

ADRIANE MARTINS DE FREITAS

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA ATIVIDADE
ANTIVIRAL DE EXTRATOS DE *Araucaria angustifolia*
(Bert.) O. Kuntze, ARAUCARIACEAE**

FLORIANÓPOLIS

2001

ADRIANE MARTINS DE FREITAS

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA ATIVIDADE
ANTIVIRAL DE EXTRATOS DE *Araucaria angustifolia*
(Bert.) O. Kuntze, ARAUCARIACEAE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia, da
Universidade Federal de
Santa Catarina, visando a
obtenção do grau de Mestre
em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões

Co-orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Monte Barardi

FLORIANÓPOLIS

2001

**"Avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral de extratos de
Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze, (Araucariaceae)"**

POR

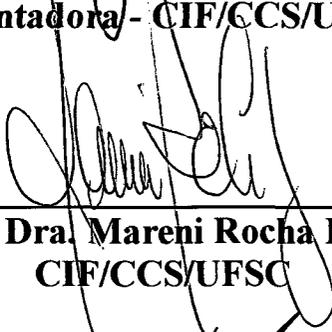
ADRIANE MARTINS DE FREITAS

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pela Orientadora e membros
da Comissão Examinadora.**

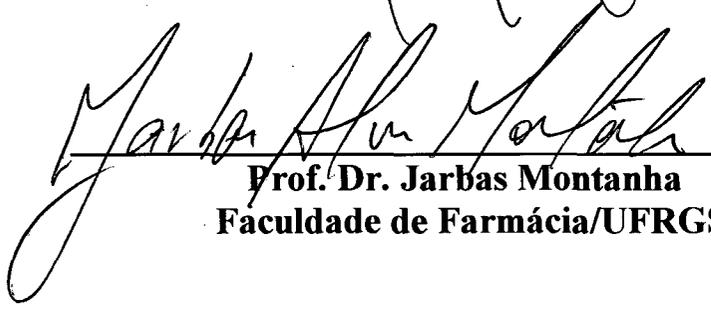
Comissão Examinadora:



Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões
Orientadora - CIF/CCS/UFSC



Profa. Dra. Maren Rocha Farias
CIF/CCS/UFSC



Prof. Dr. Jarbas Montanha
Faculdade de Farmácia/UFRGS



Prof. Dr. Artur Smânia Júnior - MIP/CCB/UFSC
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

Florianópolis, fevereiro de 2001

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Aplicada/MIP/CCB e faz parte de um projeto maior denominado "Estratégias de Conservação, Valoração e Aproveitamento da Biodiversidade da Floresta Tropical Atlântica", financiado pelo PADCTIII/MCT/CNPq, no qual estão envolvidos os Departamentos de Fitotecnia (CCA) e de Ciências Farmacêuticas (CIF) da UFSC.

AGRADECIMENTOS

À professora Cláudia Maria Oliveira Simões, pela orientação durante todo o mestrado, pela amizade e pelo aprendizado, que foi de grande importância não somente para a execução deste trabalho, mas para toda minha vida profissional.

À professora Célia Regina Monte Barardi, pela orientação, amizade e convivência.

A todos os bolsistas, estagiários e colegas de mestrado do Laboratório de Virologia Aplicada, pelo carinho, senso de companheirismo, dedicação e amizade.

Às amigas e parceiras de trabalho, Janine e Thaís, meu muito obrigado por tudo.

Aos professores Mário Stendel e Edmundo Carlos Grisard pela paciência, orientação, bom humor e exemplo de profissionalismo.

À bolsista Maria Teresa Rojo de Almeida, pela dedicação, amizade e parceria constante na execução deste trabalho.

À professora Marení Rocha Farias, pelo trabalho em conjunto.

Ao professor Maurício Sedrez dos Reis, pelo seu exemplo de profissionalismo, apoio, paciência, pelas conversas científicas e por toda sua ajuda.

À CAPES pela concessão da bolsa e ao PADCTIII/MCT/CNPq pelo apoio financeiro.

Aos amigos Michele, Wanderson e Renata, pela convivência inesquecível nestes dois anos, pela amizade, pelos "almoços", enfim, muito obrigado por tudo.

À sempre amiga e companheira de profissão Carolina, por todos os bons momentos e conversas que tivemos juntas.

À todos que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

À meus pais e irmãos, presença constante em minha vida e pensamento, meu porto seguro, obrigado por sempre estarem comigo. Amo vocês.

À Ruben, por seu amor, companheirismo, apoio, compreensão da minha ausência, enfim, por tudo que você é e simplesmente por estar ao meu lado. Te amo muito.

À Deus, por estar sempre comigo e permitir que eu tenha saúde para dar mais um passo importante em minha vida.

Adriane

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. A evolução da pesquisa de agentes antivirais	2
2.2. Agentes antivirais a partir de produtos naturais	8
2.3. Vírus herpético humano do tipo 1	9
2.4. Vírus da poliomielite	12
2.5. Espécie <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Kuntze	14
3. JUSTIFICATIVA	17
4. OBJETIVOS	18
5. MATERIAIS E MÉTODOS	19
5.1. Coleta e preparação dos extratos de <i>A. angustifolia</i>	19
5.2. Culturas celulares	21
5.2.1. Células	21
5.2.2. Meio de cultura e reagentes	21
5.3. Vírus	22
5.3.1. Origem das cepas	22
5.3.2. Preparação das suspensões-estoque virais	23
5.3.3. Determinação do título infeccioso viral	23
5.4. Delineamento experimental	26
5.5. Avaliação da citotoxicidade	26
5.5.1. Avaliação das alterações morfológicas	27
5.5.2. Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)	28

5.6. Estudo da atividade antiviral <i>in vitro</i>	30
5.6.1. Inibição do efeito citopático viral	30
5.6.2. Redução do título infeccioso viral	32
5.6.2.1. Técnica A:um ciclo de multiplicação	32
5.6.2.2. Técnica B:vários ciclos de multiplicação	33
5.6.3. Estudo da ação virucida	33
6. RESULTADOS	34
6.1. Citotoxicidade através das alterações morfológicas	34
6.2. Padronização do MTT	38
6.3. Avaliação do efeito citopático viral	41
6.4. Redução do título infeccioso viral	52
6.5. Sinergismo entre as frações	54
6.6. Estudo da ação virucida	56
7. DISCUSSÃO	57
7.1. Citotoxicidade por alterações morfológicas	58
7.2. Padronização do ensaio do MTT	59
7.3. Avaliação do efeito citopático viral	60
7.4. Redução do título infeccioso viral	62
7.5. Sinergismo entre as frações	63
7.6. Discussão final e perspectivas	65
8. CONCLUSÕES	67
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

RESUMO

Os produtos naturais são uma fonte inesgotável de compostos com atividades farmacológicas promissoras, incluindo atividade antiviral. *Araucaria angustifolia*, conhecida como pinheiro-do-paraná, é uma espécie exclusivamente sul-americana, de grande importância econômica, ecológica e medicinal. A partir de suas acículas foi preparado um extrato bruto hidroalcoólico (EBH), o qual sofreu um processo de fracionamento com solventes de diferentes polaridades, originando oito frações: fração éter de petróleo (FEP), emulsão entre água e éter de petróleo (eAq/EP), resíduo da fração éter de petróleo (rFEP), precipitado da fração éter de petróleo (pptEP), fração diclorometano (FDM), fração acetato de etila (FAE), fração *n*-butanol (FnBU) e fração aquosa (Faq). Esses foram submetidos a ensaios de avaliação da citotoxicidade por alterações morfológicas e atividade antiviral através da inibição do efeito citopático viral, utilizando o herpes simples humano tipo 1 (HSV-1, cepa KOS) e poliovírus tipo 2 (polio-2). Nenhuma fração se mostrou ativa contra o polio-2 e os ensaios subsequentes foram realizados somente com o HSV-1. As frações que apresentaram os maiores índices de seletividade ($IS = CC_{50} / CE_{50}$) foram FnBU ($IS=11,0$), FAE ($IS=9,0$), eAq/EP ($IS=6,3$) e rEP ($IS=5,0$). Em paralelo aos ensaios descritos acima, foi realizada a padronização do ensaio colorimétrico com MTT, a fim de avaliar concomitantemente a citotoxicidade e a atividade anti-herpética de produtos naturais. Este ensaio foi realizado somente com as frações que apresentaram os maiores valores de IS nos ensaios iniciais, a fim de comparar os resultados obtidos nos dois experimentos. A partir deste momento, deu-se início ao fracionamento biomonitorado, onde as frações que não apresentaram atividade foram descartadas e somente a de maior IS foi fracionada novamente. Em um primeiro momento, a fração FAE havia apresentado o maior valor de IS, porém, após o segundo fracionamento realizado, com intuito de obter maior quantidade de material-teste, os testes foram repetidos e a fração FnBU apresentou um valor de IS levemente acima do que o da FAE. No entanto, o processo de fracionamento já havia sido iniciado com a fração FAE e a diferença entre os valores de IS foi pequena. Do fracionamento da fração FAE, foram obtidas nove sub-frações, SF1 a SF9, as quais foram submetidas aos mesmos ensaios descritos acima e as sub-frações SF2 ($IS=7,13$), SF3 ($7,13$) e SF8 ($IS=5,76$) apresentaram os maiores valores de IS. Apesar das sub-frações SF2 e SF3 apresentarem os mesmos valores de IS, no ensaio com o MTT estes foram diferentes, $IS=4,24$ e $IS=2,31$, respectivamente. Portanto, o fracionamento foi realizado com a sub-fração SF2, o qual resultou em quatro outras sub-frações, SF2A a SF2D, sendo que SF2D foi a única que se mostrou ativa ($IS=3,17$). A atividade antiviral de todas as frações que apresentaram os maiores valores de IS foi avaliada quantitativamente através da redução do título infeccioso viral, utilizando MOI de 1000 e 10 e todas mostraram percentuais de inibição de 99 e 100%. Como os valores de IS foram diminuindo ao longo do processo de fracionamento, é possível que ocorra sinergismo entre os componentes do extrato bruto (FAE), já que a hipótese de ter ocorrido degradação da FAE no processo de fracionamento foi descartada. Porém, experimentos mais detalhados deverão ser realizados no intuito de verificar qual a relação entre os componentes do extrato FAE, se é sinérgica ou simplesmente aditiva, e também investigar qual o(s) mecanismo(s) de ação antiviral desta fração.

ABSTRACT

Natural products are inexhaustible source of compounds with promising pharmacological activities, including antiviral. *Araucaria angustifolia*, known as pinheiro-do-paraná, is a South Brazilian tree showing important economical, ecological and medicinal aspects. Their leaves were macerated affording a crude hydroethanolic extract which was submitted to a sequential liquid-liquid extraction with solvents of increased polarity: petroleum ether, methylene chloride, ethyl acetate, *n*-butanol and water. They were evaluated for cytotoxicity by using microscopic visualization of cell morphological changes caused by the tested materials and for antiviral activity by using the inhibition test of cytopathic effects produced by herpes simplex virus (HSV-1, strain KOS) and poliovirus type 2 (polio-2). The results permit us to estimate values of CC_{50} and CE_{50} , respectively, for each tested material. Among the extracts showing the best preliminar results, it means the bigger values of selectivity indices ($SI = CC_{50}/CE_{50}$), the ethyl acetate extract (EA) was chosen to perform other tests. In parallel, the standardization of the colorimetric MTT assay was realized in order to evaluate concomitantly cytotoxicity and antiviral activity. All the tested extracts were inactive against polio-2 replication, and subsequent experiments were realized only with HSV-1. A bioguided fractionation was done with the EA extract affording nine sub-fractions (SF1 to SF9) which were submitted to the same assays described above, and the sub-fractions SF2 and SF3 ($SI=7.13$), and SF8 ($SI=5.76$) showed the best values. In spite of the sub-fractions SF2 and SF3 have showed the same values of SI, at the MTT assay these values were smaller: $SI=4.24$ and 2.31 , respectively. As MTT assay is more sensitive and accurate, this decrease was expected. So, the subsequent fractionation was realized with SF2 and results other four sub-fractions: SF2A to SF2D, and SF2D was the only active sub-fraction ($SI=3.17$). The antiherpetic activity of all extracts and sub-fractions that showed activity in the preliminar tests was then confirmed quantitatively by using the yield reduction assay, and all of them inhibited by 99-100% the replication of HSV-1. As usual, the SI values were diminished during the fractionation process, and it was possible that some kind of synergism has occurred between the components of the EA extract. Nevertheless, more detailed experiments should be done to detect the interactions between compounds of this extract and to know if the demonstrated antiviral effects are truly synergistic or merely additive.

1. INTRODUÇÃO

A busca de novos agentes farmacologicamente ativos através da triagem de fontes naturais, como fermentações microbianas e extratos de plantas, tem levado à descoberta de muitos fármacos úteis clinicamente, que desempenham uma importante função no tratamento de doenças humanas. Uma recente revisão apontou que 39% dos 520 novos medicamentos aprovados entre 1983 a 1994 eram produtos naturais ou derivados destes e que cerca de 60-80% dos agentes antitumorais e anti-infecciosos, que estão disponíveis comercialmente ou encontram-se nos últimos estágios de avaliação clínica são de origem natural (CRAGG *et al.*, 1997). Por exemplo, o paclitaxel (Taxol[®]), isolado das cascas dos troncos de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), é considerado o agente antitumoral mais promissor desenvolvido nos últimos 20 anos, sendo utilizado principalmente no tratamento de câncer de mama, ovário e pulmão (EISENHAUER & VERMORKEN, 1998). Ele foi isolado na década de 60 (WANI *et al.*, 1971) e somente agora está disponível no mercado, devido à baixa concentração de paclitaxel encontrada na planta (100-300mg/kg). Para viabilizar a sua utilização, estudos foram realizados com a espécie europeia *T. baccata* L. e dela foi isolada a 10-desacetil-bacatina III. Esse composto foi então utilizado como matéria-prima para a síntese do paclitaxel e do docetaxel (Taxotere[®]), outro importante agente antitumoral (EISENHAUER & VERMORKEN, 1998; SCHENKEL, GOSMANN & PETROVICK, 2000).

A pesquisa na área dos agentes antivirais a partir de produtos naturais, principalmente de plantas, está despertando cada vez mais o interesse das indústrias farmacêuticas (STROHL, 2000). Este fato se deve não somente a infinidade e diversidade dos compostos metabólicos vegetais com inúmeras atividades biológicas e farmacológicas (incluindo atividade antiviral), mas também devido ao freqüente aparecimento de resistência viral aos agentes quimioterápicos clássicos.

A seleção de plantas com o objetivo de buscar uma potencial atividade antiviral é feita, principalmente, com base em pesquisas etnobotânicas e etnofarmacológicas, ou seja, as plantas escolhidas são usadas na medicina popular para o tratamento de afecções possivelmente relacionadas a processos infecciosos. Outro método para a escolha das plantas é a chamada abordagem randômica, onde estas plantas são escolhidas ao acaso para serem testadas. As duas metodologias oferecem vantagens e desvantagens e o ideal é que a seleção destas plantas seja baseada em uma análise combinada dessas abordagens (RATES, 2001).

Após a seleção da planta, o próximo passo é preparar os extratos que serão testados, escolhendo a(s) parte(s) da planta e os solventes a serem utilizados para a preparação dos mesmos e, posteriormente, escolher os ensaios para a avaliação da atividade antiviral.

De maneira geral, os ensaios preliminares realizados na pesquisa da atividade antiviral de produtos naturais utilizam culturas de células e podem ser aplicados com sucesso para a determinação da atividade antiviral ou ação virucida de qualquer material. São considerados agentes antivirais aqueles materiais capazes de inibir um ou mais dos processos que constituem o ciclo de replicação viral e terão atividade virucida aqueles que inibem a infectividade viral extracelularmente, podendo ser utilizados então como antissépticos (VLIETINCK, DE BRUYNE E VANDEN BERGHE, 1997).

Os métodos comumente utilizados para a avaliação da atividade antiviral *in vitro* são baseados na capacidade dos vírus de se replicarem em células cultivadas. A replicação viral em cultura de células pode ser monitorada pela presença de efeito citopático ou pela formação de placas de lise causados pelo vírus ou ainda pela detecção de determinados elementos virais, tais como DNA ou RNA genômicos ou polipeptídeos, quando os vírus não produzem efeito citopático nas células. Outrossim, o teste antiviral selecionado pode ser baseado na inibição do efeito citopático, redução ou inibição da formação de placas de lise, redução do título viral, etc.

Com o intuito de contribuir com a pesquisa de agentes antivirais a partir de plantas e com base numa triagem antiviral preliminar de extratos de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, que revelou resultados promissores, foi realizada uma avaliação complementar e mais aprofundada a respeito da potencial atividade antiviral de vários extratos preparados com este vegetal. Os ensaios para avaliação da atividade antiviral e virucida *in vitro* foram realizados com o vírus herpético humano do tipo 1 (HSV-1) e com o vírus da poliomielite humana do tipo 2 (polio-2).

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1-A EVOLUÇÃO DA PESQUISA DE AGENTES ANTIVIRAIS

Os primeiros compostos com ação antiviral foram descobertos na década de 50 e passaram a ser usados clinicamente em 1960. A partir da década de 80, houve um acentuado avanço nesta área, porém, ainda há poucos agentes antivirais quando comparados à grande

disponibilidade de compostos antimicrobianos e mesmo antifúngicos. Duas principais razões contribuíram para que isto ocorresse: primeiramente, a falta de conhecimento sobre o ciclo de vida dos vírus aliado ao fato de que esses são parasitas intracelulares obrigatórios, ou seja, um agente tóxico viral é também tóxico, em diferentes graus, para as células hospedeiras (VANDEN BERGHE, VLIETINCK & VAN HOOFF, 1986). Entretanto, pesquisas moleculares subsequentes a respeito dos mecanismos de replicação viral revelaram a existência de processos que são exclusivos para os vírus, facilitando o desenvolvimento de agentes antivirais. O segundo problema foi a falta de sistemas ou ensaios para testar a atividade antiviral de novos compostos, que deveria ser de fácil reprodutibilidade e permitir a multiplicação das partículas virais bem como a verificação da potencial atividade antiviral. Isto se tornou possível devido ao desenvolvimento de experimentos com ovos fertilizados, depois ratos e, finalmente, culturas de células (BOON, 1997).

De maneira geral, os compostos antivirais se enquadram em duas categorias: aqueles com ação indireta ou imunomoduladores, como os interferons e as vacinas, e aqueles com ação direta, como os agentes virucidas, que destroem o vírus quando este está fora da célula, e os compostos antivirais propriamente ditos, que irão agir sobre uma determinada etapa do processo de replicação viral após infecção da célula hospedeira (CHE, 1991).

A descoberta das vacinas é, sem dúvida alguma, uma das mais importantes contribuições para o desenvolvimento da virologia, do controle, e até mesmo da erradicação, de várias doenças causadas por vírus. Como exemplo, pode-se citar a erradicação mundial da varíola e o desaparecimento quase completo da poliomielite no mundo todo (WOOD, SUTTER E DOWDLE, 2000). Entretanto, somente com o advento da vacinação, não foi possível controlar todas as doenças infecciosas virais que atingem a espécie humana. Isto se deve, principalmente, às características inerentes a alguns tipos de vírus, como por exemplo, a alta frequência de mutações e a latência, que impossibilitaram o desenvolvimento de vacinas para algumas doenças. Existe também o risco de complicações pós-vacinação, sendo relatados vários casos de doenças provocadas pela própria reativação do vírus vacinal. Soma-se a isto, o problema de que vacinas elaboradas com vírus atenuados constituem um grande risco para pacientes imunocomprometidos e gestantes (MURRAY *et al.*, 1992).

A partir de 1960, os agentes antivirais propostos eram compostos sintéticos já existentes ou novas moléculas, tais como os nucleosídeos sintéticos (DARBY, 1993; BOON, 1997) e o início dos programas de pesquisa tratando de tipos específicos de vírus permitiu o desenvolvimento de vários compostos, por exemplo, contra os vírus herpéticos, uma área de grande sucesso no progresso da terapia antiviral. O primeiro fármaco antiviral licenciado para

qualquer tipo de virose e o primeiro agente anti-herpético a ser identificado foi a idoxirudina, que foi sintetizada por Prusoff em 1959 (KAUFMAN, 1964; DARBY, 1994). Devido à sua baixa seletividade e alta citotoxicidade, ela foi aprovada somente para o tratamento tópico de infecções por HSV. Em seguida, foi sintetizada a vidarabina, em 1968 (SCHABEL, 1968).

Porém, foi com a descoberta do aciclovir, um análogo acíclico do nucleosídeo 2'-deoxiguanosina, em 1977, que se iniciou uma nova era na pesquisa de fármacos antivirais (ELION *et al.*, 1977; SCHAFFER *et al.*, 1978). O sucesso do aciclovir se deve à combinação da sua alta especificidade e eficácia no tratamento de infecções pelo HSV-1, HSV-2 e herpes-zoster, com baixíssima toxicidade (WEBER E CINATL, 1996). A fim de aumentar a biodisponibilidade do aciclovir no tratamento por via oral, outros análogos de nucleosídeos foram sintetizados a partir de sua estrutura, como o ganciclovir (FIELD *et al.*, 1983), o penciclovir e o famciclovir, com atividade contra o vírus varicela-zoster (BOYD *et al.*, 1987) e o valaciclovir (LOWANCE, 1999), que juntamente com o ganciclovir possui uma potente atividade inibidora da replicação do citomegalovírus humano (CMV). Os análogos do pirofosfato, como o ácido fosfonoacético (PAA) e o ácido fosfonofórmico (foscarnet), também possuem a capacidade de inibir a replicação do HSV (WAGSTAFF E BRYSON, 1994) e são usados como alternativa no tratamento de pacientes resistentes ao aciclovir. Porém, sua utilização é limitada devido aos vários efeitos colaterais da terapia, como distúrbios renais, decréscimo dos níveis de íons de cálcio no soro, variações nos níveis de fósforo e potássio e ulcerações vaginais (SAFRIN *et al.*, 1990).

Apesar do contínuo desenvolvimento de novos fármacos antivirais sintéticos, poucos vem sendo aprovados pelas autoridades governamentais na área de saúde para uso clínico e, a maioria destes compostos tem aplicações limitadas a poucas doenças (VLIETINCK & VANDEN BERGHE, 1998). Portanto, a descoberta de novos compostos antivirais se faz necessária, principalmente, para o tratamento de doenças virais responsáveis por alta mortalidade e/ou alta incidência em pacientes imunocomprometidos, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), os vírus herpéticos dos tipos 1 e 2, vírus da hepatite B e o vírus da gripe (SCHINAZI, 1992).

Ainda há a questão das vacinas anti-herpéticas. Para a maioria das viroses que acometem o homem ainda não foi possível o desenvolvimento de uma vacina eficaz. Isto ocorre devido a certas características dos vírus, com destaque para a alta taxa de mutações e a capacidade de latência. A família *Herpesviridae* destaca-se por apresentar ambas essas características, o que dificulta a ação das vacinas, além da sua distribuição ubíqua na população mundial (LUPI, 2000). Porém, muitas pesquisas têm sido realizadas no intuito de se desenvolver uma vacina anti-herpética que possa conferir proteção à população ainda não infectada,

principalmente infantil, ou que controle o aparecimento de recidivas em pacientes já infectados e, principalmente, imunodeprimidos, tornando-os portadores sãos (BABIUK & ROUSE, 1996). O problema no desenvolvimento de uma vacina específica para HSV é que indivíduos já infectados dificilmente poderão ser curados da doença devido à latência viral. Durante esta fase, o HSV torna-se praticamente indestrutível porque, além de estar biologicamente inativo, ele aloja-se no tecido nervoso, que tem uma capacidade mínima de expressão antigênica (LUPI & PEREIRA JR., 2000). Além disso, o HSV é capaz de impedir a ação da IgG anti-HSV e da ativação em cascata do complemento, através de suas glicoproteínas de superfície gE e gI. As primeiras vacinas anti-herpéticas utilizavam o vírus morto ou atenuado. Eram as “vacinas de primeira geração”, que predominaram até o fim da década de 70. DUNDAROV *et al.* (1982) descreveram a existência de um maior intervalo entre as recorrências nos indivíduos vacinados com a principal vacina da “primeira geração”, a lupidon, a qual ainda é ministrada a milhares de indivíduos, apesar de ter sido muito criticada devido à falta de padronização nos estudos clínicos e a grande diversidade da população estudada. No início dos anos 80 se deu início à produção de vacinas glicoprotéicas ou de “segunda geração” e estas representavam uma nova esperança na busca de uma vacina anti-herpética eficaz. Algumas ainda se encontram em fase avançada de estudos em animais e devem entrar brevemente na fase de estudos clínicos. Apesar de apresentarem resultados encorajadores, possuem algumas restrições como potência imunogênica reduzida e durabilidade curta. Seu custo e eficácia ainda não se comparam à terapêutica usando os análogos de nucleosídeos (LUPI, 2000). Assim, deu-se início às pesquisas com as vacinas gênicas ou de “terceira geração”. Essas ainda encontram-se em fase experimental e de padronização. A principal diferença neste tipo de vacina é a maneira como o antígeno é apresentado ao sistema imunológico. O DNA do HSV é isolado, clonado e veiculado em microesferas lipídicas; uma vez fagocitado pelos macrófagos tissulares, é apresentado na forma complexada ao HLA de classe II (LUPI, 2000).

Portanto, as vacinas anti-herpéticas ainda não são uma realidade na prática clínica. Elas não curam pacientes já infectados, porém parecem ser promissoras em reduzir a frequência de recidivas, e talvez, permitir a manutenção subclínica do HSV. Quanto às vacinas gênicas, são uma perspectiva fascinante para o futuro, tão logo sejam solucionados os problemas tecnológicos dos processos de fabricação (BABIUK & ROUSE, 1996; LUPI, 2000).

