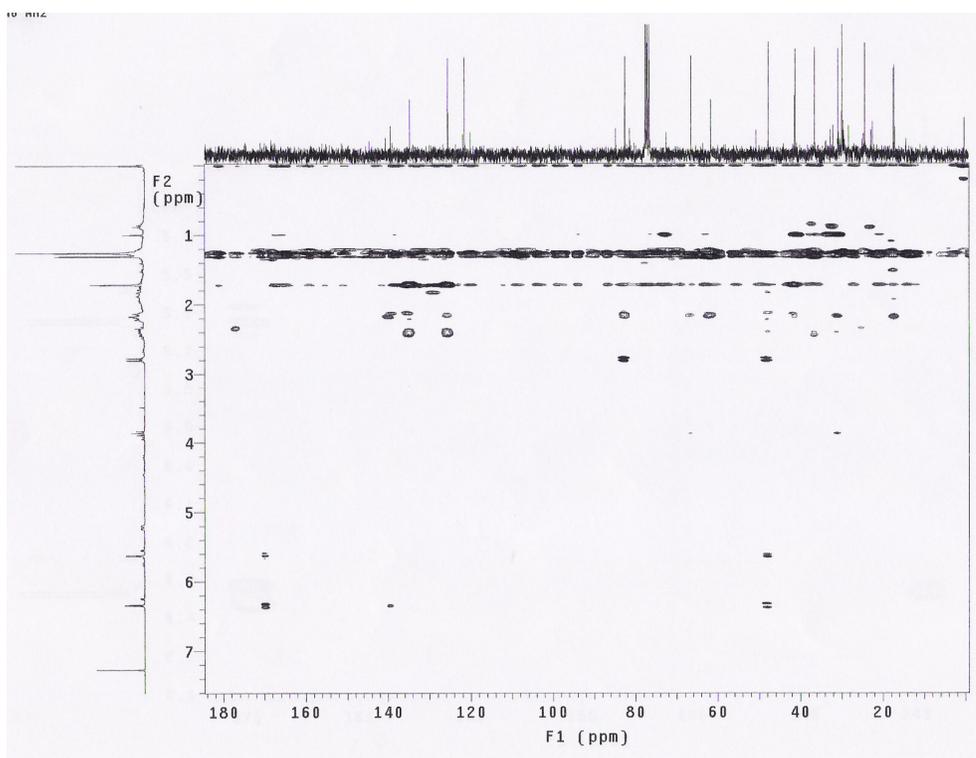


Figura 14. Espectro de HMBC da substância 49-52D em CDCl_3 .

Tabela 12. Dados de RMN ^{13}C (75,45 MHz) em CDCl_3 da substância 49-52D comparados com os valores de deslocamento químico do partenolídeo, (75,45 MHz) em CDCl_3 , descritos na literatura (TIUMAN *et al.*, 2005).

Carbono	(49-52D) Padrão de hidrogenação	(49-52D) δ_{C}	(Partenolídeo) δ_{C}
1	CH	125,5	125,3
2	CH ₂	24,3	24,1
3	CH ₂	36,5	36,3
4	C	61,7	61,5
5	CH	66,6	66,4
6	CH	82,6	82,4
7	CH	47,8	47,7
8	CH ₂	30,8	30,6
9	CH ₂	41,4	41,2
10	C	134,8	134,6
11	C	139,4	139,2
12	C	169,2	169,3
13	CH ₂	121,5	121,3
14	CH ₃	17,1	16,9
15	CH ₃	17,4	17,3

Deslocamento químico em ppm (δ_{C}).

4.3. Citotoxicidade

A citotoxicidade dos extratos brutos, frações e substâncias purificadas das partes aéreas de *T. vulgare* foram verificadas através do método colorimétrico da sulforodamina B, utilizando cultura de células Vero. Os extratos brutos apresentaram resultados de toxicidade sobre células Vero semelhantes, com $\text{CC}_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$ (Tabelas 13 e 14).

As frações hexano, acetato de etila, metanol e metanol/água (9:1) do EAE mostraram-se menos tóxicas quando comparadas com as outras frações, com $\text{CC}_{50} > 150 \mu\text{g/ml}$ (Tabela 13). Estes resultados se repetiram para as frações do EBL (Tabela 14).

A fração 17C (estigmasterol), mostrou-se pouco tóxica, com $\text{CC}_{50} > 600 \mu\text{g/ml}$ (Tabela 13), diferentemente, a substância purificada partenolídeo apresentou-se tóxica para cultura de células Vero até a concentração de $4 \mu\text{g/ml}$ (Tabela 13).

4.4. Atividade antiviral pelo método colorimétrico da sulforodamina B

Os extratos brutos das partes aéreas de *T. vulgare* apresentaram atividade contra o HSV-1 no teste colorimétrico da sulforodamina B, com EC_{50} de 55 $\mu\text{g/ml}$ para o EBL e 40 $\mu\text{g/ml}$ para o EAE (Figura 15 e Tabelas 13 e 14). A partir da verificação da atividade antiviral dos extratos, iniciou-se o fracionamento dos mesmos, a fim de se obter a substância responsável por tal atividade.

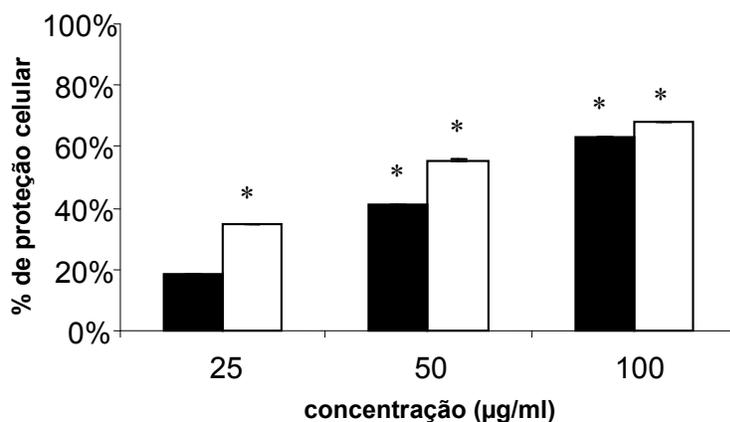


Figura 15. Atividade antiviral sobre o HSV-1 dos extratos brutos acetato de etila (EAE) (□) e hidrossolúvel (EBL) (■). Média de dois experimentos. * $P < 0,01$.

O EBL foi fracionado como já descrito e todas suas frações foram testadas contra o HSV-1. As frações do EBL que apresentaram atividade antiviral (% proteção celular > 50%) foram as frações LF5, LF6 e LF7 com EC_{50} de 76,6 $\mu\text{g/ml}$, 94 $\mu\text{g/ml}$ e 85 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Tabela 14).

