

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Centro de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

LUCIANE ANITA SAVI

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E DAS ATIVIDADES
ANTI-HERPÉTICA E ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS FENÓLICOS**

Florianópolis

2004

LUCIANE ANITA SAVI

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E DAS ATIVIDADES
ANTI-HERPÉTICA E ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS FENÓLICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões

Florianópolis

2004

LUCIANE ANITA SAVI

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E DAS ATIVIDADES
ANTI-HERPÉTICA E ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS FENÓLICOS**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Saúde, e aprovada em sua forma final pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 26 de Fevereiro de 2004.

Profª. Dra. Célia Regina Monte Barardi
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

BANCA EXAMINADORA:

Profª. Dra. Lucia Regina Ribeiro (UNESP/Botucatu/SP)
Membro

Profª. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa (CIF/CCS/UFSC)
Membro

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti (MIP/CCB/UFSC)
Membro

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Aplicada, coordenado pelas Professoras Dra. Cláudia Maria Oliveiras Simões (Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS) e Dra. Célia Regina Monte Barardi (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, CCB), e no Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas, coordenado pela Professora Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa (Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha existência e por permitir estar dando mais uma passo em minha vida.

Aos meus pais Luiz Narciso e Sueli, pela vida e pelo eterno e incansável apoio.

Aos meus familiares, em especial à minha irmã, Ledijane, pelo incentivo e compreensão da minha ausência.

À professora Cláudia Maria Oliveira Simões, pela confiança, orientação, pelos ensinamentos e conselhos, pela amizade e principalmente por me levar a compreender o verdadeiro sentido das palavras *dedicação e ciência*.

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

À professora Tânia Beatriz Creczynski-Pasa, pela valiosa orientação e por sua inestimável colaboração nesse trabalho.

Aos professores Mário Steindel, Edmundo Grisard, Carlos Pinto, Sônia Carobrez, Aguinaldo Pinto e Carlos Zanetti, pela orientação, amizade, apoio e pela maravilhosa convivência.

Aos colegas Paulo César Leal, Rober Rosso e Tiago Opala Vieira, pela disponibilidade e pelo precioso auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas de laboratório pelo companheirismo, especialmente aos queridos amigos Alexandre, Aline, Márcia, Javier, Danielle, Thaís, Larissa, Juliana, Leonardo e Fabiana, pelo incentivo e inesquecível convívio.

À todas as pessoas que contribuíram no desenvolvimento desse trabalho, os quais, direta ou indiretamente, participaram da minha formação como profissional e ser humano, o meu muito obrigado,

Luciane
Florianópolis, 2004.

*“ It is not the strongest of the species that survive,
nor the most intelligent, but the one
most responsive to change.”*

Charles Darwin

RESUMO

Os compostos fenólicos (CF) são substâncias presentes numa grande variedade de plantas. Eles podem atuar nos vegetais como antioxidantes, antimicrobianos, fotorreceptores, atraentes visuais e repelentes de predadores. Muitos estudos mostraram que os CF possuem inúmeras atividades farmacológicas, incluindo ações vasodilatadora, antialérgica, antiinflamatória, antiviral, entre outras. Contudo, o maior interesse nos CF diz respeito à sua atividade antioxidante, a qual é devida a capacidade em captar e reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS). Sugere-se que a presença de EROS em células infectadas por vírus está relacionada à apoptose, de forma a deter a infecção. Neste trabalho, a citotoxicidade e a atividade anti-herpética (HSV-1, cepas KOS e 29-R) de vários CF foram avaliadas, em células VERO, pelo ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT); a viabilidade celular pelo método de exclusão do corante azul de Trypan; a genotoxicidade pelo ensaio do Cometa; e a atividade antioxidante pela habilidade de captar o radical DPPH e inibir a peroxidação lipídica. Os resultados mostraram que os CF testados apresentaram atividade anti-herpética com índices de seletividade que variaram de 0,88 a 33,52, dependendo da cepa viral utilizada. Com exceção da epigalocatequina, galato de cetila, floroacetofenona e quercetina, todos os outros CF apresentaram algum nível de genotoxicidade, estatisticamente significante ($p < 0,05$, teste *t*-Student). Com relação à ação antioxidante, os CF apresentaram uma considerável atividade, com exceção do 1,3,5-trihidróxibenzeno, ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico, 4-metóxiacetofenona, 3,4,5-trimetóxiacetofenona, 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila e floroacetofenona. Através dos resultados obtidos, foram, ainda, estabelecidas algumas possíveis relações estrutura-atividade. Foi observado que a presença e localização das hidroxilas nas moléculas influenciam sua genotoxicidade, atividades antioxidante e antiviral. Contudo, tais hidroxilas podem provocar danos ao DNA devido à sua interação com metais de transição, naturalmente presentes no meio de cultura suplementado com soro fetal bovino e no organismo, o que explicaria a genotoxicidade detectada.

Palavras-chave: compostos fenólicos; citotoxicidade; genotoxicidade; antiviral; vírus herpes simplex tipo 1; antioxidante; ensaio com MTT; ensaio do Cometa; radical DPPH; peroxidação lipídica.