2.2-AGENTES ANTIVIRAIS A PARTIR DE PRODUTOS NATURAIS

Os produtos naturais originados a partir de microorganismos, animais e, principalmente, plantas constituem uma fonte inesgotável de compostos com promissoras atividades biológicas e farmacológicas (HARVEY, 2000; STROHL, 2000), incluindo atividade antiviral (HUDSON, 1990; CHE, 1991; CHU & CUTLER, 1992; BURKE *et al.*, 1995; HOUGHTON, 1996; ROBIN, 1998; SHU, 1998; VLIETINCK & VANDEN BERGHE, 1998). A busca de novos compostos a partir de plantas tornou-se uma abordagem muito freqüente nas pesquisas realizadas por indústrias farmacêuticas e em instituições de pesquisa e muitos compostos antivirais têm sido obtidos através de ensaios de fracionamento biomonitorados a partir de extratos de plantas, os quais têm mostrado propriedades antivirais promissoras em vários programas de triagem *in vitro* (HOSTETTMANN, WOLFENDER & RODRIGUES, 1997; VLIETINCK & VANDEN BERGHE, 1998).

Os principais compostos com atividade antiviral obtidos a partir de plantas são substâncias que fazem parte do metabolismo vegetal, ou seja, são sintetizados pelas plantas com diferentes funções fisiológicas, tais como proteger contra patógenos, conferir cor e odor às flores e frutos para atrair polinizadores, conferir maior resistência à doenças, etc. (SALISBURY & ROSS, 1992). Recentemente, com base nos dados obtidos a partir do NAPRALERT (Banco de Dados de Produtos Naturais), VERPOORTE (1998) relatou a existência de mais de 100.000 metabólitos secundários já conhecidos, isolados de um número limitado de espécies vegetais. A extrapolação do número de espécies estudadas e do número de compostos conhecidos sugere que, de todo o reino vegetal, poder-se-ia isolar, no mínimo, um milhão de diferentes compostos, o que demonstra a riqueza desta fonte.

Vários produtos do metabolismo vegetal primário e secundário já foram estudados e apresentaram atividade antiviral contra vários vírus, incluindo os vírus herpéticos e o HIV. São substâncias pertencentes ao grupo dos alcalóides (VANDEN BERGHE *et al.*, 1986; YAMAMOTO *et al.*, 1989; MONTANHA *et al.*, 1995), carboidratos (YAO, WAINBERG & PARNIAK, 1992; MARCHETTI *et al.*, 1996), flavonóides (SIMÕES *et al.*, 1990; AMOROS, SIMÕES & GIRRE, 1992; BURKE *et al.*, 1995; ROBIN, 1998; SHAHAT *et al.*, 1998), cumarinas (HUDSON *et al.*, 1993; HOUGHTON, 1996), compostos fenólicos (VANDEN BERGHE *et al.*, 1986; CHE, 1991; HAYASHI, 1997), taninos (FERREA *et al.*, 1993; ERDELMEIER, 1996), saponinas (SIMÕES *et al.*, 1990; SIMÕES, AMOROS & GIRRE, 1999a), quinonas (HUDSON *et al.*, 1991; DIWU, 1995), terpenos (DARGAN, 1986), proteínas (DOCHERTY, 1987) e lignanas (MACRAE, 1988; CHARLTON, 1998). Revisões mais completas das substâncias isoladas a partir de plantas, que

possuem ação antiviral foram realizadas por VLIETINCK *et al.* (1997) e HUDSON & TOWERS (1999).

O processo de seleção das plantas a serem testadas numa triagem antiviral pode partir de quatro pressupostos: a) escolha randômica das plantas; b) seleção baseada em estudos etnobotânicos e/ou etnofarmacológicos, ou seja, escolher plantas a partir do seu uso na medicina popular; c) escolha através de dados já pré-existentes na literatura; d) abordagens quimiotaxonômicas (VLIETINCK & VANDEN BERGHE, 1998). A seleção de plantas baseada em dados etnobotânicos e etnofarmacológicos tem sido freqüentemente sugerida quando não se têm informações fitoquímicas a respeito das espécies (ROMING *et al.*, 1992; BEUSCHER, 1994; CAVALLARO *et al.*, 1995; TAYLOR, 1996; ZAVALA *et al.*, 1997; ROBIN, 1998; SINDAMBIWE *et al.*, 1999), porém a análise de extratos de plantas escolhidas ao acaso também pode fornecer novas substâncias com atividade antiviral. A Tabela 1 mostra uma comparação da freqüência de compostos ativos isolados usando as abordagens da indústria farmacêutica Shaman (seleção etnobotânica) e da indústria em geral (seleção randômica).

Tabela 1: Comparação da freqüência de compostos ativos isolados utilizando duas abordagens.

SHAMAN PHARMACEUTICALS			
ÁREA	Nº DE PLANTAS TESTADAS	Nº DE COMPOSTOS ISOLADOS	% DE COMPOSTOS ATIVOS
VRS	97	8	8,2
FLU	123	2	1,6
CMV	231	5	2,2
INDÚSTRIA EM GERAL			
ÁREA	Nº DE PLANTAS TESTADAS	Nº DE COMPOSTOS ISOLADOS	% DE COMPOSTOS ATIVOS
HSV	15.000	2	0,013

Legenda: RSV: Respiratory Syncyatic Virus; FLU: Influenza; CMV: Citomegalovírus; HSV: Herpes Simplex Vírus. (ELISABESTKY, 2000)

Vale a pena ressaltar o grande interesse de grupos de pesquisa, universidades e indústrias farmacêuticas, principalmente, de países como Estados Unidos, Japão, França,

Canadá, Inglaterra, Bélgica, Alemanha e Espanha, na biodiversidade das florestas tropicais de regiões como América Latina, África e Ásia (SHU, 1998). A busca de produtos naturais com alguma atividade farmacológica ou de novas moléculas que possam servir de modelo para a síntese de outras a partir de plantas das florestas tropicais é crescente e muito promissora. Como exemplos, pode-se citar os trabalhos realizados com plantas do Panamá (ROMING *et al.*, 1992; MATSUSE *et al.*, 1999), Equador (ABAD *et al.*, 1999), Brasil (LAGROTA *et al.*, 1994; SIMÕES *et al.*, 1999b; BARRIO & PARRA, 2000), Colômbia (BENTACUR-GALVIS *et al.*, 1999), Cuba (BARRIO & PARRA, 2000), Argentina (BARBINI *et al.*, 1999; ABAD *et al.*, 2000), Paraguai (HAYASHI *et al.*, 1993), Egito (SHAHAT *et al.*, 1998), Togo e Ilhas Maurício (BEUSCHER *et al.*, 1994; ROBIN *et al.*, 1998), Benin (SUMMERFIELD *et al.*, 1997), Tanzânia, Zimbábue, Nigéria, Quênia e África do Sul (CHAPUIS, SORDAT & HOSTETTMANN, 1988), Ruanda (VLITINCK *et al.*, 1995), Tailândia (YOOSOOK *et al.*, 1999), Coreia do Sul (WOO *et al.*, 1997; KANG *et al.*, 1999), Indonésia (NAWAWI *et al.*, 1999), Sudão (HUSSEIN *et al.*, 2000) e China (KUROKAWA *et al.*, 1993).

2.3- VÍRUS HERPÉTICO HUMANO DO TIPO-1

(WHITE & FENNER, 1994; ROIZMAN & SEARS, 1996; WHITLEY, 1996; LUPI, PEREIRA JR. & SILVA, 2000)

Todos os vírus herpéticos pertencem à família Herpesviridae e apresentam duas importantes características biológicas: a neurovirulência e a latência. Após o primeiro contato do vírus com o hospedeiro (infecção primária), geralmente infectando células das mucosas, os vírus herpéticos migram para as células do sistema nervoso e lá permanecem latentes até uma nova infecção; este fenômeno é chamado neurovirulência. A capacidade de persistir em seus hospedeiros indefinidamente, na forma de um episomo no núcleo das células infectadas, é chamada de latência. A infecção latente é um mecanismo de escape da resposta imune celular, pois permite com que os vírus permaneçam no interior das células hospedeiras, sem serem reconhecidas pelo sistema imune. No caso do HSV, como ele tem a capacidade de infectar células nervosas e essas não se replicam mais ou o fazem de maneira muito lenta, o DNA viral não é replicado e não fica exposto ao reconhecimento dos anticorpos, vacinas e fármacos antivirais. A partir de estímulos externos como luz solar, estresse, traumas, etc., a replicação é reativada (FLINT *et al.*, 2000). Os vírus herpéticos são altamente disseminados na natureza e acredita-se que, praticamente, todas as espécies de vertebrados sejam susceptíveis a pelo menos um deles. Até o momento, cerca de 100 vírus herpéticos já foram caracterizados e

destes, oito são específicos para humanos (Tabela 2). O vírus herpético B de símios pode também infectar o homem, causando encefalite mortal.

Tabela 2: Vírus herpéticos humanos caracterizados até o momento.

NOME COMUM	SIGLA	DESIGNAÇÃO	SUBFAMÍLIA
Vírus herpes simples tipo 1	HSV-1	Herpesvírus humano 1	α -herpesvirinae
Vírus herpes simples tipo 2	HSV-2	Herpesvírus humano 2	α -herpesvirinae
Vírus da varicela-zoster	VZV	Herpesvírus humano 3	α -herpesvirinae
Citomegalovírus	CMV	Herpesvírus humano 4	β -herpesvirinae
Vírus herpes humano tipo 6	HHV-6	Herpesvírus humano 5	β -herpesvirinae
Vírus herpes humano tipo 7	HHV-7	Herpesvírus humano 6	β -herpesvirinae
Vírus Epstein-Barr	EBV	Herpesvírus humano 7	γ -herpesvirinae
Vírus herpes humano tipo 8	HHV-8	Herpesvírus humano 8	γ -herpesvirinae

(Fonte: SILVA, 2000).

A importância destes patógenos humanos está aumentando à medida que a medicina se desenvolve e a cultura sexual se altera. Os vírus herpéticos são frequentemente reativados em pacientes com AIDS e pacientes imunodeprimidos devido a transplantes ou câncer. Sob estas condições, podem ocorrer infecções disseminadas letais. Embora para a maioria destes vírus ainda não tenha sido possível o desenvolvimento de vacinas, os efeitos por eles causados são amenizados através da quimioterapia antiviral (WHITE & FENNER, 1994).

Os vírus herpéticos são partículas esféricas e envelopadas, de aproximadamente 150-250nm de diâmetro, constituídas de quatro camadas concêntricas: um núcleo, envolvido por um capsídeo icosaédrico, um tegumento amorfo e finalmente um envelope (Figura 1). Eles possuem um DNA genômico linear e dupla fita, que é infeccioso sob condições apropriadas. Os genomas da maioria dos vírus herpéticos foram seqüenciados e sabe-se que estes codificam 70 a 100 proteínas distintas (LUPI *et al.*, 2000). Seqüências de DNA repetitivas geralmente ocorrem nas duas extremidades e, em alguns vírus, também alternativamente, dividindo o genoma em duas seqüências únicas, chamadas grande e pequena. Quando estas seqüências repetitivas são invertidas na sua orientação, os componentes grande e pequeno podem se inverter durante a

replicação, originando dois ou quatro isômeros diferentes do genoma em proporções equimolares. Assim, eventos de recombinação intra e intergenômica podem alterar o número de seqüências repetitivas, criando polimorfismo (ROIZMAN, 1996; LUPI *et al.*, 2000).

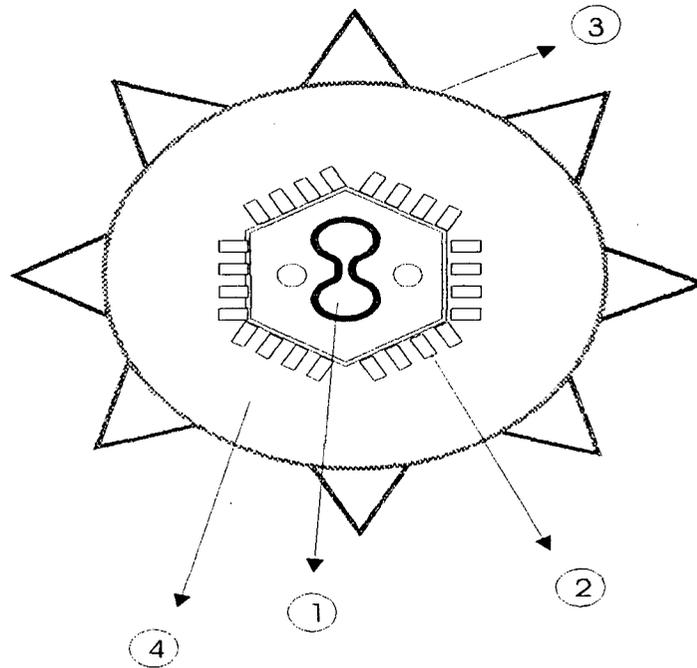


Figura 1: Esquema do vírus herpético humano tipo 1 (HSV-1). **Legenda:** 1-DNA viral; 2-capsídeo proteico, com simetria icosaédrica e 162 capsômeros; 3-envelope composto por uma membrana externa recoberta de glicoproteínas virais; 4-tegumento.

A replicação dos vírus herpéticos tem sido melhor estudada com o HSV-1. Este é adsorvido na célula através de uma glicoproteína gC do envelope e forma uma forte associação entre a glicoproteína gD e um segundo receptor celular. Entrar no citoplasma requer as glicoproteínas gB, gD e gH e isto ocorre por fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira. As proteínas do tegumento são liberadas e o capsídeo é transportado ao longo do citoesqueleto até o poro nuclear, onde o DNA viral é liberado, entra no núcleo e se circulariza. Proteínas virais são sintetizadas, permitindo que os componentes da partícula viral sejam formados e então as partículas virais envelopadas vão se acumulando no citoplasma da célula hospedeira e os vírions maduros são liberados por exocitose. O ciclo de multiplicação do HSV-1 está esquematizado na Figura 2.

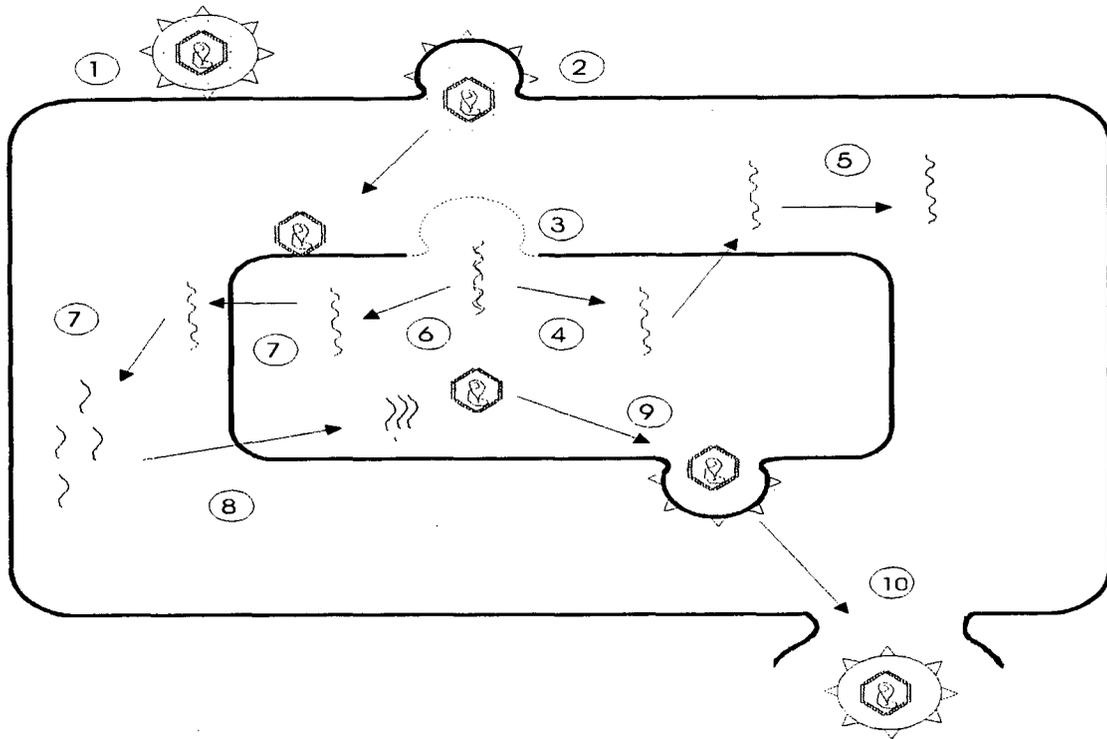


Figura 2: Esquema do ciclo de multiplicação do HSV-1. **Legenda:** 1-adsorção; 2-penetração; 3-desnudamento; 4-transcrição inicial; 5-tradução das proteínas precoces; 6-replicação do DNA viral; 7-transcrição e tradução das proteínas tardias; 8-reunião das partículas virais no núcleo; 9-brotamento a partir da membrana do núcleo; 10-liberação dos virions.

Patogenia do HSV-1 (MURRAY *et al.* , 1994; LUPI *et al.* , 2000)

Na *infecção primária*, o vírus penetra no corpo por invasão das mucosas ou soluções de descontinuidade da pele, sendo que muitos indivíduos são infectados já em idade precoce. Quando no organismo, o vírus replica-se nas células situadas na base do sítio de entrada, podendo ou não produzir lesões vesiculares. Em seguida, os virions se disseminam para as células nervosas adjacentes e nos neurônios estes são encaminhados para o núcleo, iniciando a infecção latente. Nesta fase, o genoma viral está reprimido e integrado ao DNA da célula. O vírus pode então ser ativado por vários estímulos, tais como estresse, febre, trauma, alterações hormonais, exposição ao frio e/ou calor excessivos, etc., e depois voltar pelo nervo, causando lesões características em sítios específicos da pele e mucosas. Os principais sintomas das infecções causadas pelo HSV-1 são:

-infecções cutâneo-mucosas: ocorrem principalmente na boca, lábios e faringe; o local fica coberto por vesículas que podem romper-se formando úlceras. Pode ocorrer febre, dor

edema dos gânglios cervicais e irritabilidade. Em crianças recém-nascidas a manifestação clínica clássica da infecção é a gengivomastite;

-querato-conjuntivites: geralmente resultam da auto-inoculação do HSV-1, envolvendo a córnea e produzindo uma ulceração dendrítica característica. Geralmente, as ocorrências são unilaterais, podendo levar à cegueira. Mais raramente podem ser causadas pelo HSV-2 com sintomas ainda mais severos;

-encefalites: manifestação rara, porém fatal se não tratada (mortalidade de 70%); a maioria dos sobreviventes permanecem com seqüelas neurológicas;

-infecções genitais: cerca de 80% das infecções genitais são causadas pelo HSV-2, porém também podem ser atribuídas ao HSV-1, possivelmente como resultado de práticas de sexo orogenital, sendo transmitidas geralmente entre adultos jovens. A maior parte das infecções primárias são subclínicas, mas quando a doença ocorre é particularmente severa em mulheres;

-infecções neonatais: os bebês são contaminados por suas mães durante o parto, geralmente pelo HSV-2, mas também pelo HSV-1. Raramente, a infecção é adquirida no período pós-ou pré-natal. O herpes neonatal pode estar presente como uma doença disseminada, causando encefalite e lesões na pele, olhos e boca.

Em pacientes imunocomprometidos, tanto nos submetidos a transplantes, quimioterapia antitumoral quanto nos portadores de AIDS, as infecções latentes são freqüentemente reativadas.

2.4-VÍRUS DA POLIOMIELITE

(WHITE & FENNER, 1994; TORTORA *et al.*, 1998)

A família Picornaviridae é uma das maiores famílias de vírus e inclui alguns dos mais importantes vírus humanos e animais, com mais de 230 vírus diferentes. Apenas os representantes dos gêneros Enterovirus e Rhinovirus causam doenças em humanos.

Os picornavirus são pequenos, com material genômico RNA fita simples e não são envelopados. Os principais representantes desta família são os enterovirus, dos quais existem 68 sorotipos humanos, incluindo o vírus da hepatite A. Os capsídeos dos enterovirus são muito resistentes, mesmo em condições adversas, como por exemplo, em águas servidas que passaram pelo tratamento de esgoto, calor, detergentes e ácidos. Os poliovirus possuem aproximadamente 30nm de diâmetro e o filamento de RNA (+) circundado por um capsídeo

icosaédrico com 12 vértices pentaméricas. O ciclo de multiplicação dos poliovírus é semelhante ao esquema geral de replicação dos virus RNA (+) e está esquematizado na Figura 3.

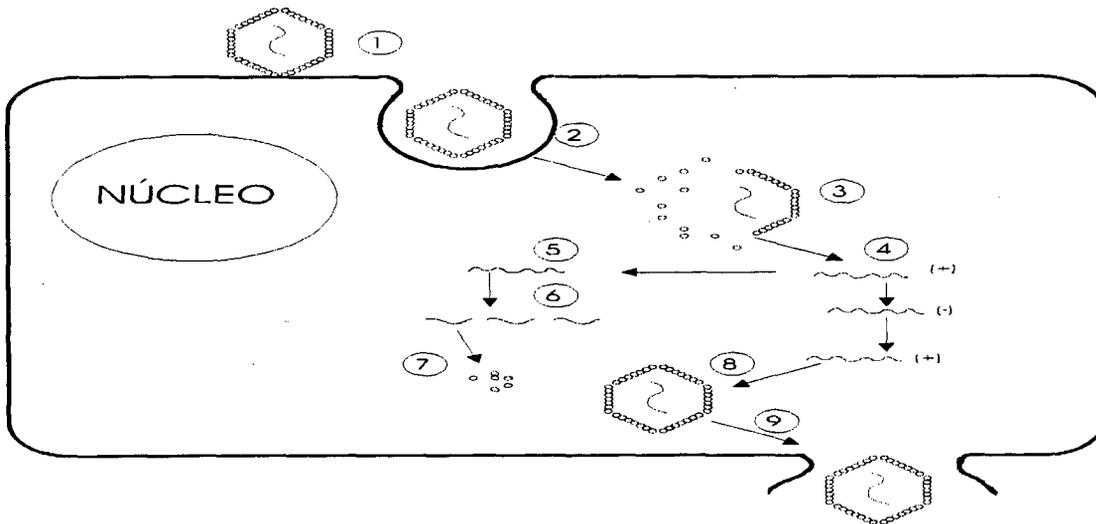


Figura 3: Esquema do ciclo de multiplicação do vírus da poliomielite. **Legenda:** 1-adsorção; 2-penetração; 3-desnudamento; 4-replicação; 5-tradução da poliproteína; 6-clivagem da poliproteína; 7-reunião das proteínas do capsídeo; 8-inserção do genoma; 9-liberação dos vírions.

Patogenia do poliovírus (WHITE E FENNER, 1994; TORTORA *et al.*, 1998):

Geralmente, as infecções causadas pelos poliovírus são assintomáticas (90%), mas podem ocorrer sintomas semelhantes aos de uma gripe até uma doença paralítica. As portas de entrada para os poliovírus são as vias aéreas superiores, orofaringe e trato gastrointestinal. A viremia primária dissemina o vírus para os tecidos alvo. O poliovírus reconhece um receptor expresso nas células da medula espinhal e neurônios motores e é citolítico. As más condições sanitárias e a alta densidade populacional contribuíram para a transmissão viral, mas, atualmente, as infecções pelos poliovírus em países desenvolvidos e em desenvolvimento são raras, graças às vacinas Salk e Sabin. A OMS tem como meta erradicar totalmente a poliomielite do globo terrestre em 2003.

Quando sintomática, a infecção causada pelos poliovírus pode apresentar-se como:

-poliomielite menor: doença inespecífica podendo ocorrer febre, cefaléia, dor de garganta e vômito;

-poliomielite não paralítica (1-2% dos pacientes): o vírus evolui para o SNC e meninges, causando meningite asséptica e espasmos musculares, além dos sintomas da doença menor;

-poliomielite paralítica ou maior (0,1-0,2% dos indivíduos infectados): aparece alguns dias após o término da doença menor e a paralisia medular pode envolver até mesmo os centros da respiração, resultando em morte em 75% dos casos.

2.5- ESPÉCIE *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze

Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze (sinonima botânica: *A. brasiliana* Richard, *A. brasiliensis* London) é uma espécie arbórea da família Araucariaceae, conhecida popularmente como pinheiro-do-Paraná, pinheiro-brasileiro, araucária ou pinheiro e é a única espécie do seu gênero de ocorrência natural no Brasil (SHIMIZU & OLIVEIRA, 1981). Apresenta entre 10 a 35 m de altura e possui um aspecto original (Figura 4), com tronco retilíneo sem divisões, copa alta, estratificada, caliciforme ou em forma de taça nas árvores mais velhas e cônica nas mais jovens. Suas folhas são pequenas, coriáceas, lanceoladas e pontiagudas em forma de agulhas (aciculas), e suas sementes são muito apreciadas como fonte alimentar (CARVALHO, 1994). Ocorre, principalmente, nos Estados do Paraná (40%), Santa Catarina (31%) e Rio Grande do Sul (25%), podendo ser encontrada até o sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro (CARVALHO, 1994).

A floresta com araucária é designada como floresta ombrófila mista e faz parte do domínio da Mata Atlântica, a qual é constituída por várias outras formações florestais (GUERRA & REIS, 1999).

O pinheiro-do-Paraná é amplamente utilizado pelo homem. A sua madeira, de alta qualidade, produz também celulose e resina. Suas sementes, conhecidas como pinhão, são muito apreciadas na alimentação humana, de animais domésticos e fauna silvestre, por serem ricas em amido (CARVALHO, 1994). Devido ao uso descontrolado e a exploração predatória da *A. angustifolia*, os 20 milhões de hectares ocupados pela espécie no início do século XX praticamente se esgotaram até a década de 70 (MATTOS, 1994).