O mesmo procedimento foi feito para o EAE e as frações que apresentaram atividade contra o HSV-1 foram: fração diclorometano, diclorometano/acetato de etila 1:1 e acetato de etila, com EC_{50} de 27,5 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$ e 21 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Figura 16), apresentando valores de EC_{50} mais baixos que as frações do EBL. Diante destes resultados, a purificação foi direcionada para a fração diclorometano do EAE, por apresentar o melhor rendimento dentre as frações mais ativas.

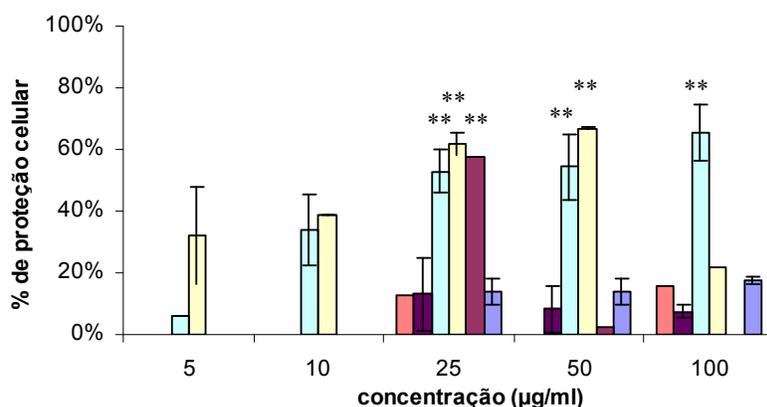


Figura 16. Atividade antiviral sobre o HSV-1 das frações do extrato bruto acetato de etila (EAE). Fração hexano (■), diclorometano (■), diclorometano / acetato de etila (1:1) (■), acetato de etila (■), metanol (■) e metanol /água (9:1) (■). Média de dois experimentos. ** $P < 0,05$.

A fração 17C (estigmasterol), proveniente da fração F2 do EAE, apresentou perfil de pureza na CCD e foi testada para atividade biológica, porém esta fração não apresentou atividade anti-herpes vírus quando testada até a concentração de 100 µg/mL. Já a substância 49-52D (partenolídeo), purificada da mesma fração, apresentou atividade anti-HSV com EC_{50} de 0,3 µg/mL (Figura 17).

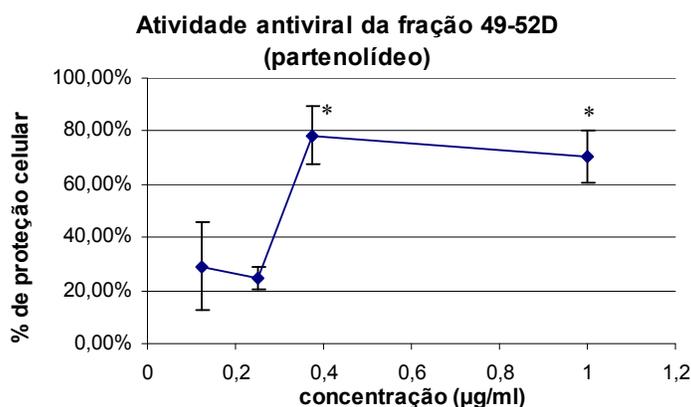


Figura 17. Atividade antiviral da substância purificada 49-52D (partenolídeo). Média de dois experimentos. * $P < 0,01$.

Tabela 13. Concentração efetiva 50% (EC₅₀), citotoxicidade (CC₅₀) e índice de seletividade (IS - CC₅₀ / EC₅₀) do extrato bruto acetato de etila (EAE), suas frações, substâncias purificadas de *T. vulgare* e aciclovir.

	EC ₅₀	CC ₅₀	IS
EAE	40 µg/mL	154 µg/mL	3,9
Fr. Hexano (F1)	> 100 µg/mL	730 µg/mL	-
Fr. DCM (F2)	27,5 µg/mL	32,5 µg/mL	1,2
Fr. DCM/AcOEt 1:1 (F3)	15 µg/mL	72 µg/mL	4,8
Fr. AcOEt (F4)	21 µg/mL	160 µg/mL	7,6
Fr. MeOH (F5)	> 100 µg/mL	210 µg/mL	-
Fr. MeOH / Água 9:1 (F6)	> 100 µg/mL	200 µg/mL	-
49-52D (partenolideo)	0,3 µg/mL	5,5 µg/mL	18,3
17C (estigmasterol)	> 100 µg/mL	650 µg/mL	-
Aciclovir	0,2 µg/mL	> 1000 µg/mL	>5000

Tabela 14. Concentração efetiva 50% (EC₅₀), citotoxicidade (CC₅₀) e índice de seletividade (IS) do extrato bruto hidrossolúvel (EBL), suas frações e aciclovir.

	EC ₅₀	CC ₅₀	IS
EBL	55 µg/mL	119 µg/mL	2,2
Fr. Hexano (LF1)	> 100 µg/mL	> 1000 µg/mL	-
Fr. Hexano / DCM 1:1 (LF2)	> 100 µg/mL	28,6 µg/mL	-
Fr. DCM (LF3)	> 100 µg/mL	30 µg/mL	-
Fr. DCM/AcOEt 1:1 (LF4)	> 100 µg/mL	30 µg/mL	-
Fr. AcOEt (LF5)	76,6 µg/mL	238 µg/mL	3,1
Fr. MeOH (LF6)	94 µg/mL	200 µg/mL	2,1
Fr. MeOH / Água 9:1 (LF7)	85 µg/mL	200 µg/mL	2,3
Aciclovir	0,2 µg/mL	> 1000 µg/mL	>5000

4.5. Atividade antiviral por ensaio de redução de placas

A partir da verificação da atividade anti-HSV do partenolídeo foram feitos os ensaios de redução de placas com vários protocolos de tratamento, na tentativa de verificar o possível mecanismo pelo qual se dá a ação desta droga. Para estes testes foi utilizado partenolídeo de origem comercial (Sigma[®]). Nos protocolos profilático e virucida não houve diminuição no número de placas de lise quando as células e vírus foram tratados com o partenolídeo, porém quando adicionado após a adsorção viral, o partenolídeo inibiu a formação de placas de lise em 40%, na concentração de 2,5 µg/mL, quando comparado ao controle de células infectadas e não-tratadas (Figura 18).