ABSTRACT

Phenolic compounds (PC) are substances present on a wide range of plants. They can act in vegetables as antioxidants, antimicrobials, photoreceptors, visual attractors and feeding repellants. Many studies show that PC exhibit a great range of pharmacological activities, including vasodilating actions, antiallergenic, anti-inflammatory, antiviral, among others. However, most interest has been devoted to the antioxidant activity of PC, which is due to their ability to scavenge and reduce oxygen reactive species (ORS) formation. It is suggested that the presence of ORS in virus infected cells is related to apoptosis, blocking the spreading of the viral infection. In this study, the cytotoxicity and the anti-herpetic (HSV-1, KOS and 29-R strains) activity of various PC were studied by MTT colorimetric assay; the cell viability by Trypan blue dye exclusion method; the genotoxicity by Comet assay; and the antioxidant activity by DPPH radical scavenging ability and lipid peroxidation inhibition. The results show that the PC tested have anti-herpetic activity with selective indexes varying from 0,88 to 33,52, depending on the viral strain used. Except for epigallocatechin, cetyl gallate, floroacetophenone and quercetin, all PC present statistically significant ($p < 0,05$, *t*-Student tested) genotoxicity. Considering the antioxidant action, PC show considerable activity, excepting 1,3,5-trihydroxybenzen, 3,4,5-trimetoxibenzoic acid, 4-metoxiacetophenone, 3,4,5-trimetoxiacetophenone, ethyl 3,4,5-trimetoxibenzoat and floroacetophenone. Nevertheless, the results obtained, allowed to establish some possible structure-activity relationship. It was observed that the presence and the site of hydroxyl groups in molecules possibly influence their genotoxicity, antioxidant and antiviral activities. However, that hydroxyl groups can induce DNA damage, due transitional metals interactions, naturally, presents in culture medium supplemented with serum and organism, possibly explaining the genotoxicity detected.

Key-words: phenolic compounds; cytotoxicity; genotoxicity; antiviral; herpes simplex virus type 1; antioxidant; MTT assay; Comet assay; DPPH radical; lipid peroxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia do vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1)	24
Figura 2: Núcleo fundamental dos flavonóides	32
Figura 3: Monômeros básicos dos taninos condensados	33
Figura 4: Estrutura do radical 1,1difetil-2-picrilhidrazil (DPPH)	49
Figura 5: Diferenciação das classes dos cometas	73
Figura 6: Resultados da determinação da citotoxicidade dos compostos fenólicos selecionados, em células VERO, através do ensaio colorimétrico com MTT	82
Figura 7: Resultados da determinação da atividade anti-herpética dos compostos fenólicos selecionados, em células VERO infectadas com o vírus HSV-1 (cepas KOS e 29-R), através do ensaio colorimétrico com MTT	86
Figura 8: Índices de seletividade dos compostos fenólicos selecionados, em relação ao vírus HSV-1, cepa KOS e 29-R	90
Figura 9: Resultados da avaliação da genotoxicidade dos compostos fenólicos selecionados frente às células VERO, tratadas com duas diferentes concentrações (C1 e C2), pelo Ensaio do Cometa	98
Figura 10: Resultados da determinação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos selecionados, através da capacidade de captar os radicais livres DPPH e da capacidade de inibir a peroxidação lipídica (TBARS)	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vírus herpéticos humanos	23
Tabela 2: Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico	31
Tabela 3: Concentração das amostras utilizadas para a avaliação da genotoxicidade através do Ensaio do Cometa	70
Tabela 4: Resultados da determinação da citotoxicidade dos compostos fenólicos selecionados, em células VERO, através do ensaio colorimétrico com MTT	82
Tabela 5: Resultados da determinação da atividade anti-herpética dos compostos fenólicos selecionados, em células VERO infectadas com o vírus HSV-1 (cepas KOS e 29-R), através do ensaio colorimétrico com MTT	86
Tabela 6: Índices de seletividade dos compostos fenólicos selecionados, em relação ao vírus HSV-1, cepa KOS	90
Tabela 7: Índices de seletividade dos compostos fenólicos selecionados, em relação ao vírus HSV-1, cepa 29-R	92
Tabela 8: Resultados da determinação da viabilidade das células VERO tratadas com os compostos fenólicos selecionados, através do teste de exclusão com azul de Trypan	95
Tabela 9: Resultados da avaliação da genotoxicidade dos compostos fenólicos selecionados frente às células VERO, tratadas com duas diferentes concentrações (C1 e C2)	98
Tabela 10: Resultados da determinação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos selecionados, através da capacidade de captar os radicais livres DPPH	106

Tabela 11: Resultados da determinação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos selecionados, através da capacidade de inibir a peroxidação lipídica, usando o teste de TBARS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Pesquisa de fármacos a partir de produtos naturais	17
2.1.2 Fármacos antivirais de origem natural	18
2.2 Vírus	21
2.2.1 Vírus herpético humano do tipo 1	22
2.2.2 Ciclo de multiplicação dos vírus herpéticos	25
2.2.3 Diagnóstico da infecção herpética	26
2.2.4 Terapia anti-herpética (HSV-1 e 2) disponível	26
2.3 Compostos fenólicos	29
2.3.1 Definição	29
2.3.2 Distribuição	30
2.3.3 Biossíntese	30
2.3.4 Localização nos vegetais	31
2.3.5 Classificação química	31
2.3.6 Propriedades farmacológicas	34
2.4 Atividade anti-herpética de compostos fenólicos	38
2.5 Genotoxicidade de compostos fenólicos	41
2.6 Estresse oxidativo	45
2.6.1 Espécies reativas de oxigênio	45
2.6.2 Atividade de captação de espécies reativas de oxigênio	48
2.6.3 Peroxidação lipídica	49

2.7 Atividade antioxidante de compostos fenólicos	51
3. OBJETIVOS	57
4. MATERIAIS E MÉTODOS	58
4.1 Culturas celulares	58
4.1.1 Células	58
4.1.2 Meio de cultura e outros reativos	58
4.2 Vírus	59
4.2.1 Origem das cepas	59
4.2.2 Preparação das suspensões-estoques virais	59
4.2.3 Determinação do título infeccioso viral	60
4.3 Compostos fenólicos testados	62
4.3.1 Preparação das soluções-mãe	65
4.4 Avaliação da citotoxicidade	66
4.4.1 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)	66
4.5 Avaliação da potencial atividade antiviral <i>in vitro</i>	67
4.5.1 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)	67
4.6 Avaliação da genotoxicidade através do Ensaio do Cometa	68
4.6.1 Preparação da suspensão celular	69
4.6.2 Preparação das lâminas	71
4.6.3 Lise celular	71
4.6.4 Tratamento alcalino e eletroforese	72
4.6.5 Neutralização	72
4.6.6 Coloração	72
4.6.7 Análise dos cometas	73

