



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CURSO DE FARMÁCIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

PABLO RICARDO MARZZANI

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA & AVALIAÇÃO DAS  
ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-HERPÉTICA DE  
EXTRATO DE FRUTOS DE FRAMBOESA**

Florianópolis

2019

PABLO RICARDO MARZZANI

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA & AVALIAÇÃO DAS  
ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTI-HERPÉTICA DE  
EXTRATO DE FRUTOS DE FRAMBOESA**

Trabalho de Conclusão de Curso de  
Graduação em Farmácia da Universidade  
Federal de Santa Catarina.

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso  
II

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique  
Reginatto;

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Izabella Thaís da  
Silva.

FLORIANÓPOLIS

2019

“Para todos desejo felicidade, alegria e muitas riquezas! E para mim, que o verão acabe e nunca me falte cerveja.”

(Anna C. Marzzani)



## RESUMO

A framboesa (*Rubus idaeus* L.) é um alimento funcional visto que apresenta elementos em sua composição que demonstram características nutricionais, principalmente os compostos fenólicos e antocianinas. Este trabalho teve como objetivo analisar, através do método de Folin-Ciocalteu e Fast Blue BB, o teor de compostos fenólicos totais; quantificar o teor das antocianinas monoméricas totais por meio de ensaio de pH diferencial, além de também avaliar as atividades antioxidante e anti-herpética (HSV-1) dos frutos de framboesa, utilizando o ensaio de radical DPPH e de sulforrodamina B e redução de placas de lise, respectivamente. Os resultados obtidos para o teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu foi de 12,17 mg de equivalente de ácido gálico por grama de fruto fresco, enquanto que pelo ensaio de FBBB foi de 2,91 mg de equivalente de ácido gálico por grama de fruto fresco. O teor de antocianinas monoméricas totais foi de 0,25mg.g<sup>-1</sup>/100g FF. A capacidade de captação de radicais livres pelo método de DPPH foi de 0,89 mg/mL. A possível relação entre a capacidade de captação de radicais livres com o teor de compostos fenólicos e de antocianinas monoméricas totais foi realizada através da correlação de Pearson. O resultado obtido sugere que a capacidade de neutralizar radicais livres provém dos compostos fenólicos e não das antocianinas. O ensaio de citotoxicidade mostrou um valor de concentração necessária para diminuir em 50% a viabilidade celular (CC<sub>50</sub>) maior que 2500 µg/mL, o que indica baixa citotoxicidade, enquanto o ensaio de atividade anti-HSV-1 apresentou um valor de concentração necessária para inibir 50% da infecção viral (CI<sub>50</sub>) maior que 250,0 µg/mL, ou seja, uma baixa atividade anti-herpética.

**Palavras-chave:** Framboesa. *Rubus idaeus* L. Compostos fenólicos. Antocianinas. Folin-Ciocalteu. Fast Blue BB. pH Diferencial. DPPH. Herpes vírus. Citotoxicidade. Sulforrodamina B

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Coeficientes de correlação de Pearson realizada entre os resultados obtidos nas análises do teor de compostos fenólicos (FC e FBBB), teor de antocianinas monoméricas totais (pH-D) e capacidade de captação de radicais livres (DPPH).....	32
--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Núcleo fundamental e principais antocianinas .....	11
Figura 2 Framboeseiras .....	13
Figura 3 Framboesas .....	14
Figura 4 Estrutura geral das antocianinas .....	16
Figura 5 Antocianinas em equilíbrio.....	18
Figura 6 Representação estrutural da redução do radical DPPH.....	25
Figura 7 Interações propostas do sal diazônio do FBBB com a perlagonidina.....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMT – Antocianinas monoméricas totais

CC<sub>50</sub> – Concentração que reduz em 50% a viabilidade celular

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EAG – Equivalente de ácido gálico

EC<sub>50</sub> – Concentração que reduz em 50 % a concentração inicial (DPPH)

FBBB – Fast blue BB

FC – Folin-Ciocalteu

F-D – Folin-Denis

FD – Fator de diluição

FF – Fruto fresco

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HSV-1 – *Herpes Simplex Virus* tipo-1

HSV-2 – *Herpes Simplex Virus* tipo-2

CI<sub>50</sub> – Concentração que inibe 50% da replicação viral

IS – Índice de seletividade

M - Molaridade

MEM – Minimal Essential Medium

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

SFB – Soro fetal bovino

SRB – Sulforrodamina B

TCA – Ácido tricloroacético

TFT – Teor de Fenólicos Totais

UV/Vis – Ultravioleta - Visível

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	12
2.1. ALIMENTO FUNCIONAL .....	12
2.2. FRAMBOESA.....	13
<b>2.2.1. Aspectos botânicos e fisiológicos</b> .....	13
<b>2.2.2. Aspectos nutricionais</b> .....	14
2.3. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	14
<b>2.3.1. Compostos Fenólicos</b> .....	15
<b>2.3.2. Flavonoides</b> .....	15
<b>2.3.3. Antocianinas</b> .....	15
2.4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	18
<b>2.4.1. Estresse oxidativo</b> .....	19
2.4.1.1. DPPH .....	19
2.5. Herpes Simplex Virus (HSV).....	20
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	21
3.1. OBJETIVOS GERAIS .....	21
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>4. JUSTIFICATIVA</b> .....	22
<b>5. MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	23
5.1. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	23
5.2. VÍRUS E LINHAGEM CELULAR.....	23
5.3. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA .....	23
5.3.1. Folin-Ciocalteu.....	23
5.3.2. Fast Blue BB.....	24
5.3.3. Método pH diferencial.....	24
5.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS LIVRES .....	25
5.4.1. Ensaio com o radical DPPH.....	25
5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA .....	25
5.5.1. Ensaio de citotoxicidade .....	25
5.5.2. Ensaio de inibição da formação de placas de lise .....	26
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
6.1. TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM FRUTOS DE FRAMBOESA .....	28

6.1.1. Método de Folin Ciocalteu .....	28
6.1.2. Método de Fast Blue BB.....	29
6.2. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE FENÓLICOS TOTAIS POR FC E FBBB .....	29
6.3. TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS EM FRUTOS DE FRAMBOESA .....	30
6.4. CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS LIVRES .....	31
6.4.1. DPPH .....	31
6.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA .....	32
6.5.1. Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio colorimétrico de sulforrodamina B (SRB) .....	32
6.5.2. Avaliação do potencial antiviral pelo método de inibição da formação de placas de lise .....	32
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>33</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>35</b>

## 1. INTRODUÇÃO

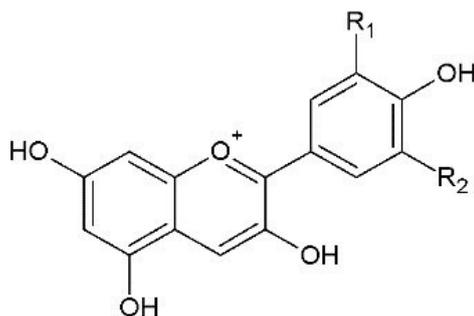
O uso de produtos naturais na medicina ainda é muito presente, visto que mais de 50% de todos os medicamentos aprovados pela agência reguladora americana FDA são derivados, direta ou indiretamente de plantas ou animais. Entre estes podem ser citados morfina, efedrina, digoxina, vincristina, entre outros (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Outro foco importante que envolve os produtos naturais é a alimentação, visto que mais valor tem sido dado aos alimentos na prevenção de doenças e promoção à saúde. A relação entre alimentação e saúde tem instigado pesquisas buscando descobrir os principais componentes responsáveis nesses processos (YILDIZ; EYDURAN, 2009; KAUR; DAS, 2011).

Neste contexto estão inseridos os frutos vermelhos, que são consumidos e apreciados por uma grande parcela da população mundial devido à sua coloração, sabor e textura. Estes frutos são considerados alimentos que trazem benefícios a saúde humana por causa de seus componentes químicos, majoritariamente constituídos por compostos fenólicos, na forma de ácidos fenólicos, proantocianidinas, flavonoides e antocianinas (BENVENUTI et al., 2004), sendo esses últimos responsáveis pela coloração avermelhada, azul ou roxa dos frutos (YILDIZ; EYDURAN, 2009; FIDRIANNY; SYIFA; INSANU, 2019).

Classificadas quimicamente como compostos fenólicos, as antocianinas estão inseridas no subgrupo dos flavonoides, sendo representada por sua aglicona, denominada de antocianidina. Todavia, nas plantas estes compostos ocorrem normalmente na forma de heterosídeos, devido à baixa estabilidade que a forma livre apresenta. As antocianidinas são derivadas de um núcleo denominado 2-fenilbenzopirílio (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; HE; GIUSTI, 2010).

Figura 1 Núcleo fundamental e principais antocianinas



	R1	R2
Delfinidina	OH	OH
Cianidina	OH	H
Petunidina	OCH3	OH
Peonidina	OCH3	OH
Malvidina	OCH3	OCH3
Pelargonidina	H	H

(Fonte: PASCUAL-TERESA; SANCHEZ-BALLEST, 2008)

Além de dar a coloração característica aos frutos vermelhos, as antocianinas apresentam atividade antioxidante (TENG et al., 2017; VIZZOTTO et al., 2012; ZHAO et al., 2013) e antiviral (SILVA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2018).

Dentre os frutos vermelhos ricos em antocianinas está a framboesa (*Rubus idaeus*) pertencente à família Rosaceae, que possui mais de 740 espécies (DAUBENY, 1996). A framboesa é um fruto de coloração avermelhada com um sabor doce-ácido e de aroma marcante (BRASIL, 2004).