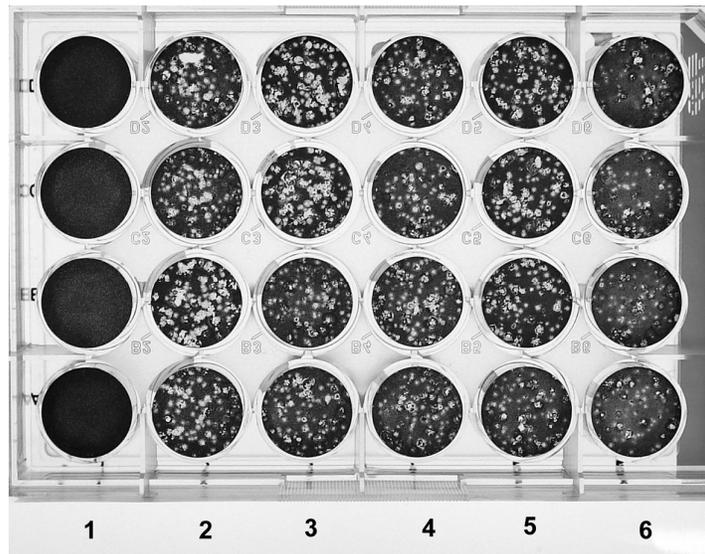


Figura 18. Atividade antiviral do partenolídeo por ensaio de redução de placas. Controle de células Vero não infectadas (1); controle de células Vero infectadas e não tratadas (2); células Vero infectadas e tratadas com partenolídeo na concentração de 1 µg/ml (3); 1,5 µg/ml (4); 2 µg/ml (5) e 2,5 µg/ml (6).

ANEXO

O trabalho que compõe a presente dissertação de mestrado será submetido a publicação segundo o título:

“*Tanacetum vulgare*: anti-herpes virus activity of crude extract and the purified compound parthenolide”.

Thelma Onozato, Celso Vataru Nakamura, Diógenes Aparício Garcia Cortez, Benedito Prado Dias Filho, Tânia Ueda-Nakamura

Title: *Tanacetum vulgare*: anti-herpes virus activity of crude extract and the purified compound parthenolide.

Authors: Thelma Onozato^a, Celso Vataru Nakamura^c, Diógenes Aparício Garcia Cortez^b, Benedito Prado Dias Filho^c, Tânia Ueda-Nakamura^c

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

^bDepartamento de Farmácia e Farmacologia.

^cDepartamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá, PR - Brazil

Corresponding author

Phone: + 55 44 3261-4863. Fax: + 55-44-3261-4860, e-mail address: tunakamura@uem.br

Abstract

The present study demonstrated that the ethyl-acetate extract and the isolated compound, parthenolide, from aerial parts of *Tanacetum vulgare* L. (Asteraceae), protected Vero cells from herpes simplex virus (HSV-1) infection in vitro. The extract and parthenolide were assayed against HSV-1 by sulforhodamine B colorimetric assay and exhibited anti-HSV-1 activity with an EC₅₀ of 40 µg/ml and 0.3 µg/ml, respectively. In order to determine which stage of the virus-cell interaction was affected by parthenolide, the pure compound was used. No effect was observed when both viruses and cells were pre-treated, or during early stages of infection, suggesting that parthenolide interfered with virus replication after the penetration stage, inhibiting approximately 40% of plaques formed at a concentration of 2.5 µg/ml when compared with an untreated control.

Key words: *Tanacetum vulgare* – anti-herpes virus activity – parthenolide

1. Introduction

Herpes simplex virus type 1 is a common human pathogen which causes several diseases such as labial herpes, gingivostomatitis, keratitis and encephalitis. In immunocompetent hosts these clinical symptoms are usually benign, but in immunocompromised patients they become severe, may be progressive and require more time for healing (Whitley, 2002; Bacon et al., 2003). Nucleoside analogues such as acyclovir have been successfully used to treat herpetic infections. However, resistant strains and drug toxic side effects encourage research for new compounds, either synthetic or natural, to improve the current antiviral arsenal (Vlietinck and Berghe, 1991; Chibo et al., 2004; De Clercq, 2005).

Natural products obtained from plants are an important source of antimicrobial compounds. Up to 40% of modern drugs are derived from natural products, and medicinal plants have been used in virtually all cultures around the world to treat many kinds of disease, including viral infections (Jassim and Naji, 2003). A number of recent studies have investigated the antiviral activity of plants and their purified compounds (Kurokawa et al., 1999; Fortin et al., 2002; Vijayan et al., 2004; Andriguetti-Fröhner et al., 2005; Kuo et al., 2006).

Tanacetum vulgare L. (Asteraceae) is a perennial herbaceous plant native to Europe and Asia. Known as common tansy, this herb has a long history of medicinal use. The aerial parts of this plant are popularly used to treat migraine, neuralgia and rheumatism, and as an antihelminthic and insect repellent (Alonso, 1998). Schinella et al. (1998) and Williams et al. (1999) showed that flavonoids and the sesquiterpene lactone parthenolide are responsible for the anti-inflammatory activity of *T. vulgare*. A chloroform extract of *T. vulgare* and the purified compound parthenolide also showed anti-ulcerogenic activity in gastric ulcers induced by oral administration of ethanol to rats (Tournier et al.,

1999). More recently, Lahlou et al. (2006) demonstrated that the water extract of *T. vulgare* leaves has strong diuretic action and apparently no renal toxicity or any other adverse effects. To confirm the folk use of common tansy as an insect repellent, Chiasson et al. (2001) tested the essential oil of *T. vulgare* against the twospotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch and demonstrated its acaricidal properties.

In the present study we evaluated the in-vitro antiviral activity of the crude extract and an isolated compound parthenolide from *Tanacetum vulgare* against herpes simplex type 1, and the possible mechanism by which parthenolide produces its anti-herpetic effect.

2. Materials and methods

2.1. Plant collection and extraction

Aerial parts of *Tanacetum vulgare* L. were collected in January 2004 at Maringá, Paraná, Brazil, and identified. A voucher specimen (HUM 10 070) was deposited at the Universidade Estadual de Maringá Herbarium, Paraná, Brazil. The dried powder (554.63 g) was macerated with ethanol-water (9:1) solution at room temperature in the dark. The solvent was extracted under vacuum at 40 °C to give a water-soluble extract (67.14 g) and a dark-green residue, which was solubilized with ethyl acetate, yielding the ethyl-acetate extract (67.18 g).

2.2. Isolation and identification of parthenolide

The active ethyl-acetate extract was submitted to silica-gel vacuum-column chromatography and eluted with hexane (F1), dichloromethane (F2), dichloromethane/ethyl acetate 1:1 (F3), ethyl acetate (F4), methanol (F5) and methanol/water 9:1 (F6). Each fraction was assayed for antiviral activity. Based on biological results and yield, the active fraction F2 (8.2 g) was chromatographed by column

chromatography on silica gel 60 (230-400 mesh) eluted with hexane, hexane/dichloromethane (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 50:50) and dichloromethane/ethyl acetate (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 50:50), and yielded 91 fractions (1B – 91B). The fractions were monitored by thin-layer chromatography and similar fractions were combined. Fraction 72-74B (615 mg) eluted with dichloromethane/ethyl acetate (95:5), was chromatographed on silica gel 60 (230-400 mesh) with the mobile phase hexane/dichloromethane (80:20, 50:50, 30:70), dichloromethane and dichloromethane/ethyl acetate (99:1, 98:2, 95:5), to separate 173 fractions (1C – 173C). Fraction 103-113C (23.6 mg), eluted with dichloromethane/ethyl acetate (99:1), was chromatographed on silica gel 60 (230-400 mesh) with hexane/ethyl acetate (90:10, 80:20, 50:50) as mobile phase, to give the pure compound 49-52D (9 mg), eluted with hexane/ethyl acetate (80:20). The isolated compound was identified as a sesquiterpene lactone, 4 α ,5 β -epoxy-germacra-1-(10),11(13)-dien-12,6 α -olide (parthenolide) (Fig. 1), by nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometry (Gemini 2000 BB, Varian A) - one dimensional ^1H (300 MHz), ^{13}C (75.5 MHz) and DEPT.