4.6.8	Análise estatística	74
4.6.9	Avaliação da viabilidade celular	74
4.7	Avaliação da atividade antioxidante de compostos fenólicos	75
4.7.1	Ensaio de captação do radical livre DPPH	75
4.7.2	Avaliação da peroxidação lipídica	76
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.1	Avaliação da citotoxicidade	79
5.2	Avaliação da atividade antiviral <i>in vitro</i>	84
5.3	Avaliação da genotoxicidade	93
5.4	Avaliação da atividade antioxidante	103
5.4.1	Ensaio de captação do radical livre DPPH	104
5.4.2	Avaliação da peroxidação lipídica	109
5.5	Determinação das possíveis correlações entre as atividades detectadas	112
5.5.1	Atividade antioxidante <i>x</i> atividade anti-herpética	112
5.5.2	Atividade antioxidante <i>x</i> genotoxicidade	113
5.5.3	Atividade antioxidante <i>x</i> genotoxicidade <i>x</i> atividade anti-herpética	114
6.	CONCLUSÕES	116
7.	PERSPECTIVAS	120
8.	REFERÊNCIAS	122

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa de novos fármacos passou por significativos avanços nos últimos anos, principalmente depois da introdução de modelos biológicos realizados *in vitro* e em grande escala, os quais podem avaliar várias amostras, em um curto período de tempo, permitindo a realização de várias repetições dos experimentos e propiciando uma análise estatística consistente dos resultados (HOUGHTON, 2000).

A busca de novos agentes farmacologicamente ativos, através da triagem de fontes naturais, tem levado à descoberta de muitos fármacos úteis clinicamente e que desempenham um importante papel no tratamento de várias doenças humanas (CRAGG et al., 1997).

Os produtos naturais, incluindo os do reino vegetal, constituem uma fonte inesgotável de compostos com promissora atividade antiviral, não apenas pelo grande número de espécies vegetais com propriedades medicinais inexploradas, mas principalmente pela variedade de metabólitos sintetizados. Sendo assim, os produtos naturais continuarão a oferecer novas opções de agentes terapêuticos, mesmo com os importantes avanços tecnológicos, que propiciam o desenvolvimento de novos fármacos (CHE, 1991; HUDSON, 1993; HARVEY, 1999; ABAD et al., 2000).

O atual interesse sobre os compostos fenólicos (CF), que estão presentes em grande quantidade em frutas, vegetais, chás e vinhos tintos, deve-se a uma clara correlação epidemiológica entre o consumo desses na dieta e um baixo risco de desenvolvimento de doenças degenerativas, como câncer e doenças cardiovasculares, devido à atividade antioxidante dessas substâncias. A atividade antioxidante de alguns CF também tem sido relacionada às suas propriedades antiviral, antimutagênica, antilipoperoxidante e antiinflamatória (COS et al., 2000).

Além da atividade antioxidante, é importante considerar que alguns compostos, dependendo de condições específicas, podem atuar como pró-oxidantes, promovendo danos oxidativos ao DNA, lipídeos, proteínas e carboidratos (COS et al., 2000).

No que diz respeito à potencial atividade antiviral dos CF, presume-se que eles poderiam atuar através da associação com proteínas das partículas virais e/ou das superfícies das células hospedeiras, resultando na redução ou prevenção da adsorção viral (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGUE, 1997).

Os vírus herpéticos desenvolvem latência em células e podem ser ativados por vários estímulos como estresse, febre, traumas, mudanças hormonais e radiação ultra-violeta, situações essas em que caracteriza estresse fisiológico e, possivelmente, estresse oxidativo (LUPI; PEREIRA JR., 2000).

Buscando correlacionar atividade antiviral *versus* atividade antioxidante, Skulachev (1998) elaborou uma hipótese que sugere que a elevação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) em infecções virais seja uma resposta bioquímica das células infectadas, como forma de adaptação, levando ao processo apoptótico, ou seja, à morte celular programada, como forma de deter o processo infeccioso. No entanto, tal envolvimento parece ser mais complexo, já que inclui regulações metabólicas tanto do metabolismo do hospedeiro quanto da replicação viral, de forma que o efeito de fármacos antioxidantes em infecções virais necessita ser melhor estudado (PETERHANS, 1997).

Adicionalmente, estudos relataram o efeito antioxidante de CF na proteção de danos ao DNA, gerados por EROS, visualizado pelo Ensaio do Cometa (ANDERSON et al., 1994; DUTHIE; DOBSON, 1999) e mostraram que a auto-oxidação dos CF pode aumentar a produção de EROS (ANDERSON et al., 1994; DUARTE et al., 1999). Portanto, é importante conhecer a extensão dos danos oxidativos causados ao DNA celular, no estudo de potenciais atividades farmacológicas de novos compostos, independentemente de sua origem.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pesquisa de fármacos a partir de produtos naturais

Fármacos de origem natural são a base de muitos medicamentos, atualmente, disponíveis no mercado, e isso se deve à grande diversidade química desses produtos. Deles podem ser retiradas substâncias ativas que, quando modificadas estruturalmente, tornam-se mais eficazes e/ou menos tóxicas, ou então, que podem ser utilizadas como protótipos de fármacos sintéticos com atividades farmacológicas semelhantes às originais (MACMAHON et al., 1995; HOUGHTON, 1996; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; NIELSEN, 2002).