Introduzida no Brasil em Campos do Jordão, SP, o início da cultura da framboesa não tem data precisa. A sensibilidade da planta e frutos ao clima, em especial a umidade e temperatura baixa em grande parte do ano, torna o cultivo limitado para as regiões de cultivo. Os principais produtores de framboesa no Brasil são os estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Minas Gerais, sendo a área estimada em cerca de 40 hectares (PAGOT; HOFFMANN, 2002).

Com base nos dados apresentados, o objetivo deste trabalho foi realizar a investigação da composição química e a avaliação *in vitro* das atividades antioxidante e anti-herpética de extratos de frutos de framboesa.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. ALIMENTO FUNCIONAL**

A relação direta entre dieta e saúde é assunto crescente nas últimas décadas, visto que a alimentação vem se mostrando um relevante fator na prevenção de certas doenças, fato que pode ser justificado pela capacidade de modular diversas funções metabólicas que os alimentos possuem para a manutenção da saúde e diminuição do risco de morbidades (PADILHA; PINHEIRO, 2004; STANIMIROVIC et al., 2016).

Os alimentos conhecidos como alimentos funcionais, nutracêuticos ou alimentos planejados, são alimentos que fazem parte da dieta cotidiana do indivíduo, não sendo algo destinado para o tratamento ou cura de qualquer patologia, mas devem possuir também alguma ação metabólica ou fisiológica que colabore para a saúde física, diminuição de morbidades crônicas e exercer efeitos positivos quando ingerido em quantidades não tóxicas, persistindo também após a suspensão de seu consumo (BORGES et al., 2010; SILVA, DA; BARREIRA; OLIVEIRA, 2016).

## 2.2. FRAMBOESA

### 2.2.1. Aspectos botânicos e fisiológicos

Pertencente à família Rosaceae, do gênero *Rubus*, a framboeseira é uma espécie herbácea subdividida em mais de dez diferentes subgêneros, sendo o gênero *Idaeobatus* encontrado ao redor do planeta. Além disso, a framboeseira possui característica perene e bianual (VALDIVIESSO et al., 2017).

Com seu cultivo ocorrendo em regiões de baixa temperatura ou de verões brandos (MARO et al., 2007), regiões temperadas da Europa, Ásia e América do Norte são os principais locais de ocorrência das framboeseiras (MAZZA; MINATTI, 1993). As regiões brasileiras onde o cultivo foi introduzido pertencem, em sua maioria, ao Sudeste do país, embora o Rio Grande do Sul seja um dos principais produtores dos frutos no Brasil, juntamente com São Paulo e Minas Gerais (PAGOT, 2002). Em Santa Catarina, ocorre o cultivo orgânico de frutos de framboesa na cidade de Urubici (FRUTAFINA, 2019). O plantio das mudas ocorre através de um sistema chamado espaldeira simples, no qual se utiliza um fio ao qual é amarrado o ramo principal de cada planta (Figura 2). A frutificação ocorre após cerca de um ano e meio de cultivo, usualmente realizado em setembro, sendo novembro, dezembro e abril os melhores meses para realizar a colheita (MATHIAS, 2015).

Figura 2 Framboeseiras



(Fonte: RASEIRA et al., 2004)

A produção de frutos de framboesa (Figura 3) é destinada ao mercado na forma fresca e também para a indústria na forma de congelação/transformação. A colheita destinada para o consumo na forma fresca é realizada de forma manual, com o intuito de preservar as características visuais e a integridade do fruto. Já para a produção destinada a indústria, a colheita mecânica possui maior interesse comercial por reduzir os custos de produção (BARROTE, 2013).

Figura 3 Framboesas



(Fonte: LUDWIG et al., 2015)

### 2.2.2. Aspectos nutricionais

A framboesa contém alto teor de água e, em cada 100g do fruto, é possível encontrar até 2,0 mg de manganês, 30 mg de cálcio, 22 mg de fósforo e 225 mg de potássio (ANCOS, DE; GONZALEZ; CANO, 2000; NILE; PARK, 2014). Possui também um alto teor de vitaminas C e E, sendo descritos também vitamina B6, riboflavina, tiamina, vitaminas A e K em menores teores (USDA, 2011).

### 2.3. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Qualquer substância que as plantas produzem e que não são essenciais para a sua sobrevivência se enquadram como metabólitos secundários, sendo a função atribuída a estes compostos a de propiciar vantagens às espécies que os produzem (BRITT; AMANDEEP; INDIKA, 2016). Os metabólitos mais encontrados nos frutos de *Rubus idaeus* L. são compostos fenólicos pertencentes às classes dos flavonoides e taninos, majoritariamente ocorrendo a presença de antocianinas e, em menores quantidades, os flavonois (BEEKWILDER; HALL; VOS, DE, 2005).

### 2.3.1. Compostos Fenólicos

A classificação dos compostos fenólicos deriva principalmente de suas estruturas químicas, podendo variar desde ácidos fenólicos simples, até compostos polifenólicos, como taninos hidrolisáveis e condensados (BRAVO, 1998). Uma característica comum a estes compostos é a de possuir pelo menos um anel aromático hidroxilado, mas que podem conter outros constituintes na sua estrutura, tais como açúcares ou ácidos orgânicos (AABY et al., 2005).

Os compostos fenólicos possuem atividade funcional antioxidante (NILE; PARK, 2014), mas também há descrições de atividade anticâncer (CHOUNDHARY et al., 2015), anti-inflamatória (FANG, 2015), e antiviral contra norovirus murino (SEO et al., 2016), chikungunya (LANI et al., 2016) e dengue vírus (ZANDI et al., 2011).

### 2.3.2. Flavonoides

Com estrutura formada por quinze átomos de carbono com dois anéis aromáticos, na disposição C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, os flavonoides são os compostos fenólicos com maior presença nos frutos vermelhos (ANGELO, JORGE, 2007). De acordo com o estado de oxidação do anel central, os flavonóis são subcategorizados em antocianinas, flavonóis, flavonas, flavanonas e isoflavonoides. Nos frutos vermelhos e, em especial nos frutos de *Rubus idaeus* L., as antocianinas estão em maiores concentrações e são responsáveis por sua coloração vermelha vibrante (RIO, DEL; BORGES; CROZIER. 2010).

### 2.3.3. Antocianinas

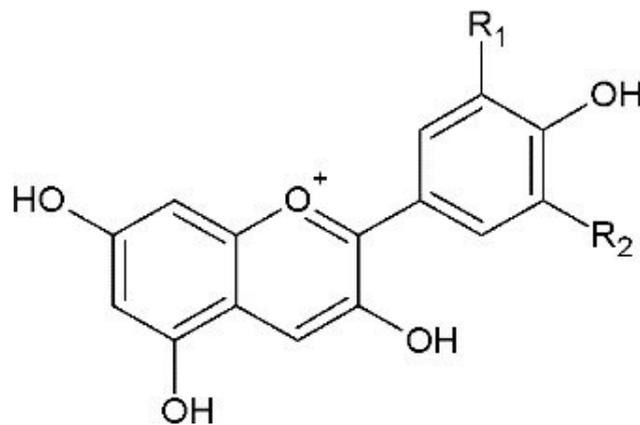
A palavra antocianina vem do grego ‘anthos’, que significa flor, e ‘kyanos’ que significa azul. A coloração de flores e frutos que apresentam estas substâncias tem a função de atrair polinizadores e animais dispersores de sementes (WILSON; WHELEN, 1990). Outra função atribuída às antocianinas é a de defesa contra agressões do meio externo, tais como, infecções e radiação UV, por exemplo (HÄKKINEN, 2000).

Os níveis de antocianinas na framboesa aumentam de acordo com a maturidade, embora a capacidade antioxidante máxima desses frutos ocorra no começo de seu amadurecimento (MANGANARIS et al., 2014), sendo que a média dos teores de antocianinas totais na framboesa é de 200 à 300mg por 100g de fruto fresco (BEEKWILDER et al., 2005).

### 2.3.3.1. Características químicas

As antocianinas são glicosídeos polihidroxilados ou polimetoxilados derivados do 2-fenil-1-benzopirílio ou dos sais de flavílio (KONG et al., 2003). A cadeia estrutural da cianidina é constituída por uma estrutura básica denominada antocianidina, que é composta por um anel aromático ligado a um anel heterocíclico constituído por um oxigênio, o qual também é ligado a outro anel aromático por uma ligação carbono-carbono (Figura 4) (KONCZAK; ZHANG, 2004). Quando a antocianidina se liga a uma porção de açúcar, tal estrutura se torna uma antocianina (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). Os açúcares mais comuns são: glicose, galactose, ramnose e arabinose (CLIFFORD; SCARLBERT, 2000).

Figura 4 Estrutura geral das antocianinas



(Fonte: (PASCUAL-TERESA; SANCHEZ-BALLEST, 2008))

Já foram reportados mais de 540 tipos diferentes de antocianinas, diferindo entre si pelo número de hidroxilações, pela natureza e pelo número de açúcares ligados em sua estrutura, tanto pela cadeia alifática quanto pela cadeia aromática carboxilada ligada aos açúcares e na posição dessas ligações (KONG et al., 2003).