2.3. Cells and virus

African green monkey kidney (Vero) cells, originally purchased from the ATCC, were cultured in Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM; Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco) and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin. The sample of HSV-1 was kindly donated by Dr. Rosa Elisa Carvalho Linhares, Microbiology Department, Universidade Estadual de Londrina, Brazil. Virus stocks were prepared in Vero cells and stored at -70 $^{\circ}\text{C}$.

2.4. Drugs

The parthenolide used in the tests of the virus-cell interaction, and acyclovir were purchased from Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA. Acyclovir was solubilized in phosphate-buffered saline (PBS) to give a stock solution of 1 mg/ml. Parthenolide was solubilized with maximum 1% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) and PBS to give a stock solution of 1 mg/ml.

2.5. Cytotoxicity assay

The cytotoxicity assay was carried out as previously described (Skehan et al., 1990), with modifications. Briefly, confluent Vero cell monolayers grown in 96-well cell-culture plates (TPP®) were incubated with various concentrations of the test drugs (extracts, fractions, isolated parthenolide and Sigma parthenolide) for 72 h at 37 °C and 5% CO₂. The viable cells were fixed with 10% trichloroacetic acid for 1 h at 4 °C, washed 5 times with deionized water and allowed to dry at room temperature. The cells were then stained for 30 min with 0.4% sulforhodamine B (SRB) in 1% acetic acid, and the unbound dye was removed by 4 washes with 1% acetic acid. Bound SRB was solubilized with 150 µl of a 10 mM unbuffered Tris-base solution. Absorbance was read at 530 nm in a microplate reader (Power Wave XS, Bio-Tek). Cytotoxicity was expressed as a percentage of the optical density of the control. The tests were performed in triplicate on two separate occasions.

2.6. Antiviral activity

Confluent Vero cells grown in 96-well cell culture plates were infected with 10³ TCID₈₀/25 µl of HSV-1 for extracts and fractions, and 10⁴ TCID₅₀/25 µl of HSV-1 for parthenolide. After 1 h incubation, the unadsorbed virus was removed, and the cell monolayer was incubated with the test compounds (extracts, fractions, isolated

parthenolide and Sigma[®] parthenolide) for 72 h. Next, the culture medium was removed, and the monolayer was fixed and stained as previously described. The percentage of inhibition of virus-induced CPE was expressed as the percentage of the optical density of the test in comparison to that of untreated virus-infected cells (Semple et al., 2001). The concentration that reduced 50% of CPE in respect to that of the virus control was estimated from the plots of the data, and was defined as 50% effective concentration (EC₅₀). The tests were performed in triplicate on two independent experiments.

Parthenolide was determined, by bio-guided assays, as one of the compounds responsible for the antiviral activity of *T. vulgare* extract. In attempts to determine which stage of the virus-cell interaction was affected by parthenolide, the commercial material from Sigma was used for the antiviral tests described below.

2.6.1. Pre-treatment of cells with parthenolide

In an attempt to determine whether parthenolide has a prophylactic effect, confluent Vero cell monolayers were incubated for 1 h at 37 °C with DMEM containing various concentrations of parthenolide. Cells were washed twice with PBS, followed by infection with 40-50 plaque-forming units (PFU) of HSV-1 at 37 °C for 1 h. The inoculum was then replaced with overlay medium (DMEM containing 0.5% carboxymethylcellulose (CMC) - Synth[®]). After 72 h, the monolayers were fixed with 10% formaldehyde and the nutrient agarose layer removed. Cell monolayers were stained with 0.5% crystal violet in 20% ethanol, and plaques counted. Prophylactic activity was determined as the percent of plaque inhibition in comparison to the mock-pretreated control. These tests were performed in quadruplicate in two independent experiments.

2.6.2. Effect of parthenolide during early stages of infection

To determine whether parthenolide interferes in adsorption or penetration of HSV-1, a plaque assay was performed as described above, except that various concentrations of the test compound were added together with the virus. After 1 h incubation, the solution containing unadsorbed virus was removed, and the cell monolayer was washed twice with PBS and further incubated in overlay medium for 72 h. The monolayers were fixed and stained as described. The plaques were counted, and the antiviral activity was determined as the percent of plaque inhibition compared to the mock-treated control. These tests were performed in quadruplicate in two independent experiments.

2.6.3. Effect of parthenolide on infected cells

To test whether parthenolide interferes during the replication period, a plaque assay was carried out as reported above, with the following difference: the confluent cell monolayer was infected with HSV-1 for 1 h at 37 °C, cells were washed twice with PBS and then the inoculum was replaced with overlay medium (DMEM with 0.5% CMC) supplemented with various concentrations of parthenolide. After 72 h, the monolayers were fixed and stained. The plaques were counted and the percent of plaque inhibition determined. These tests were performed in quadruplicate in two independent experiments.

2.6.4. Virucidal activity

The direct inactivation of HSV-1 by parthenolide was tested by direct contact assay. Virus suspensions ranging from 1×10^6 to 2.5×10^6 PFU/ml were mixed with equal volumes of various concentrations of parthenolide for 1 h at 37 °C. Upon dilution, the surviving infectious virus was measured using the plaque assay method described above. These tests were performed in quadruplicate in two independent experiments.

2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, U.S.A.). The data were analyzed by Dunnet's test (one-way ANOVA). A p-value less than 0.05 was considered as significant.