Harvey (1999) afirmou que os produtos naturais são uma fonte importante de novos agentes terapêuticos, mesmo com os avanços tecnológicos, tais como os da área de biologia molecular e os computacionais, que propiciam o desenvolvimento de fármacos, principalmente, porque apenas uma pequena fração da biodiversidade global já foi avaliada do ponto de vista farmacológico. Outras vantagens da pesquisa de produtos naturais como fonte de novos fármacos são a diversidade estrutural dos mesmos, muito maior que a fornecida pela maioria das técnicas de química combinatória; a pequena dimensão da maioria das moléculas de origem natural, podendo ser facilmente absorvidas e metabolizadas; o fato de ocorrerem, em geral, como membros de uma família de compostos relacionados, possibilitando o isolamento de inúmeros homólogos e a obtenção de informações sobre as relações de estrutura-atividade.

Cragg, Newman e Snader (1997) estimaram, num estudo publicado pelo *National Cancer Institute* (NCI, EUA), que mais de 60% dos fármacos anti-infecciosos e antitumorais, aprovados ou em processo de aprovação, no período de 1983-1994, são de origem natural, sendo classificados como tal aqueles verdadeiramente de origem natural, aqueles derivados da

semi-síntese de produtos naturais, e fármacos sintéticos que tiveram um produto natural como modelo. Os autores afirmaram, ainda, que o alto índice de novos fármacos de origem natural, aliado à contínua ameaça à biodiversidade através da destruição de ecossistemas terrestres e marinhos, constitui um poderoso argumento para a expansão da pesquisa de produtos naturais como fonte de novos agentes farmacologicamente ativos.

2.1.2 Fármacos antivirais de origem natural

O desenvolvimento da quimioterapia antiviral tem crescido nos últimos anos juntamente com o conhecimento sobre compostos com atividade antiviral e seus mecanismos de ação. Este, porém, é ainda bastante incipiente, se comparado aos avanços da quimioterapia antimicrobiana (KÖNIG; DUSTMANN, 1985; VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGUE, 1997).

Em contraste com a enorme quantidade de fármacos antibacterianos e antifúngicos, encontram-se disponíveis somente alguns poucos fármacos antivirais efetivos. Uma das principais razões para a falta de sucesso no desenvolvimento de fármacos antivirais é, principalmente, a natureza dos vírus, os quais possuem uma estrutura extremamente simples e um sistema enzimático restrito, sendo totalmente dependentes dos processos metabólicos celulares para sua multiplicação e sobrevivência. Desta forma, agentes que inibem ou causam a morte de vírus, exibem também um certo grau de toxicidade às células hospedeiras. O compromisso com a especificidade pelas células infectadas, a eficácia e um baixo nível de toxicidade são indispensáveis e, destes problemas, advém a escassez de medicamentos antivirais (VLIETINCK, 1987; VANDEN BERGUE; VLIETINCK, 1991; WHITE; FENNER, 1994; VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGUE, 1997).

A terapia antiviral atual é composta por mais de 30 fármacos oficialmente aprovados, e alguns outros que estão em processo de aprovação. A maioria deles foi aprovada nos últimos oito anos e, pelo menos metade desses fármacos, é usada no combate ao vírus HIV. Os demais fármacos são usados contra o vírus da hepatite B, vírus influenza e os vírus herpéticos, incluindo nessa classe o vírus da varicela zoster, o citomegalovírus e os vírus herpes simplex. As infecções herpéticas estão presentes em 60-95% da população humana e, portanto, necessitam de uma terapia constantemente atualizada (DE CLERCQ, 2001; BRADY; BERNSTEIN, 2004).

A terapia anti-herpética disponível, atualmente, compõe-se basicamente de medicamentos à base de aciclovir, valaciclovir, penciclovir, fanciclovir, trifluridina (DE CLERCQ, 2001; BRADY; BERNSTEIN, 2004), idoxuridina, brivudina (DE CLERCQ, 2001), vidarabina, docosanol (BRADY; BERNSTEIN, 2004), preferencialmente, para infecções causadas pelos vírus herpéticos dos tipos 1 e 2 (HSV-1 e 2) e varicela zoster, e de ganciclovir, cidofovir, foscarnet (DE CLERCQ, 2001) para infecções provocadas pelo citomegalovírus (CMV) e HSV-1 e 2, e fornivirsen e maribavir (DE CLERCQ, 2001), exclusivos para a inibição do CMV. As infecções resistentes ao aciclovir são tratadas, preferencialmente, com foscarnet e cidofovir (DE CLERCQ, 2001; BRADY; BERNSTEIN, 2004) e as resistentes ao aciclovir e foscarnet são tratadas com cidofovir (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

No entanto, a crescente resistência dos vírus herpéticos aos fármacos antivirais já existentes, especialmente, em pacientes imunocomprometidos, aumenta a necessidade do desenvolvimento de fármacos com diferentes mecanismos de ação. Neste sentido, é bastante preocupante a possibilidade de que estas novas cepas resistentes sejam disseminadas de pacientes imunocomprometidos para pacientes imunocompetentes e sadios (FIELD; BIRON, 1994).

Há, portanto, uma grande necessidade de não apenas melhorar a atual quimioterapia antiviral, mas também encontrar novos compostos efetivos contra as infecções virais, e que apresentem, ao mesmo tempo, menor toxicidade às células hospedeiras (CHE, 1991).