Com relação ao seu uso na medicina popular, até o momento, não foram encontradas muitas referências na literatura. Sabe-se que este vegetal é empregado por várias tribos indígenas dos Estados do Paraná e Santa Catarina, como os guaranis, os caingangues e os cauiás, que utilizam principalmente os nós, cascas dos caules e brotos para vários fins: reumatismo, catarata, cortes, feridas, dores renais e doenças venéreas (MARQUESINI, 1995) e como emoliente, antisséptico das vias respiratórias e da garganta, no tratamento do reumatismo e de dores ciáticas (PIO CORRÊA, 1926). Apesar da grande importância econômica, da ampla

ocorrência na Floresta Tropical Atlântica (FTA) e da utilização na medicina popular, poucos estudos fitoquímicos e biológicos/farmacológicos foram realizados até o momento. Do óleo essencial das folhas de *A. angustifolia* foram identificados terpenóides como germacreno (9%), os diterpenos hibaeno (30%) e filocladeno (20%) (BROPHY *et al.*, 2000) e monoterpenos como α - e β -pineno, mirceno, α -terpineno, limoneno e terpinoleno, os quais também foram identificados nos brotos (FERNANDES, MOREIRA & MIGUEL, 1991). Também foram identificadas lignanas, ciclolignanas e norlignanas em várias partes da planta e na resina dos nós (FONSECA, 1979; OHASHI *et al.*, 1992; CASTRO *et al.*, 1995) e lecitinas do pinhão (DATTA *et al.*, 1993). Para outras espécies do gênero *Araucaria*, os estudos fitoquímicos também revelaram a presença de compostos, tais como flavonóides para *A. araucana*, *A. cunninghamii* e *A. cookii* (PARVEEN, 1987; HARADA *et al.*, 1992) e labdanos diterpênicos para *A. araucarana* (GARBARINO, 1987). Para a maioria das classes de metabólitos secundários encontrados em *A. angustifolia* e nas outras espécies do gênero já foram detectadas potenciais atividades biológicas/farmacológicas, incluindo ação antiviral.

Uma triagem antiviral preliminar realizada com extratos de *A. angustifolia* revelou resultados promissores (MOREIRA & SIMÕES, 1998; SIMÕES *et al.*, 1999b), aumentando assim a importância deste estudo e justificando-o.

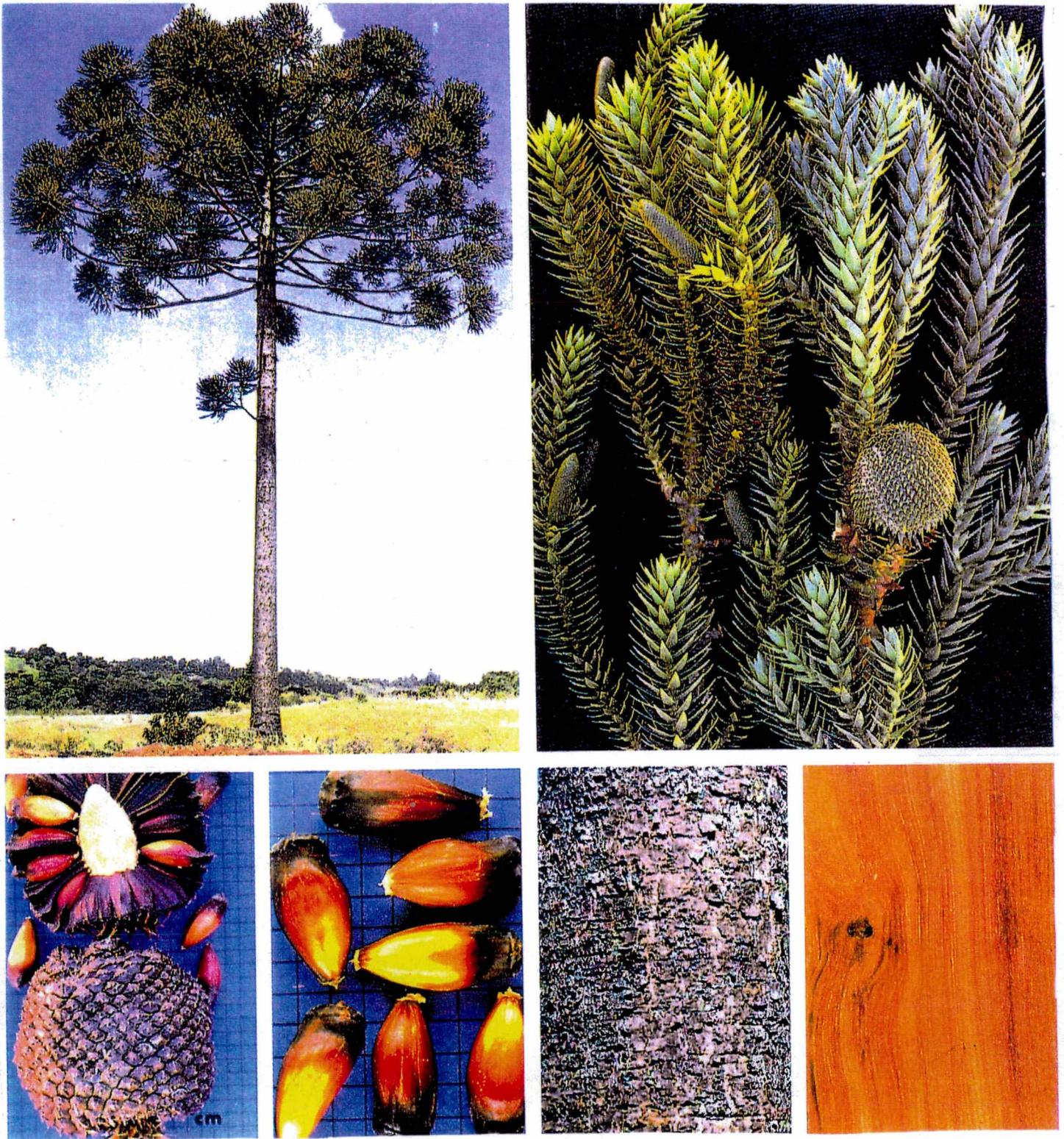


Figura 4: Aspectos gerais de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Legenda:** a) esquerda superior: planta adulta; b) direita superior: inflorescência, sendo o ramo da esquerda de uma planta masculina e o da direita de uma planta feminina; c) esquerda inferior: estróbilo feminino (pinha) e sementes (pinhão); d) direita inferior: caule e madeira. Fonte: LORENZI (1992).

3.JUSTIFICATIVA

Apesar do grande número de compostos sintetizados com potencial atividade antiviral, poucos têm sido aprovados para uso clínico. Isto ocorre porque geralmente o composto é eficaz ao inibir a replicação viral, porém é igualmente tóxico para as células, o que o torna inviável para esta finalidade. Em virtude da grande necessidade de se obter novos agentes antivirais, pesquisadores do mundo todo têm buscado nos produtos naturais, principalmente nas plantas, compostos que possam solucionar esta problemática, já que o reino vegetal é um gerador permanente de estruturas químicas, onde muitos dos compostos encontrados não poderiam ser sintetizados pelo mais imaginativo dos químicos orgânicos (CHU & CUTLER, 1992).

Como já citado anteriormente, este trabalho baseia-se nos resultados preliminares promissores obtidos com extratos de *A. angustifolia*, sua ampla ocorrência na Floresta Tropical Atlântica (FTA), sua grande importância econômica e sua utilização na medicina popular. O HSV-1 foi escolhido para este trabalho por ser um importante patógeno humano, distribuído no mundo todo e para o qual ainda não foi desenvolvida uma vacina totalmente eficaz e economicamente viável. Além disso, algumas cepas isoladas de pacientes se mostraram resistentes ao aciclovir, o principal fármaco utilizado no tratamento das infecções herpéticas. Um outro aspecto é que o HSV-1 é um vírus de genoma DNA, servindo como modelo para outros vírus da mesma constituição gênica.

O poliovírus foi usado neste trabalho apenas como um modelo de vírus RNA, podendo ser comparado a outros enterovírus, já que as infecções pelo poliovírus estão sob controle devido ao esquema de vacinação. Ainda, por se tratar de uma cepa vacinal, trabalhar com o poliovírus não apresenta risco a quem o manipula. É um vírus muito bem adaptado à cultura celular e possui um efeito citopático facilmente visualizável.

4. OBJETIVOS

GERAL:

- ❖ Avaliar a citotoxicidade e a potencial atividade anti-herpética e antipoliiovírus de extratos de folhas (acículas) de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, Araucariaceae.

ESPECÍFICOS:

- ❖ Avaliar a citotoxicidade dos extratos brutos e das frações purificadas, utilizando diferentes metodologias.
- ❖ Avaliar a atividade anti-herpética (anti-HSV-1) e antipoliiovírus (antipolio) dos extratos brutos e das frações purificadas, utilizando diferentes metodologias.
- ❖ Padronizar a técnica colorimétrica com sal de tetrazolium (MTT) para células VERO, a fim de utilizá-la para avaliar concomitantemente citotoxicidade e atividade antiviral de produtos naturais, nas condições do Laboratório de Virologia Aplicada, UFSC.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. COLETA E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE *Araucaria angustifolia*

O material vegetal -galhos com acículas- foi coletado em seu ambiente natural, no município de Lages-SC, pela equipe coordenada pelo Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis (Departamento de Fitotecnia, CCA, UFSC). Após identificação no campo, foi coletado um galho de um indivíduo adulto pertencente a uma população já caracterizada genética e demograficamente. As acículas foram retiradas e o material foi encaminhado ao Laboratório de Farmacognosia (Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, UFSC) onde foi preparado um extrato hidroetanólico, que posteriormente foi fracionado. O processo de maceração, preparação do extrato e fracionamento foi realizado pelas bolsistas Renata Alves Barbosa e Maria Tereza Rojo de Almeida, sob orientação da Profª Drª Marení Rocha Farias (Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, UFSC).

A preparação dos extratos seguiu a seguinte metodologia:

- a) o material vegetal (acículas) foi seco à temperatura ambiente e posteriormente moído;
- b) ao material seco e moído foi adicionada uma mistura de etanol: água na proporção 80:20 (v/v) e este foi macerado à temperatura ambiente por 5 dias; o material foi submetido à filtração e o filtrado designado extrato bruto hidroetanólico, EBHA;
- c) o extrato EBHA foi concentrado sob pressão reduzida ($t < 40^{\circ}\text{C}$) para eliminar o etanol e então submetido à partição com solventes de polaridade crescente: éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. O fracionamento do extrato bruto EBHA está esquematizado na Figura 5.

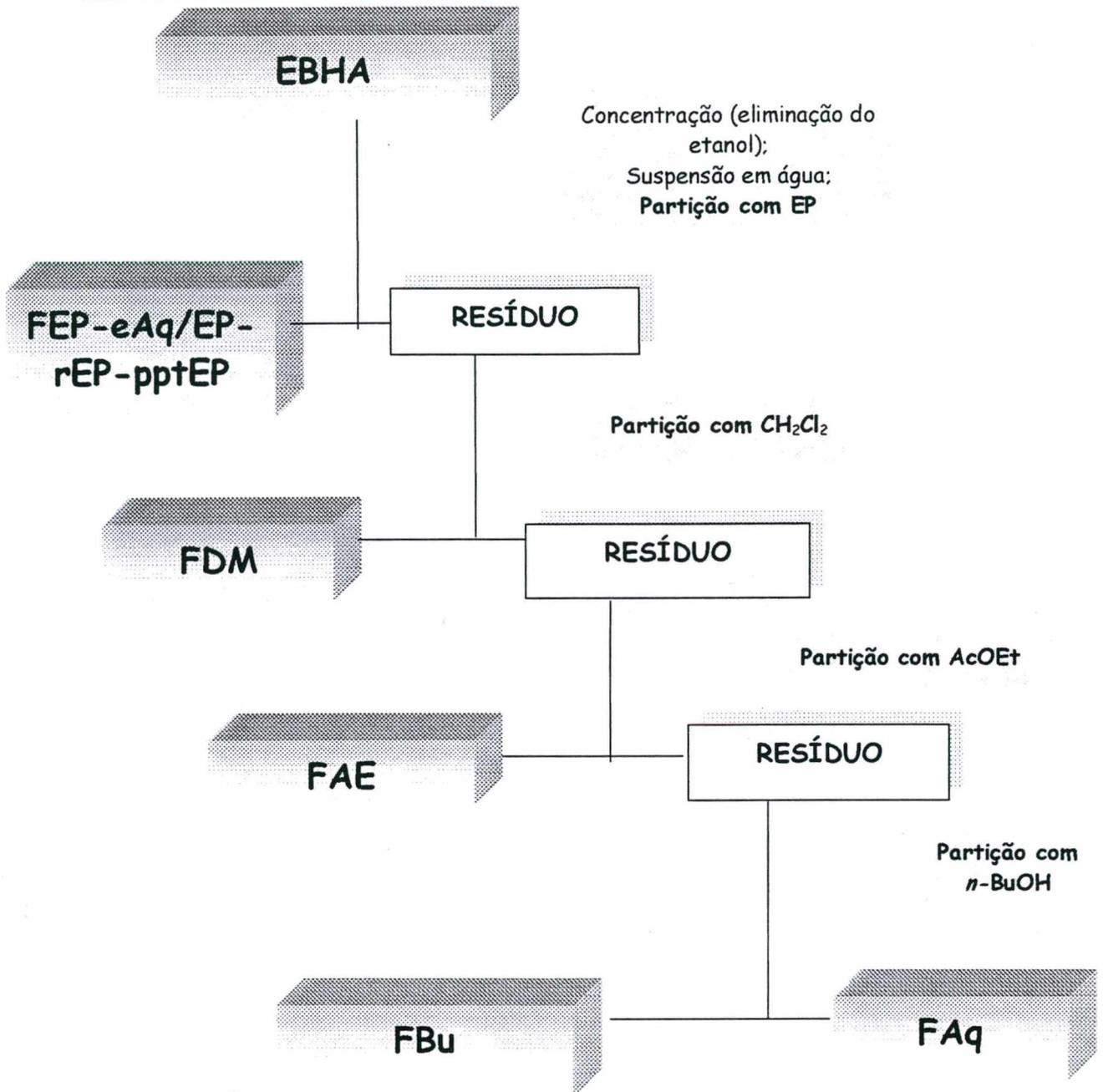


Figura 5. Esquema de fracionamento do extrato bruto hidroetanólico EBH de *Araucaria angustifolia*.

EP= éter de petróleo; CH_2Cl_2 = diclorometano; AcOEt= acetato de etila; *n*-BuOH= *n*-butanol; EBHA=extrato bruto hidroalcoólico; FEP= fração éter de petróleo; eAq/EP= emulsão entre éter de petróleo e água; rEP= resíduo da fração FEP; pptEP= precipitado da fração FEP; FDM= fração diclorometano; FAE= fração acetato de etila; FBu= fração *n*-butanólica; FAq= fração aquosa.

Os materiais-teste foram testados para avaliar sua citotoxicidade e potencial atividade antiviral e os que apresentaram melhores resultados na triagem antiviral foram submetidos a um novo fracionamento (método do biomonitoramento), com o objetivo de isolar os constituintes químicos responsáveis pela atividade antiviral. Após o fracionamento, cada fração foi concentrada no evaporador rotatório e mantida em dessecador e sala climatizada até o seu uso.

Preparo das soluções-mãe a partir do extrato bruto EBHA e das frações que foram obtidas por partição com diferentes solventes: foram pesados 10mg de cada material seco e esta quantidade foi diluída em dimetilssulfóxido, concentração final 0,5-1% (DMSO- Merck) + qsp 10ml de meio 199 sem soro fetal bovino. A concentração final das soluções-mãe foi de 1mg/ml, e estas foram mantidas sob refrigeração a -20° C até o seu uso.

5.2. CULTURAS CELULARES

5.2.1. CÉLULAS

Foram utilizadas células VERO (nº ATCC: CCL 81), que são culturas contínuas de fibroblastos de rins de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*). Estas células foram escolhidas porque são permissivas aos vírus selecionados para este trabalho, permitindo sua multiplicação e apresentando efeitos citopáticos bem visíveis, reprodutíveis e de fácil observação ao microscópio invertido.

5.2.2. MEIO DE CULTURA E REAGENTES

Meio de cultura: o meio 199 (Sigma) foi utilizado para permitir o crescimento e a manutenção das células, complementado com bicarbonato de sódio. A proporção de meio/bicarbonato de sódio é previamente estabelecida para que o pH do meio permaneça entre 7,2 e 7,4. Estas condições requerem o uso de uma estufa de CO₂ (atmosfera: 5% CO₂ e 95% de O₂), uma vez que os frascos de cultura celular e as placas de microtitulação não são totalmente herméticos. A regulação da concentração de CO₂ na estufa é de extrema importância quando o tampão utilizado for o sistema HCO₃. O CO₂ influencia também na proliferação celular através de sua participação na biossíntese das bases púricas e pirimídicas. A atmosfera dentro da estufa deve estar saturada com vapores d'água a fim de prevenir a evaporação e o aumento da osmolaridade do meio.

Soro Fetal Bovino (SFB): foi adicionado ao meio 199 para permitir que as células em cultura não apenas sobrevivam, mas também se reproduzam. Sabe-se que a divisão celular só é possível na presença de um certo número de fatores mitógenos, que são então fornecidos pelo soro fetal. É preferível a utilização de soro de origem animal, extraído de indivíduos jovens, já que o efeito estimulante do soro é inversamente proporcional à idade do doador. Ao meio 199 foi acrescentado 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL) para o crescimento e 5% para manutenção das células.

Antibióticos e antifúngicos: costumam ser adicionados ao meio para evitar a contaminação das culturas por bactérias, fungos, leveduras e micoplasmas, dependendo do espectro de ação dos produtos escolhidos. Foi adicionado 1ml de penicilina/estreptomicina/anfotericina B (Gibco BRL, proporções: 10.000U penicilina, 10.000µg estreptomicina, 25µg anfotericina B) para cada 100ml de meio 199.

Tripsina: a tripsina é uma enzima que faz parte do grupo das proteases, que catalisam reações de quebra da cadeia polipeptídica em determinadas seqüências de aminoácidos. A tripsina rompe a cadeia peptídica quando os aminoácidos da extremidade aminoterminal são L-lisina ou L-leucina. Esta enzima não requer a presença de co-fatores e é muito utilizada em culturas celulares que necessitam de um suporte para se fixarem e proliferarem. Ela age então sobre as proteínas que permitem a fixação das células no suporte, liberando as células. A tripsina deve ter sua ação proteolítica inibida, após o descolamento das células, para evitar a citólise. Esta inibição é feita através da adição de SFB às células. Nos experimentos foi utilizada tripsina de pâncreas de porco (Sigma) preparada numa solução de EDTA a 0,05%.

5.3. VÍRUS

5.3.1. ORIGEM DAS CEPAS

Os vírus utilizados nos experimentos foram os seguintes:

❖ Vírus com genoma DNA:

Herpesvírus simplex humano tipo 1 (HSV-1):

-HSV-1 cepa KOS (Universidade de Rennes, França)

❖ Vírus com genoma RNA:

Poliovírus humano tipo 2 (polio-2):

-polio-2, cepa vacinal (Instituto Adolpho Lutz, SP)

5.3.2. PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES-ESTOQUE VIRAIS

As suspensões virais foram inoculadas em um frasco de cultura de 75cm² de área contendo uma monocamada de células VERO, cultivadas em 10ml de meio 199 suplementado com 5% de SFB e 1% de antibiótico/antifúngico, e que foram tripsinizadas 24h antes da infecção. Primeiramente, o meio de cultura 199 foi aspirado e o tapete celular foi lavado 3X com PBS; com o auxílio de uma micropipeta, foi adicionado 1ml da suspensão viral. Após a inoculação, o frasco foi incubado por 1h a 37° C em estufa de CO₂ para permitir a adsorção e penetração viral e, então, retirou-se o excesso da suspensão viral e foram adicionados outros 10ml de meio 199, nas mesmas condições descritas acima. O efeito citopático viral foi monitorado com o auxílio de um microscópio invertido a cada ciclo de replicação: 18h para HSV-1 e 8h para polio-2. Quando o tapete celular se mostrou totalmente infectado pelo vírus, o frasco foi congelado a -80°C e descongelado a temperatura ambiente por 3X, para o rompimento total das células e liberação das partículas virais. O conteúdo do frasco de cultura foi alíquotado em tubos estéreis (200µl) e armazenados à -80° C até sua utilização.

5.3.3. DETERMINAÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO VIRAL

Alguns conceitos básicos devem ser considerados antes de se iniciar a descrição do método propriamente dito. Segundo BURLESON, CHAMBERS & WIEDBRAUK (1992):

-Infectividade viral é a capacidade que uma partícula viral possui de invadir uma célula e parasitá-la para se replicar;

-Título é o número de partículas virais infecciosas por unidade de volume;

-Unidade infecciosa é a menor quantidade de vírus que produz algum efeito reconhecível na célula hospedeira;

-Efeito citopático (ECP) é o conjunto de todas as lesões provocadas por uma partícula viral nas células onde ela se multiplica. A maioria dos vírus provoca modificações celulares específicas e fáceis de observar ao microscópio. No caso dos vírus herpéticos, o ECP se expressa pelo aparecimento de células arredondadas, brilhantes, freqüentemente ligadas umas às outras por prolongamentos citoplasmáticos, formando os focos. Estes focos têm o aspecto característico de cachos de uva, que se estendem pelo tapete celular, desorganizando-o (GIRARD & HIRTH, 1989). O ECP provocado pelo poliovírus se traduz por células arredondadas ou piriformes, que se destacam do suporte, se vacuolizam e acabam por arrebentar-se ou encolher-se em massas

cristalinas; as células tornam-se refringentes com o citoplasma vacuolizado e granuloso (WHITE & FENNER, 1994).

O título infeccioso é quantificado pelo valor recíproco da diluição dos vírus que têm a capacidade de infectar 50% das células hospedeiras inoculadas. O título infeccioso é expresso como a dose infectante a 50% do tecido celular (TCID₅₀) por ml. A metodologia utilizada para estimar o TCID₅₀ foi aquela preconizada por REED & MUENCH (1938). O TCID₅₀ não revela quantas unidades infecciosas podem estar presentes na amostra, mas somente se esta dose ou diluição produzirá ECP em cerca de 50% das unidades experimentais (no caso, cada cavidade). A partir do valor estimado de TCID₅₀ (=DI₅₀), pode-se calcular a multiplicidade de infecção (MOI), que é a relação entre o título infeccioso e a quantidade de células.

Técnica: a partir de uma suspensão-estoque viral foi preparada uma série de diluições na razão de 1:10, em tubos de microtitulação, usando meio 199 sem soro fetal bovino (225µl de meio + 25µl de suspensão viral). Em seguida, 200µl de cada diluição foram adicionados ao tapete celular previamente formado em placas de microtitulação de 96 cavidades após ter aspirado o meio de cultura. A placa foi então incubada a 37°C, em estufa de CO₂, durante 72h para o HSV-1 (=4 ciclos de multiplicação). As placas foram observadas diariamente ao microscópio invertido e todas as cavidades foram analisadas (Figura 6).

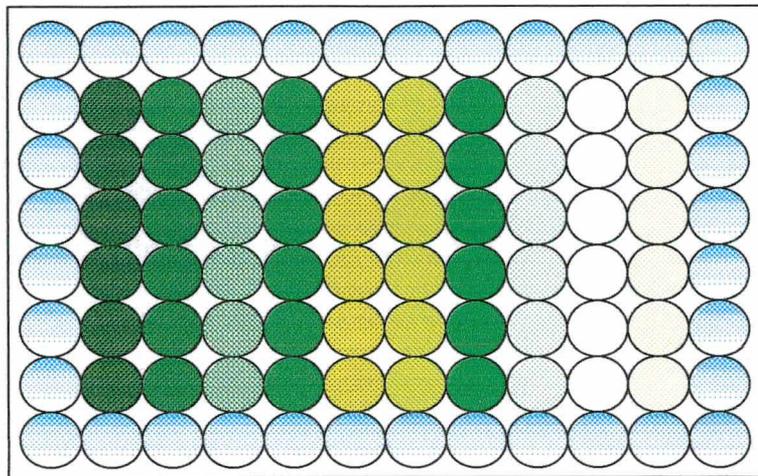
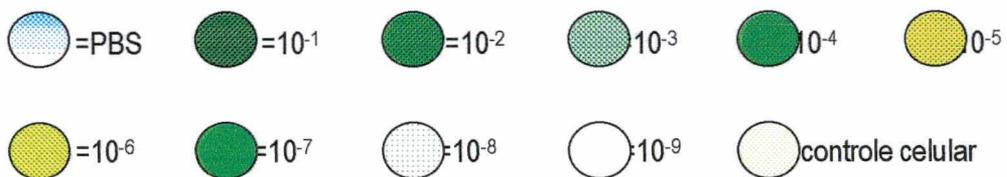


Figura 6: Disposição da placa de microtitulação para titulação da suspensões-estoque virais pelo método de REED & MUENCH (1938).



As diluições da suspensão viral, bem como os controles foram colocados nas 60 cavidades internas da placas, enquanto que as cavidades periféricas foram preenchidas com 100µl de tampão fosfato (PBS). Este procedimento tem por finalidade evitar o efeito da evaporação e da variação de temperatura que pode ocorrer nas cavidades mais externas da placa. Em cada diluição foram contadas as cavidades infectadas (positivas) e não infectadas (negativas) e foram calculadas as porcentagens de cavidades infectadas para cada diluição. Caso a diluição que infecta 50% das cavidades variar entre duas diluições, o título pode ser calculado através da distância proporcional (DP) entre as mesmas, pela seguinte fórmula:

$$DP = \frac{(\% \text{ de positivas acima de } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ de positivas acima de } 50\%) - (\% \text{ de positivas abaixo de } 50\%)}$$

$$(DP \times \log \text{ do fator de diluição}) + (\log \text{ da diluição acima de } 50\%) = \log \text{ TCID}_{50}$$

Então, o valor encontrado é multiplicado pelo volume adicionado a cada cavidade, no caso, 200 μ l e obtém-se o valor de TCID₅₀/ml.