3. Results

3.1. Structure elucidation

Fractionation of the crude extract from aerial parts of *Tanacetum vulgare* yielded the sesquiterpene lactone 4 α ,5 β -epoxy-germacra-1-(10),11(13)-dien-12,6 α -olide (parthenolide) (Fig. 1). Its chemical structure was determined by comparing its NMR spectral profiles with those in the literature (Tiuman et al., 2005). ¹H-NMR (CDCl₃ – 300MHz): 6.34 (d, *J* = 3.6 Hz, H-13 α), 5.63 (d, *J* = 3.0 Hz, H-13 β), 5.22 (dd, *J* = 3.8, 13.0 Hz, H-1), 3.86 (t, *J* = 8.7 Hz, H-6), 2.79 (d, *J* = 9.0 Hz, H-5), 2.74 to 2.81 (m, H-7), 2.32 to 2.45 (m, H-9 β), 2.32 to 2.49 (m, H-2 β), 2.1 to 2.21 (m, H-3 β), 2.1 to 2.22 (m, H-2 α , H-8 α , H-9 α), 1.69 to 1.79 (m, H-8 β), 1.71 (s, H-14), 1.30 (s, H-15), 1.21 to 1.30 (m, H-3 α); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ 169.2 (C-12), 139.4 (C-11), 134.8 (C-10); 125.5 (C-1), 121.5 (C-13), 82.6 (C-6), 66.6 (C-5), 61.7 (C-4), 47.8 (C-7), 41.4 (C-9), 36.5 (C-3), 30.8 (C-8), 24.3 (C-2), 17.4 (C-15), 17.1 (C-14).

3.2. Cytotoxicity assay and antiviral activity

The water-soluble and ethyl-acetate extracts obtained from aerial parts of *T. vulgare* were assayed against HSV-1 by SRB colorimetric assay. Both extracts showed anti-HSV-1 activity, with an EC₅₀ of 55 μ g/ml and 40 μ g/ml respectively. Partitioning of the ethyl-

acetate extract of *T. vulgare* with organic solvents yielded six fractions (F1 – F6), all of them were tested against HSV-1. Of these fractions, F2, F3 and F4 showed an antiviral effect, with an EC₅₀ of 19 µg/ml, 15 µg/ml, and 21 µg/ml, respectively. To continue the purification of an active anti-herpetic compound, the F2 fraction was successively chromatographed and yielded the compound parthenolide, which was active against HSV-1 with an EC₅₀ of 0.3 µg/ml. Parthenolide from the commercial source and acyclovir were also tested for antiviral activity, with an EC₅₀ of 0.47 (± 0.08) and < 0.5 µg/ml, respectively, and for cytotoxicity, with a CC₅₀ of 3.7 (±0.14) and > 1000µg/ml, respectively.

As determined by SRB colorimetric assay, all extracts, active fractions, and parthenolide exhibited a cytotoxic effect on Vero cells, but only at concentrations higher than the EC₅₀. Table 1 shows the EC₅₀, CC₅₀, and Selective Index (SI) of the extracts, fractions, and parthenolide.

Stage of virus-cell interaction affected by parthenolide

There was no significant difference between treated and untreated samples when both viruses and cells were pre-treated, or during early steps of infection, suggesting that the anti-herpetic activity of this drug was not by direct interaction with the target cells or virus, nor in the adsorption or penetration stage.

In order to determine if parthenolide has a therapeutic effect, Vero cells were treated after 1 h adsorption with HSV-1. After 72 h of incubation, parthenolide inhibited approximately 40% of PFU at a concentration of 2.5 µg/ml, and the size of plaques formed was also reduced, indicating that this drug acts after the penetration stage, during replication of HSV-1 (Fig. 2).

4. Discussion

Medicinal plants with potential antiviral activity have been widely studied with promising results. Several members of the family Asteraceae have shown antiviral activity against all sorts of viruses (Robin et al., 2001; Bettega et al., 2004; Ooi et al., 2006; Romero et al., 2006). In this study we report the anti-HSV-I activity in vitro of *T. vulgare* extract and the pure compound parthenolide isolated from the aerial parts of this medicinal plant. A range of biological effects has been described for the sesquiterpene lactone parthenolide, such as cytotoxicity (Hoffman et al., 1977; Wu et al., 2006), antitumorigenicity (Wen et al., 2002; Nakshatri et al., 2004), antibacterial (Fischer et al., 1998), antiprotozoal (Tiuman et al., 2005), antiulcer (Tournier et al., 1999), inhibitor of human blood platelet aggregation (Groenewegen; Heptinstall, 1990), antimigraine activity (Tassorelli et al., 2005), anti-inflammatory (Schinella et al., 1998) and antiviral. Hwang et al. (2006) described an antiviral activity of parthenolide and several commercially available sesquiterpene lactones against hepatitis C virus replicon assay. Other sesquiterpene lactones purified from species of *Senecio* were reported to have antiviral activity against the hepatitis B virus (double strain DNA enveloped virus) (Li et al., 2005).

An antiviral compound could protect cells against virus infection in several ways, by directly inactivating the virus or by interfering in the replication cycle. In order to determine the possible mechanism by which parthenolide produces its anti-herpetic effect, the pure compound from a commercial source was used. It was tested for virucidal and antiviral activity (before, during or after virus adsorption/penetration in the host cell) by a plaque-inhibition assay. No effect was observed when both viruses and cells were pre-treated (data not shown), suggesting that the parthenolide neither inactivated virus particles directly nor protected the cell from infection, but interfered with the virus replication after

the penetration stage, inhibiting approximately 40% of plaques formed at a concentration of 2.5 µg/ml compared with the untreated control.

Parthenolide has been described as an anti-inflammatory drug: it inhibits a common stage in NF-κB activation, preventing the TNF-α -induced induction of IκB kinase (IKK) and IKKb (Hehner et al., 1999). The transcription factor NF-κB is a key regulator of the cellular inflammatory and immune response, and a frequent target for anti-inflammatory and antiviral agents. The activation of NF-κB pathway is a hallmark of most infections, including viral infections, and plays a central role in virus-dependent cytokine expression and pathology. Mogensen and Paludan (2001) described the importance of NF-κB in the herpes-simplex-virus-induced signal transduction and cytokine expression. Amici et al. (2001) showed that HSV type 1 induces persistent activation of the transcription factor NF-κB by activating IκB kinase (IKK) in the early phase of infection, is dependent on viral early protein synthesis, and is not blocked by acyclovir. In 2004, Gregory and co-workers reported that the activation of NF-κB pathway promotes efficient replication by HSV-1, at least in part by suppressing the host's innate response to virus infection.

Drugs that inhibit the NF-κB pathway have been reported as antiviral agents. Amici et al. (2001) reported that IKK inhibition by the anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandin A1 blocks HSV-1 gene expression and reduces virus yield more than 3000-fold. More recently, Faith et al. (2006) reported that the mechanism by which resveratrol inhibits herpes simplex virus replication was by suppressing HSV induced activation of NF-κB within the nucleus and impairing the expression of essential immediate-early, early and late HSV genes and synthesis of viral DNA.

The present study reports for the first time the anti-HSV-1 activity of the extract, fractions, and parthenolide from *T. vulgare* aerial parts. Bio-guided assays led to the antiviral compound parthenolide, but other substances, present in fractions F3 and F4,

seem also to be involved in the antiviral activity of the crude extract. The antiviral assays showed that the compound had no effect when both viruses and cells were pre-treated, or during the early stages of infection, suggesting that parthenolide interferes with the virus replication after the penetration stage. Further experiments, however, are required to study fractions F3 and F4 and determine parthenolide's mechanism and target of action.