Em geral, existem duas categorias de agentes antivirais: aqueles com ação indireta, incluindo imunomoduladores como os interferons ou indutores desses e vacinas, que estimulam o mecanismo de defesa das células hospedeiras; e aqueles com ação direta, que são os agentes virucidas e os compostos que agem em etapas específicas do processo de replicação viral (CHE, 1991). Os agentes antivirais diretos interferem num ou mais processos dinâmicos da replicação viral e são, conseqüentemente, candidatos a fármacos antivirais com aplicação clínica, enquanto que as substâncias virucidas inativam os vírus extracelularmente e são então candidatos a anti-sépticos, possuindo um amplo espectro de atividade germicida (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGUE, 1997).

Com relação à atividade antiviral de produtos naturais, eles podem interferir em muitos alvos virais, desde a adsorção do vírus à célula hospedeira até sua liberação, o que pode resultar em mecanismos de ação complementares àqueles dos fármacos antivirais disponíveis. Muitos agentes antivirais derivados de plantas são candidatos a uso pelo seu potencial em terapia sistêmica e/ou profilaxia de infecções herpéticas, sendo que alguns podem ser úteis como agentes tópicos ou como adjuvantes em combinação com outros fármacos antivirais (VLIETINCK et al., 1997; VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGUE, 1997).

Vários produtos derivados do metabolismo vegetal 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), flavonóides (SIMÕES et al., 1990; AMOROS; SIMÕES; GIRRE, 1992; BURKE et al., 1995; ROBIN, 1998; SHAHAT et al., 1998 e 2002), cumarinas

(HUDSON et al., 1993; HOUGHTON, 1996), compostos fenólicos (VANDEN BERGHE, et al, 1986; CHE, 1991; HAYASHI, 2001; ABDEL-KADER, 2001; CHIANG et al., 2002; TOYOKUNI et al., 2003), taninos (FERREA et al., 1993; ERDELMEIER, 1996), saponinas (SIMÕES et al., 1990; SIMÕES; AMOROS; GIRRE, 1999), quinonas (HUDSON et al., 1993; DIWU, 1995), terpenos (DARGAN, 1986) e lignanas (MACRAE; HUDSON; TOWERS, 1988; CHARLTON, 1998), entre outros.

2.2 Os vírus

Vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, que necessitam da atividade metabólica e das organelas da célula hospedeira para produção de energia e síntese de macromoléculas, ou seja, para sua multiplicação. Eles contêm apenas um tipo de material genético (RNA ou DNA) e seu material de reserva constitui-se apenas de proteínas ou glicogênio. Essas entidades infecciosas consistem de um genoma DNA ou RNA, acondicionado num *capsídeo* protéico, que pode ou não ser circundado por uma membrana de revestimento, o *envelope*. O material nucléico recoberto por proteína é denominado *nucleocapsídeo*. O termo *vírion* serve para designar partículas virais completas, potencialmente infecciosas, formadas na última fase da replicação viral. O capsídeo é composto por um número definido de unidades morfológicas, os *capsômeros*. A montagem dos vírus é definida pela natureza das ligações formadas entre os capsômeros individuais, o que confere a simetria do capsídeo, podendo esta ser helicoidal, icosaédrica ou mista (VOYLES, 1993).

Os vírus são capazes de reconhecer e de penetrar em células-alvo apropriadas, principalmente, pela especificidade dos receptores existentes na superfície dessas células hospedeiras e dos próprios vírus. O conjunto de eventos que vão desde a penetração do genoma viral na célula até a liberação dos vírions, é chamado de ciclo de multiplicação viral.

A forma pela qual o vírus realiza as etapas do seu ciclo de multiplicação é determinada pela estrutura do genoma [se DNA ou RNA; se RNA positivo (+) ou negativo (-)] e da estrutura do próprio vírion a ser replicado. As principais etapas de multiplicação de um vírus qualquer podem ser resumidas numa fase inicial, com fixação do vírus à célula hospedeira, penetração e desnudamento (decapsidação) da partícula, e uma fase tardia, que vai desde a síntese macromolecular até a montagem e liberação dos vírions (WHITE; FENNER, 1994).

2.2.1 Vírus herpético humano do tipo 1

Os vírus herpéticos são altamente disseminados na natureza. Aproximadamente 100 vírus da família Herpesviridae foram caracterizados, sendo que existem oito vírus herpéticos humanos (Tabela 1). Além disso, o vírus herpético B de macacos pode também infectar o homem causando encefalite mortal (ROIZMAN, 1996; DA SILVA, 2000).

O HSV-1 pertence à subfamília Alphaherpesvirinae, apresentando propriedades biológicas de crescimento rápido, lise das células infectadas e estabelecimento de infecções latentes em gânglios nervosos sensoriais. O fato do próprio vírus herpético codificar as principais enzimas necessárias à replicação do DNA viral, mantendo um grau de virulência suficiente para não ser subjugado pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, faz com que sua sobrevivência em células neurais (permanentes), que não replicam DNA e não se dividem, constitua um fato bastante provável de ocorrer (WHITE; FENNER, 1994; LUPI; PEREIRA JR., 2000).

Ao contrário da maioria das outras famílias de vírus, os vírus herpéticos podem causar infecções líticas, latentes e transformadas. A infecção latente com subsequente doença recorrente é uma de suas características. Durante o período de recorrência herpética, os vírus

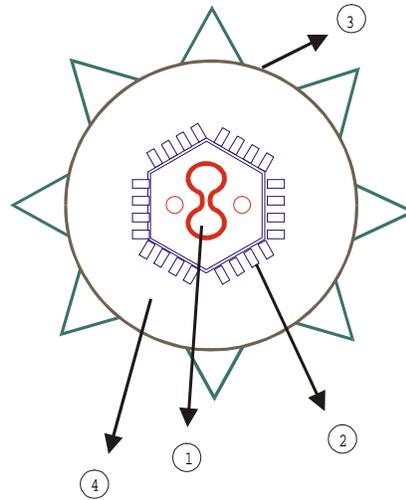
são inacessíveis ao sistema imune e aos medicamentos atualmente disponíveis (ROIZMAN, 1996).