Quanto às antocianidinas, há a notificação de mais de 20 tipos diferentes, sendo a perlagonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina e delphinidina as mais comuns em plantas vasculares (CLIFFORD, 2000). A delphinidina, cianidina e perlagonidina são derivadas de antocianinas não metiladas (DEY, HARBORNE, 1993) e encontradas majoritariamente em folhas pigmentadas, seguidas por frutos e, por fim, em flores (KONG et al., 2003).

A cianidina e perlagonidina são encontrados de forma majoritária na framboesa (MEJIA-MEZA et al., 2010). Há três possíveis classificações de frutos ricos em antocianinas:

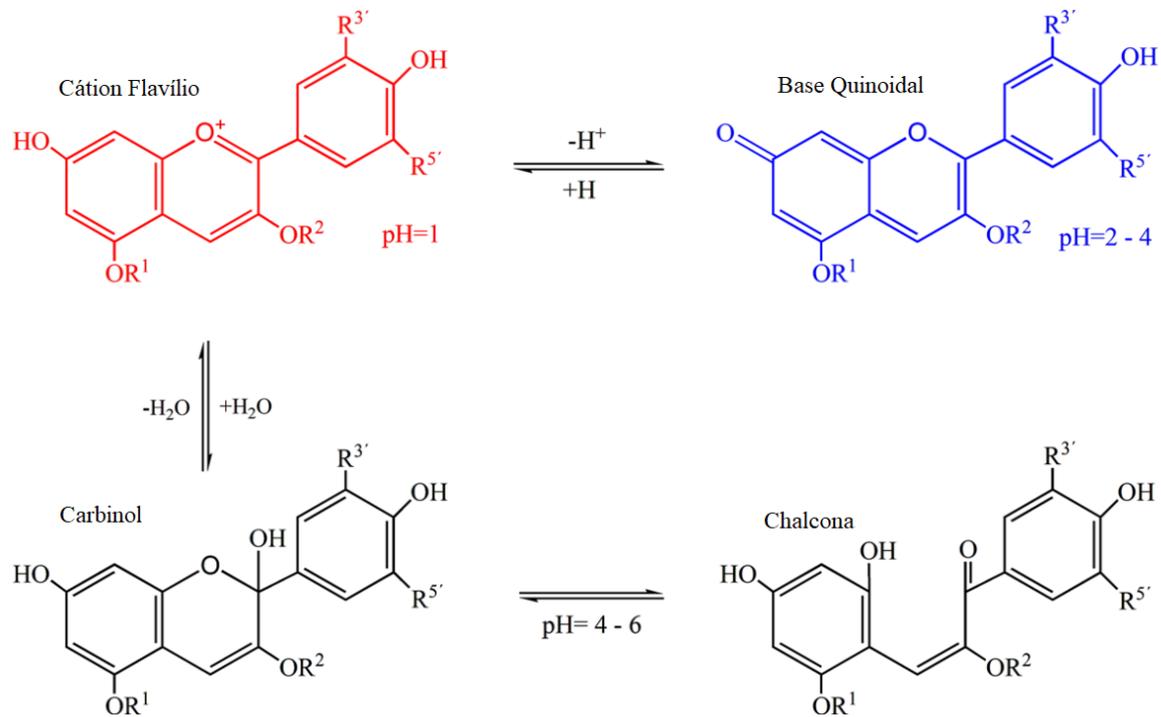
o grupo perlagonidina, grupo cianidina/peonidina e grupo das múltiplas antocianinas. Essa classificação é utilizada para melhorar o entendimento do processo de absorção e metabolização das antocianinas, bem como o entendimento dos efeitos benéficos de diferentes frutos (FANG, 2015). A framboesa, de acordo com esta classificação, está enquadrada no grupo cianidina/peonidina (JAKOBEK et al., 2007).

#### 2.3.3.2. Estabilidade e pH

As antocianinas são moléculas muito sensíveis e altamente instáveis quando isoladas, tornando-as propícias à degradação. Sua estabilidade é influenciada por inúmeras razões, como pH, luz, oxigênio, temperatura, entre outros (REIN, 2005). Em meio neutro, os derivados monoglicosídeos e diglicosídeos são mais estáveis do que as agliconas, já que a presença de açúcar evita a degradação dos intermediários instáveis em ácidos fenólicos e aldeídos (FLESCHHUT et al., 2006). Por sua baixa estabilidade em meio aquoso de pH acima de 2,0, o uso da antocianina ainda é restrito nas indústrias cosméticas e de alimentos (FALCÃO et al., 2003).

Diferente dos demais flavonoides, as antocianinas são capazes de se rearranjarem estruturalmente em função do pH no meio em que se encontram (HEREDIA et al., 1998). A coloração vermelha da antocianina vem de origem da sua forma iônica, o cátion flavílio, que ocorre em pH 1. A base quinoidal é predominante em meio com pH 2 – 4, já em meios com pH entre 5 – 6, identifica-se uma pseudobase carbinol e uma chalcona, ambas sem coloração (Figura 5) (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Figura 5 Antocianinas em equilíbrio



(Fonte: CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009)

## 2.4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

As antocianinas desempenham um papel importante entre os compostos bioativos da dieta, reduzindo significativamente a gordura corporal acumulada e a concentração de glicose do plasma quando induzidas por uma alimentação rica em gordura (TSUDA et al., 2003). Diversos trabalhos mostram que as antocianinas são capazes de reduzir a resistência à insulina em pacientes portadores de diabetes e possuem também efeitos frente à obesidade (AZZINI; GIACOMETTI; RUSSO, 2017; BELWAL et al., 2017).

Além dessas propriedades, também foi evidenciado que o uso das antocianinas podem prevenir ou reverter parcialmente doenças no sistema cardiovascular, como a hipertensão, aterosclerose, hipercolesterolemia e agregação plaquetária (SERBAN et al., 2015). Em estudos com animais, a dieta rica em antocianinas resultou numa diminuição da circulação de radicais livres no plasma dos animais (BAGCHI et al., 2006). Segundo os autores, o potencial antioxidante das antocianinas vem de sua capacidade de doar elétrons ou átomos de hidrogênio do radical hidroxila para os radicais livres.

### 2.4.1. Estresse oxidativo

O oxigênio tem papel essencial para a execução das funções celulares, como a produção de energia por exemplo (KOHEN; NYSKA, 2002). No interior da célula, aproximadamente 20% do oxigênio é reduzido, sendo que uma fração desse apresenta um elétron desemparelhado, denominado radical livre ou também, espécie reativa de oxigênio (FRIEDMAN, 2011).

O equilíbrio entre a produção de radicais livres e os mecanismos de defesa antioxidante é fundamental para a proteção das células. Quando há um desvio para o acúmulo de radicais livres, devido a alguma descompensação na produção de agentes antioxidantes, há o potencial de dano celular derivados dessas espécies reativas de oxigênio e é denominado estresse oxidativo, podendo aumentar a medida que as células antioxidantes se tornam incapazes de neutralizá-los (STOCKER; KEANEY, 2004; VIGNINI, 2011). O excesso de radicais livres lesiona o tecido de células normais pela destruição de lipídeos, proteínas, DNA e ácidos nucleicos, gerando moléculas reativas secundárias que podem levar a necrose da região afetada (PALMIERI; SBLENDORIO, 2007).

Constituintes majoritários da framboesa, as antocianinas são moléculas que se oxidam facilmente através da doação de um átomo de hidrogênio para os radicais livres, dado que sugere que o consumo de framboesa ou de outros frutos ricos em antocianinas, podem auxiliar na proteção contra os efeitos degenerativos e de doenças crônicas causadas pelo estresse oxidativo (HEINONEN; MEYER; FRANKEL, 1998; PEREIRA et al., 2014).

Diversas publicações analisam o efeito benéfico causado pela composição química de frutos vermelhos, utilizando para isso métodos distintos, como o método de radical livre DDPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), o método de redução do ferro (FRAP), o método de captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS) e o método de absorção dos radicais oxigenados (ORAC), por exemplo (FREDES et al., 2014; LIN, 2000; VAN DEN BERG et al., 1999; WANG; SHIOW).

#### 2.4.1.1. DPPH

O DPPH é um método que avalia a atividade de captação de radicais livres de distintas plantas e frutos através da redução do radical estável, o 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) pelo composto que está sendo analisado. A medida que ocorre a redução do radical gerado, há uma diminuição na absorbância da amostra, sendo o resultado avaliado através do monitoramento das absorbâncias medidas (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET,

1995).

Trabalhos prévios que utilizaram essa técnica para estudar o perfil antioxidante de frutos vermelhos, obtiveram resultados significativos. Ensaio realizado por Bowen-Forbes (2010) para determinar a caracterização química e o poder antioxidante de sete diferentes cultivares de framboesa através do método de DPPH. Os ensaios indicaram valores entre 304,5 – 351,3  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalente/grama ( $\mu\text{mol TE/g}$ ). Outro trabalho, utilizando amoras, obteve um resultado de 147,7  $\mu\text{mol TE/100g}$  de fruto. Ambos os trabalhos obtiveram resultados que demonstraram a relação direta do teor de antocianinas com o poder de captação de radicais livres (BOWEN-FORBES; ZHANG; NAIR, 2010; GOUVEIA-FIGUEIRA; CASTILHO, 2010).

## 2.5. Herpes Simples Virus (HSV)

Infecções virais apresentam relevância no cenário das doenças infecciosas, destacando-se as causadas pelos vírus herpéticos. Responsáveis pelas infecções de cerca de 60 – 95% da população mundial adulta, estão os Herpes Simples Virus tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) (BRADY; BERNSTEIN, 2004; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013). A soroprevalência do HSV-1, em países subdesenvolvidos, pode chegar a 100% da população, enquanto que o HSV-2 chega a atingir aproximadamente 80% em algumas regiões da África (GELLER et al., 2012).