5.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento utilizado em todos os experimentos, tanto nos de avaliação da citotoxicidade quanto nos de avaliação da atividade antiviral, foi o de blocos completamente casualizados (BCC) e um arranjo multifatorial dos tratamentos, onde cada cavidade constituiu uma unidade experimental e os tratamentos foram as diferentes frações X diferentes concentrações (SOKAL & ROHLF, 1995). Os tratamentos foram distribuídos aleatoriamente entre as cavidades e as repetições ficaram em placas diferentes (3 repetições-triplicata).

A casualização, ou seja, o sorteio dos diferentes tratamentos sobre as unidades experimentais, aumenta a probabilidade de que possíveis fatores interferentes desconhecidos fiquem igualmente distribuídos nos blocos e que a estimativa dos valores e médias dos tratamentos e do erro experimental não tomem-se tendenciosas. No caso dos experimentos em placas de 96 cavidades, a casualização permite que cada tratamento tenha a chance de ocupar cavidades diferentes dentro da placa, as quais podem estar sujeitas à variações de temperatura, umidade ou difusão de gases dependendo da posição que ocupam na placa. O bloqueamento agrupa uma repetição de todos os tratamentos, permitindo que estas sejam submetidas às mesmas condições experimentais, diluindo desta forma a variância atribuída ao erro experimental.

Um erro grave que normalmente é cometido quando se trata de experimentos realizados em placas de microtitulação, é acreditar que colocando as mesmas concentrações de um material-teste em duas ou três colunas dentro da placa, se estaria fazendo uma duplicata ou replicata. Estatisticamente, este procedimento é considerado apenas uma réplica de um mesmo tratamento e não uma repetição, pois a variância devido a fatores externos (erro experimental) não estaria sendo levado em consideração (Sokal & Rohlf, 1995).

A análise estatística dos dados obtidos foi feita através de análise de regressão.

5.5. AVALIAÇÃO DA CITOXICIDADE

Os ensaios para a avaliação da citotoxicidade dos materiais-teste foram realizados anteriormente aos ensaios de atividade antiviral. Isto porque se o material-teste for tóxico às células,

será inviável a sua utilização, mesmo que este apresente uma ação antiviral. Então, com concentrações não tóxicas, poderão ser realizados os testes antivirais.

5.5.1. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

A citotoxicidade se traduz pela desorganização do tapete celular bem como pelo aspecto granuloso e arredondado das células, e conseqüente aparecimento de alterações morfológicas quando as células são expostas a agentes externos (STREISSLE *et al.*, 1981).

Técnica: uma suspensão de células VERO contendo aproximadamente 2×10^5 células/ml foi obtida através da tripsinização de um frasco de cultura celular. Esta suspensão foi distribuída em uma placa de microtitulação de 96 cavidades (100 μ l de suspensão por cavidade). Após 24h de incubação, a 37° C, em estufa de CO₂, o tapete celular estava conflúente. A partir das soluções-mãe (1mg/ml) de cada um dos materiais-teste foram preparadas diluições na razão de 1:2 em meio 199 sem SFB, em tubos de microtitulação. O meio da placa foi descartado por aspiração e as diluições foram transferidas para a placa. Nos controles celulares foi adicionado somente meio 199. O ensaio foi realizado em blocos completamente casualizados (BCC), conforme já detalhado no item 5.4. As placas foram incubadas, a 37°C, em estufa de CO₂, e as alterações morfológicas foram acompanhadas diariamente, por 72h.

As alterações morfológicas provocadas pelas frações foram comparadas com os controles celulares. Esta técnica permite estimar a concentração que causou citotoxicidade a 50% das células de uma cavidade (CC₅₀) e também a concentração máxima não tóxica (CMNT). As alterações morfológicas do tapete celular foram classificadas em cinco categorias, de acordo com a porcentagem de alteração celular:

- 1 = de 0 a 20% aproximadamente do tapete celular com alterações;
- 2 = de 21 a 40% aproximadamente do tapete celular com alterações;
- 3 = de 41 a 60% aproximadamente do tapete celular com alterações;
- 4 = de 61 a 80% aproximadamente do tapete celular com alterações;
- 5 = de 81 a 100% aproximadamente do tapete celular com alterações.

A CC₅₀ de cada material-teste foi estimada a partir dos valores das categorias (1 a 5) plotados em gráfico. Um esquema deste experimento é mostrado na Figura 7.

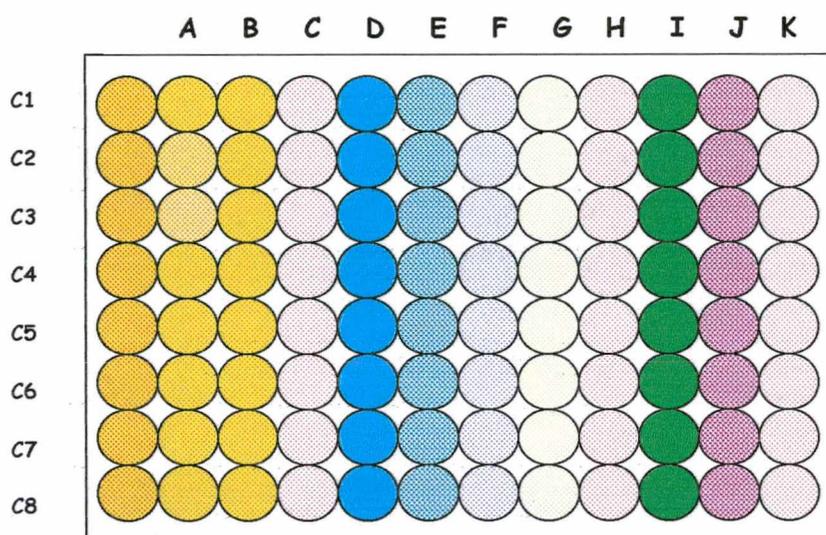


Figura 7: Disposição da placa de microtitulação para determinação da citotoxicidade dos diferentes materiais-teste obtidos de *Araucaria angustifolia*, em células VERO. As concentrações variaram de 500µg/ml (C1) a 3,9 µg/ml (C8).

 =controles celulares ; A-K= materiais-teste; C1-C8= diferentes concentrações dos materiais-teste

5.5.2. ENSAIO COLORIMÉTRICO COM SAL DE TETRAZOLIUM (MTT)

O sal de tetrazolium MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium] é um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em sua mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto formazan de coloração azul-escuro, não solúvel em água e fica armazenado no citoplasma celular (SLATER *et al.*, 1963). O ensaio colorimétrico com MTT mede a quantidade de formazan formado através de espectrofotometria tipo ELISA e é sensível e quantitativo, já que o valor da absorbância é proporcional ao número de células viáveis. A técnica foi descrita por MOSMANN (1983), primeiramente para avaliar compostos com atividade antitumoral, que está intimamente relacionada com citotoxicidade. Em 1988, PAUWELS *et al.* modificaram a técnica para avaliar a potencial atividade antiviral (anti-HIV) e a citotoxicidade de vários compostos, o que representou uma

inovação na metodologia já existente. Em 1991, TAKEUCHI, BABA & SHIGETA utilizaram o teste para avaliar a atividade antiviral e citotoxicidade de compostos anti-HSV-1, como aciclovir (ACV), brovavir (BvaraU), vidarabina (AraA) e sulfato de dextrana.

Padronização: Com o objetivo de verificar se a relação entre a quantidade de formazan formada e a densidade celular se confirmava para as células VERO, nas condições experimentais do laboratório, as células foram cultivadas em placas de 96 cavidades em várias densidades: 5×10^2 , 5×10^3 ; 1×10^4 ; 2×10^4 ; $2,5 \times 10^4$; 3×10^4 e 4×10^4 células/cavidade, com 0, 1,5 e 5% de soro fetal bovino adicionado ao meio e tempos de incubação após a troca do meio de 48 e 72h. Com estes dois períodos de tempo, os resultados da padronização não foram os esperados e, então, foi decidido realizar a técnica num período de até 7 dias, conforme preconizado por TAKEUCHI *et al.* (1991), fazendo-se as leituras a partir do 4^o até o 7^o dia. O MTT (Sigma) foi diluído em PBS em duas concentrações diferentes: 5 e 7,5mg/ml. Após cada tempo de incubação (48 e 72h), foram adicionados a cada cavidade 10 μ l da solução de MTT e as placas foram incubadas por 4 e 6h. Após, 100 μ l de isopropanol ácido (0,04 N HCl) foram adicionados em todas as cavidades da placa, que foi agitada levemente por 5min e lida em leitor de ELISA (Bio-Tek, ELx 800) a 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Técnica: células VERO foram cultivadas em placas de 96 cavidades (2×10^4 células/cavidade) até confluência (24h). Então, o meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100 μ l dos materiais-teste diluídos (razão 1:2) a partir da CMNT estimada anteriormente e 100 μ l de suspensão viral (1×10^4 TCID₅₀/ml). Foram realizados controles virais (100 μ l da suspensão viral + 100 μ l de meio), controles celulares (200 μ l de meio), controles positivos (100 μ l de suspensão viral + 100 μ l de solução de aciclovir 10 μ g/ml) e brancos (todos os reagentes exceto células). Após, as placas foram incubadas a 37°C, por até 7 dias, e no 4^o e 7^o dia, 20 μ l de MTT (5 e 7,5mg/ml) foram adicionados em todas as cavidades da placa e estas foram incubadas por 4h e 6h. Após, 100 μ l do meio foram removidos de cada cavidade, sem danificar as células e 100 μ l de isopropanol-ácido (0,04 N HCl) foram adicionados em todas as cavidades para solubilizar o formazan. A adição de HCl no isopropanol torna o meio de cultura amarelado, devido a presença do vermelho de fenol e com isto evita-se que a coloração rósea original do meio interfira na leitura a 540 nm. Após, as placas foram agitadas levemente à temperatura ambiente, por 5-10min, para que todo o formazan fosse solubilizado e lidas a 540nm em leitor tipo ELISA (Bio-Tek, ELx 800).

5.6. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO*

5.6.1. INIBIÇÃO DO EFEITO CITOPÁTICO VIRAL

O efeito citopático viral foi definido por ENDERS *et al.* (1949) como sendo todas as lesões provocadas por um vírus na célula onde ele se replica. A maioria dos vírus provoca modificações celulares específicas e fáceis de serem detectadas ao microscópio (Figura 8).

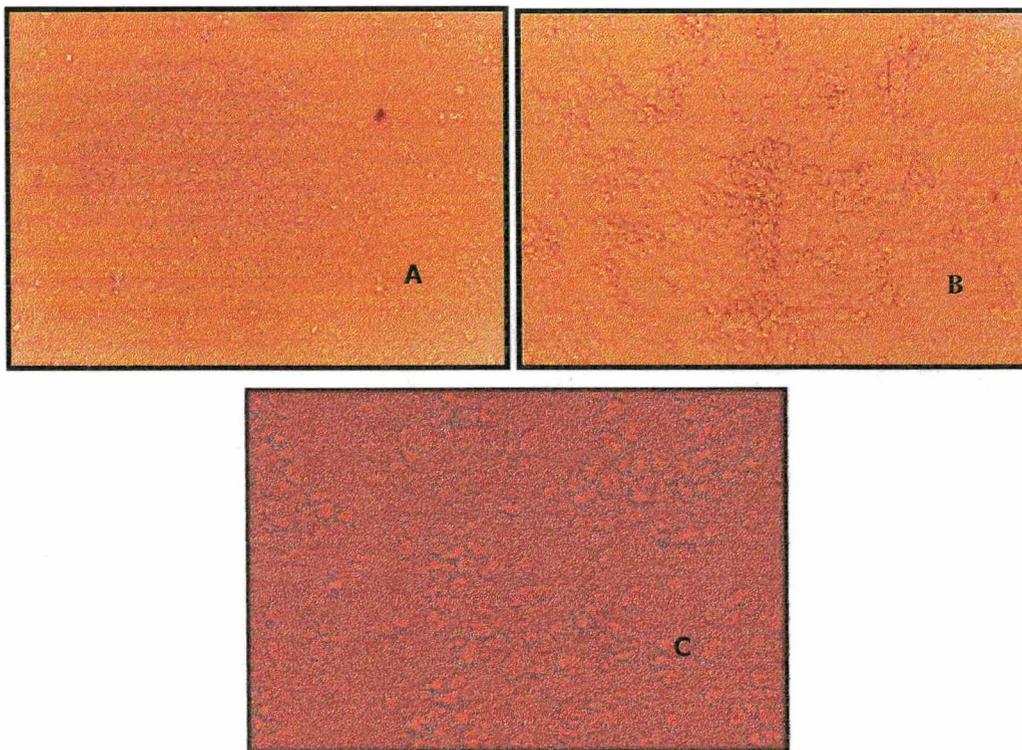


Figura 8: Fotografias em microscópio invertido (40X) de uma monocamada de células VERO normais (A), infectadas com HSV-1 (B) e infectadas com poliovírus-2 (C).

Técnica: uma suspensão celular contendo aproximadamente 2×10^5 células/ml foi preparada e distribuída em uma placa de microtitulação de 96 cavidades. Após incubação de 24h, a 37°C , as células atingiram confluência. Após retirar o meio por sucção, foram adicionados simultaneamente $100\mu\text{l}$ dos materiais-teste, em diferentes concentrações (razão 1:2), a partir da concentração máxima não tóxica (CMNT) estimada nos experimentos anteriores, e $100\mu\text{l}$ da suspensão viral

previamente titulada na dose limite que causou 100% de infecção no tapete celular ($DI=10^{-3}$). Também foram realizados controles virais (para confirmar a virulência da suspensão viral), controles celulares (para confirmar a integridade do tapete celular na ausência dos materiais-teste e dos vírus) e controles positivos de inibição do efeito citopático do HSV-1 com o aciclovir ($10\mu\text{g/ml}$). O ensaio foi realizado em blocos completamente casualizados (BCC), conforme já detalhado no item 5.4. Após a incubação, a $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$, durante 72h para o HSV-1 e 24h para o polio-2, as leituras foram realizadas ao microscópio invertido e a inibição do ECP foi comparada com os controles. O efeito citopático viral foi estimado de acordo com uma escala de 1 a 5, conforme o grau de destruição do tapete celular:

- 1 = de 0 a 20% aproximadamente do tapete celular infectado;
- 2 = de 21 a 40% aproximadamente do tapete celular infectado;
- 3 = de 41 a 60% aproximadamente do tapete celular infectado;
- 4 = de 61 a 80% aproximadamente do tapete celular infectado;
- 5 = de 81 a 100% aproximadamente do tapete celular infectado.

A concentração que inibiu o efeito citopático em aproximadamente 50% das células (CE_{50}) foi estimada a partir dos valores de cada categoria plotados em gráfico. De posse dos valores estimados de CC_{50} e CE_{50} , calculou-se o índice de seletividade (IS), que é a relação entre CC_{50} e CE_{50} . A disposição dos materiais-teste e controles na placa de microtitulação está ilustrada na Figura 9.

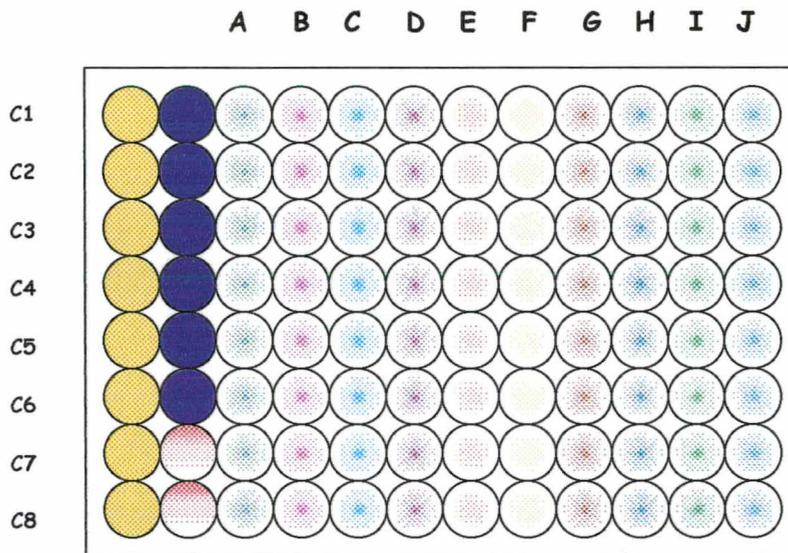


Figura 9: Disposição da placa de microtitulação para avaliação da inibição do efeito citopático viral dos diferentes materiais-teste obtidos de *Araucaria angustifolia*, em células VERO.

● =controles celulares ● =controles virais ● =aciclovir+HSV-1
A-J= materiais-teste; C1-C8= diferentes concentrações dos materiais-teste

5.6.2. REDUÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO VIRAL

O ensaio de redução do título infeccioso viral foi utilizado para avaliar quantitativamente a inibição viral provocada pelos materiais-teste. Os materiais-teste utilizados neste ensaio foram aqueles que apresentaram uma atividade antiviral expressiva nos testes preliminares. Esta técnica pode ser realizada em um ou mais ciclos de multiplicação viral, de acordo com a metodologia clássica de REED & MUENCH (1938).

5.6.2.1. TÉCNICA A: UM CICLO DE MULTIPLICAÇÃO

Uma suspensão celular contendo aproximadamente 2×10^5 células/ml foi preparada e distribuída em uma placa de microtitulação de 96 cavidades. Após incubação de 24h, a 37°C , $100 \mu\text{l}$ da suspensão-estoque viral foram inoculados em cada cavidade, resultando numa multiplicidade de infecção (MOI) de 1000. Após incubação por 1h, a 37°C , a placa foi lavada com PBS para retirar o excesso de partículas virais. Em seguida, os materiais-teste diluídos em meio 199, sem SFB, foram adicionados na placa. O ensaio foi realizado em blocos completamente casualizados (BCC),

conforme descrito no item 5.4. Na mesma placa, foram ainda adicionados os controles virais, celulares e positivos (aciclovir). As placas foram então incubadas, a 37°C, durante 18h (um ciclo de multiplicação do HSV-1).

Após incubação, as placas foram congeladas a -80°C e descongeladas 3X para que as células que ainda estavam intactas se rompessem e liberassem as partículas virais. Os conteúdos das cavidades de uma repetição foram centrifugados a 350Xg para eliminar os restos celulares. Os títulos infecciosos foram determinados conforme descrito no item 5.3.3. A atividade antiviral dos materiais-teste foi expressa através da redução do título infeccioso (em log₁₀) com relação aos controles virais.

5.6.2.2. TÉCNICA B: VÁRIOS CICLOS DE MULTIPLICAÇÃO

Para a realização deste teste, os vírus, em duas diferentes multiplicidades de infecção (MOI=10 e 1000) e os materiais-teste (em diferentes concentrações), foram adicionados simultaneamente às células. As placas foram então incubadas, a 37°C, durante 72h (4 ciclos de multiplicação) para o HSV-1. Após incubação, as placas foram congeladas e descongeladas por 3X e as titulações foram realizadas conforme descrito no item 5.3.3.

5.6.3. ESTUDO DA AÇÃO VIRUCIDA

Técnica: em tubos tipo Eppendorf, 100µl da suspensão viral (10⁴ TCID₅₀/ml) foram mantidos em contato com 100µl dos materiais-teste em diferentes concentrações (iguais ou inferiores à CMNT), por um período de 2h à temperatura ambiente. Após, todas as concentrações dos materiais-teste bem como o controle viral (somente suspensão viral) foram titulados de acordo com o método proposto por Reed & Muench (1938) e a redução do título devido à ação virucida foi calculada em função de log₁₀.

6.RESULTADOS

6.1. Avaliação da citotoxicidade através das alterações morfológicas:

A estimativa da citotoxicidade deu-se através da observação diária das células frente às várias concentrações dos materiais-teste, sendo que os valores utilizados foram os de 72h de incubação (média das 3 repetições). De acordo com o grau de desorganização do tapete celular, os valores foram enquadrados numa das cinco categorias já descritas anteriormente (item 5.5.1) e os valores de 1 a 5 foram plotados num gráfico a fim de se estimar a concentração que seria citotóxica a 50% (CC₅₀), através da equação que explica o gráfico (Figura 10).

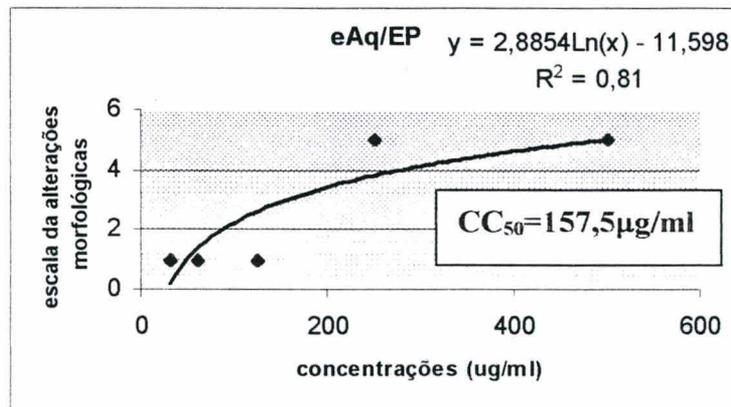
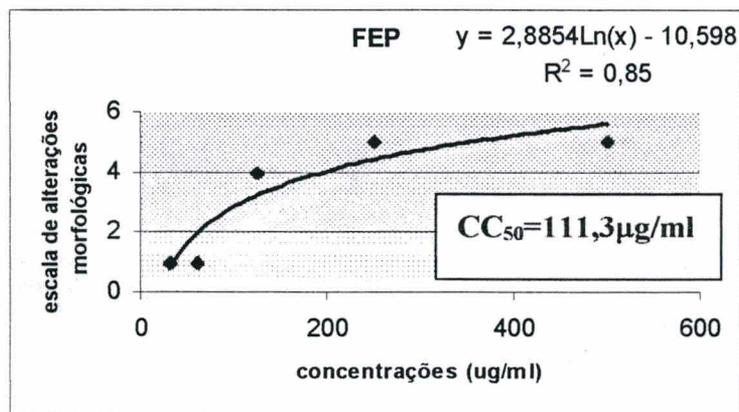
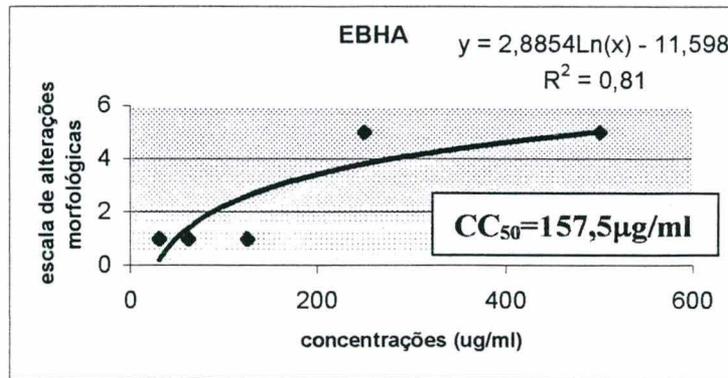


Figura 10: Cálculo dos valores das concentrações citotóxicas a 50% (CC_{50}) dos materiais-teste obtidos de *Araucaria angustifolia*, a partir de análise de regressão dos dados plotados nos gráficos (...)

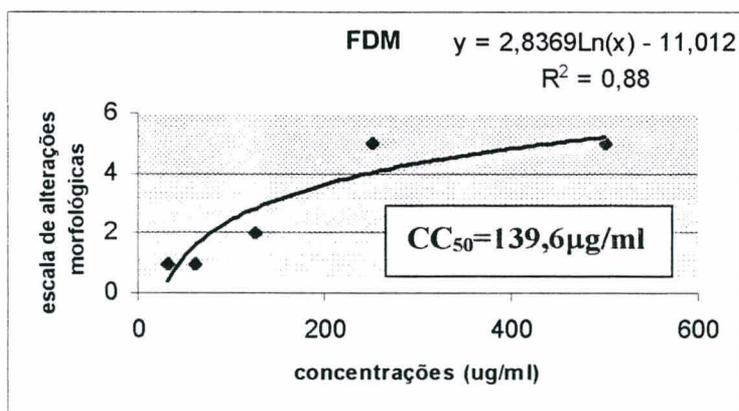
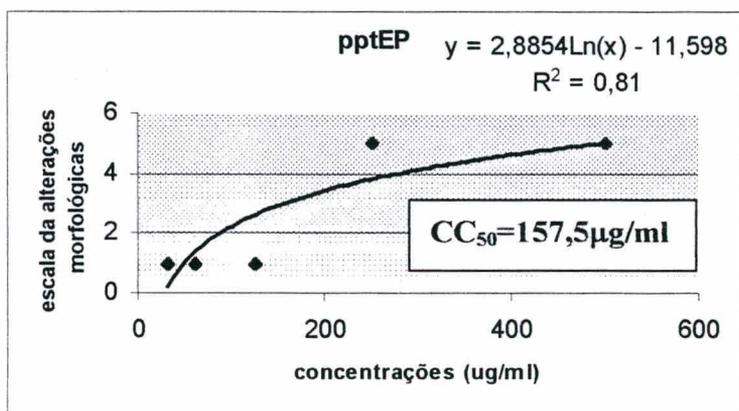
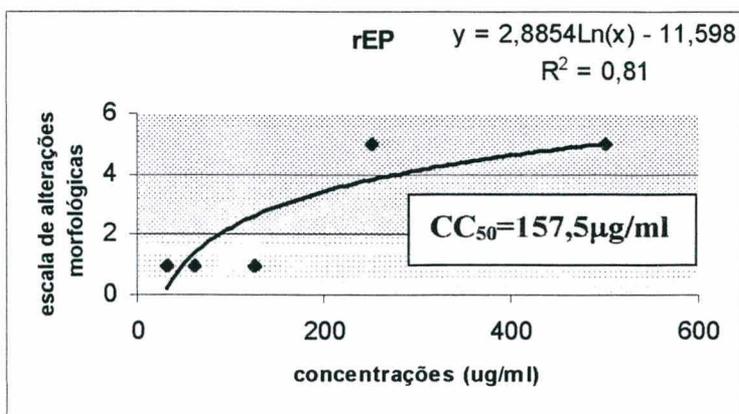
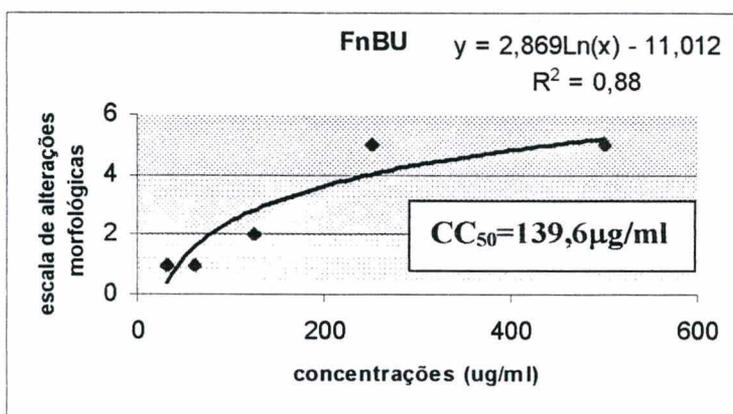
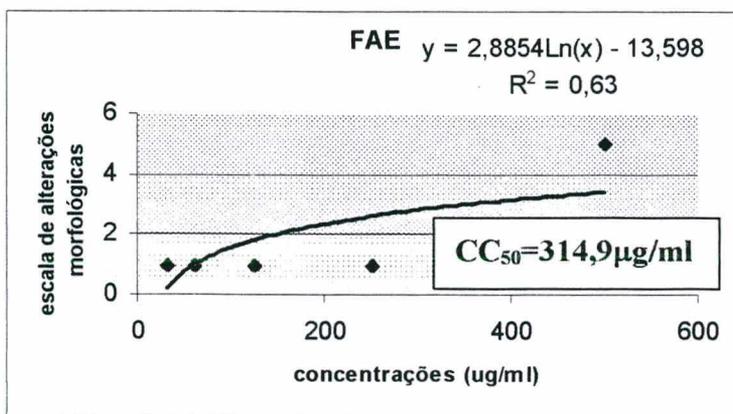


Figura 10: Cálculo dos valores das concentrações citotóxicas a 50% (CC_{50}) dos materiais-teste obtidos de *Araucaria angustifolia*, a partir de análise de regressão dos dados plotados nos gráficos (...)