Tabela 1. Vírus herpéticos humanos.

Subfamília Gênero	Nome oficial	Nome comum	Sigla
<i>Alphaherpesvirin</i>			
<i>ae</i>			
Herpes simplex 1	Herpesvírus humano-1	Vírus herpes simples tipo 1	HSV-1
Herpes simplex 2	Herpesvírus humano-2	Vírus herpes simples tipo 2	HSV-2
Varicella zoster	Herpesvírus humano-3	Vírus da varicela zoster	VZV
<i>Betaherpesvirina</i>			
<i>e</i>			
Citomegalovírus	Herpesvírus humano-5	Citomegalovírus	CMV
Roseolovirus	Herpesvírus humano-6	Vírus herpes humano tipo 6	HHV-6
	Herpesvírus humano-7	Vírus herpes humano tipo 7	HHV-7
<i>Gamaherpesvirin</i>			
<i>ae</i>			
Epstein- Barr	Herpesvírus humano-4	Vírus Epstein-Barr	EBV
	Herpesvírus humano-8	Vírus herpes humano tipo 8	HHV-8

Fonte: modificado de Da Silva, 2000.

O HSV-1 é composto de um cerne contendo DNA linear, de fita dupla, associado às proteínas do core, ancorado por fibrilas à um capsídeo icosaédrico de 100nm de diâmetro composto de 162 capsômeros (150 hexâmeros e 12 pentâmeros) e de um envelope lipoprotéico de 120-200nm com numerosos peplômeros glicoprotéicos. Seu genoma é um dos maiores genomas virais de herpesvírus humanos, codificando cerca de 70 a 200 proteínas (WHITE; FENNER, 1994). Sua morfologia característica é ilustrada na Figura 1.



1. Cerne de DNA (fita dupla)
2. Capsídeo protéico envolvendo o cerne, com simetria icosaédrica, constituído de 162 capsômeros (150 hexâmeros e 12 pentâmeros) - 100nm.
3. Envelope composto por uma membrana externa recoberta de glicoproteínas virais
4. Tegumento, que é o espaço protéico entre o capsídeo e o envelope

Figura 1: Morfologia do vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1).

Na infecção primária pelos vírus herpéticos ou primo-infecção, o vírus penetra no corpo por invasão das mucosas ou soluções de continuidade da pele. Muitos indivíduos são infectados já em idade precoce. O vírus sofre, então, replicação nas células situadas na base do sítio de entrada, podendo ou não produzir lesões vesiculares. Após, o vírus dissemina-se para células nervosas adjacentes. Nos neurônios, o nucleocapsídeo é encaminhado 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, como estresse, febre, trauma, mudanças hormonais, radiação ultra-violeta, etc, e depois passar retrogradamente pelo nervo, causando lesões características em sítios específicos da pele e mucosas (CLEMENTS; TIMBURY; GRIFFITHS, 1990; LUPI; PEREIRA JR., 2000).

As manifestações clínicas primárias e recorrentes podem variar desde gengivomastites, faringotonsilites e herpes labial até querato-conjuntivites, encefalites e

doença disseminada. Após a recuperação da infecção primária, o indivíduo retém o DNA herpético no gânglio trigêmio por toda a vida, com no mínimo 50% de chances de sofrer ataques recorrentes de herpes labial várias vezes no decorrer da sua existência. Em pacientes imunocomprometidos (submetidos à transplantes, quimioterapia anticâncer e portadores de AIDS), as infecções latentes são freqüentemente reativadas (WHITE; FENNER, 1994).

O HSV-1 está associado a infecções orais, enquanto que o HSV-2 a infecções genitais. Contudo, ambos os vírus podem causar infecções clinicamente indistinguíveis em vários locais e podem permanecer latentes no gânglio sensorial, o qual pode ser reativado em infecções recorrentes sintomáticas ou assintomáticas (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

2.2.2 Ciclo de multiplicação dos vírus herpéticos

Resumidamente, o ciclo de multiplicação dos vírus herpéticos consiste nas seguintes etapas (ROIZMAN, 1996):

- Adsorção: ocorre a ligação específica dos receptores superficiais das células hospedeiras com as glicoproteínas do envelope viral;
- Penetração e desnudamento: a principal via de penetração do HSV é por fusão na membrana da superfície celular, mas também pode ocorrer por endocitose. Neste último caso, o capsídeo é digerido por enzimas lisossomais celulares, enquanto que no primeiro caso, a fusão do envelope com a membrana celular permitirá que o material genético seja liberado, iniciando a replicação viral;
- Transcrição, tradução e replicação: a transcrição e a síntese protéica prosseguem de forma coordenada, reguladas em três fases: imediata (α), precoce (β), e tardia (γ). Os produtos imediatos e precoces são algumas enzimas, que promovem a replicação do DNA viral e enzimas destruidoras, que iniciam a degradação do RNAm celular. Após a replicação, os

genes tardios são transcritos e codificam proteínas estruturais do capsídeo e outras proteínas que formarão o vírion;

- Montagem e liberação dos vírions: as proteínas do capsídeo são transportadas para o núcleo, onde são reunidas em pró-capsídeos vazios ou preenchidos com DNA. Os nucleocapsídeos brotam de porções modificadas da membrana nuclear com glicoproteínas virais, e sofrem exocitose.