Geralmente o HSV-1 é associado a infecções orofaciais e o HSV-2 a infecções do trato geniturinário. Contudo, esta distinção anatômica não é mais considerada tão rígida como antes (STEINER; KENNEDY; PACHNER, 2007; MCALLISTER; SCHLEISS, 2014). Devido ao tropismo específico, o HSV-1 infecta predominantemente as membranas da mucosa e pele da região orolabial; no entanto, nas últimas décadas passou a ser visto com mais frequência na genitália, devido ao aumento do contato orogenital desprotegido. Apesar desse tropismo por regiões “acima e abaixo da cintura”, não existe um local específico para cada tipo de HSV, já que ocorre frequentemente uma coinfeção (GARLAND; STEBEN, 2014). Além disso, infecções oculares por HSV-1 são a principal causa de cegueira em países desenvolvidos, com episódios recorrentes de reativação viral levando a cicatrizes progressivas e opacidade da córnea; o HSV-1 também causa encefalite e várias desordens do sistema nervoso periférico (SCHUPPE et al., 2008; BELLO-MORALES et al., 2012). A latência viral, desenvolvimento de resistência aos tratamentos disponíveis no mercado e o acometimento de pacientes imunodeficientes, são características de infecções herpéticas e limitam o sucesso do tratamento, facilitando o agravamento dos sintomas (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

O hospedeiro natural do Herpes Simples Virus é o ser humano e sua transmissão requer contato direto, necessitando haver uma porta de entrada para a infecção (FORSGREN;

KLAPPER, 2009). A principal alternativa para o tratamento de infecções causadas pelos HSV-1 e HSV-2 é a utilização de fármacos como aciclovir e outros análogos de nucleosídeos. Porém, a busca por novos fármacos antivirais mais eficientes vem sendo necessária devido ao aparecimento de cepas virais resistentes aos medicamentos que já existem no mercado (ROTTINGHAUS; WHITLEY, 2007).

Devido a simplicidade estrutural dos vírus e de sua dependência em relação às células dos hospedeiros para sua replicação, há relativa dificuldade no desenvolvimento de novos fármacos antivirais que sejam de toxicidade seletiva para o vírus sem que haja dano relevante às células. Poucos são os estudos que avaliaram o potencial antiviral dos frutos vermelhos, um exemplo foi realizado por Carvalho e colaboradores (2012) que detectaram atividade antiviral para o extrato hidroetanólico de frutos de morango frente ao HSV-1.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Investigar a composição fitoquímica e as atividades antioxidante e anti-herpética de extratos de frutos de framboesa.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a. Avaliar o teor de fenólicos totais (Folin–Ciocalteu e Fast-Blue BB) e antocianinas monoméricas totais (pH diferencial) nos frutos de framboesa;
- b. Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos de frutos framboesa pelo ensaio colorimétrico com o radical DPPH;
- c. Avaliar o perfil citotóxico dos extratos de frutos de framboesa pelo ensaio de Sulforrodamina B;
- d. Avaliar o perfil antiherpético dos extratos de frutos de framboesa pelo ensaio de inibição de formação de placas de lise.

#### 4. JUSTIFICATIVA

O arsenal terapêutico para infecções virais compreende cerca de 50 fármacos aprovados oficialmente para uso clínico, sendo que metade deles é utilizada para o tratamento das infecções causadas pelo HIV. Os demais fármacos antivirais são utilizados contra os vírus das hepatites B e C, vírus influenza, vírus respiratório sincicial e vírus herpéticos, incluindo neste último grupo o vírus da varicela zoster, o citomegalovírus e os HSV tipos 1 e 2 (DE CLERCQ, 2009a).

Os vírus HSV-1 e HSV-2 (Herpes Simplex Virus 1 e 2, respectivamente), são causadores de infecções de mucosa e pele e têm sido considerados problemas de saúde pública por causarem infecções agudas e recorrentes. Atualmente, a escolha terapêutica é restrita e há relatos de cepas resistentes ao tratamento de primeira escolha (aciclovir), o que dificulta o manejo dessas infecções, tornando a busca por novos agentes antivirais necessária e urgente (WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

Segundo a literatura, inúmeras espécies vegetais possuem constituintes químicos, que possuem capacidade de inibir o ciclo de replicação de vários tipos de vírus.

Neste contexto, os frutos vermelhos possuem diversos estudos demonstrando a sua capacidade antiviral. Os frutos do gênero *Rubus* apresentam atividade antiviral frente ao norovírus murino e ao vírus influenza (LEE et al., 2016a; LEE et al., 2016b), enquanto frutos do gênero *Fragaria* têm atividade contra o HSV-1 (CARVALHO, et al., 2012).

Considerando que não existem relatos de atividade antiviral de *Rubus idaeus* L., neste trabalho foram avaliadas as atividades citotóxica, antioxidante e o potencial anti-herpético frente ao HSV-1 do extrato de framboesa.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. MATÉRIA PRIMA VEGETAL

Frutos de *Rubus idaeus* foram obtidos da EMBRAPA – Clima Temperado (Pelotas – RS). O material foi armazenado a -20°C ao abrigo da luz.

### 5.2. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Extrato de *Rubus idaeus* (framboesa) foi preparado em triplicata através da sonicação de 1g de fruto em 60 mL de metanol por 50 minutos em temperatura ambiente (23°C). O extrato foi filtrado e então concentrado sob pressão reduzida. Posteriormente, o extrato foi solubilizado em água destilada, congelado e liofilizado (CHAVES et al., 2018).

### 5.3. VÍRUS E LINHAGEM CELULAR

Foi utilizada a linhagem celular VERO (Green African Monkey Kidney cells) (ATCC:CCL81) cultivada em *Eagle's Minimum Essential Medium* (MEM; Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF; Gibco, Carlsbad, CA). As culturas celulares foram mantidas em temperatura de 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. O HSV-1 (cepa KOS) (Faculty of Pharmacy, University of Rennes, France) foi propagado em células VERO.

### 5.4. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

O extrato foi quimicamente caracterizado quanto ao teor de fenólicos totais (Folin Ciocalteu e Fast-Blue BB) e de antocianinas monoméricas totais (pH diferencial).

#### 5.4.1. Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999).

O teor de fenólicos totais (TFT) nos extratos foi realizado a partir da adição de 0,125 mL de cada extrato a 0,5 mL de água destilada e 0,125 mL do reagente de Folin- Ciocalteu. Após seis minutos, foram adicionados 1,25 mL de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 7%, além de 1 mL de água destilada. Após reação de complexação por 90 minutos, as absorbâncias foram medidas a 760 nm em espectrofotômetro Lambda 25 UV/Vis, PerkinElmer®. O mesmo procedimento descrito acima foi utilizado para construir a curva analítica, elaborada a partir de soluções metanólicas de ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicata, e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de fruto fresco

(mg EAG.g<sup>-1</sup> FF).

#### 5.4.2. Fast Blue BB (MEDINA et al., 2011)

O TFT também foi determinado pela metodologia descrita por Medina (2011), que consiste na reação direta entre o sal de diazônio Fast Blue BB e os compostos polifenólicos. Para tal, foi adicionado, para cada 1 mL de extrato, 0,1 mL do reagente Fast Blue BB em uma concentração de 0,1%. As soluções foram homogeneizadas por 1 minuto com posterior adição de 0,1 mL de NaOH 5%. Após 90 min à temperatura ambiente as absorbâncias foram medidas a 420 nm em espectrofotômetro Lambda 25 UV/Vis (PerkinElmer®). O mesmo procedimento descrito acima foi utilizado para preparar uma curva analítica contendo seis soluções metanólicas de ácido gálico. As análises foram efetuadas em triplicata, e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de fruto fresco (mgEAG.g<sup>-1</sup> FF).

#### 5.4.3. Método pH diferencial (LEE et al., 2005)

O doseamento de antocianinas monoméricas totais foi realizado a partir da utilização de duas soluções tampão, das quais a primeira trata-se de uma solução de cloreto de potássio (0,025 M) em pH 1, e a segunda, uma solução de acetato de sódio (0,4M) com pH 4,5. A seguir, 5,0 mL de cada solução tampão foram adicionados a 0,5 mL da amostra. Após 30 minutos da adição dos tampões, a leitura foi realizada em dois comprimentos de onda (520 e 700 nm). Os resultados foram expressos em miligramas de antocianinas monoméricas totais (AMT) por 100 gramas de fruto fresco, de acordo com seguintes equações:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH1} - (A_{520} - A_{700})_{pH4,5} ;$$

Onde A é absorbância, A<sub>520</sub> é absorbância em 520nm e A<sub>700</sub> é a absorbância em 700nm (LEE et al., 2005).

$$AMT = \frac{AxMMxFD}{\epsilon x L} x 100;$$

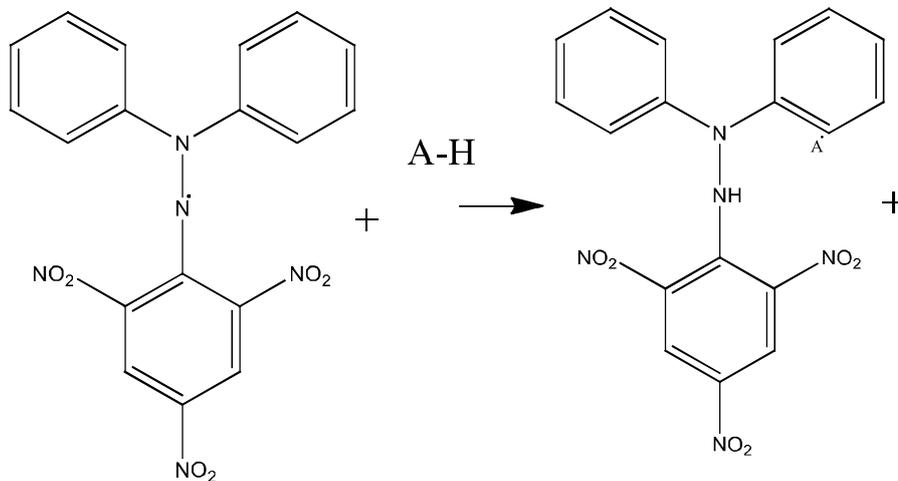
MM refere-se ao peso molecular do padrão utilizado para expressar os resultados; FD, o fator de diluição envolvido na análise;  $\epsilon$ , o coeficiente de absorvidade molar; L é o caminho óptico.