These results may contribute to establish the appropriate use of *T. vulgare* in traditional medicine in the treatment of diseases caused by HSV-1.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação Araucária and Post-graduate Program in Pharmaceutical Sciences of the Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil.

References

Alonso, J. R., 1998. Tratado de fitomedicina: Bases clínicas y farmacológicas, Isis, Buenos Aires, pp. 908-913.

Amici, C., Belardo, G., Rossi, A., Santoro, M. G., 2001. Activation of I κ B Kinase by herpes simplex virus type 1: a novel target for anti-herpetic therapy. *J. Biol. Chem.* 276, 28759–28766.

Andrighetti-Frönher, C. R., Sincero, T. C. M., Da Silva, A. C., Savi, L. A., Gaido, C. M., Bettega, J. M. R., Mancini, M., De Almeida, M. T. R., Barbosa, R. A., Farias, M. R., Barardi, C. R. M., Simões, C. M. O., 2005. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. *Fitoterapia* 76, 374-378.

Bacon, T. H., Levin, M. J., Leary, J. J., Sarisky, R. T., Sutton, D., 2003. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin Microbiol Rev.* 16(1), 114-128.

Bettega J. M., Teixeira H., Bassani V. L., Barardi C. R., Simoes C. M., 2004. Evaluation of the antiherpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. *Phyther. Res.* 18(10), 819-823.

Chiasson, H.; Belanger, A.; Bostanian, N.; Vincent, C.; Poliquin, A., 2001. Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction. *J. Econom. Entomol.* 94, 167-171.

Chibo, D.; Druce, J.; Sasadeusz, J.; Birch, C., 2004. Molecular analysis of clinical isolates of acyclovir resistant herpes simplex virus. *Antiviral Res.* 61, 83-91.

De Clercq, E., 2005. Recent highlights in the development of new antiviral drugs. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 552-560.

Faith, S. A., Sweet, T. J., Bailey, E., Booth, T., Docherty, J. J., 2006. Resveratrol suppresses nuclear factor-kappaB in herpes simplex virus infected cells. *Antiviral Res.* 72, 242-251.

Fischer, N. H., Lu, T., Cantrell, C. L., Castaneda-Acosta, J., Quijano, L., Franzblau, S. G., 1998. Antimycobacterial evaluation of germacranolides. *Phytochemistry* 49, 559-564.

Fortin, H., Vigor, C., Lohézic-Le Dévéhat, F., Robin, V., Le Bossé, B., Boustie, J., Amoros, M., 2002. In vitro activity of thirty-six plants from La Réunion island. *Fitoterapia* 73, 346-350.

Gregory, D., Hargett, D., Holmes, D., Money, E., Bachenheimer, S. L., 2004. Efficient replication by herpes simplex virus type 1 involves activation of the I κ B Kinase-I κ B-p65 pathway. *J. Virol.* 78, 13582–13590.

Groenewegen WA, Heptinstall S., 1990. A comparison of the effects of an extract of feverfew and parthenolide, a component of feverfew, on human platelet activity in-vitro. *J. Pharm. Pharmacol.* 42, 553-557.

Hehner S. P., Hofmann T. G., Dröge W., Schmitz M. L., 1999. The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF- κ B by targeting the I κ B kinase complex. *J. Immunol.* 163, 5617–5623.

Hoffmann, J. J., Torrance, S. J., Widehopf, R. M., Cole, J. R., 1977. Cytotoxic agents from *Michelia champaca* and *Talauma ovata*: parthenolide and costunolide. *J Pharm Sci.* 66, 883-884

Hwang, D. R., Wu, Y. S., Chang, C. W., Lien, T. W., Chen, W. C., Tan, U. K., Hsu, J. T., Hsieh, H. P., 2006. Synthesis and anti-viral activity of a series of sesquiterpene lactones and analogues in the subgenomic HCV replicon system. *Bioorg Med Chem.* 14, 83-91.

Jassim, S. A. A.; Naji, M. A., 2003. Novel antiviral agents: A medicinal plant perspective. *J. Appl. Microbiol.* 95, 412-427.

Kuo, Y.C., Kuo, Y. H., Lin, Y. L., Tsai, W. J., 2006. Yatein from *Chamaecyparis obtusa* suppresses herpes simplex virus type 1 replication in Hela cells by interruption the immediate-early gene expression. *Antiviral Res.* 70, 112–120.

Kurokawa, M., Basnet, P., Ohsugi, M., Hozumi, T., Kadota, S., Namba, T., Kawana, T., Shiraki, K., 1999. Anti-herpes simplex virus activity of moronic acid purified from *Rhus javanica* in vitro and in vivo. *J. Pharmacol. Experim. Therap.* 289, 72-78.

Lahlou, S., Tahraoui, A., Israili, Z., Lyoussi, B., 2006. Diuretic activity of the aqueous extracts of *Carum carvi* and *Tanacetum vulgare* in normal rats. *J. Ethnopharmacol.* Epub ahead of print.

Li H., Zhou C., Zhou L., Chen Z., Yang L., Bai H., Wu X., Peng H., Zhao Y., 2005. *In vitro* antiviral activity of three enantiomeric sesquiterpene lactones from *Senecio* species against hepatitis B virus. *Antivir. Chem. Chemother.* 16, 277-282.

Mogensen, T. H., Paludan, S. R., 2001. Molecular pathways in virus-induced cytokine production. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 131–150.

Nakshatri, H., Rice, S.E., Bhat-Nakshatri, P., 2004. Antitumor agent parthenolide reverses resistance of breast cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand through sustained activation of c-Jun N-terminal kinase. *Oncogene* 23, 7330-7344.

Ooi L. S., Wang H., He Z, Ooi V. E., 2006. Antiviral activities of purified compounds from *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae, Compositae). *J. Ethnopharmacol.* 106,187-191.

Robin V., Irurzun A., Amoros M., Boustie J., Carrasco L., 2001. Antipoliiovirus flavonoids from *Psiadia dentata*. *Antivir. Chem. Chemother.* 12, 283-291.