Faq
 $CC_{50} > 500 \mu\text{g/ml}$

Figura 10: Cálculo dos valores das concentrações citotóxicas a 50% (CC_{50}) dos materiais-teste obtidos de *Araucaria angustifolia*, a partir de análise de regressão dos dados plotados nos gráficos.

EBH=extrato bruto hidroalcoólico; **FEP**= fração éter de petróleo; **eAq/EP**= emulsão entre éter de petróleo e água; **rEP**= residuo da fração FEP; **pptEP**= precipitado da fração FEP; **FDM**= fração diclorometano; **FAE**= fração acetato de etila; **Fnbu**= fração n-butanólica; **FAq**= fração aquosa.

6.2. Padronização do teste do MTT

Observando-se os valores de absorvância fica clara a relação: quantidade de células viáveis *versus* quantidade de formazan, sendo que os tratamentos com 1,5 e 5% de SFB mostraram os valores mais altos, indicando que o SBF manteve as células viáveis após 72h de incubação. No entanto, quando se trata de experimentos com vírus, a concentração de SBF deve ser mais baixa do que a utilizada normalmente para manter as células em cultura. Isto porque o SBF pode conter anticorpos específicos, resultado de uma infecção natural pelo vírus em questão ou de espécies relacionadas (CARTWRIGHT & SHAH, 1994). Os valores de absorvância para 200.000 células/ml foram considerados satisfatórios para a realização dos experimentos, já que esta é densidade celular utilizada em todos os experimentos de avaliação da citotoxicidade e atividade antiviral no Laboratório de Virologia Aplicada, UFSC (Figuras 11 e 12).

No entanto, os tempos de 48 e 72h não são suficientes quando se trata de experimentos para avaliar a atividade antiviral. Isto se deve à necessidade de obtenção de valores menores ou iguais a 0,2 na relação $(DO)_{\text{controle viral}} / (DO)_{\text{controle celular}}$, indicando que as células do controle viral foram totalmente infectadas e mortas pelo vírus. Esse valor é necessário para a determinação da atividade anti-HSV-1 de compostos e garante a confiabilidade do teste (TAKEUCHI *et al.*, 1991). As leituras foram então realizadas em um período de tempo maior: 4 e 7 dias, conforme preconizado, respectivamente, por SERKEDJIEVA & IVANCHEVA (1999) e TAKEUCHI *et al.* (1991). Não houve diferença significativa nos valores de DO obtidos quando da utilização de soluções de MTT a 5 e 7,5mg/ml (dados não mostrados). Também verificou-se que o tempo de incubação de 6h com o MTT não mostrou valores de DO significativamente maiores quando comparados aos obtidos com 4h de incubação (dados não mostrados). Inclusive, o tempo de incubação de 4h é preconizado por alguns autores que utilizaram a técnica (MOSMANN, 1983; VISTICA *et al.*, 1991; SIEUWERTS *et al.*, 1995), porém este tempo pode variar de 1h (DA COSTA *et al.*, 1999) até 24h (SUDO *et al.*, 1994), de acordo com a linhagem celular utilizada e o tipo do experimento realizado.

Em síntese, para obtenção de dados de $(DO)_{\text{cv}} / (DO)_{\text{cc}} \leq 0,2$, que é ideal para este tipo de experimento, após a padronização, foram selecionados os seguintes parâmetros e seus respectivos valores: densidade celular (células VERO): **2×10^5 células/ml**; concentração de SBF: **1,5%**; concentração da solução de MTT: **5mg/ml**; tempo de incubação da placa após troca de meio: **4 e 7 dias** e tempo de incubação da placa após adição da solução de MTT: **4h**

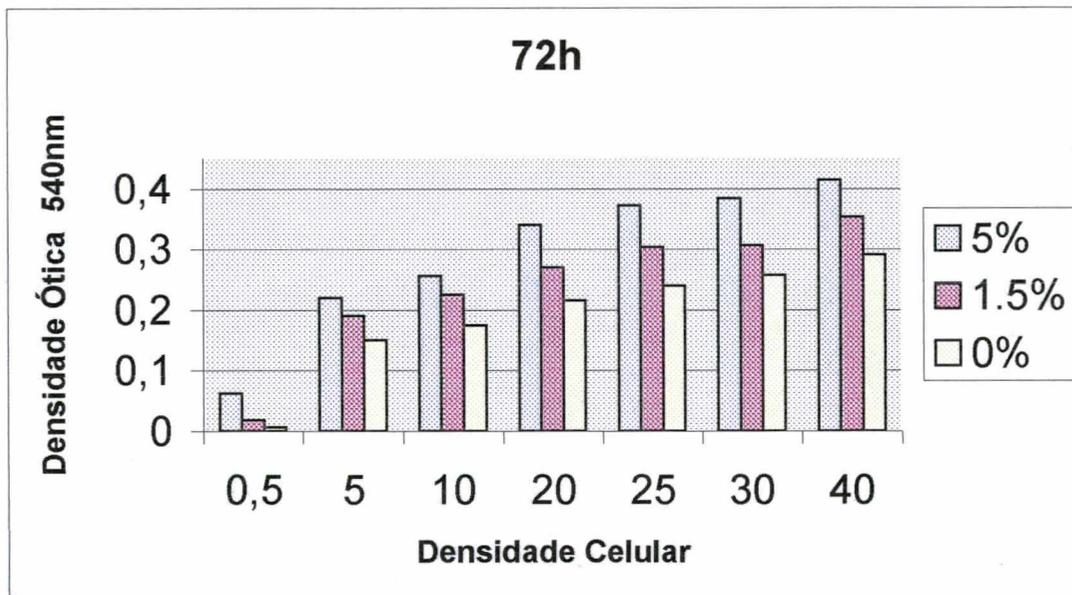
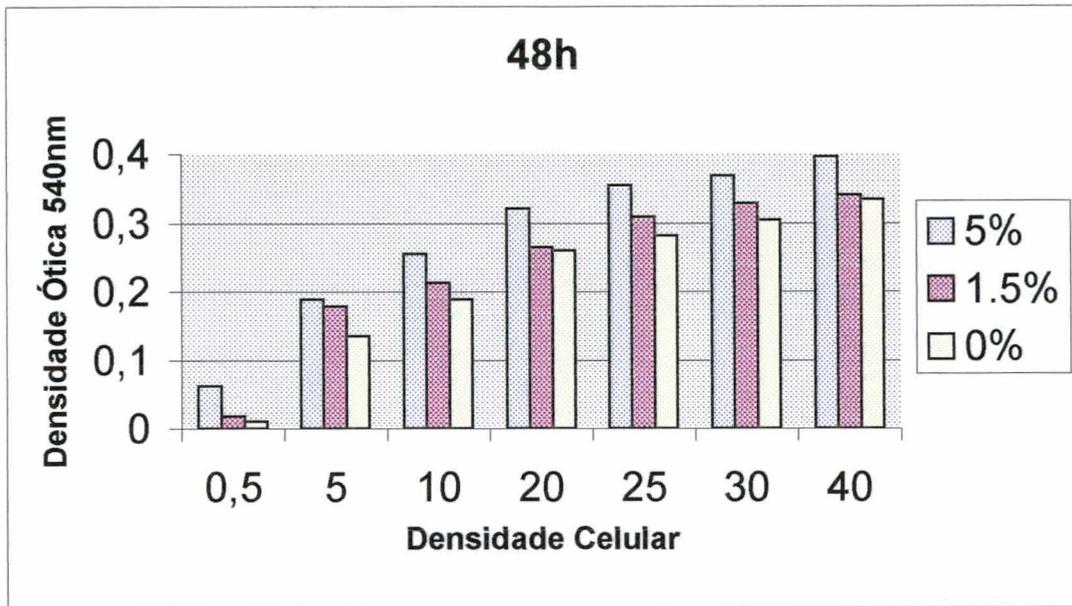


Figura 11: Relação densidade celular X densidade ótica (540nm), com células VERO em três diferentes condições: 0, 1,5 e 5% de soro fetal bovino (SFB) adicionado ao meio 199, solução de MTT a 5mg/ml. Os valores representam a média de três repetições.

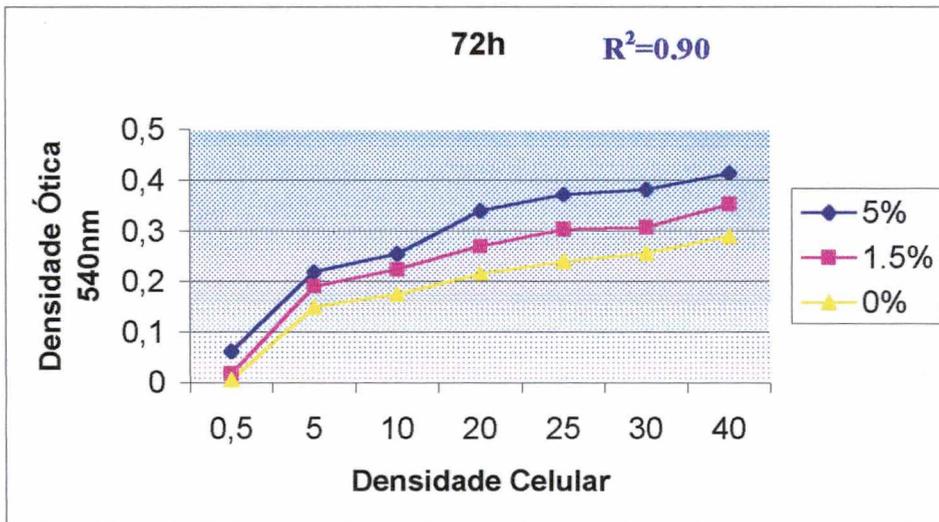
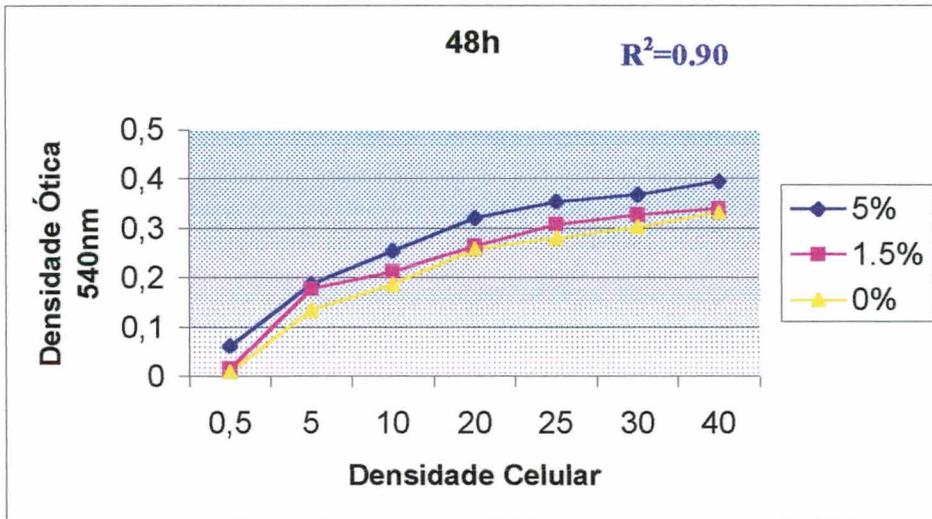


Figura 12: Análise de regressão dos valores de densidade ótica a 540nm para cada percentagem de soro fetal bovino (SFB) adicionado ao meio em 48 e 72h.

6.3. Avaliação do efeito citopático viral:

As concentrações dos materiais-teste foram iguais ou menores do que as concentrações máximas não tóxicas (CMNT). Os valores estimados das percentagens de inibição do ECP, para cada concentração dos materiais-teste, foram plotados num gráfico a fim de se calcular a concentração efetiva a 50% das células (CE_{50}), através da equação que explica o gráfico. A partir dos valores de CC_{50} e CE_{50} foram calculados os índices de seletividade ($IS=CC_{50}/CE_{50}$) para cada material-teste. Quanto maior for o valor de IS, mais promissora é a atividade antiviral.

Nenhum material-teste se mostrou ativo na inibição do efeito citopático viral do poliovirus-2.

Sendo assim, todos os experimentos subseqüentes para avaliar a atividade antiviral foram realizados somente com o HSV-1. Os valores obtidos de CE_{50} , CC_{50} e IS estão sumarizados na Tabela 3.

Vale a pena ressaltar aqui que o valor de IS encontrado para o aciclovir em todos os experimentos de avaliação da atividade antiviral realizados neste trabalho está muitíssimo abaixo do seu valor real e que o valor de sua CE_{50} é muito menor do que $10,0\mu\text{g/ml}$ e, conseqüentemente, seu IS é também muito maior. Porém, a concentração de aciclovir utilizada nos experimentos foi sempre de $10,0\mu\text{g/ml}$, já que o objetivo neste trabalho foi utilizá-lo como controle positivo.

Tabela 3: Valores de CC_{50} , CE_{50} , IS e CMNT dos diferentes materiais-teste obtidos de *Araucaria angustifolia*.

FRAÇÕES OU FÁRMACO	INIBIÇÃO DO ECP VIRAL				ENSAIO DO MTT			
	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	IS	CMNT ($\mu\text{g/ml}$)	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	IS	CMNT ($\mu\text{g/ml}$)
EBHA	157,5	SI	---	125,0	NT	NT	NT	NT
FEP	111,3	SI	---	62,5	NT	NT	NT	NT
eAq/EP	157,5	24,8	6,35	31,25	250,0	SI	---	31,25
pptAq/EP	157,5	SI	---	125,0	NT	NT	NT	NT
rEP	157,5	31,5	5,00	250,0	187,5	93,75*/ 135,0♣	2,00*/ 1,40♣	62,5
FDM	139,6	SI	---	62,5	NT	NT	NT	NT
FAE	314,9	35,1	9,00	125,0	500,0	62,5*/ 93,75♣	8,00*/ 5,33♣	250,0
FBu	139,6	12,7	11,00	250,0	257,4	23,4*/ 31,25♣	11,0*/ 8,23♣	250,0
Faq	>500,0	SI	---	>500,0	NT	NT	NT	NT
aciclovir	>10,0	<<<10,0	>>>1,0		>10,0	<<<10,0	>>1,0	>10,0

*=valores obtidos após o 4^o dia de incubação das placas (CV/CC=0,24).

♣=valores obtidos após o 7^o dia de incubação das placas (CV/CC=0,197)

NT= não testado por não apresentar atividade inibitória do ECP viral nos experimentos anteriores

SI= sem atividade inibitória do ECP viral

6.2.1. Biomonitoramento:

A partir desta etapa, começaram os novos fracionamentos através do processo de biomonitoramento. A metodologia do fracionamento biomonitorado ou biomonitoramento consiste na realização de fracionamentos sucessivos de acordo com os resultados positivos obtidos nos ensaios biológicos (HOSTETTMANN, WOLFENDER & RODRIGUEZ, 1997; HOUGHTON & RAMAN, 1998). Geralmente, parte-se de extratos brutos ou frações semi-purificadas, que são avaliados para detecção de alguma atividade farmacológica e/ou biológica e, de acordo com os resultados, as mais promissoras são submetidas a um novo fracionamento, enquanto que aquelas que não mostraram resultados satisfatórios são descartadas. O objetivo é isolar e identificar substâncias ativas a partir de dados biológicos. Esta metodologia foi utilizada para direcionar os experimentos neste trabalho.

Em experimentos iniciais de avaliação da atividade antiviral, a fração acetato de etila- FAE havia mostrado valores de IS mais promissores do que a fração n-butanólica- FBu (dados não mostrados). No entanto, após a realização de um segundo fracionamento para obtenção de uma maior quantidade de material-teste, a FBu (IS=11,0) se mostrou levemente mais ativa do que a FAE (IS=9,0). Porém, como o processo de biomonitoramento já havia sido iniciado com a FAE, resultando nas sub-frações SF1 a SF9 e a diferença dos valores de IS não foi significativa, os experimentos subsequentes foram realizados com as sub-frações da FAE. Uma investigação mais aprofundada a respeito da atividade antiviral da FBu poderá ser realizada futuramente.

O processo de biomonitoramento e as sub-frações obtidas são mostrados na Figura 13.

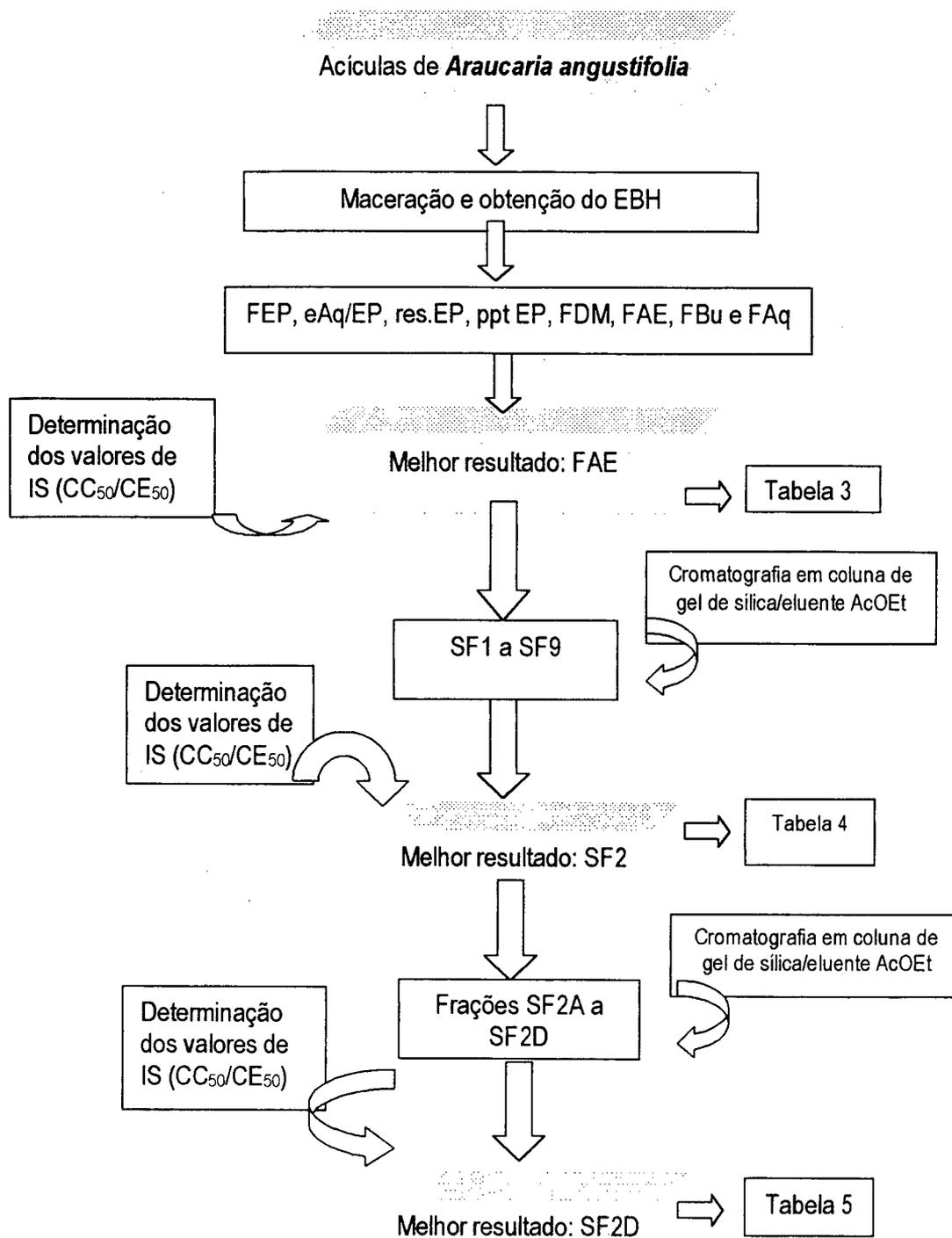


Figura 13: Esquema do biomonitoramento realizado com os materiais-teste que apresentaram resultados mais promissores nos ensaios de avaliação da atividade antiviral.

O fracionamento da FAE foi realizado em coluna de gel de sílica com eluente acetato de etila e resultou em 9 sub-frações semi-purificadas: SF1 a SF9. Também foi feito um fracionamento em coluna de Sephadex®, onde resultaram 7 sub-frações semi-purificadas: SFI a SFVII. Estas sub-frações foram avaliadas para determinar sua citotoxicidade e sua potencial inibição do ECP viral, conforme metodologia já descrita anteriormente. Os resultados da avaliação da citotoxicidade das SF1 a SF9 estão demonstrados na Figura 14.

SF1
 $CC_{50} > 1000,0 \mu\text{g/ml}$

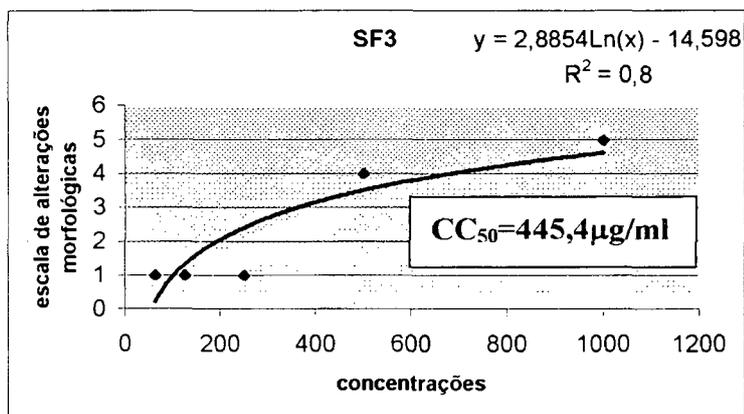
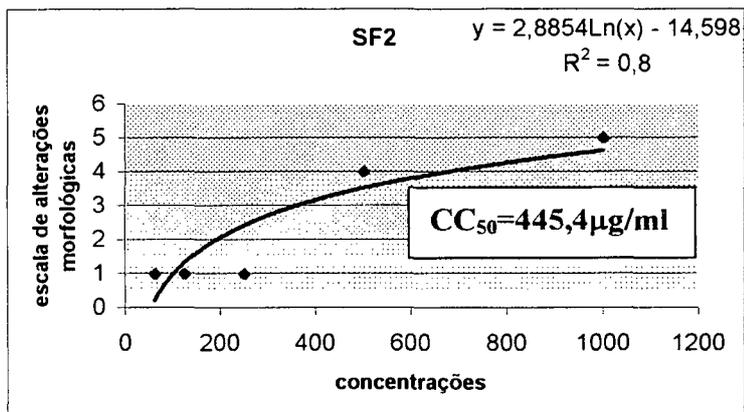


Figura 14: Cálculo dos valores das concentrações citotóxicas a 50% (CC_{50}) das sub-frações SF1-SF9 obtidas de *Araucaria angustifolia*, a partir do fracionamento da fração acetato de etila-FAE em coluna de gel de sílica (...)