## 5.5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS LIVRES

### 5.5.1. Ensaio com o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (SANCHEZ-MORENO et al., 1998)

A determinação do potencial de captação de radicais livres foi realizada por meio do ensaio com o radical DPPH. Para isso, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de seis diferentes concentrações da amostra a 3,9 mL de uma solução metanólica de DPPH (60  $\mu\text{M}$ ). Após 60 min, as absorvâncias das amostras foram aferidas, a 515 nm, em espectrofotômetro Lambda 25 UV/Vis, PerkinElmer®. Os resultados foram plotados como absorvâncias versus concentrações das amostras, e por meio de análise de regressão linear, foram obtidos os valores de  $\text{EC}_{50}$ , ou seja, a concentração necessária capaz de reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH, sendo os resultados expressos em  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Como controle positivo foi utilizado ácido gálico (Sigma-Aldrich). As análises foram efetuadas em triplicata.

Figura 6 Representação estrutural da redução do radical DPPH



(Fonte: SANCHEZ-MORENO et al., 1998)

## 5.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

### 5.6.1. Ensaio de citotoxicidade (VICHAI; KIRTIKARA, 2006)

Células VERO foram cultivadas em uma placa de 96 poços ( $2,5 \times 10^4$  células/poço) e

expostas, após 24h, a diferentes concentrações de extrato por 48h. Após período de tratamento, as células foram fixadas com ácido tricloroacético 10% (TCA) em cada poço por uma hora. As placas então foram lavadas com água destilada para remover o TCA e em seguida, as células foram coradas com solução ácida de sulforrodamina B (SRB) por 30 minutos. A seguir, a placa foi lavada com ácido acético 1% para remover o corante não ligado às proteínas. A partir de então, a SRB ligada às proteínas celulares foi dissolvida em uma solução de Tris-Base 10mM e a leitura das absorbâncias foi realizada em 510nm em um espectrofotômetro de microplacas Spectra Max M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

As absorbâncias medidas para cada concentração de cada material-teste, foram convertidos em porcentagens de viabilidade (X%), em relação ao controle celular, o qual foi considerado 100% viável, por meio da seguinte fórmula, onde **DO = Densidade Óptica**:

$$X\% = \frac{DO_{material-teste} \times 100}{DO_{controle\ celular}}$$

Em seguida, os percentuais calculados, referentes às diferentes concentrações das amostras, foram inseridos num gráfico e por meio de análise de regressão não-linear foi possível calcular a concentração de cada amostra que reduziu a viabilidade celular em 50% (CC<sub>50</sub>).

#### 5.6.2. Ensaio de inibição da formação de placas de lise (DE LOGU et al., 2000)

Células VERO foram cultivadas em placas de 24 cavidades (2,5 x 10<sup>5</sup> células/cavidade) e incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> até a confluência (24 h). Após a lavagem, as células foram infectadas com aproximadamente 100 UFP de HSV-1 por 1h à 37°C, exceto nos controles celulares. Após 1 h de adsorção a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, as células foram lavadas com PBS e, então, foram adicionados 500 µL da solução de carboximetilcelulose (CMC; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) e MEM contendo diferentes concentrações (diluições 1:2) dos diferentes materiais-teste. Os controles virais e celulares receberam apenas 500 µL da solução de diluição das amostras e, as placas foram incubadas por 48 h, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Passado este período, o meio contendo o material-teste foi aspirado e as células foram coradas com 200 µL de solução de preto de naftaleno (Sigma). Após 40 min, à temperatura ambiente e em agitador horizontal, o corante foi aspirado e as placas contadas através da visualização em microscópio estereoscópio. A porcentagem de inibição da replicação viral de cada material-teste, com relação aos controles virais, foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 1 - \left( \frac{N^{\circ} \text{ de Placas}_{material-teste} \times 100}{N^{\circ} \text{ de Placas}_{controle\ viral}} \right)$$

Em seguida, os percentuais calculados foram inseridos em um gráfico e, através da análise de regressão não-linear, foi possível calcular os valores de  $CI_{50}$ , ou seja, a concentração de cada amostra que inibe 50% a infecção viral. Os valores de  $CI_{50}$  representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão.

Com posse dos valores de  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$  foi possível calcular o índice de seletividade (IS) de cada amostra em relação a cada cepa viral utilizada, através da seguinte fórmula:

$$IS = \frac{CC_{50}}{CI_{50}}$$

## 5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise de caracterização química e atividade antioxidante, foi utilizada a estatística descritiva.

Os valores de  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$  foram estimados por meio de curvas concentração-resposta por análise de regressão não-linear.

Os experimentos foram realizados em triplicata ou duplicata e os resultados expressos como a média dos experimentos independentes com seu intervalo de confiança de 95% (para as triagens iniciais).

A análise dos dados foi realizada com o auxílio do *software GraphPad Prism 8*.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM FRUTOS DE FRAMBOESA

Para realizar as determinações do Teor de Fenólicos Totais em frutos de *Rubus idaeus* foram utilizados dois métodos: Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999) e Fast Blue BB (MEDINA et al., 2011).

#### 6.1.1. Método de Folin Ciocalteu

Este método surgiu com o objetivo de melhorar a técnica antes descrita por Folin e Denis, que determinava a concentração total de proteína através da tirosina e do triptofano, de forma indireta. Ambas partem do princípio da reação entre o agente oxidante com a tirosina e/ou o triptofano, resultando numa coloração azulada, onde a intensidade da cor corresponde a concentração da proteína. A principal diferença entre o FC e o F-D é a proporção de molibdato utilizado na preparação do reagente, que foi aumentada por Folin e Ciocalteu, visando prevenir a formação de um precipitado branco que era possível observar no método de F-D (ALSTYNE, 1995; FOLIN; CIOCALTEU, 1927; FOLIN; DENIS, 1912).

Com este método foi possível realizar a detecção dos compostos fenólicos pois ocorre a formação de complexos de fosfotungstato e molibdatos em meio básico, estando esses presentes no reagente de Folin-Ciocalteu, resultando em uma coloração azulada do meio (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). A cor é formada devido a redução dos compostos do reagente do FC em comprimento de onda de 760 nm (MEDINA, 2011a). Para alcançar o meio básico, utiliza-se carbonato de sódio, acarretando na formação do íon fenolato por meio da dissociação do próton do composto fenólico, que é capaz de reduzir o reagente FC, formando complexos (SÁNCHEZ-RANGEL et al., 2013). A desvantagem dessa metodologia é a capacidade do reagente de Folin-Ciocalteu reagir com outras substâncias oxidáveis, como o ácido ascórbico, aminas aromáticas, purinas e açúcares, por exemplo (ALSTYNE, 1995; MEDINA, 2011a).

O resultado obtido neste trabalho para o teor de compostos fenólicos totais foi de 12,17 mg EAG.g<sup>-1</sup> FF.

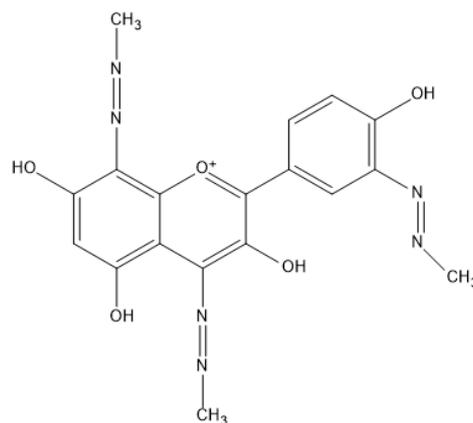
Benvenuti et al. (2004) realizou análises em diferentes cultivares de framboesa, obtendo resultados que variaram de 1,40 mg EAG.g<sup>-1</sup> FF até 8,88 mg EAG.g<sup>-1</sup> FF, sendo que o menor valor encontrado foi para *Rubus idaeus*. Já outro trabalho, realizado por FU e colaboradores, encontrou-se um resultado de 1,08mg.g<sup>-1</sup> de compostos fenólicos. Os resultados apresentados

por este trabalho portanto, estão com valores superiores quando comparados com os resultados encontrados na literatura.