- Romero M. R., Serrano M. A., Vallejo M., Efferth T., Alvarez M., Marin J. J., 2006. Antiviral effect of artemisinin from *Artemisia annua* against a model member of the Flaviviridae family, the bovine viral diarrhoea virus (BVDV). *Planta Med.* 72, 1169-1174.
- Schinella, G. R., Giner, R. M., Recio, M. C., Buschiazzo, P. M., Rios, J. L., Manez, S., 1998. Anti-inflammatory effects of South American *Tanacetum vulgare*. *J. Pharm. Pharmacol.* 50, 1069-1074.
- Semple, S. J., Pyke, S. M., Reynolds, G. D., Flower, R. L. P., 2001. In vitro antiviral activity of the anthraquinone chrysophanic acid against poliovirus. *Antiviral Res.* 49, 169-178.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudeiro, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M. R., 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Nat. Cancer Inst.* 82, 1107-1112.
- Tassorelli, C., Greco, R., Morazzoni, P., Riva, A., Sandrini, G., Nappi, G., 2005. Parthenolide is the component of *Tanacetum parthenium* that inhibits nitroglycerin-induced Fos activation: studies in an animal model of migraine. *Cephalalgia* 25, 612-621.
- Tiuman, T.S., Ueda-Nakamura, T., Garcia Cortez, D.A., Dias Filho, B.P., Morgado-Diaz, J.A., De Souza, W., Nakamura, C.V., 2005. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 176-182.
- Tournier, H., Schinella, G., De Balsa, E. M., Buschiazzo, H., Manez, S., Buschiazzo, P. M., 1999. Effect of the chloroform extract of *Tanacetum vulgare* and one of its active principles, parthenolide, on experimental gastric ulcer in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 51, 215-219.
- Vijayan, P., Raghu, C., Ashok, G., Dhanaraj, S.A., Suresh, B., 2004. Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. *Ind. J. Med. Res.* 120, 24-29.
- Vlietinck, A. J., Berghe, D. A. V., 1991. Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? *J. Ethnopharmacol.* 32, 141-153.
- Wen, J., You, K. R., Lee, S. Y., Song, C. H., Kim, D. G., 2002. Oxidative stress-mediated apoptosis: the anticancer effect of the sesquiterpene lactone parthenolide. *J. Biol. Chem.* 277, 38954-38964.
- Whitley, R. J., 2002. Herpes simplex viruses, in: Fields, B. N.; Knipe, D. M.; Howley, P. M.; Griffim, R. A.; Lamb, M. A.; Martin, B.; Roizman, B.; Straus, S. S. (Eds), *Fields Virology*, fourth ed. Lippincott-Williams E. Wilking, Philadelphia, pp. 2461-2498.
- Williams, C. A., Harborne, J. B., Geiger, H., Houlst, J. R. S., 1999. The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties. *Phytochemistry* 51, 417-423.

Wu C, Chen F, Rushing JW, Wang X, Kim HJ, Huang G, Haley-Zitlin V, He G., 2006. Antiproliferative activities of parthenolide and golden feverfew extract against three human cancer cell lines. *J. Med. Food* 9, 55-61.

Figure captions

Figure 1. Chemical structure of parthenolide (4 α ,5 β -epoxy-germacra-1-(10),11(13)-dien-12,6 α -olide).

Figure 2. Antiviral activity on HSV-1 by treatment of infected cells determined by plaque assay: non-infected cells (1); untreated infected cell (2); infected cells treated with 1 μ g/ml (3); 1.5 μ g/ml (4); 2 μ g/ml (5); 2.5 μ g/ml of parthenolide (6).

Table 1. Antiviral activity (EC₅₀), cytotoxicity (CC₅₀) and selective index (IS) of extracts, fractions and parthenolide* .

	EC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	IS (CC ₅₀ / EC ₅₀)
Water-soluble extract	55 (± 16.2)	136 (± 7.07)	2.2
Ethyl-acetate extract	40 (± 9.8)	154 (± 12.02)	3.9
F1	> 100	730 (± 2.4)	-
F2	19 (± 12.7)	32.5 (± 7.8)	1.71
F3	15 (± 7.7)	72 (± 6.4)	4.8
F4	21 (± 2.6)	160 (± 21.2)	7.6
F5	> 100	210 (± 7.07)	-
F6	> 100	200 (± 7.7)	-
Parthenolide (isolated)	0.3 (± 0.1)	5.5 (± 0.49)	18.3

* Antiviral activity and cytotoxicity were determined by a sulforhodamine B colorimetric assay. Results are presented as the mean ± SD from two independent tests.

Figure 1

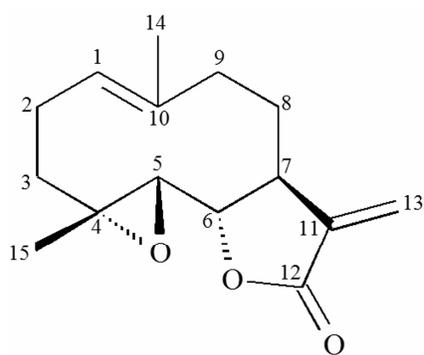
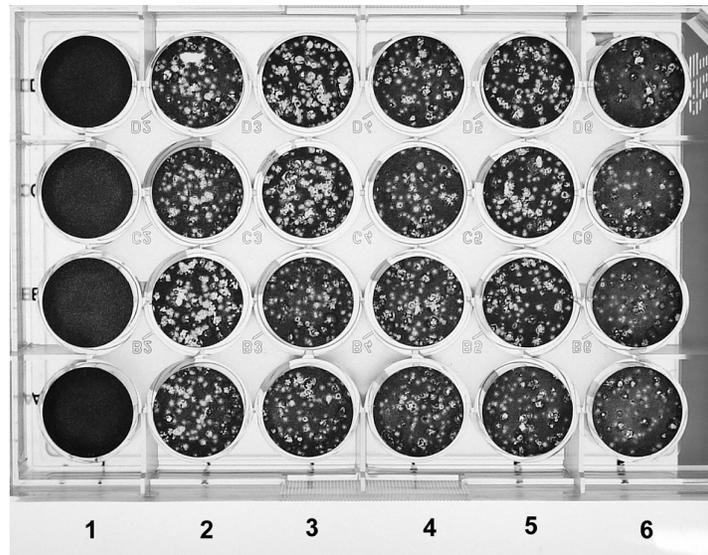


Figure 2



6. CONCLUSÕES

- ↪ A partir dos resultados obtidos neste trabalho verificamos que o extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Tanacetum vulgare* possui atividade antiviral contra o vírus do herpes simples tipo 1 e que uma das substâncias responsáveis por esta atividade é a lactona sesquiterpênica partenolídeo.
- ↪ Até o presente momento não havia relatos de atividade antiviral contra o herpes simples tipo 1 para nenhuma espécie do gênero *Tanacetum*, nem para a lactona sesquiterpênica partenolídeo.
- ↪ Outras substâncias, além do partenolídeo, podem estar também envolvidas na atividade antiviral do extrato bruto, visto que frações que não o contém apresentaram atividade contra o HSV-1.
- ↪ Verificamos que o partenolídeo não apresenta ação virucida nem profilática, porém atua após a adsorção viral, apresentando potencial para uma droga antiherpética.
- ↪ Os resultados deste trabalho constituem os primeiros passos para utilização do extrato de *Tanacetum vulgare* L. como fitoterápico e do partenolídeo como medicamento nas infecções causadas por HSV-1.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M. J.; GUERRA, J. A.; BERMEJO, P.; IRURZUN, A.; CARRASCO, L. Search for antiviral in higher plant extracts. **Phytotherapy Research**, London, v. 14, p. 604-607, 2000.

ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina: Bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: Isis, 1039 p., 1998.

ANDRIGHETTI-FRÖNHER, C. R.; SINCERO, T. C. M.; DA SILVA, A. C.; SAVI, L. A.; GAIDO, C. M.; BETTEGA, J. M. R.; MANCINI, M.; DE ALMEIDA, M. T. R.; BARBOSA, R. A.; FARIAS, M. R.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, Amsteden, v. 76, p. 374-378, 2005.

CHIASSON, H.; BELANGER, A.; BOSTANIAN, N.; VINCENT, C.; POLIQUIN, A. Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction. **Journal of economic entomology**, College Park, v. 94, nº 1, p. 167-171, 2001.

CHIBO, D.; DRUCE, J.; SASADEUSZ, J.; BIRCH, C. Molecular analysis of clinical isolates of acyclovir resistant herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 61, p. 83-91, 2004.

DE CLERCQ, E. Molecular targets for antiviral agents. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Oxford, v. 297, p. 1-10, 2001.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 30, p. 115-133, 2004.

DE LOGU, A.; LOY, G.; PELLERANO, M. L.; BONSIGNORE, L.; SCHIVO, M. L. Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. **Antiviral Research**, v. 48, p. 177-185, 2000.

DULBECCO, R.; GINSBERG, H. S. (Org.). **Microbiologia de Davis**. 2ª ed. São Paulo: Harper & Row do Brasil, v. 4, 1527p., 1980.

FORGO, P.; KÖVÉR, K. E. Gradient enhanced selective experiments in the ¹H NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. **Steroids**, New York, v. 69, p. 43–50, 2004.

FORTIN, H.; VIGOR, C.; LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F.; ROBIN, V.; LE BOSSÉ, B.; BOUSTIE, J.; AMOROS, M. In vitro activity of thirty-six plants from La Réunion Island. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 73, p. 346-350, 2002.

HARRISON, S. C. Principles of virus structure. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, R. A.; LAMB, M. A.; MARTIN, B.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. S. (eds), **Fields Virology**. 4^a ed., Philadelphia: Lippincott-Williams E. Wilking, 2002, 3087 p.

HAYDEN, F. G. Fármacos antimicrobianos: Fármacos antivirais. In: GOODMAN & GILMAN (Org.). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9^a ed. México: McGraw-Hill, 1980 p., 1996.

JASSIM, S. A. A.; NAJI, M. A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, p. 412-427, 2003.

KUO, Y.C.; KUO, Y. H.; LIN, Y. L.; TSAI, W. J. Yatein from *Chamaecyparis obtusa* suppresses herpes simplex virus type 1 replication in HeLa cells by interruption the immediate-early gene expression. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 70, p. 112–120, 2006.

KUROKAWA, M.; NAGASAKA, K.; HIRABAYASHI, T.; UYAMA, S.; SATO, H.; KAGEYAMA, T.; KADOTA, S.; OHYAMA, H.; HOZUMI, T.; NAMBA, T.; SHIRAKI, K. Efficacy of traditional herbal medicines in combination with acyclovir against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 27, p. 19-37, 1995.

KUROKAWA, M.; BASNET, P.; OHSUGI, M.; HOZUMI, T.; KADOTA, S.; NAMBA, T.; KAWANA, T.; SHIRAKI, K. Anti-herpes simplex virus activity of moronic acid purified from *Rhus javanica* in vitro and in vivo. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 289, p. 72-78, 1999.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 544p.

MEHNERT, D. U.; CANDEIAS, J. A. N. Herpesvírus. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª ed, São Paulo: Editora Atheneu, 2004. cap. 86, p. 599-606.

MIRANDA, M. M. F. S. Propriedades gerais dos vírus. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. 3ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002. p. 1-10.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1072 p.

NEWALL, C. A.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **Plantas medicinais: Guia para profissional de saúde**. São Paulo: Premier, 308 p., 2002.

NICHOL, S. T.; ARIKAWA, J.; KAWAOKA, Y. Emerging viral diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 12411-12412, 2000.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M. Herpes Simplex Viruses and Their Replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIM, R. A.; LAMB, M. A.; MARTIN, B.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. S. (eds), **Fields Virology**. 4ª ed., Philadelphia: Lippincott-Williams E. Wilking, 2002. Cap. 72, p. 2399-2443.

ROIZMAN, B.; PELLET, P. E. The Family Herpesviridae: A Brief Introduction. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIM, R. A.; LAMB, M. A.; MARTIN, B.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. S. (eds), **Fields Virology**. 4ª ed., Philadelphia: Lippincott-Williams E. Wilking, 2002. Cap. 71, p. 2381-2398.

SCHINELLA, G. R.; GINER, R. M.; RECIO, M. C.; BUSCHIAZZO, P. M.; RIOS, J. L.; MANEZ, S. Anti-inflammatory effects of South American *Tanacetum vulgare*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 50, p. 1069-1074, 1998.

SEMPLE, S. J.; PYKE, S. M.; REYNOLDS, G. D.; FLOWER, R. L. P. In vitro antiviral activity of the anthraquinone chrysophanic acid against poliovirus. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 49, p. 169-178, 2001.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDEIRO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

SONAGLIO, D. ; ORTEGA, G. G. ; PETROVICK, P. R. ; BASSANI, V. L. Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia – da Planta ao Medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre / Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1104 p., 2003.

TIUMAN, T.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; GARCIA CORTEZ, D.A.; DIAS FILHO, B.P.; MORGADO-DIAZ, J.A.; DE SOUZA, W.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 49(1), p. 176-182, 2005.

TOURNIER, H.; SCHINELLA, G.; DE Balsa, E. M.; BUSCHIAZZO, H.; MANEZ, S.; BUSCHIAZZO, P. M. Effect of the chloroform extract of *Tanacetum vulgare* and one of its active principles, parthenolide, on experimental gastric ulcer in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 51, p. 215-219, 1999.

VIJAYAN, P.; RAGHU, C.; ASHOK, G.; DHANARAJ, S.A.; SURESH, B. Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. **Indian Journal of Medical Research**, v.120, p. 24-29, 2004.

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

WHITLEY, R. J. Herpesviruses. In: BARON, S. *et al.* (Ed.). **Medical Microbiology**. 4ª ed., Galveston: The University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. cap. 68.

WHITLEY, R. J. Herpes Simplex Viruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, R. A.; LAMB, M. A.; MARTIN, B.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. S. (eds), **Fields Virology**. 4ª ed., Philadelphia: Lippincott-Williams E. Wilking, 2002. cap. 73, p. 2461-2498.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO monographs on selected medicinal plants**. v.1, Geneva, 1999.

WILLIAMS, C. A.; HARBORNE, J. B.; GEIGER, H.; HOULT, J. R. S. The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their anti-inflammatory properties. **Phytochemistry**, Oxford, v. 51, p. 417-423, 1999.