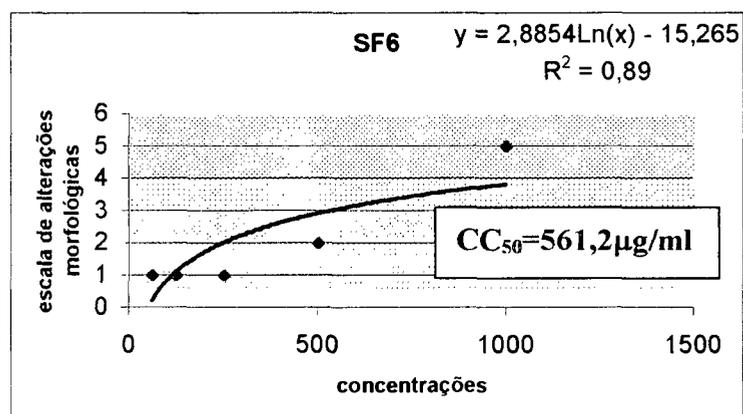
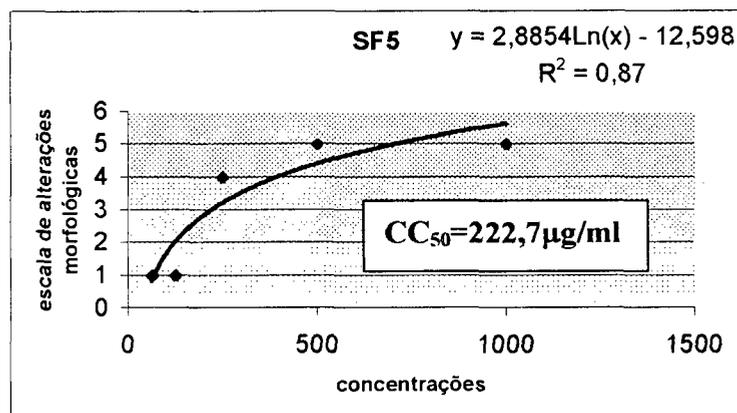
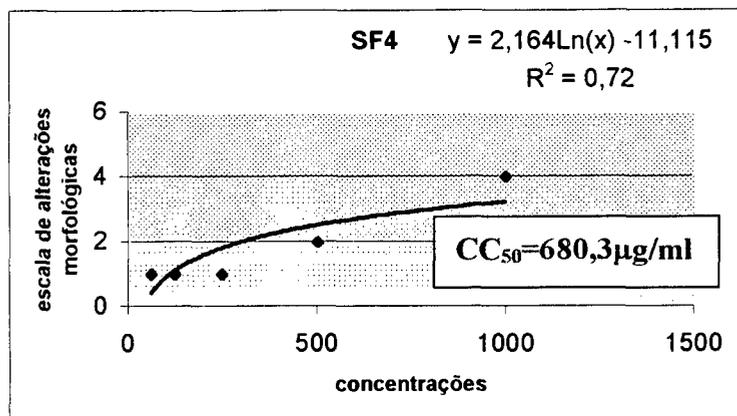
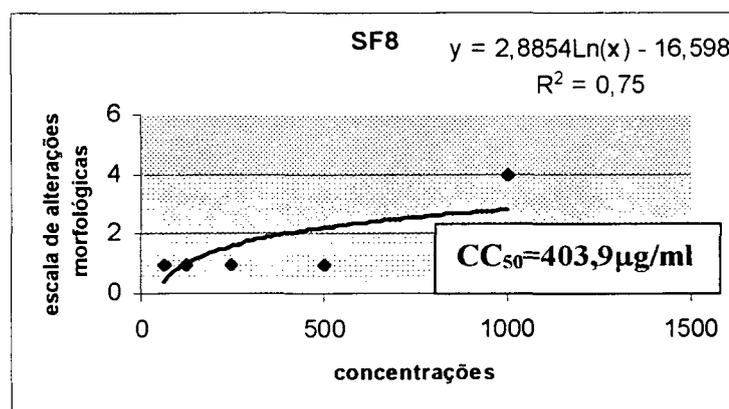
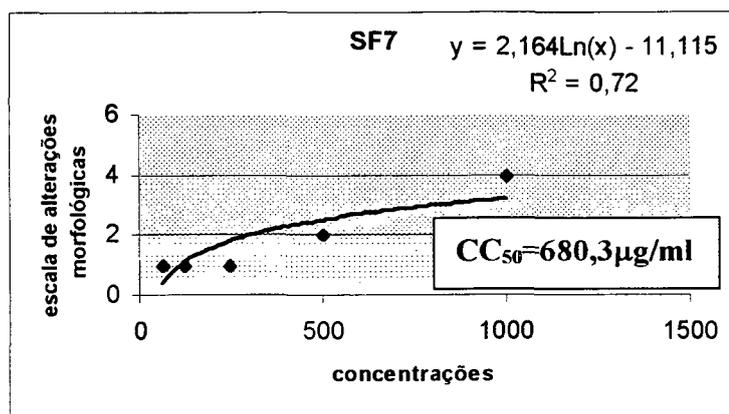


Figura 14: Cálculo dos valores das concentrações citotóxicas a 50% (CC_{50}) das sub-frações SF1-SF9 obtidas de *Araucaria angustifolia*, a partir do fracionamento da fração acetato de etila-FAE em coluna de gel de sílica (...)



SF9
 $CC_{50} > 500,0 \mu\text{g/ml}$

Figura 14: Cálculo dos valores das concentrações citotóxicas a 50% (CC_{50}) das sub-frações SF1-SF9 obtidas de *Araucaria angustifolia*, a partir do fracionamento da fração acetato de etila-FAE em coluna de gel de sílica.

A avaliação da atividade antiviral das sub-frações SF1 a SF9 foi feita através da avaliação do efeito citopático viral e do ensaio colorimétrico com o MTT. Os valores de CC₅₀, CE₅₀ e IS das sub-frações SF1 a SF9 estão sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de CC₅₀, CE₅₀, IS e CMNT das sub-frações SF1 a SF9 obtidas do fracionamento em coluna de gel de sílica de *Araucaria angustifolia*, a partir do fracionamento da fração acetato de etila-FAE.

FRAÇÕES OU FÁRMACO	INIBIÇÃO DO ECP VIRAL				ENSAIO DO MTT			
	CC ₅₀ (µg/ml)	CE ₅₀ (µg/ml)	IS	CMNT (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	CE ₅₀ (µg/ml)	IS	CMNT (µg/ml)
SF 1	>1000	SI	---	500,0	NT	NT	NT	NT
SF 2	445,40	62,50	7,13	250,0	1.772,8	417,8*/ 571,8♣	4,24*/ 3,10♣	125,0
SF 3	445,40	62,50	7,13	125,0	1.321,1	570,23*/ 695,31♣	2,31*/ 1,90♣	250,0
SF 4	680,37	140,31	5,00	125,0	NT	NT	NT	NT
SF 5	222,70	85,05	2,61	125,0	NT	NT	NT	NT
SF 6	561,23	117,99	4,75	250,0	NT	NT	NT	NT
SF 7	680,37	140,31	4,85	250,0	NT	NT	NT	NT
SF8	403,96	70,15	5,76	250,0	500,0	187,5*/ 500,0♣	2,66*/ 1,00♣	500,0
SF9	>500,0	SI	---	500,0	NT	NT	NT	NT
Aciclovir	>10,0	<<<10,0	>>>1, 0	> 10,0	>10,0	<<<10,0	>>>1,0	>10,0

*=valores obtidos após o 4^o dia de incubação das placas (CV/CC=0,24).

♣=valores obtidos após o 7^o dia de incubação das placas (CV/CC=0,197)

SI=sem inibição do efeito citopático viral

NT= não testado por não apresentar atividade inibitória do ECP viral nos experimentos anteriores

A sub-fração SF2 mostrou-se mais ativa do que as demais e, por isto, foi novamente fracionada em coluna de gel de sílica com eluente acetato de etila e, deste processo, resultaram 4 outras sub-frações: SF2A, SF2B, SF2C e SF2D. Estas sub-frações foram avaliadas para determinar sua citotoxicidade e sua potencial inibição do ECP viral, conforme metodologia já descrita anteriormente. Os resultados da avaliação da citotoxicidade das SF2A a SF2D estão demonstrados na Figura 15.

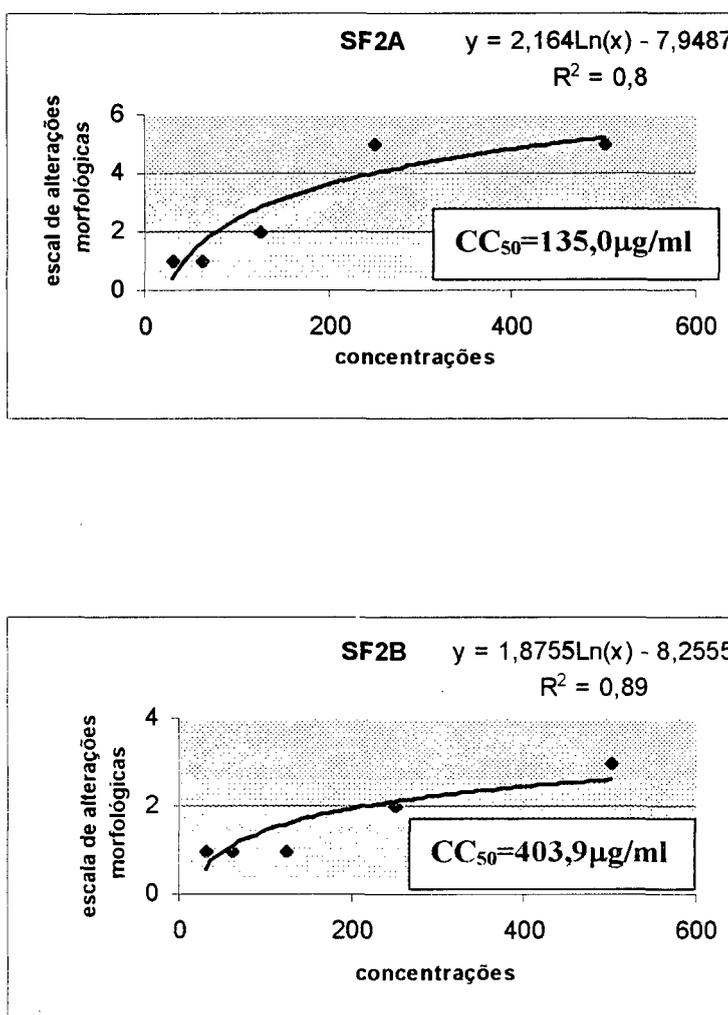


Figura 15: Cálculo dos valores das concentrações citotóxicas a 50% (CC_{50}) das sub-frações SF2A-SF2D obtidas de *Araucaria angustifolia*, a partir do fracionamento da sub-fração SF2(...)

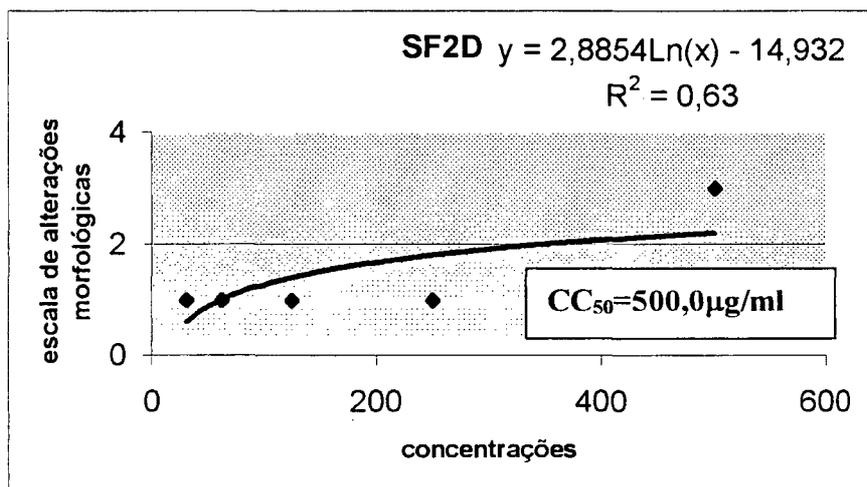
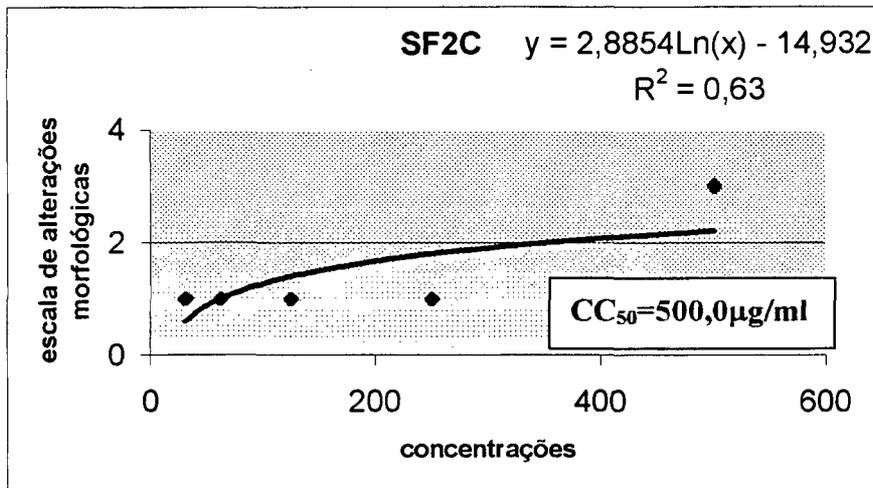


Figura 15: Cálculo dos valores das concentrações citotóxicas a 50% (CC_{50}) das sub-frações SF2A-SF2D obtidas de *Araucaria angustifolia*, a partir do fracionamento da sub-fração SF2.

Essas foram avaliadas para determinar sua potencial atividade antiviral, e a SF2D apresentou melhor resultado (Tabela 5).

Tabela 5: Valores de CC₅₀, CE₅₀, IS e CMNT das sub-frações SF2A a SF2D obtidas a partir do fracionamento da sub-fração SF2, por sua vez, obtida da fração acetato de etila- FAE de *Araucaria angustifolia*.

FRAÇÕES OU FÁRMACO	INIBIÇÃO DO ECP VIRAL				ENSAIO DO MTT			
	CC ₅₀ (µg/ml)	CE ₅₀ (µg/ml)	IS	CMNT (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	CE ₅₀ (µg/ml)	IS	CMNT (µg/ml)
SF2A	135,00	SI	---	62,5	220,0	SI	---	130,0
SF2B	403,90	SI	---	125,0	530,0	SI	---	200,0
SF2C	500,00	SI	---	125,0	700,0	SI	---	250,0
SF2D	500,00	157,47	3,17	250,0	740,0	250,0* / 375,0*	2,96* / 1,97*	500,0
Aciclovir	>10,0	<<<10,0	>>>1,0	>10,0	>10,0	<<<10,0	>>>1,0	>10,0

*=valores obtidos após o 4^o dia de incubação das placas (CV/CC=0,24).

♣=valores obtidos após o 7^o dia de incubação das placas (CV/CC=0,197)

SI=sem inibição do efeito citopático viral

6.4. REDUÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO VIRAL

O ensaio de redução do título viral foi realizado com dois valores de MOI (multiplicidade de infecção) de 1000 e 10 TCID₅₀/ml e as concentrações utilizadas foram as menores concentrações que inibiram 100% da replicação viral pelo ensaio de inibição do ECP. A técnica A, utilizando apenas um ciclo de multiplicação do HSV-1, não gerou resultados, pois este período não foi suficiente para que o vírus se multiplicasse e infectasse todas as células em cultura. Portanto, os resultados abaixo foram obtidos utilizando-se a técnica B, com 4 ciclos de multiplicação do HSV-1. Somente as frações que obtiveram resultados promissores foram utilizadas neste ensaio. Os resultados estão sumarizados nas Tabela 6.

Tabela 6: Redução do título infeccioso viral expressa em \log_{10} , com 4 ciclos de multiplicação e utilizando MOI (multiplicidade de infecção) de 1000 e 10.

FRAÇÕES OU FÁRMACO	CONCENTRAÇÕES (g/ml)	REDUÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO VIRAL EM LOG ₁₀ (% DE INIBIÇÃO)	
		MOI 1000	MOI 10
FAE	62,5	> 4log ₁₀ (>99,99%)	NT
	31,25	> 4log ₁₀ (>99,99%)	> 4log ₁₀ (>99,99%)
	15,62	NT	> 4log ₁₀ (>99,99%)
FBU	7,81	> 4log ₁₀ (>99,99%)	NT
	3,90	> 4log ₁₀ (>99,99%)	> 4log ₁₀ (>99,99%)
	1,95	NT	> 4log ₁₀ (>99,99%)
rEP	250,0	> 4log ₁₀ (>99,99%)	NT
	125,0	NT	> 4log ₁₀ (>99,99%)
	62,5	NT	> 4log ₁₀ (>99,99%)
EAq/EP	7,81	> 4log ₁₀ (>99,99%)	> 4log ₁₀ (>99,99%)
	3,9	3log ₁₀ (99,9%)	SR
SF2	62,5	> 4log ₁₀ (>99,99%)	NT
	31,25	SR	NT
	3,90	NT	> 4log ₁₀ (>99,99%)
	1,95	NT	> 4log ₁₀ (>99,99%)
SF3	31,25	> 4log ₁₀ (>99,99%)	NT
	15,62	3log ₁₀ (99,9%)	> 4log ₁₀ (>99,99%)
	7,81	NT	> 4log ₁₀ (>99,99%)
SF8	62,5	> 4log ₁₀ (>99,99%)	NT
	31,25	2log ₁₀ (99%)	> 4log ₁₀ (>99,99%)
	15,62	NT	1log ₁₀ (90%)
SF2D	62,5	> 4log ₁₀ (>99,99%)	NT
	31,25	> 4log ₁₀ (>99,99%)	> 4log ₁₀ (>99,99%)
	15,62	NT	> 4log ₁₀ (>99,99%)
Aciclovir	10,0	> 4log ₁₀ (>99,99%)	> 4log ₁₀ (>99,99%)

Título do HSV-1 (cepa KOS)= $5 \cdot 10^6$ TCID₅₀/ml

SR= sem redução do título infeccioso viral

NT= não testado

6.5. SINERGISMO ENTRE AS FRAÇÕES

Com o fracionamento da fração FAE, os valores de IS das sub-frações diminuíram em relação a primeira e este fato pode ter ocorrido por dois motivos: perda da atividade antiviral por degradação da FAE durante o fracionamento em coluna de gel de sílica ou a perda do sinergismo existente entre as sub-frações. Para verificar se houve ou não degradação da FAE durante o fracionamento em gel de sílica, as sub-frações obtidas do fracionamento em coluna de Sephadex® (SFI a SFVII) foram submetidas à avaliação da citotoxicidade por alterações morfológicas e avaliação da atividade antiviral pela inibição do efeito citopático viral e os valores de IS foram comparados com os das sub-frações SF1 a SF9. Os valores de CC_{50} , CE_{50} e IS estão sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7: Valores de CC_{50} , CE_{50} e IS das sub-frações SFI a SFVII obtidas do fracionamento em coluna de Sephadex[®] da fração acetato de etila (FAE) em comparação com os valores das sub-frações SF1 a SF9 obtidas do fracionamento em coluna de gel de sílica, obtidas de *Araucaria angustifolia*.

FRAÇÕES- SEPHADEX [®]	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	IS (= CC_{50}/CE_{50})	FRAÇÃO S- GEL SÍLICA	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	IS (= CC_{50}/CE_{50})
SFI	169,7	SI	---	SF1	> 1000	SI	---
SFII	484,0	153,6	3,15	SF2	445,4	62,5	7,13
SFIII	350,8	49,6	7,10	SF3	445,4	62,5	7,13
SFIV	198,4	49,6	4,00	SF4	680,4	140,3	4,84
SFV	157,5	111,3	1,41	SF5	222,7	85,0	2,62
SFVI	193,7	38,3	5,05	SF6	561,2	118,0	4,75
SFVII	234,3	136,7	1,71	SF7	680,4	140,3	4,84
				SF8	403,9	70,1	5,76
				SF9	> 500,0	SI	---

SI= sem inibição do efeito citopático viral

Comparando os valores de IS das sub-frações SF1 a SF9 com aqueles das sub-frações SFI a SFVII, obtidas da coluna de Sephadex[®], observou-se que os maiores valores de IS são similares, porém não necessariamente correspondentes (por exemplo, SFIII, obtida por fracionamento em coluna de Sephadex[®], possui o maior valor de IS, enquanto que as sub-frações obtidas por fracionamento em coluna de gel de sílica, possuem o maior valor) e que, provavelmente, não houve degradação durante o processo de fracionamento com coluna de gel de sílica. Sendo assim, o próximo passo foi a realização de experimentos de inibição do efeito citopático utilizando combinações das sub-frações SF2, SF3, SF8 e SF2D, a partir de suas CMNT e subseqüentes

diluições na razão 1:2. O objetivo foi identificar quais sub-frações contribuem para a atividade anti-herpética da fração FAE. Os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 8.

Tabela 8: Valores em porcentagem de inibição do efeito citopático viral (HSV-1) em relação ao controle viral das diferentes combinações das frações obtidas de sucessivos fracionamentos da fração acetato de etila (FAE), obtida de *Araucaria angustifolia*.

FRAÇÕES/ DILUIÇÃO	SF2 + SF3	SF2 + SF8	SF3 + SF8	SF2 + SF2D	SF3 + SF2D	SF8 + SF2D	SF2 + SF3 + SF8	SF2 + SF3 + SF8 + SF2D
1	Cit	Cit	Cit	Cit	Cit	Cit	Cit	Cit
2	Cit	Cit	100%	Cit	Cit	Cit	Cit	Cit
3	100%	100%	100%	Cit	Cit	Cit	100%	Cit
4	30%	100%	0%	90%	100%	100%	60%	100%
5	10%	10%	0%	20%	40%	0%	0%	100%
6	0%	0%	0%	0%	25%	0%	0%	0%
7	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
8	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
CV	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Título viral=: 5.10^6 TCID₅₀/ml

Cit= alterações morfológicas (citotoxicidade) em todo o tapete celular

6.6. ESTUDO DA AÇÃO VIRUCIDA

As sub-frações avaliadas neste experimento (SF2A a SF2D) não revelaram atividade virucida alguma (dados não mostrados).

7. DISCUSSÃO

A busca de novos compostos com atividade antiviral se faz necessária e urgente, principalmente para doenças virais para as quais não existem ainda vacinas e também porque muitos pacientes apresentam resistência à terapêutica existente. Neste âmbito, a pesquisa na área de agentes anti-herpéticos só tende a crescer, já que o HSV se enquadra nas duas situações acima citadas. Sendo assim, a busca de substâncias ativas a partir de produtos naturais, principalmente nas plantas, representa uma fonte promissora de novas moléculas, já que somente uma ínfima fração da biodiversidade mundial já foi testada e que a diversidade de estruturas encontradas na natureza é gigantesca. Ainda, os produtos de origem natural têm vantagens sobre os produtos sintéticos, tais como tamanho relativamente pequeno (>1000Da) e características de fármacos, como, por exemplo, absorção e metabolização pelo organismo (HARVEY, 1999). Porém, uma das principais dificuldades em se utilizar produtos naturais na pesquisa de novos fármacos está relacionada com o isolamento e elucidação estrutural destes compostos.

Na tentativa de solucionar estas questões, pesquisadores têm se esforçado para otimizar técnicas que possibilitem a avaliação de muitas amostras ao mesmo tempo, fornecendo resultados de maneira rápida, reprodutível e de baixo custo. Por exemplo, o uso do fracionamento biomonitorado facilita a detecção e remoção de compostos presentes nos extratos e que não apresentam atividade farmacológica, e também detecta baixas concentrações do(s) composto(s) ativo(s) no extrato, revelando as frações que devem ser fracionadas e avaliadas farmacologicamente (HARVEY, 1999). Além disso, as frações ativas podem ser analisadas quimicamente de maneira rápida e precisa, através de cromatografia líquida em camada delgada (CLCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) associada à detecção por ultra-violeta (HOSTETTMANN *et al.*, 1984), espectrometria de massa ou espectroscopia de ressonância magnética nuclear (WOLFENDER & HOSTETTMANN, 1995).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a potencial atividade antiviral de *Araucaria angustifolia*, que foi escolhida para este estudo através de alguns poucos dados etnobotânicos e fitoquímicos e também devido à sua grande importância econômica e perigo de extinção. A avaliação da atividade anti-herpética foi conduzida através do fracionamento biomonitorado, sempre acompanhado de técnicas cromatográficas.

7.1. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE POR ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

Antes de iniciar os experimentos de avaliação da atividade antiviral dos materiais-teste, é necessário se avaliar quão tóxicos serão estes materiais para as células. O composto antiviral ideal é aquele que inibe somente as etapas do ciclo de replicação viral, sem interferir na célula hospedeira, possibilitando que essa se recupere da infecção e mantenha suas atividades metabólicas (VANDEN BERGHE, VLIETINCK & VAN HOOF, 1986).

A citotoxicidade foi definida por NARDONE (1977) como sendo o conjunto de alterações da homeostase celular que leva a uma série de modificações que interferem na capacidade adaptativa das células, bem como na sobrevivência, reprodução e realização de suas funções metabólicas. A citotoxicidade, ou seja, a reação celular frente a um composto ou a uma mistura de compostos (extratos) se traduz pela desorganização do tapete celular, bem como pelo aspecto granuloso e arredondado das células (STREISSLE et al., 1981). Esta reação frente aos materiais-teste aqui utilizados foi avaliada microscopicamente, num primeiro momento. Com a padronização do ensaio do MTT (Item 7.2), esta verificação ganhará um caráter mais sensível e quantitativo, já que o MTT avalia a viabilidade metabólica das células, enquanto que a avaliação microscópica possui suas limitações, pois consegue detectar somente os efeitos visíveis da toxicidade.

A intensidade da lesão celular frente a um composto depende de vários fatores, tais como a concentração do material testado, o tempo de exposição, o tipo de célula, a capacidade do produto de penetrar na célula, etc. (HU & HSIUNG, 1989). No caso dos materiais-teste utilizados neste trabalho, extratos brutos e frações semi-purificadas, é sabido que os primeiros, por serem uma mistura complexa de vários elementos, geralmente são mais tóxicos do que substâncias isoladas e que muitas vezes o(s) composto(s) que causa(m) toxicidade às células não é(são) o(s) mesmo(s) responsável(is) pela atividade antiviral (VLIETINCK, DE BRUYNE & VANDEN BERGHE, 1997). Isto fica evidente quando se compara os valores de CC_{50} e CMNT dos materiais-teste utilizados no trabalho com o aciclovir (Item 6, Tabelas 4, 5 e 6).