### 6.1.2. Método de Fast Blue BB

Este é um método baseado na formação de complexos azo pelo acoplamento dos compostos fenólicos com sal de diazônio (MORRISON; BOYD, 1969). O sal FBBB contém um grupo diazônio, onde as hidroxilas reativas presentes nos compostos fenólicos reagem, liberando um próton e causando uma substituição aromática eletrofílica (Figura 7). Para que ocorra o acoplamento dos compostos fenólicos, é necessário antes transformá-los em íons fenoxidos, que são mais reativos, para isso, a reação de Fast Blue BB ocorre em meio alcalino (MEDINA, 2011).

Figura 7 Interações propostas do sal diazônio do FBBB com a perlagonidina



(MEDINA, 2011).

Foram detectados 2,91 mg EAG.g<sup>-1</sup> FF de compostos fenólicos totais nos extratos analisados. Não foram encontrados na literatura estudos utilizando o método de Fast Blue BB para determinação de compostos fenólicos em extratos de *Rubus idaeus*.

## 6.2. COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE FENÓLICOS TOTAIS POR FC E FBBB

O método de Folin-Ciocalteu é comumente utilizado para analisar o teor de fenólicos em matéria prima vegetal. Todavia, a interferência que esse ensaio pode sofrer de outras substâncias, como o ácido ascórbico, açúcares, amins aromáticas, ácidos orgânicos, dióxido de enxofre e até Fe (II) afeta a confiabilidade dos seus resultados (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

No intuito de obter resultados mais exatos, o método de Fast Blue BB foi desenvolvido para a determinação de fenólicos totais, não sofrendo interferência dos compostos previamente citados e tendo uma equivalência com ácido gálico maior quando comparado com o método de Folin-Ciocalteu (MEDINA, 2011).

O teor de compostos fenólicos do método de FBBB representou aproximadamente 25% do valor encontrado no ensaio de FC quando comparado ao FBBB. Um estudo realizado por Lester e colaboradores (2012), utilizando cultivares de morango, obteve também um valor menor no teor de compostos fenólicos com o método de FBBB, quando comparado com o método de FC.

Para avaliar a correlação entre as duas técnicas, foi aplicado o teste de correlação de Pearson. Como resultado foi verificada uma correlação significativa negativa ( $r = -0,39$ ) entre as duas técnicas.

### 6.3. TEOR DE ANTOCIANINAS TOTAIS EM FRUTOS DE FRAMBOESA

A determinação de antocianinas totais nos frutos de *Rubus idaeus* foi realizada com o método de pH diferencial, baseado na mudança estrutural das antocianinas frente a variação de pH do meio (LEE et al., 2005).

O conceito de determinar a quantidade de antocianinas monoméricas em um material foi primeiramente proposto em 1948, no qual a alteração estrutural era observada em pH 2,0 e 3,4 (SONDHEIMER; KERTESZ, 1948). Neste ensaio são utilizados valores de pH de 1,0 e 4,5 e a diferença de absorvância para esses pH distintos no comprimento de onda de 520 nm é proporcional a concentração do pigmento. No pH de menor valor, predomina a presença do cátio flávilio, de coloração avermelhada, enquanto no pH de maior valor, a pseudo-base incolor carbinol tem maior presença (FULEKI; FRANCIS, 1968)..

Para calcular o teor de antocianinas monoméricas totais nos frutos de framboesa, utilizou-se o coeficiente de absorvância molar da cianidina-3-glicosídeo, pelo fato dela ser a mais abundante em frutos de framboesa (CHEN et al., 2013).

Os resultados obtidos neste trabalho foram de 0,25 mg. g<sup>-1</sup> /100g FF de antocianinas monoméricas nos frutos analisados através do método de pH diferencial. Os valores de antocianinas podem variar entre 0,020 a 0,22 mg. g<sup>-1</sup> FF (REIN, 2005), sendo que estas variações são decorrentes dos métodos de extração aplicados ao fruto, como também possíveis variações de genótipos. Portanto, o teor encontrado neste trabalho está de acordo com os valores encontrados na literatura.

## 6.4. CAPACIDADE DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS LIVRES

A análise para determinar a capacidade de captação de radicais livres foi realizada utilizando o método espectrofotométrico de DPPH (SÁNCHEZ-MORENO et al., 1998).

### 6.4.1. DPPH

A capacidade de determinar a captação de radicais livres de determinados compostos pode ser realizada por um método que consiste da atividade sequestradora do radical livre DPPH\* (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) solubilizado em metanol. Por apresentar coloração púrpura e possuir absorvância máxima em 515 nm, este radical ao reagir com uma substância antioxidante forma o produto de coloração amarela difenil-picril-hidrazina, que não possui absorção no comprimento de 515 nm (BRAND-WILLIAMS; CUVÉLIER; BERSET, 1995).

Para determinar a concentração necessária para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH (EC<sub>50</sub>), os extratos foram analisados nas concentrações de 2,5, 1,25, 0,625, 0,312 e 0,156 mg.mL<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico, cuja equação da reta permitiu calcular o valor de EC<sub>50</sub>, que foi de 0,89 mg.mL<sup>-1</sup>.

Ao correlacionar o teor de compostos fenólicos com o valor de EC<sub>50</sub> foi detectado que há uma forte correlação negativa no método de FBBB ( $r = -0,95$ ), apontando que o aumento da concentração dos compostos fenólicos acarreta numa diminuição dos valores do EC<sub>50</sub>. O método de FC entretanto, apresentou uma correlação positiva moderada ( $r = 0,65$ ), mostrando que algum interferente presente no extrato propiciou um aumento no valores de EC<sub>50</sub> ao correlacionar com o método de FC. Ao comparar o EC<sub>50</sub> obtido pelo método DPPH com o resultado do pH diferencial, há uma correlação moderada e negativa ( $r = -0,64$ ), ou seja, mesmo com o aumento das antocianinas totais, não há uma redução nos valores de EC<sub>50</sub>.

Pode-se observar pela correlação de Pearson (Tabela 1) que o potencial de captação dos radicais livres pelos frutos de framboesa é proveniente de algum composto fenólico que não sejam as antocianinas. Outro ponto importante possível de ser observado pela correlação é que existe algum composto detectado pelo método de Folin-Ciocalteu que acarretou em um aumento do valor final do EC<sub>50</sub> pelo método de DPPH.

Tabela 1 Coeficientes de correlação de Pearson realizada entre os resultados obtidos nas análises do teor de compostos fenólicos (FC e FBBB), teor de antocianinas monoméricas totais (pH-D) e capacidade de captação de radicais livres (DPPH)

	DPPH
<b>FC</b>	0,65
<b>FBBB</b>	-0,95
<b>pH - D</b>	-0,64

## 6.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

Para avaliar a atividade biológica dos extratos dos frutos de *Rubus idaeus* L., foi determinada a citotoxicidade pelo ensaio colorimétrico da sulforrodamina B (VICHAI; KIRTIKARA, 2006) e a atividade anti-herpética por meio do ensaio de inibição da formação de placas de lise (DE LOGU et al., 2000).

### 6.5.1. Avaliação da citotoxicidade pelo ensaio colorimétrico de sulforrodamina B (SRB)

O ensaio colorimétrico de sulforrodamina B é um método *in vitro* utilizado para determinar a citotoxicidade de amostras e, fundamenta-se na capacidade do corante em ligar-se a componentes proteicos das células fixadas com ácido tricloroacético, possibilitando sua quantificação (VICHAI; KIRTIKARA, 2006) no comprimento de onda de 510 nm.

Neste trabalho foi investigada a citotoxicidade dos extratos de *Rubus idaeus* em células VERO, empregando uma faixa de onze concentrações (de 2500 a 2,44 µg/mL) diluídas na razão 1:2.

Após análise dos dados de viabilidade, foi possível verificar que nenhuma das concentrações testadas apresentou citotoxicidade frente às células VERO resultando em um valor de  $CC_{50} > 2500,0$  µg/mL. Confirmando a baixa citotoxicidade, Carvalho e colaboradores (2012) realizaram um experimento similar, utilizando cinco cultivares de morango (Aromas, Camarosa, Camino Real, Portola e San Andreas) com valores de  $CC_{50}$  que variaram de 19,99 mg/mL (cultivar Camino Real) à 14,46 mg/mL (San Andreas).

### 6.5.2. Avaliação do potencial antiviral pelo método de inibição da formação de placas de lise

Considerado como o padrão ouro para a análise quantitativa de infecções virais (HUDSON; TOWERS, 1999; JEFFERY; PILLAY, 2004). De metodologia relativamente

simples e precisamente quantitativa, baseia-se na habilidade que as partículas virais possuem de causar uma área de efeito citopático visível macroscopicamente. Após certo tempo, que varia de vírus para vírus, as regiões onde houve infecção viral formarão a chamada placa de lise, que é contada com o auxílio de um corante para a visualização e contagem das placas (CONDIT, 2007).

Neste trabalho foi investigado potencial antiviral de extratos de *Rubus idaeus* frente o vírus HSV-1 (cepa KOS), empregando cinco diluições, nas concentrações de 250,0 a 16,12 µg/mL (diluições 1:2).

Nos ensaios realizados, nenhuma das concentrações testadas apresentou capacidade de inibir 50% da infecção causada pelos vírus HSV-1 (cepa KOS) resultando em um  $CI_{50} > 250,0$  µg/mL.