2.2.3 Diagnóstico da infecção herpética

Normalmente, o isolamento do HSV é feito em cultura de tecidos, onde 2-7 dias são necessários para a visualização dos efeitos citopáticos característicos. O diagnóstico mais rápido para lesões mucocutâneas é a imunofluorescência direta de fragmentos corados de pele. O uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar o DNA do HSV em fluido cérebro-espinhal é mais rápido e mais sensível do que a cultura viral, e o diagnóstico pode detectar a encefalite herpética, além de confirmar infecções em outros locais do corpo. Testes sorológicos específicos podem ser usados para diferenciar infecções por HSV-1 e/ou HSV-2, ou confirmar casos suspeitos (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

2.2.4 Terapia anti-herpética (HSV-1 e 2) disponível

(FIELD; BIRON, 1994; CASSADY; WHITLEY, 1997; DE CLERCQ, 2001; BRADY; BERNSTEIN, 2004).

As infecções herpéticas estão descritas na literatura médica há séculos, porém, a terapia anti-herpética começou a ser desenvolvida somente na década de 60. Atualmente, as infecções causadas pelo HSV estão entre as mais comuns na população e, é estimado que 60-

95% das pessoas adultas estejam infectadas. Atualmente, para a seleção do tratamento, alguns fatores importantes devem ser considerados, tais como a imunidade do paciente, o local da infecção e, se a infecção é primária ou recorrente.

Agentes anti-herpéticos disponíveis:

Aciclovir e valaciclovir: têm ação seletiva contra os vírus herpéticos, pois esses induzem a atividade de uma timidina quinase (TQ) nas células que infectam. Essa enzima catalisa a fosforilação do aciclovir em monofosfato e as enzimas celulares completam a fosforilação em trifosfato. A atividade deste fármaco contra os vírus herpéticos está diretamente relacionada à sua capacidade indutora de TQ. O HSV-1 e 2 são os indutores de TQ mais ativos e são facilmente inibidos pelo aciclovir. Para tornar-se ativo, ele precisa ser fosforilado, o que ocorre somente em células infectadas por vírus herpéticos. O trifosfato de aciclovir inibe a replicação viral através da competição com o trifosfato de guanossina pela DNA polimerase viral. Essa enzima incorpora o trifosfato de aciclovir à cadeia do DNA em formação, uma vez que o aciclovir não possui a hidroxila em 3', essencial à incorporação dos demais nucleotídeos à cadeia de DNA em formação. O aciclovir é cem vezes mais seletivo para a DNA polimerase viral do que para a enzima celular, possuindo, desta forma, toxicidade mínima. O aciclovir não elimina o vírus do hospedeiro e deve ser usado nas recidivas. A resistência dos vírus herpéticos ao aciclovir não é uma questão recente, mas a disseminação de cepas resistentes em pacientes imunocomprometidos e a decorrente progressão da doença são preocupantes. A resistência pode ser devido à expressão reduzida da TQ viral nessas cepas, ou à existência de uma TQ não funcional, além de TQ mutantes capazes de selecionar o substrato nucleosídico do aciclovir. O desenvolvimento da resistência pode estar relacionado com o uso de altas doses terapêuticas ou profiláticas do aciclovir, associado à imunossupressão no caso de pacientes com AIDS. A biodisponibilidade do aciclovir oral é de 10-20%, enquanto que a do valaciclovir (éster L-valina do aciclovir) é em torno de 50%. A

administração oral do valaciclovir resulta na conversão em aciclovir, no fígado e no intestino, sendo mais eficiente do que a administração parenteral. Devido à sua maior biodisponibilidade, o valaciclovir pode ser administrado com menor frequência, tornando-se uma opção conveniente para o tratamento oral de infecções herpéticas em pacientes imunocompetentes. Entretanto, o valaciclovir não é efetivo contra infecções resistentes ao aciclovir.

Penciclovir e fanciclovir: possuem mecanismo de ação similar ao do aciclovir. O trifosfato de penciclovir é cerca de cem vezes menos potente na inibição da replicação viral do que o aciclovir; entretanto, esse atinge maior concentração plasmática e tem maior tempo de meia-vida nas células infectadas. O penciclovir só está disponível em cremes para uso tópico, e estudos sobre sua segurança e eficácia ainda estão em andamento. O fanciclovir, éster diacetil do penciclovir, é bem absorvido no trato gastrointestinal, e está disponível somente em formas farmacêuticas orais.

Trifluoridina: o trifosfato de triflouridina inibe a DNA polimerase celular e viral, em baixas concentrações; porém, é tóxico no uso sistêmico. Está disponível como solução nos tratamentos de infecções oculares pelo HSV.

Vidarabina: análogo da adenina, que é fosforilado por quinases celulares à trifosfato de vidarabina, o qual inibe a DNA polimerase viral e, um pouco menos, a celular. Está disponível em pomadas para o tratamento de infecções oculares.

Foscarnet: inibe diretamente a DNA polimerase viral e não requer fosforilação pela TQ do vírus. É ativo contra vírus resistentes ao aciclovir e vírus deficientes de TQ. A resistência ao foscarnet é rara e surge de mutações do vírus.

Cidofovir: nucleosídeo 5'-monofosfato, que é fosforilado por TQ de células hospedeiras em um metabólito biologicamente ativo, o qual inibe seletivamente a replicação viral. Por não ser dependente da TQ viral, pode ser ativo contra vírus deficientes em TQ. A

resistência ao cidofovir é rara e surge de mutações virais. Seu tempo de meia-vida é longo e, por isso, permite apenas uma dose semanal. Pode ser usado topicamente ou por via intravenosa no tratamento de HSV resistentes ao aciclovir e ao foscarnet.

Docosanol: inibe a fusão entre a membrana plasmática da célula hospedeira e o envelope do HSV, bloqueando a entrada do vírus. É disponível em cremes tópicos no tratamento de herpes labial recorrente.

Brivudina: atua como inibidor da DNA polimerase viral, após fosforilação intracelular. Pode atuar como um substrato alternativo e, portanto, ser incorporado pelo DNA viral, reduzindo sua integridade e prejudicando seu funcionamento. Esta disponível para uso tópico e oral no tratamento de infecções causadas pelo HSV-1.