Os resultados de avaliação das alterações morfológicas, valores de CC_{50} e CMNT bem como os valores das mesmas obtidas pelo ensaio do MTT estão sumarizados nas tabelas 4, 5 e 6 (Item 6). Nota-se que os valores de CC_{50} e CMNT muitas vezes diferem entre si, o que já era esperado devido ao caráter estimativo da avaliação microscópica e da maior sensibilidade do ensaio do MTT.

7.2. PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DO MTT

O ensaio do MTT vem sendo rotineiramente utilizado para a detecção de citotoxicidade e atividade antiviral de compostos sintéticos e de origem natural, inclusive concomitantemente (PAUWELS *et al.*, 1988; TAKEUCHI, BABA & SHIGETA, 1991; SUDO *et al.*, 1994; WOERDENBAG *et al.*, 1995; WOO *et al.*, 1997; SERKEDJIEVA & IVANCHEVA, 1999; DA COSTA *et al.*, 1999). Isto se deve à sua alta sensibilidade e rapidez, fornecendo uma alternativa aos métodos que utilizam compostos radioativos ou muito tóxicos. O objetivo desta padronização foi avaliar se, nas condições de infra-estrutura do Laboratório de Virologia Aplicada, da UFSC onde foram realizados os experimentos, os requisitos necessários para a utilização do ensaio seriam atendidos e, então, este poderia entrar na rotina do laboratório. O primeiro passo foi a verificação da relação densidade celular *versus* densidade ótica com as células VERO. É de extrema importância para a fidelidade do ensaio que essa relação de reciprocidade seja observada. De acordo com os resultados obtidos (Figuras 11 e 12), fica clara a relação, onde o valor de DO em cada densidade celular aumenta de acordo com a quantidade de soro fetal bovino (SFB) que foi adicionada ao meio de cultura. Nota-se que mesmo após 72h de incubação, que é o tempo utilizado na maioria dos ensaios realizados neste trabalho, as células continuam se dividindo e mantendo-se viáveis, exceto quando da não adição de SFB.

No entanto, para os experimentos de avaliação da atividade antiviral através do MTT, o tempo de incubação da suspensão viral com os materiais-teste pode variar de 4 (TAKEUCHI, BABA & SHIGETA, 1991), 5 (PAUWELS *et al.*, 1988) ou até 7 dias (SUDO *et al.*, 1994; SERKEDJIEVA & IVANCHEVA, 1999) e as concentrações da solução de MTT podem variar de 5 a 7,5mg/ml, assim como o tempo de incubação da placa após sua adição. Como já comentado no item 6.2, a concentração da solução de MTT utilizada foi de 5 mg/ml e o tempo de incubação após sua adição na placa foi de 4h. Um outro requisito importantíssimo a ser considerado quando se vai avaliar atividade antiviral através do MTT, é obter um valor igual ou inferior a 0,2 na razão $(DO)_{cv} / (DO)_{cc}$. Isto significa que a garantia da sensibilidade do ensaio se deve a diferença entre os valores de DO (entenda-se viabilidade celular) dos controles viral e celular. O ideal é que, ao final do tempo de incubação da placa, o controle celular esteja viável enquanto o controle viral totalmente destruído. Qualquer porcentagem de viabilidade celular detectada nas amostras-teste será conferida à ação

antiviral do extrato ou composto isolado e o grau desta proteção poderá ser calculado para cada concentração do material-teste.

TAKEUCHI *et al.* (1991) afirmaram que culturas de células aderentes, como é o caso das células VERO e HeLa, não são adequadas para a realização do ensaio com MTT para avaliar atividade antiviral. Eles infectaram as células do controle viral antes de colocá-las na placa para que as células do controle celular se proliferassem mais, utilizando suspensões virais com títulos bastante elevados. Mesmo assim, após 4 dias de incubação da placa, os valores de $(DO)_{cv} / (DO)_{cc}$ permaneceram maiores que 0,3. Contudo, tanto SUDO *et al.* (1994) obtiveram resultados satisfatórios utilizando células aderentes MRC-5 quanto SERKEDJIEVA & IVANCHEVA (1999) utilizando células VERO.

Para verificar se a relação $(DO)_{cv} / (DO)_{cc}$ apresentaria o resultado desejado nos experimentos realizados no laboratório, as placas foram incubadas por 4 e 7 dias, tomando como referência a maioria dos trabalhos supracitados. O resultado foi o esperado tanto no 4º como no 7º dia de incubação (ver item 6.2). No entanto, nota-se que os valores de IS obtidos através do ensaio com MTT, bem como os valores de CE_{50} , diminuem do 4º para o 7º dia (Item 6.2, Tabelas 1, 2 e 3). Isto pode significar uma leve perda da atividade antiviral devido à degradação pelo calor, metabolismo celular ou outra causa desconhecida. Vale a pena ressaltar que a maioria dos pesquisadores que utilizaram um tempo de incubação das placas maior (6-7 dias), usaram como material-teste compostos sintéticos puros de comprovada atividade anti-herpética e alto IS, tais como aciclovir, arabinofuranosil, sulfato de dextrana e ganciclovir. Como os valores de $(DO)_{cv} / (DO)_{cc}$ foram ideais nos 2 tempos de incubação utilizados neste trabalho, os valores de IS diminuiram no 7º dia e o objetivo é introduzir na rotina laboratorial um experimento de curta duração, o tempo sugerido para os ensaios subseqüentes é de 4 dias de incubação com os materiais-teste e a suspensão viral.

7.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPÁTICO VIRAL

A partir do primeiro fracionamento das acículas de *A. angustifolia*, obteve-se 9 frações, que foram avaliadas quanto à sua citotoxicidade e atividade antiviral pelo ensaio de avaliação das alterações morfológicas e inibição do efeito citopático viral, respectivamente. Conhecendo-se os valores de CC_{50} e CE_{50} , pode-se calcular o índice de seletividade (IS). Quanto maior for o valor de

IS, mais ativo será o material-teste contra o vírus e ao mesmo tempo, menos tóxico para as células. As quatro frações que apresentaram os melhores valores de IS: eAq/FEP, rFEP, FAE e FnBU foram também submetidas à avaliação da citotoxicidade e atividade antiviral pelo ensaio do MTT (Item 6.2). Quanto se trata de extratos brutos, valores de $IS \geq 4,0$ já são considerados promissores (SIDWELL, 1986). Somente a fração eAq/FEP não mostrou atividade anti-herpética no ensaio do MTT. Os valores de IS para as outras 3 frações foram um pouco menores do que os obtidos nos ensaios anteriores, o que já era esperado devido à maior sensibilidade do ensaio com MTT.

Seguindo a metodologia do biomonitoramento, somente os extratos brutos que apresentaram valores de IS promissores seriam submetidas a novos fracionamentos, enquanto os outros seriam descartados. Porém, devido ao curto tempo de execução do trabalho, somente um deles, o que apresentou o maior valor de IS, foi submetido ao fracionamento. Em experimentos iniciais de avaliação da atividade antiviral, a fração acetato de etila (FAE) havia mostrado valores de IS mais promissores do que a fração n-butanólica (FnBu) (dados não mostrados). No entanto, após a realização de um segundo fracionamento para obtenção de uma maior quantidade de material-teste, a FnBu se mostrou levemente mais ativa do que a FAE (Item 6, Tabela 1). Porém, como o processo de biomonitoramento já havia sido iniciado com a FAE, resultando nas sub-frações SF1 a SF9 e a diferença dos valores de IS não era importante, os experimentos subseqüentes foram realizados com as sub-frações da FAE. Uma investigação mais aprofundada a respeito da atividade antiviral da FnBu poderá ser realizada futuramente. Em análises fitoquímicas preliminares, foram detectados polifenóis e cianidinas nas frações FnBU e FAE e flavonas, flavonóis e xantonas na fração FAE *. Como já comentado na Introdução, a atividade anti-herpética de flavonóides já é descrita na literatura (VAN HOOFF *et al.*, 1984; ABOU-KARAM & SHIER, 1992; AMOROS, SIMÕES & GIRRE, 1992; MUCSI, GYULAI & BÉLÁDI, 1992; HAYASHI *et al.*, 1993; ERDELMEIER *et al.*, 1996), motivo este que contribuiu para continuarmos os experimentos com a fração FAE, com segurança e tranquilidade.

A partir do fracionamento da FAE, 9 novas frações foram obtidas, SF1 a SF9. Estas foram submetidas aos experimentos de citotoxicidade e atividade antiviral, sendo que SF2 mostrou o melhor resultado (Item 6, Tabela 2).

* Experimentos realizados pela bolsista de Iniciação Científica-PIBIC/CNPq/UFSC Maria Tereza Rojo de Almeida; dados não publicados.

As sub-frações que apresentaram os melhores valores de IS: SF2, SF3 e SF8, foram submetidas também ao ensaio com MTT (Item 6, Tabela 5). É importante ressaltar aqui que os valores de IS diminuíram significativamente em relação às primeiras frações. Mais adiante isto será discutido.

Um novo fracionamento foi feito com a sub-fração SF2 e dela originaram mais 4 sub-frações: SF2A, SF2B, SF2C e SF2D. Essas foram submetidas à avaliação da citotoxicidade e atividade antiviral pelos dois métodos propostos, alterações morfológicas e inibição do efeito citopático viral e ensaio com MTT. Os resultados revelaram atividade anti-herpética somente para a sub-fração SF2D (Item 6, tabela 5).

7.4. REDUÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO VIRAL

Como os experimentos utilizando a técnica A não mostraram resultados promissores, pois os controles virais não estavam completamente destruídos devido ao curto espaço de tempo (18h), os resultados a serem discutidos foram obtidos a partir da técnica B, com 4 ciclos de multiplicação viral (72h).

Várias técnicas são freqüentemente utilizadas na avaliação quantitativa de compostos com atividade anti-herpética. Alguns dos procedimentos mais freqüentes são: ensaio de redução de placas, incorporação de corante, hibridização de ácidos nucléicos e ELISA. Uma técnica menos utilizada é o ensaio de redução do título infeccioso viral (SHIPMAN *et al.*, 1976; COLLINS & BAUER, 1977). Embora este ensaio permitisse uma análise quantitativa da atividade antiviral dos materiais-teste, era muito laborioso para ser incluído como teste rotineiro. Porém, a técnica foi se aprimorando e hoje é amplamente utilizada pelos pesquisadores (PRICHARD *et al.*, 1990; MONTANHA *et al.*, 1995; PUJOL *et al.*, 1996; KUROKAWA *et al.*, 1998; DOCHERTY *et al.*, 1999).

A redução do título infeccioso viral é importante para que se possa visualizar em quanto (%) o material-teste diminuiu a infectividade das partículas virais, já que é expresso em \log_{10} e comparado com o valor do título do controle viral. Neste ensaio, foram utilizadas somente concentrações dos materiais-teste que inibiram 100% da replicação viral através do ensaio de inibição do efeito citopático viral. Porém, como geralmente mais de duas concentrações de cada material-teste haviam produzido este efeito, foram avaliadas somente as duas menores concentrações. Já era esperado que as concentrações que inibiram 100% da replicação viral

utilizando MOI de 10 fossem menores do que quando foi utilizado MOI de 1000. O resultado mostra que praticamente todas as concentrações avaliadas realmente foram capazes de reduzir em quase 100% (>99,99%) o título infeccioso viral (Item 6.4, Tabela 6).

7.5. SINERGISMO ENTRE AS FRAÇÕES

À medida que o processo de fracionamento foi ocorrendo, uma diminuição nos valores de IS foi acontecendo (Item 6, Tabelas 3, 4 e 5), ou seja, à medida que as frações foram ficando mais purificadas, a ação antiviral foi decrescendo. Duas hipóteses foram levantadas na tentativa de entender este fato: a primeira é de que houve degradação de compostos importantes na ação antiviral quando do segundo fracionamento (Item 6.2.1, Figura 13). Isto pode ter ocorrido devido à interação do material com a coluna de gel de sílica ou com o solvente. Para tanto, foi realizado um segundo fracionamento, agora em coluna de Sephadex[®], onde foi verificado que não houve degradação já que os valores de IS das sub-frações obtidas foram muito semelhantes (Item 6.5, Tabela 7). A segunda hipótese foi de que havia sinergismo entre os componentes do extrato bruto FAE e no momento em que foram separados pelo fracionamento, a atividade antiviral ficou prejudicada. Para fazer esta verificação, foi montado um experimento utilizando várias combinações de todas as sub-frações ativas derivadas de FAE, partindo de suas CMNT e fazendo diluições na razão de 1:2. Observando os valores de % de inibição do efeito citopático viral expostos na Tabela 8 (Item 6.5), pode-se sumarizar alguns dos efeitos das combinações:

- a) em todas as combinações houve o aparecimento de citotoxicidade nas concentrações mais altas; isto não era esperado, já que as concentrações utilizadas nos experimentos não apresentaram citotoxicidade quando utilizadas sozinhas;
- b) sempre que a sub-fração SF2D estava presente, o nível de toxicidade aumentava;
- c) a combinação que apresentou o menor grau de toxicidade foi SF3 + SF8;
- d) até a 3ª diluição, todas as combinações que não eram citotóxicas, confeririam 100% de inibição do efeito citopático viral;
- e) a partir da 4ª diluição somente as combinações SF2+SF8, SF3+SF2D, SF8+SF2D e todas juntas, mantiveram 100% de inibição do efeito citopático viral;
- f) a partir da 5ª diluição, somente as combinação SF3+SF2D e todas juntas mantiveram ainda um nível de proteção (40% e 100%, respectivamente);

g) até a 6ª diluição a combinação SF3+SF2D apresentou um certo nível de proteção (25%) e a partir da 7ª não se mostrou mais ativa.

Fica difícil tirar conclusões muito detalhadas a respeito do possível sinergismo que ocorreu entre as sub-frações de FAE e de qual combinação vieram os melhores resultados. O esperado era que a combinação contendo todas as sub-frações apresentasse o melhor resultado, já que as sub-frações que obtiveram os maiores valores de IS estavam juntas. Apesar de apresentar 100% de inibição do efeito citopático viral até a 5ª diluição, onde o máximo que as outras combinações atingiram foi 40%, ela se apresentou inativa a partir da 6ª diluição, enquanto que a combinação SF3+ SF2D apresentou ainda 25% de inibição. Outro problema foi o grau de citotoxicidade encontrado nas três primeiras diluições, tanto para a combinação SF3+ SF2D quanto para todas juntas.

Segundo WILLIAMSON (2000) sinergismo significa a existência de algum tipo de moderação da atividade farmacológica entre os componentes do extrato, e esta interação pode tanto potencializar os efeitos benéficos dos componentes como atenuar seus efeitos indesejáveis (antagonismo) e esta é a principal característica do sucesso de muitos fitoterápicos. O termo sinergismo, infelizmente, é muito utilizado para designar toda e qualquer interação entre os constituintes de um extrato. A dúvida é se realmente os efeitos de um extrato são causados pelo sinergismo ou se ocorre meramente uma adição de efeitos, o que não é considerado a mesma coisa pelo autor. Somente pode ser considerado sinergismo, se o efeito total de uma combinação for maior do que o efeito de cada componente em separado.

Se os valores de CC_{50} , CE_{50} e CMNT da fração FAE fossem comparados com os resultados obtidos com a combinação todas juntas, a uma informação seria de que a citotoxicidade na última interferiria muito no valor de IS (valores de CC_{50} maiores indicam maior toxicidade), provavelmente diminuindo-o, já que a toxicidade foi muito pronunciada.

Como foi o primeiro experimento realizado, outras averiguações ainda terão que ser realizadas, porém estes resultados preliminares indicam que a probabilidade de ocorrer sinergismo entre os componentes da fração FAE é grande e que para a obtenção de uma atividade anti-herpética mais eficaz, melhores resultados seriam obtidos utilizando a fração bruta.

7.6. DISCUSSÃO FINAL E PERSPECTIVAS

Este trabalho teve como objetivo principal, contribuir com a busca de novos agentes antivirais, no caso agentes anti-herpéticos, a partir de fontes naturais. A planta escolhida para este trabalho foi *Araucaria angustifolia* e esta escolha foi baseada em dados etnofarmacológicos e ensaios preliminares promissores.

Como já citado anteriormente, existem pouquíssimos dados na literatura a respeito da composição química de *A. angustifolia*, apesar dessa espécie ser de grande importância econômica, ecológica e medicinal na sua restrita área de abrangência. Aliado ao fato de se encontrar praticamente extinta geneticamente, é de grande urgência que estudos fitoquímicos e farmacológicos sejam realizados, que servirão para embasar e solidificar ainda mais a necessidade de proteção desta espécie.

A atividade anti-herpética encontrada nos extratos brutos e sub-frações, tendo sido a mais promissora a fração acetato de etila (FAE), provavelmente pela presença de flavonóides, já que com esse solvente espera-se extrair preferencialmente tais compostos, que são conhecido por apresentarem atividade anti-herpética. Os resultados de IS obtidos com as frações de *A. angustifolia* foram promissores, levando-se em consideração o fato de que são extratos brutos, que contém uma série de compostos.

Alguns aspectos na metodologia do trabalho devem ser aprimoradas, como por exemplo, os experimentos de detecção de sinergismo entre as sub-frações. Novos ensaios devem ser realizados com o intuito de averiguar com maior cuidado e sensibilidade a verdadeira lação dos componentes da fração FAE, levando em consideração os valores de CC_{50} , CE_{50} e IS da fração FAE e das sub-frações dela derivadas, bem como analisar todos os fatores que podem estar contribuindo ou não para que ocorra um verdadeiro sinergismo ou somente um efeito aditivo das frações.

Outro atividade a ser realizada será a caracterização química, através de métodos espectroscópicos, do(s) componente(s) da sub-fração SF2D, que já estão em andamento, sob supervisão da Profa. Dra. Mareni Rocha Farias.

Com base em resultados obtidos por cromatografia em camada delgada, foi revelada a presença de apenas duas substâncias diferentes*. O objetivo seria então conhecer a estrutura dessas moléculas e, a partir das substâncias isoladas e purificadas,

realizar novos ensaios para reafirmar ou não a existência da atividade anti-herpética detectada anteriormente. Uma abordagem interessante seria a realização de experimentos para avaliar essa provável atividade utilizando uma combinação de aciclovir, potente anti-herpético sintético, com as substâncias isoladas da sub-fração SF2D. Estes experimentos podem ser realizados com cepas usuais e cepas resistentes ao aciclovir, com o intuito de verificar se o efeito combinado pode intensificar a atividade anti-herpética do aciclovir. Alguns estudos tem sido realizados neste sentido, utilizando tanto combinações de compostos sintéticos (PRICHARD, PRICHARD & SHIPMAN JR., 1993; PRICHARD & SHIPMAN, 1996; JAVALY *et al.*, 1999) quanto de flavonóides e flavonas (AMOROS *et al.*, 1992) e de flavonóides combinados com aciclovir (MUCSI, GYULAY & BÉLÁDI, 1992).

Ainda, após a elucidação estrutural das substâncias encontradas na sub-fração SF2D, poder-se-á realizar um estudo de relação estrutura-atividade antiviral a fim de verificar se essas podem servir como modelos para a síntese ou modificações químicas, originando novas moléculas mais ativas e menos citotóxicas. Este estudo poderia ser realizado com estas substâncias associadas a uma série de outros compostos flavonoídicos (65) já existentes no laboratório.

Como o trabalho avolumou-se além previsto, devido às três etapas de fracionamento, da grande quantidade de frações e sub-frações obtidas e também pelo decréscimo nos valores de IS à medida que as frações foram ficando mais purificadas, a investigação sobre o possível mecanismo de ação anti-herpética não pode ser realizada. Futuramente, seria interessante realizar esses experimentos com as substâncias isoladas e purificadas a partir da sub-fração SF2D. Porém, se novas pesquisas forem realizadas com a fração FAE, devido ao seu maior valor de IS, o método de fracionamento deve se padronizado e se poderia pensar também num estudo tecnológico com o objetivo de padronizar este extrato, o que poderia viabilizar posteriormente a realização de estudos in vivo e mesmo a incorporação desse extrato numa forma farmacêutica.

* Experimentos realizados pela bolsista de Iniciação Científica-PIBIC/CNPq/UFSC

Maria Tereza Rojo de Almeida; dados não publicados.

8. CONCLUSÕES

- ✓ Nenhuma fração mostrou-se ativa contra a replicação do poliovírus tipo 2 (polio-2), sendo somente ativas contra a replicação do herpesvírus simples humano tipo 1 (HSV-1).
- ✓ A partir da fração mais ativa acetato de etila (FAE) foi iniciado o processo de fracionamento biomonitorado, através de uma coluna de gel de sílica, originando mais nove sub-frações (SF1 a SF9), as quais foram submetidas à análise da citotoxicidade e atividade anti-herpética. Como a sub-fração SF2 apresentou o melhor resultado, essa foi fracionada e originou mais quatro sub-frações (SF2A a SF2D), sendo que SF2D apresentou os melhores resultados.
- ✓ A padronização do ensaio colorimétrico com MTT se revelou uma técnica sensível, rápida e simples, capaz de avaliar concomitantemente a citotoxicidade e a atividade antiviral de produtos naturais. Todas as frações que apresentaram melhores resultados, obtidos através dos testes clássicos já citados, foram avaliadas também pelo ensaio com MTT e os resultados foram confirmados.
- ✓ Os resultados obtidos através da avaliação do efeito citopático viral e do ensaio colorimétrico com MTT foram também confirmados através do teste quantitativo de redução do título infeccioso viral, onde praticamente todas as concentrações utilizadas foram capazes de inibir 99,99% ($>4\log_{10}$) da replicação viral quando comparadas aos controles virais.
- ✓ As sub-frações SF2A, SF2B, SF2C e SF2D não apresentaram ação virucida, nas condições testadas.
- ✓ A comparação dos valores de IS das sub-frações obtidas através do fracionamento da fração FAE em coluna de gel de sílica (SF1 a SF9) e em coluna de Sephadex[®] (SFI a SFVII) revelou que, possivelmente, não houve degradação da fração quando essa foi fracionada,

não sendo esta a causa da diminuição dos valores de IS, pois os valores obtidos foram similares.

- ✓ Os experimentos preliminares realizados com intuito de verificar se a diminuição dos valores de IS foi devido ao sinergismo das frações revelaram um possível efeito sinérgico ou aditivo, o qual deve ser melhor investigado.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; SÁNCHEZ PALOMINO, S.; CHIRIBOGA, X.; CARRASCO, L. – Antiviral activity of some South American medicinal plants. **Phytother. Res.**, 13: 142-6, 1999.
- ABAD, M.J.; GUERRA, J.A.; BERMEJO, P.; IRURZUN, A.; CARRASCO, L. – Search for antiviral activity in higher plant extracts. **Phytother. Res.**, 14 (supl. 8): 604-7, 2000.
- ABOUD-KARAM, M.; SHIER, T. – Isolation and characterization of an antiviral flavonoid from *Waldsteinia fragarioides*. **J. Nat. Prod.**, 55 (supl. 10): 1525-7, 1992.
- AMOROS, M.; SIMÕES, C.M.O.; GIRRE, L. – Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture: comparison with the antiviral activity of propolis. **J. Nat. Prod.**, 55 (supl.12): 1732-40, 1992.
- BABIUK, L.A.; ROUSE, B.T. – Herpesvirus vaccines. **Adv. Drug Deliver. Rev.**, 21: 63-76, 1996.
- BARRIO, G.; PARRA, F. – Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. **J. Ethnopharmacol.**, 72: 317-22, 2000.
- BENTACUR-GALVIS, L.A.; SAEZ, J.; GRANADOS, H.; SALAZAR, A.; OSSA, J.E. – Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94 (supl. 4): 531-5, 1999.
- BEUSCHER, N.; BODINET, C.; NEUMANN-HAEFELIN, D.; MARSTON, K.; HOSTETTMANN, K. – Antiviral activity of African medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, 42:101-9, 1994.
- BOON, R. - Antiviral treatment: from concept to reality. **Antivir. Chem. Chemoth.**, 8 (supl.1):5-10, 1997.

- BOYD, M.R.; BACON, T.H.; SUTTON, D.; COLE, M. - Antiherpes activity of 9-(4-hydroxy-3-hydroxymethylbutyl-1-yl) guanine (BRL39123) in cell culture. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 31:1238-42, 1987.
- BROPHY, J.J.; GOLDSACK, R.J.; WU, M.Z.; FOOKES, C.J.R.; FORSTER, P.I. - The steam volatile oil of *Wollemia nobilis* and its comparison with other members of the Araucariaceae (*Agathis* and *Araucaria*). **Biochem. Syst. Ecol.**, 28 (supl. 6): 563-78, 2000.
- BURKE JR, T.R.; FESEN, M.R.; MAZUMDER, A.; WANG, J.; CAROTHERS, A.M.; GRUNBERGER, D.; DRISCOLL, J.; KOHN, K.; POMMIER, Y. - Hydroxylated aromatic inhibitors of HIV-1 integrase. **J. Med. Chem.**, 38:4171-78, 1995.
- BURLESON, F.G.; CHAMBERS, T.M.; WIEDBRAUK, D.L. - **Virology: a laboratory manual**. San Diego, Academic, 1992. 250 p.
- CARVALHO, P.E.R. - **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo-PR, EMBRAPA, 1994. 639p.
- CARTWRIGHT, T.; SHAH, G.P. - Culture media. In: DAVIS, J.M. - **Basic Cell Culture: a practical approach**. New York, IRL, 1994. 301p.
- CASTRO, M.A.; GORDALIZA, M.; DEL CORRAL, J.M.M.; SAN FELICIANO, A. - The distribution of lignanoids in the order Coniferae. **Phytochemistry**, 41 (supl. 4): 995-1011, 1996.
- CAVALLARO, L.; GARCIA, G.; BROUSSALIS, A.; FERRARO, X.; MARTINO, V.; COUSSIO, J.; TORRES, R.; CAMPOS, R. - Anti-herpetic *in vitro* activity of *Gamochaeta simplicicaulis* extract. **Phytoter. Res.**, 9: 176-9, 1995.
- CHAPUIS, J.C.; SORDAT, B.; HOSTETTMANN, K. - Screening for cytotoxic activity of plants used in traditional medicine. **J. Ethnopharmacol.**, 23: 273-84, 1988.