Até o momento da conclusão desse trabalho, não foram encontrados relatos na literatura sobre a atividade anti-herpética dos frutos de *Rubus idaeus* L., não sendo possível assim, comparar aos resultados obtidos neste trabalho. Entretanto, um estudo realizado por Carvalho e colaboradores (2012) utilizando cinco cultivares de morango, mostrou a atividade frente ao vírus HSV-1, com valores de  $CI_{50}$  variando de 2,69 a 1,68 mg/mL e um índice de seletividade de 7,4 a 9,1 evidenciando que compostos fenólicos, em especial as antocianinas, possuem atividade frente ao HSV-1.

## 7. CONCLUSÕES

A quantificação do teor de compostos fenólicos no método de Folin-Ciocalteu foi de 12,17 mg EAG.g<sup>-1</sup> FF, enquanto que no ensaio por Fast Blue BB o resultado foi 2,91 mg EAG.g<sup>-1</sup> FF. Os teores de antocianinas monoméricas totais determinados pelo método do pH diferencial resultaram em 0,25 mg.g<sup>-1</sup>/100g FF, estando dentro dos valores de referência de artigos previamente publicados.

Quanto à capacidade em captar radicais livres, o radical DPPH demonstrou um  $EC_{50} =$

0,89 mg.mL<sup>-1</sup>. Nesse método, foi verificado uma maior correlação com os compostos fenólicos totais do que com as antocianinas.

No estudo realizado para avaliar a atividade biológica dos extratos de *Rubus idaeus*, o fruto não apresentou citotoxicidade relevante nas concentrações utilizadas ( $CC_{50} > 2500,0$  µg/mL). Da mesma forma, nos extratos dos frutos não apresentaram atividade antiviral frente ao vírus HSV-1 ( $CI_{50} > 250,0$  µg/mL) nas condições testadas.

## 8. REFERÊNCIAS

- ALSTYNE. Comparison of three methods for quantifying brown algal polyphenolic compounds. **Journal of chemical ecology**, v. 21, n.1, p. 45-58, 1995.
- ANCOS, Begoña de; GONZÁLEZ, Eva M.; CANO, M. Pilar. Ellagic Acid, Vitamin C, and Total Phenolic Contents and Radical Scavenging Capacity Affected by Freezing and Frozen Storage in Raspberry Fruit. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 48, n. 10, p.4565-4570, out. 2000.
- ANDERSON, James W. et al. Carbohydrate and Fiber Recommendations for Individuals with Diabetes: A Quantitative Assessment and Meta-Analysis of the Evidence. **Journal Of The American College Of Nutrition**, v. 23, n. 1, p.5-17, fev. 2004.
- ANGELO; JORGE. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Instituto Adolfo Lutz**, v. 66 n.1 p. 01-09, 2007
- AZZINI, Elena; GIACOMETTI, Jasminka; RUSSO, Gian Luigi. Antiobesity Effects of Anthocyanins in Preclinical and Clinical Studies. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity** v. 2017, p.1-11, 2017.
- BARROTE, I. Framboesa. **Divisão de apoio ao sector agroalimentar**. 2013.p. 1-17.
- BELLO-MORALES, R.; CRESPILO, A. J.; FRAILE-RAMOS, A., et al. Role of the small GTPase Rab27a during herpes simplex virus infection of oligodendrocytic cells. **BMC Microbiology**, v.12, p.265, 2012.
- BELWAL, Tarun et al. Dietary Anthocyanins and Insulin Resistance: When Food Becomes a Medicine. **Nutrients**, [s.l.], v. 9, n. 10, p.1111-1118, 12 out. 2017.
- BENVENUTI, S. et al. Polyphenols, Anthocyanins, Ascorbic Acid, and Radical Scavenging Activity of Rubus, Ribes, and Aronia. **Food Chemistry And Toxicology**. p. 164-169. 03 out. 2004.
- BEEKWILDER, Jules et al. Antioxidants in Raspberry: On-Line Analysis Links Antioxidant Activity to a Diversity of Individual Metabolites. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**. v. 53, n. 9, p.3313-3320, maio 2005.
- BORGES, Gina et al. Identification of Flavonoid and Phenolic Antioxidants in Black Currants, Blueberries, Raspberries, Red Currants, and Cranberries†. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p.3901-3909, 14 abr. 2010.
- BOWEN-FORBES, Camille S.; ZHANG, Yanjun; NAIR, Muraleedharan G.. Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. **Journal Of Food Composition And Analysis**, v. 23, n. 6, p.554-560, set. 2010.
- BRADY, R. C.; BERNSTEIN, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**, v.61, n.2, p.73-81, 2004.

- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.e.; BERSET, C.. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lwt - Food Science And Technology** v. 28, n. 1, p.25-30, jan. 1995.
- BRASIL. MARIA DO CARMO BASSOLS RASEIRA. . **Aspectos técnicos da cultura da framboeseira**. Pelotas: Embrapa, 2004. 14 p.
- BRAVO, Laura. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p.317-333, 27 abr. 2009.
- BRAVO, Karent; ALZATE, Fernando; OSORIO, Edison. Fruits of selected wild and cultivated Andean plants as sources of potential compounds with antioxidant and anti-aging activity. **Industrial Crops And Products**, v. 85, p.341-352, jul. 2016.
- BURTON-FREEMAN, Britt M; SANDHU, Amandeep K; EDIRISINGHE, Indika. Red Raspberries and Their Bioactive Polyphenols: Cardiometabolic and Neuronal Health Links. **Advances In Nutrition**, v. 7, n. 1, p.44-65, 1 jan. 2016.
- CARVALHO, Annelise et al. Anti HSV-1 Activity of Five Strawberry Cultivars. **Latin American Journal Of Pharmacy**. Florianópolis, p. 133-137. fev. 2012
- CASTAÑEDA-OVANDO, Araceli et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**. p. 859-871. 2009.
- CHAVES, Vitor C et al. Berries grown in Brazil: anthocyanin profiles and biological properties. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**. p. 4331-4338. ago. 2018.
- CHEN, Liang et al. Phytochemical properties and antioxidant capacities of commercial raspberry varieties. **Journal Of Functional Foods** v. 5, n. 1, p.508-515, jan. 2013.
- CHAVES, Vitor Clasen. **Caracterização química de frutos vermelhos cultivados no sul do Brasil e avaliação farmacológica de extrato de Rubus sp. em modelo animal de mania e neuroinflamação**. 2016. 169 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.
- CLIFFORD, Michael N; SCALBERT, Augustin. Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, v. 80, n. 7, p.1118-1125, 15 maio 2000.
- CONDIT, R.C. Principles of virology In: KNIFE, D.M.; HOWLEY, P.M. GRIFFIN, D.; LAMB, R.; MARIN, M.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. (Eds.). **Fields Virology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkings p. 25-57, 2007.
- DAUBENY, H. Brambles. Fruit breeding, v.2, p.109-190, 1996.
- DE CLERCQ, E. Antiviral chemotherapy in 2009: quo vadis? Future Medicine, v. 4, p. 313-315, 2009a.
- DEY; HARBORNE. Plant phenolics methods in plant biochemistry (2<sup>nd</sup> printing). London: Academic Press Limited. N.1, p. 326-341. 1993.

- FALCÃO, Leila D. et al. COPIGMENTAÇÃO INTRA E INTERMOLECULAR DE ANTOCIANINAS: UMA REVISÃO. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 2, p.351-366, 31 dez. 2003. Universidade Federal do Parana.
- FANG, Jim. Classification of fruits based on anthocyanin types and relevance to their health effects. **Nutrition**, v. 31, n. 11-12, p.1301-1306, nov. 2015.
- FIDRIANNY, Irda; SYIFA, Fadhila; INSANU, Muhamad. In vitro Antioxidant Profiles and Phytochemical Content of Different Organs of Strawberry (*Fragaria ananassa* Duchesne). **Asian Journal Of Scientific Research**. p. 241-248. 2019.
- FLESCHHUT, J. et al. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. **European Journal Of Nutrition**, v. 45, n. 1, p.7-18, 18 abr. 2005.
- FOLIN; CIOCALTEU. Tyrosine and tryptophane in proteins. **Journal of biological chemistry**, v.45, n.2, p. 7-18, 1927.
- FOLIN; DENIS. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. **Journal of Biological Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 239-243, 1912.
- FORSGREN, M.; KLAPPER, P. E. Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. In: (Ed.). Principles and Practice of Clinical Virology: Sixth Edition. ed.: John Wiley and Sons p. 95-131, 2009.
- FRUTAFINA, 2019. Página inicial. Disponível em <https://www.frutafina.com.br/>. Acesso em 27 de nov. De 2019
- FU, et al. Chemical composition and antioxidant activity of Chinese wild raspberry. **LWT – Food science and technology**, 2015. V.60 n.2, p. 1262-1268.
- GARLAND, S. M.; STEBEN, M. Genital herpes. Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology, v.28, n.7, p.1098-1110, 2014.
- GELLER, M.; SUCHMACHER NETO, M.; RIBEIRO, M. G. Herpes simples: atualização clínica, epidemiológica e terapêutica. J. Bras. Doenças Sex. Transm, v.24, p.260-266, 2012.
- HÄKKINEN. **Flavonols and phenolic acids in berries and berry products**. Tese de doutorado da University of Kuopio, 2000.
- HUDSON, J.; TOWERS, G.H.N. Phytomedicines as antivirals. **Drugs of the Future**, v.24, p. 295-320, 1999.
- HE, Jian; GIUSTI, Monica. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **The Annual Review Of Food Science And Technology**. p. 163-187. jan. 2010.
- JAKOBEB, et al. Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices. **Deutsche lebensmittelrundschau**, 2007. V. 103, n.2, p.52-58
- JEFERRY, K; PILLAY, D. Diagnostic Approaches In: ZUCKERMAN, A.J.; BANATVALA, J.E.;