- CHARLTON, J.L. - Antiviral activity of lignans. **J. Nat. Prod.**, 61: 1447-51, 1998.
- CHE, C.T. - Plants as a source of potencial antiviral agents. In: Wagner,H.; Farnsworth,N. R. -**Economic and medicinal plants research**. Londres, Academic, 1991. p. 167-251.
- CHU, C.K.; CUTLER, H.G. -**Natural products as antiviral agents**. New York, Plenum, 1992. 279p.
- COLLINS, P.; BAUER, D.J. - Relative potencies of anti-herpes compounds. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 284: 49-59, 1977.
- COSTA, A.O.; ASSIS, M.C.; MARQUES, E.A.; PLOTKOWSKI, M.C. - Comparative analysis of three methods to assess viability of mammalian cells in culture. **Biocell**, 23: 65-72, 1999.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. - Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod.**, 60: 52-60, 1997.
- DARBY, G. - The acyclovir legacy: its contribution to antiviral drug discovery. **J. Med. Virol.**, 1: 134-8, 1993.
- DARGAN, D.J.; SUBAK-SHARPE, J.H. - The effect of triterpenoid compounds on uninfected and herpes simplex virus infected cells in culture. II. DNA and protein synthesis, polypeptide processing and transplantation. **J. Gen. Virol.**, 67: 1831-42, 1986.
- DATTA, P.K.; FIGUEROA, M.O. R.; LAJOLO, F.M. - Chemical modification and sugar binding properties of two major lectins from pinhão (*Araucaria brasiliensis*) seeds. **J. Agric. Food Chem.**, 41: 1851-5, 1993.
- DIWU, Z. - Novel therapeutic and diagnostic applications of hypericins. **Photochem. Photobiol.**, 61: 529-39, 1995.

- DOCHERTY, J.J.; FU, M.M.H.; STIFFLER, B.S.; LIMPEROS, R.J.; POKABLA, C.M.; DELUCIA, A.L.
-Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication. **Antivir. Res.**, 43: 145-55, 1999.
- DOCHERTY, J.J.; POLLOCK, J.J. - Inactivation of herpes simplex virus tipe 1 and 2 by synthetic histidine peptidies. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 31: 1562-8, 1987.
- DUNDAROV, S.; ANDONOV, P.; BAKALOV, B. – Immunotherapy with inactivated polyvalent herpes vaccines. **Develop. Biol. Standart.**, 52: 351-8, 1882.
- EISENHAUER, E.A. & VERMORKEN, J.B. – The taxoids: comparative clinical pharmacology and therapeutic potential. **Drugs**, 55 (supl.1): 5-30, 1998.
- ELDERMEIER, C.A. J.; CINATL JR, J.; RABENAU, H.; DOERR, H.W.; BIBER, A.; KOCH, E.
- Antiviral and antiphlogistic activities of *Hamammelis virginiana* bark. **Planta Med.**, 62 (supl. 3): 241-5, 1996.
- ELION, G.B.; FURMAN, P.A.; FYPE, J.A.; DE MIRANDA, P.; BEAUCHAMP, L.; SCHAFFER, H.J.
- Selectivity of action of an anti-herpetic agent, 9-(2-hydroxymethyl) guanosine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 74 (supl. 12): 5716-20, 1977.
- ELISABETSKY, E. – Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: - Simões, C.M.O. et al. – **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2000. 819p.
- FERNANDES, R.R.; MOREIRA, E.A.; MIGUEL, O.G. - Monoterpenes of essencial oils from shoots and leaves of *Araucaria angustifolia*. **Acta Biol. Par.**, Curitiba-PR, 20: 125-33, 1991.
- FERREA, G.; CANESS, A.; SAMPIETRO, F.; CRUCIANI, M.; ROMUSSI, G.; BASSETTI, D. – In vitro activity of a *Combretum micranthum* extract against herpes simplex virus types 1 and 2. **Antivir. Res.**, 21: 317-25, 1993.

- FIELD, A.K.; DAVIS, M.E.; DE WITT, C.; PERRY, H.C.; LIOU, R.; GERMESHAUSEN, J.; KARKAS, J.D.; ASHTON, W.T.; JOHNSTON, D.B. R.; TOLMAN, R.L. - 9-[[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-ethoxy]methyl]quanine: a selective inhibitor of herpes group virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4139-43, 1983.
- FLINT, S.J.; ENQUIST, L.W.; KRUG, R.M.; RACANIELLO, V.R.; SKALKA, A.M. – **Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control**. 1 ed. Washington D.C., 2000. 804p.
- FONSECA, S.F.; NIELSEN, L.T.; RÚVEDA, E.A. - Lignans of *Araucaria angustifolia* and ¹³C NMR analysis of some phenyltetralin lignans. *Phytochemistry*, 18: 1703-8, 1979.
- GARBARINO, J.A.; OYARZÚN, M.L.; GAMBARO, V. - Labdane diterpenes from *Araucaria araucana*. *J. Nat. Prod.*, 50 (supl. 5): 935-6, 1987.
- GIRARD, M.; HIRTH, L. - **Virologie Moléculaire**. 2 ed. Paris, Doin, 1989. 617 p.
- GUERRA, M.P. & REIS, M.S. – **Inventário de recursos florestais da Mata Atlântica: a exploração e utilização dos recursos, seus impactos sócio-econômicos atuais e potencialidades de manejo sustentável**. Florianópolis, 1999.
- HARADA, N.; ONO, H.; UDA, H.; PARVEEN, M.; UD-DIN KHAN, N.; ACHARI, B.; DUTTA, P.K. - Atropisomerism in natural products: absolute stereochemistry of biflavone (-)-4', 4'', 7, 7''-tetra-O-methylcupressuflavone, as determined by the theoretical calculation of CD spectra. *J. Am. Chem. Soc.*, 114: 7687-92, 1992.
- HARVEY, A.L. – Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery?. *TIPS*, 20: 196-8, 1999.
- HARVEY, A.L. – Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Disc. Today*, 5 (supl.7): 294-300, 2000.

- HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; MORITA, N. - Antiviral agents of plant origin: anti-herpetic activity of acacetin. **Antivir. Chem. Chemoth.**, 4 (supl. 1): 49-53, 1993.
- HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; HIDAEGI, O.; TAKEDA, Y. - Antiviral activity of 5, 6, 7-trimethoxyflavone and its potentiation of antiherpes activity of acyclovir. **J. Antimicrob. Chemoth.**, 39: 821-4, 1997.
- HOSTETTMANN, K.; DOMON, B.; SCHAUFELBERGER, D.; HOSTETTAMANN, M. - On line high performance liquid chromatography ultraviolet visible spectroscopy of phenolic compounds in plant extracts using post column derivatization. **J. Chromatogr.**, 283: 137-47, 1984.
- HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J.L.; RODRIGUEZ, S. - Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. **Planta Med**, 63: 2-10, 1997.
- HOUGHTON, P.J. - Medicinal plants and the control of parasites: compounds with anti-HIV activity from plants. **T. Roy. Soc. Trop. Med. H.**, 90: 601-4, 1996.
- HOUGHTON, P.J. & RAMAN, A. - **Laboratory handbook for the fractionation of natural products**. 1ed. Londres, Chapman & Hall, 1998. 130p.
- HU, J.M.; HSIUNG, G.D. - Evaluation of new antiviral agents: in vitro perspectives. **Antivir. Res.**, 11: 217-32, 1989.
- HUDSON, J.B. - **Antiviral compounds from plants**. Florida, CRC, 1990. 200p.
- HUDSON, J.B.; GRAHAM, E.A.; HARRIS, L.; ASHWOOD-SMITH, M.J. - The unusual UVA-dependent antiviral properties of the furoisocoumarin, coriandrin. **Photochem. Photobiol.**, 57: 491-6, 1993.
- HUDSON, J.B.; LOPEZ-BAZZOCHI, I.; TOWERS, G.H.N. - Antiviral activities of hypericin. **Antivir. Res.**, 15: 101-12, 1991.

- HUDSON, J.B.; TOWERS, N. – Phytomedicines as antivirals. *Drugs Fut.*, 24 (supl. 3): 295-320, 1999.
- HUSSEIN, G.; MIYASHIRO, H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KAKINCHI, N.; SHIMOTOHNO, K. – Inhibitory effects of sudanes medicinal plantextracts on hepatitis C virus (HCV) protease. *Phytother. Res.*, 14: 510-6, 2000.
- JAVALY, K.; WOHLFEILER, M; KALAYJIAN, R.; KLEIN, T.; BRYSON, Y.; GRAFFORD, K.; MARTIN-MUNLEY, S.; HARDY, D.W. – Treatment of mucocutaneous herpes simplex virus infections unresponsive to aciclovir with topical foscarnet cream in AIDS patients. *JAIDS*, 21 (supl. 4): 301-9, 1999.
- KANG, K.H.; HUH, H.; KIM, B.K.; LEE, C.K. – An antiviral furanoquinone from *Paulownia tomentosa* Steud. *Phytother. Res.*, 13; 624-6, 1999.
- KAUFMAN, H.E.; HEIDELBERGER, C. - Therapeutic antiviral action of 5-trifluoromethyl-2' deoxyuridine in herpes simplex keratitis. *Science*, 145: 585-6, 1964.
- KOTT, V.; BARBINI, L.; CRUANES, M.; MUNOZ, J.D.; VIVOT, E.; CAVALLARO, L.; CAMPOS, R. – Antiviral activity in Argentine medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, 64: 79-84, 1999.
- KUROKAWA, M.; HOZUMI, T.; BASNET, P.; NAKANO, M.; KADOTA, S.; NAMBA, T.; KAWANA, T.;SHIRAKI, K. – Purification and characterization of eugeniin as an anti-herpes compound from *Geum japonicum* and *Syzygium aromaticum*. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics*, 284 (supl. 2): 728-35, 1998.
- KUROKAWA, M.; OCHIAI, H.; NAGASAKA, K.; NEKI, M.; XU, H.; KADOTA, S.; SUTARDJO, S.; MATSUMOTO, T.; NAMBA, T.; SHIRAKI, K. – Antiviral tradicional medicines against herpes simplex virus (HSV-1), poliovirus ans measles virus *in vitro* and their therapeutic efficacies for HSV-1 infection in mice. *Antivir. Res.*, 22 (supl. 2-3): 175-88, 1993.

- LAGROTA, M.H.C.; WIGG, M.D.; SANTOS, M.M.G.; MIRANDA, M.M.F.S.; CAMARA, F.P.; COUCEIRO, J.N.S.S.; COSTA, S.S. – Inhibitory activity of extracts of *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) against the herpes simplex virus. **Phytother. Res.**, 8: 358-61, 1994.
- LORENZI, H. - **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo, Plantarum, 1992. 352p.
- LOWANCE, D. - Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. **N. Engl. J. Med.**, 340: 1462-70, 1999.
- LUPI, O. – Vacinas anti-herpéticas. In: LUPI, O.; SILVA, A.G.; PEREIRA JR, A.C. –**Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro, Medsi, 2000. 278p.
- LUPI, O.; PEREIRA JR., A.C. – Herpes simples. In: LUPI, O.; SILVA, A.G.; PEREIRA JR, A.C. – **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro, Medsi, 2000. 278p.
- LUPI, O.; SILVA, A.G.; PEREIRA JR, A.C. –**Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro, Medsi, 2000. 278p.
- MACRAE, W.D.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H.N. - Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. **J. Ethnopharmacol.**, 22: 143-50, 1981.
- MARCHETTI, M.; PISANI, S.; PIETROPAOLO, V. – Antiviral effect of a polysaccharide from *Sclerotium gluconicum* towards herpes simplex virus type 1 infection. **Planta Med**, 62: 303-7, 1996.
- MARQUESINI, N.R. – **Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil: guarani, kaingáng, xokleng, ava-guarani, kraó e cayuá**. Curitiba, 1995. (Tese - Mestrado - Universidade Federal do Paraná)

- MATTOS, J.R. - **O pinheiro brasileiro**. 2 ed. Lages-SC, Princesa, 1994, v. 1, 225 p.
- MATSUSE, I.T.; LIM, Y.; HATTORI, M.; CORREA, M.; GUPTA, M.P. - A search for antiviral properties in Panamanian medicinal plants: the effects on HIV and its essential enzymes. **J. Ethnopharmacol.**, 64: 15-22, 1999.
- MONTANHA, J.A.; AMOROS, M.; BOUSTIE, J.; GIRRE, L. - Anti-herpes activity of aporphine alkaloids. **Planta Med.**, 61: 419-24, 1995.
- MOREIRA, L.C.; SIMÕES, C.M.O. - **Avaliação da potencial atividade anti-herpética do líquen *Cladina* sp.e de espécies vegetais das famílias Myrtaceae, Passifloraceae, Phytolacaceae, Araliaceae e Araucariaceae**. Relatório de Iniciação Científica-CNPq/UFSC, Florianópolis, 1998. 20p.
- MOSSMANN, T. - Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, 65: 55-63, 1983.
- MUCSI, I.; GYULAI, Z.; BÉLÁDI, I. - Combined effects of flavonóides and aciclovir against herpesviruses in cell cultures. **Acta Microbiol. Hung.**, 39: 137-47, 1992.
- MURRAY, P.R.; DREW, L.W.; KOBAYASHI, G.S.; THOMPSON, J.H. - **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1992. 513p.
- NARDONE, R.M. - Toxicity testing *in vitro*. In: ROTBBLAT, G.H.; CRISTOFALO, V.J. - **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York, Academic, 1977. 441-95p.
- NAWAWI, A.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KUROKAWA, M.; SHIRAKI, K. - Inhibitory effects of Indonesian medicinal plants on the infection of herpes simplex virus type 1. **Phytoter. Res.**, 13 (supl. 1): 37-41, 1999.

- OHASHI, H.; KAWAI, S.; SAKURAI, Y.; YASUE, M. Norlignan from the knot resin of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry*, 31 (supl. 4): 1371-3, 1992.
- PARVEEN, N.; TAUFEEQ, H.M.; UD-DIN KHAN, N. - Biflavones from the leaves of *Araucaria araucana*. *J. Nat. Prod.*, 50 (supl. 2): 332-3, 1987.
- PAUWELS, R.; BALZARINI, J.; BABA, M.; SNOECK, R.; SCHOLS, D.; HERDEWIJN, P.; DESMYTER, J.; DE CLERQ, E. - Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *J. Virol. Methods*, 20: 309-21, 1988.
- PIO CORRÊA, M. - **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1926-1979.
- PRICHARD, M.N.; TURK, S.R.; COLEMAN, L.A.; ENGELHARDT, S.L.; SHIPMAN JR., C.; DRACH, J.C. - A microtiter virus yield reduction assay for the evaluation of antiviral compounds against human citomegalovirus and herpes simplex virus. *J. Virol. Methods*, 28: 101-6, 1990.
- PUJOL, C.A.; ERREA, M.I.; MATULEWICZ, M.C.; DAMONTE, E.B.- Anti-herpetic activity of S1, an algal derived sulphated galactan. *Phytother. Res.*, 10: 410-3, 1996.
- RATES, S.M.K. -Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39:603-13, 2001.
- REED, L.J.; MUENCH, H. - A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27 (supl. 3): 493-7, 1938.
- ROBIN, V.; BOUSTIE, M.; AMOROS, M.; GIRRE, L. - In vitro antiviral activity of seven *Psiadia* species, Asteraceae: isolation of two antipoliovirus flavonoids from *Psiadia dentata*. *Pharm. Pharmacol. Commun.*, 4: 61-4, 1998.

- ROIZMAN, B. – Herpesviridae. In: - FIELDS, B.N. et al. – **Virology**. 3 ed. New York, Lippincott-Raven, 1996. 2221-95p.
- ROMING, T.L.; WEBER, N.D.; MARRAY, B.K.; NHOTH, J.A.; WOOD, S.G.; HUGHES, B.G.; CATES, R.G. - Antiviral activity of Panamanian plant extracts. **Phytother. Res.**, 6: 38-43, 1992.
- SAFRIN, S.; ASSAYKEEN, T.; FOLLANSBEE, S.; MILLS, J. – Foscarnet therapy for aciclovir-resistant mucocutaneous herpes simplex virus infection in 26 AIDS patients. **J. Infect. Dis.**, 161: 1078-84, 1990.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. - **Plant Physiology**. 4 ed. California, Wadsworth Publishing, 1992. 759p.
- SCHABEL JR., F.M. - The antiviral activity of 9- β -D-arabino-furanosyladenine (ARA-A). **Chemotherapy**, 13: 321-38, 1968.
- SCHAFFER, H.J.; BEAUCHAMP, L.; DE MIRANDA, ELION, G.B.; BAUER, D.J.; COLLINS, P. - 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. **Nature**, 272: 583-5, 1978.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. – Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: - Simões, C.M.O. et al. – **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2000. 819p.
- SCHINAZI, R.F. - Progress in the development of natural products for human immunodeficiency viruses infections. In: Chu, C.K. & Cutler, H.G. – **Natural products as antiviral agents**. New York, Plenum, 1992. 279p.
- SERKEDJIEVA, J.; IVANCHEVA, S. – Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. **J. Ethnopharmacol.**, 64: 59-68, 1999.

- SHAHAT, A.A.; ISMAIL, S.I.; HAMMOUDA, F.M.; AZZAM, S.A.; LEMIÉRE, G.; DE BRUYBE, T.; DE SWAEF, S.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. – Anti-HIV activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. *Phytomedicine*, 5 (supl. 2): 133-6, 1998.
- SHIMIZU, J.Y. & OLIVEIRA, Y.M.M. – **Distribuição, variação e usos dos recursos genéticos da araucária no sul do Brasil**. Curitiba-PR, EMBRAPA-URPFCS, doc.04, 1981. 9p.
- SHIPMAN JR., C.; SMITH, S.H.; CARLSON, R.H.; DRACH, J.C. – Antiviral activity of arabinosyl-adenine and arabinosylhypoxanthine in herpes simplex virus-infected KB cells: selective inhibition of viral deoxyribonucleic acid synthesis in synchronized suspension cultures. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 9: 120-7, 1976.
- SHU, Y.Z. - Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.*, 61: 1053-71, 1998.
- SILVA, A.G. – Propriedades gerais dos herpesvírus. In: LUPI, O.; SILVA, A.G.; PEREIRA JR, A.C. –**Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro, Medsi, 2000. 278p.
- SIMÕES, C.M.O.; AMOROS, M.; GIRRE, L.; GLEYE, J.; FAUVEL, M.T.H. - Antiviral activity of ternatin and melitematin, 3-methoxyflavones from species of Rutaceae. *J. Nat. Prod.*, 53 (supl.4): 989-92, 1990.
- SIMÕES, C.M.O.; AMOROS, M.; GIRRE, L. - Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. *Phytoter. Res.*, 13: 323-8, 1999a.
- SIMÕES, C.M.O.; FALKENBERG, M.; AULER MENTZ, L.; SCHENKEL, E.P.; AMOROS, M.; GIRRE, L. - Antiviral activity of South Brazilian medicinal plant extracts. *Phytomedicine*, 6 (supl. 3): 205-14, 1999b.

- SINDAMBIWE, J.B.; CALOMME, M.; COS, P.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.; VANDEN BERGHE, V. - Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. **J. Ethnopharmacol.**, 65: 71-7, 1999.
- SIDWELL, R.W. - Determination of antiviral activity. **Drugs Pharm. Sci.**, 27: 433-80, 1986.
- SIEUWERTS, A.M.; KLIJN, J.G.M.; PETRES, H.A.; FOEKENS, J.A. - The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC₅₀ values and cell survival. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, 33: 813-23, 1995.
- SLATER, T.F.; SAWYER, B.; STRAULI, U.D. - Studies on succinate tetrazolium reductase systems: points of coupling of 4 different tetrazolium salts. **Biochim. Biophys. Acta**, 77: 383-90, 1963.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. - **Biometry**. 3 ed. New York, W. H. Freeman, 1995. 850p.
- STREISSLE, G.; SCHWOBEL, W.; HEWLETT, G.- Evaluation of antiviral compounds in cell cultures with acute or persistent virus infection. **Adv. Cell Cult.**, 1: 67-90, 1981.
- STROHL, W.R. - The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Disc. Today**, 5 (supl. 2): 39-41, 2000.
- SUDO, K.; KONNO, K.; YOKOTA, T.; SHIGETA, S. - A sensitive assay system screening antiviral compounds against herpes simplex virus type 1 and type 2. **J. Virol. Methods**, 49: 169-78, 1994.
- SUMMERFIELD, A.; KEIL, G.M.; METTENLEITER, T.C.; RZIHA, H.J.; SAALMÜLLER, A. - Antiviral activity of an extract from leaves of the tropical plant *Acanthospermum hispidum*. **Antivir. Res.**, 36: 55-62, 1997.

- TAKEUCHI, H.; BABA, M.; SHIGETA, S. – An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **J. Virol. Methods**, 33: 61-71, 1991.
- TAYLOR, R.S.L.; MANANDHAR, N.P.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H.N. - Antiviral activities of Nepalese medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, 52: 157-63, 1996.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **-Microbiology**. 6 ed. California, Addison Wesley Longman, 1998. 832p.
- VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J.; VAN HOOF, L. - Plants products as potencial antiviral agents. **Bull. Inst. Pasteur**, 84: 101-47, 1986.
- VAN HOOF, L.; VANDEN BERGHE, D.A.; HATFIELD, G.M.; VLIETINCK, A.J. – Plant antiviral agents: 3-methoxyflavones as potent inhibitors of virus-induced block of cell synthesis. **Planta Med.**, 50: 513-7, 1984.
- VERPOORTE, R. – Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Disc. Today**, 3 (supl.5): 232-38, 1998.
- VISTICA, D.T.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; PITTMAN, A.; BOYD, M.R. – Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Res.**, 51: 2515-20, 1991.
- VLIETINCK, A.J.; DE BRUYNE, T.; VANDEN BERGHE, D.A. –Plant substances as antiviral agents. **Curr. Org. Chem.**, 1: 307-44, 1997.
- VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D.A. - Leads for antivirals from tradicional medicines. In: Prendergast, H.D.V.; Etkin, N.L.; Hamis, D.R.; Houghton, P.J. **-Plants for Food and Medicine**, Kew, Royal Botanic Gardens, 1998.

- VLIETINCK, A.J.; VAN HOOF, L.; TOTTE, J.; LASURE, A.; VANDEN BERGHE, D.; RWANGABO, P.; MVUKIYUMWAMI, J. - Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. **J. Ethnopharmacol.**, 46: 31-47, 1995.
- WANI, M.C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E.; COGGON, P.; McPHAIL, A.T. – Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agente from *Taxus brevifolia*. **J. Am. Chem. Soc.**, 93:2325-27, 1971.
- WAGSTAFF, A.J.; BRYSON, H.M. – Foscarnet: a reappraisal of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use in immunocompromised patients with viral infection. **Drugs**, 48: 199-226, 1994.
- WEBER, B.; CINATL, J. –Antiviral therapy of herpes simplex virus infection: recent developments. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, 6: 112-26, 1996.
- WHITE, D.O.; FENNER, F.J. –**Medical Virology**. 4 ed. San Diego, Academic, 1994. 603p.
- WHITLEY, R.J. – Herpes simplex virus. In: - FIELDS, B.N. et al. – **Virology**. 3 ed. New York, Lippincott-Raven, 1996. 2297-2341p.
- WILLIAMSON, E.M. – Synergy: myth or reality?. In: ERNST, E. - **Herbal medicine: a concise overview for professionals**. Butterworth Heinemann, 2000. 120p.
- WOERDENBAG, H.J.; MERFORT, I.; SCHMIDT, T.J.; PASSREITER, C.M.; WILLUHN, G.; VAN UDEN, W.; PRAS, N.; KONINGS, A.W.T. – Decreased helenalin-induced cytotoxicity by flavonóides from *Arnica* as studied in a human lung carcinoma cell line. **Phytomedicine**, 2: 127-32, 1995.
- WOLFENDER, J.L.; HOSTETTMANN, K. – Applications of liquid chromatography-mass spectrometry to the investigation of medicinal plants. In: ARNASON, J.T.; MATA, R.; ROMEO, J. - **Phytochemistry of medicinal plants**. New York, Plenum, 1995. 189-215.

- WOO, E.R.; KIM, H.J.; KWAK, J.H.; LIM, Y.K.; PARK, S.K.; KIM, H.S.; LEE, C.K.; PARK, H. – Anti-herpetic activity of various medicinal plant extracts. **Arch. Pharm. Res.**, 20 (supl. 1): 58-67, 1997.
- WOOD, D.J.; SUTTER, R.W.; DOWDLE, W.R. –Stopping poliovirus vaccination after eradication: issues and challenges. **Bull. World H. Org.**, 78 (supl. 3): 347-63, 2000.
- YAMAMOTO, N.; FURUKAUWA, H.; ITO, Y.; YOSHIDA, S.; MAENO, K.; NISHIYAMA, Y. – Anti-herpes virus activity of citrusine-I, a new acridone alkaloid and related compounds. **Antivir. Res.**, 12: 21-36, 1989.
- YAO, X.J.; WAINBERG, M.A.; PARNIAK, M.A. – Mechanism of inhibition of HIV-1 infection in vitro by purified extract of *Prunella vulgaris*. **Virology**, 178: 56-62, 1992.
- YOOSOOK, C.; PANPISUTCHAI, Y.; CHAICHANA, S.; SANTISUK, T.; REUTRAKUL, V. – Evaluation of anti-HSV-2 activities of *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans*. **J. Ethnofarmacol.**, 67: 179-87, 1999.
- ZAVALA, S.M.A.; PÉREZ, G.S.; PÉREZ, G.R.M. - Antimicrobial screening of some medicinal plants. **Phytoter. Res.**, 11: 368-71, 1997.