- PATTISON, J.r.; GRIFFITHS, P.D.; SCHOUB, B.D. **Principles and Practice of Clinical Virology**. 2<sup>nd</sup> ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. P. 1-22.
- JUNQUEIRA-GONÇALVES, Maria et al. Isolation and Characterization of Phenolic Compounds and Anthocyanins from Murta (*Ugni molinae* Turcz.) Fruits. Assessment of Antioxidant and Antibacterial Activity. **Molecules**, v. 20, n. 4, p.5698-5713, 31 mar. 2015.
- KAUR, Sumeet; DAS, Madhusweta. Functional foods: An overview. **Food Science And Biotechnology**, v. 20, n. 4, p.861-875, ago. 2011. Springer Science and Business Media LLC.
- KOCA, Ilkay; KARADENIZ, Bulent. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. **Scientia Horticulturae**, v. 121, n. 4, p.447-450, ago. 2009.
- KONCZAK, Izabela; ZHANG, Wei. Anthocyanins—More Than Nature's Colours. **Journal Of Biomedicine And Biotechnology**, v. 2004, n. 5, p.239-240, 2004. Hindawi Limited
- KONG, Jin-ming et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p.923-933, nov. 2003.
- LANI, Rafidah et al. Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. **Antiviral Research**, v. 133, p.50-61, set. 2016.
- LEE J, DURST RW AND WROLSTAD RE, Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **J AOAC Int.** p 1269-1278. 2006.
- LEE, Ji-hye et al. Antiviral effects of black raspberry (*Rubus coreanus*) seed extract and its polyphenolic compounds on norovirus surrogates. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, v. 80, n. 6, p.1196-1204, 17 mar. 2016a.
- LEE, Ji-hye et al. Antiviral Effects of Black Raspberry (*Rubus coreanus*) Seed and Its Gallic Acid against Influenza Virus Infection. **Viruses**, v. 8, n. 6, p.157-169, 6 jun. 2016b.
- LOGU, Alessandro de et al. Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. **Antiviral Research**. p. 177-185. dez. 2000.
- LUDWIG, Iziar A. et al. New insights into the bioavailability of red raspberry anthocyanins and ellagitannins. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 89, p.758-769, dez. 2015. Elsevier BV.
- MATHIAS. Framboesa. **Globo Rural**, 2015. Disponível em <http://www.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC1602263-4529,00.html>. Acessado em 06 nov. 2019
- MAZZA, Giuseppe. Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains. United States of America: CRC Press Inc., 10 Jan. 2018.
- MARO, Luana Aparecida Castilho et al. Ciclo de produção de cultivares de framboeseiras (*Rubus idaeus*) submetidas à poda drástica nas condições do sul de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 2, p.435-441, jun. 2012.

- MCALLISTER, S. C.; SCHLEISS, M. R. Prospects and perspectives for development of a vaccine against herpes simplex virus infections. *Expert Review of Vaccines*, v.13, n.11, p.1349-1360, 2014.
- MEDINA, A. L.; HAAS, L. I. R.; CHAVES, F. C. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v.128, n.4, p.916-922, 2011.
- MEDINA, Marjorie B.. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. **Journal Of Functional Foods**,v. 3, n. 2, p.79-87, abr. 2011.
- MILLER, Nicholas J. et al. A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. **Clinical Science**, v. 84, n. 4, p.407-412, abr. 1993.
- MORRISON; BOYD. "Diazonium salts" and "Phenols". **Organic Chemistry**; Allyn and Bacon, Inc.: Boston, MA, 1969; pp 772-821
- MOURA, Pedro Henrique Abreu et al. Fenologia e produção de cultivares de framboeseiras em regiões subtropicais no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 12, p.1714-1721, dez. 2012.
- NEWMAN, David J; M, Cragg G. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal Of Natural Products**. p. 629-661. mar. 2016.
- NILE, Shivraj Hariram; PARK, Se Won. Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. **Nutrition**,, v. 30, n. 2, p.134-144, fev. 2014
- OLIVEIRA, Pathise Souto et al. Southern Brazilian native fruit shows neurochemical, metabolic and behavioral benefits in an animal model of metabolic syndrome. **Metabolic Brain Disease**. p. 1551-1562. 29 maio 2018.
- PADILHA, Patricia de Carvalho; PINHEIRO, Rosilene de Lima. O Papel dos Alimentos Funcionais na Prevenção e Controle do Câncer de Mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 50, p.251-260, 21 jun. 2004.
- PAGOT, E.; HOFFMANN, A. Produção de pequenas frutas no Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PEQUENAS FRUTAS, 1, 2003., Vacaria. Anais... Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. 64 p. (Embrapa Uva e Vinho. Documentos, 37).
- PASCUAL-TERESA, Sonia de; SANCHEZ-BALLEST, Maria Teresa. Anthocyanins: from plant to health. **Phytochem Rev**,p. 281-289. 31 out. 2008.
- PRIOR, Ronald L.; WU, Xianli; SCHAICH, Karen. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p.4290-4302, maio 2005.
- RASEIRA, Maria do Carmo Bassols et al. **Aspectos técnicos da cultura da framboeseira**. 120. ed. Florianópolis: Embrapa, 2004.

- REIN. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins, 2005.
- IO, Daniele del; BORGES, Gina; CROZIER, Alan. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. **British Journal Of Nutrition**, v. 104, n. 3, p.67-90, out. 2010.
- ROIZMAN, B.; KNIPE, D.; WHITLEY, R. Herpes simplex viruses, p 2501–2601. *Fields virology*, v.2, 2007.
- ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M.; WHITLEY, R. J. Herpes simplex viruses. In: (Ed.). *Fields Virology: Sixth Edition*. ed.: Wolters Kluwer Health Adis (ESP), v.1, 2013.
- ROTTINGHAUS, S. T.; WHITLEY, R. J. Current non-AIDS antiviral chemotherapy. Expert review of anti-infective therapy, v.5, n.2, p.217-230, 2007.
- SÁNCHEZ-MORENO C, LARRAURI JA AND SAURA-CALIXTO F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **J Sci Food Agric**. p 270-276, 1998.
- SCHUPPE, H. C.; MEINHARDT, A.; ALLAM, J. P., et al. Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? *Andrologia*, v.40, n.2, p.84- 91, 2008
- SEO, Dong Joo et al. Comparison of the antiviral activity of flavonoids against murine norovirus and feline calicivirus. **Food Control**, v. 60, p.25-30, fev. 2016
- SEERAM, Navindra P. et al. Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry, and Strawberry Extracts Inhibit Growth and Stimulate Apoptosis of Human Cancer Cells In Vitro. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 54, n. 25, p.9329-9339, dez. 2006.
- SILVA, Carlos H Blum da et al. Anti HSV-1 Activity of Five Strawberry Cultivars. **Latin American Journal Of Pharmacy**.p. 133-137. 2012.
- SILVA, Beatriz Vieira da; BARREIRA, João C.m.; OLIVEIRA, M. Beatriz P.p.. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. **Trends In Food Science & Technology**, v. 50, p.144-158, abr. 2016.
- SINGLETON, V. L, ORTHOFER R. AND LAMUELA-RAVENTÓS RM, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent.
- STEINER, I.; KENNEDY, P. G.; PACHNER, A. R. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *The Lancet - Neurology*, v.6, n.11, p.1015-1028, 2007.
- SOUZA, Vanessa Rios de et al. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, v. 156, p.362-368, ago. 2014.
- STANIMIROVIC, Julijana et al. A high fat diet induces sex-specific differences in hepatic lipid metabolism and nitrite/nitrate in rats. **Nitric Oxide**, v. 54, p.51-59, abr. 2016.

- SUDA, Takanori et al. Dietary Cyanidin 3-O- $\beta$ -D-Glucoside-Rich Purple Corn Color Prevents Obesity and Ameliorates Hyperglycemia in Mice. **The Journal Of Nutrition**, v. 133, n. 7, p.2125-2130, 1 jul. 2003
- TENG, Hui et al. Red raspberry and its anthocyanins: Bioactivity beyond antioxidant capacity. **Trends In Food Science & Technology**.p. 153-165. ago. 2017.
- USDA. 2011. U.S. Department of Agriculture. National Nutrient Database for Standard Reference – Raw Raspberries, Release 24.
- VALDIVIESSO, et al. A planta de framboesa: morfologia e fisiologia. 2007. p. 1-38
- VICHAI, Vanicha; KIRTIKARA, Kanyawim. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**. p. 1112-1116. 17 ago. 2006.
- VIZZOTTO, Márcia et al. Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em diferentes genótipos de amora-preta (*Rubus* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. p. 853-858. set. 2012.
- WILSON; WHELEN. The evolution of fruit color in fleshy-fruited plants. **Am.Nat.** 136, p. 790-809.
- WHITLEY, Richard J; ROIZMAN, Bernard. Herpes simplex virus infections. **The Lancet**,v. 357, n. 9267, p.1513-1518, maio 2001.
- YILDIZ, Önder; EYDURAN, Sadiye Peral. Functional components of berry fruits and their usage in food technologies. **Academic Journals**. p. 422-426. maio 2009.
- ZAFRA-STONE, Shirley et al. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health
- ZANDI, Keivan et al. Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. **Virology Journal**, v. 8, n. 560, p.1-11, 2011.