Ganciclovir: atua na DNA polimerase viral, onde é fosforilado a trifosfato de ganciclovir, sendo então incorporado como monofosfato de ganciclovir ao DNA viral, impedindo sua replicação. É encontrado em formas intravenosas, orais e implantes intraoculares.

2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

2.3.1 Definição

Compostos fenólicos (CF) são derivados do metabolismo vegetal secundário que apresentam como estrutura fundamental dois ou mais anéis benzênicos, aos quais está ligada, no mínimo, uma hidroxila, livre ou conjugada às funções éster, éter ou heterosídeo. No grupo dos compostos fenólicos são encontradas estruturas químicas tão variadas quanto aquelas dos ácidos fenólicos, dos flavonóides e dos taninos (BRUNETON, 1995; WILDMAN, 2001).

2.3.2 Distribuição

O grupo dos polifenóis é um dos mais numerosos e amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo atualmente conhecidas mais de 8000 estruturas químicas diferentes. Encontram-se naturalmente conjugados a um ou mais resíduos de açúcares ligados aos grupos hidroxila ou, menos freqüentemente, ligados diretamente a um carbono aromático (BRAVO, 1998; CROFT, 1998; PIETTA, 2000; MARTINEZ-FLORES et al., 2002).

2.3.3 Biossíntese

A diversidade estrutural dos compostos fenólicos deve-se a sua dupla origem biossintética, com a possibilidade de uma participação simultânea nas vias do ácido chiquímico e do acetato-malonato, formando compostos de origem mista, o que pode originar desde moléculas simples como as dos ácidos fenólicos até compostos altamente polimerizados como os taninos (BRUNETON, 1995; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2003). O ácido chiquímico e o acetato são ambos intermediários principais do metabolismo da glicose. O primeiro é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose: o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato e, uma vez formado, pode ser metabolizado em ácido corísmico ou ácido gálico. Dentre os derivados do ácido chiquímico encontram-se os fenilpropanóides, cujos precursores são os ácidos cinâmicos, e também os taninos hidrolisáveis, que são polímeros polifenólicos de elevado peso molecular constituídos de unidades de açúcar e ácido gálico e/ou seus derivados (BELL; CHARLWOOD, 1980; BRUNETON, 1995).

2.3.4 Localização nos vegetais

A maioria dos compostos fenólicos encontra-se compartimentalizada em vacúolos nas células vegetais, podendo reagir com proteínas e outros compostos citoplasmáticos, em reações de complexação. Essas reações podem ser significativas quando a estrutura celular é degradada, como na senescência dos tecidos vegetais, ou ainda em decorrência da predação (HASLAM et al., 1992).

2.3.5 Classificação química

Os compostos fenólicos podem ser classificados segundo o tipo do esqueleto principal, conforme representado na Tabela 2, onde C6 corresponde ao anel benzênico e CX à cadeia substituinte com X átomos de carbono:

Tabela 2: Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico

Esqueleto básico	Classe de compostos fenólicos
C6	fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	ácidos fenólicos
C6-C2	acetofenonas, ácidos fenilacéticos
C6-C3	fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	naftoquinonas
C6-C1-C6	xantonas
C6-C2-C6	estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	flavonóides, isoflavonóides
(C6-C3) ₂	lignanas
(C6-C3-C6) ₂	diflavonóides
(C6) _n	melaninas vegetais
(C6-C3) _n	ligninas
(C6-C1) _n	taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	taninos condensados

Fonte: ZUANAZZI, 2003.

a) ácidos fenólicos:

São derivados do ácido benzóico: ácido *p*-hidróxi-benzóico, ácido protocatéquico, ácido gálico, ácido salicílico, ácido vanílico, ácido siríngico e ácido gentísico, ou do ácido cinâmico: ácido *p*-cumárico, ácido caféico, ácido sinápico e ácido ferúlico. O ácido gálico, um dos derivados do ácido *p*-hidróxi-benzóico é encontrado mais freqüentemente na natureza na forma de seu dímero de condensação, o ácido elágico, que é encontrado em plantas vascularizadas, de forma solúvel ligado à glicose, como um galotanino hidrolisável (BELL; CHARLWOOD; 1980; ZUANAZZI, 2003).

b) flavonóides:

Os flavonóides possuem uma estrutura básica de dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de três átomos de carbono (C6-C3-C6), resultante das duas rotas biossintéticas distintas, a do ácido chiquímico e a do acetato, via ácido malônico (BELL; CHARLWOOD, 1980; BRUNETON, 1995; ZUANAZZI, 2003) (Figura 2).

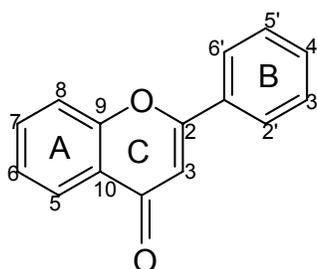


Figura 2: Núcleo fundamental dos flavonóides

Os flavonóides de origem natural apresentam-se, freqüentemente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares. Esta forma conjugada é conhecida como heterosídeo e, quando está sem o açúcar, é chamado de aglicona ou genina. Os flavonóides são subdivididos em: flavonas, flavonóis, *O*-heterosídeos, *C*-heterosídeos, antocianos, chalconas, auronas, diidroflavonóides, flavanas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonóides, neoflavonóides, biflavonóides, além de outras estruturas (ZUANAZZI, 2003). Tendo em vista

que as proantocianidinas também fazem parte de uma das classes dos taninos, estas serão abordadas no próximo item.

b) taninos:

Os taninos são classificados segundo sua estrutura química em taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são formados por um álcool polihídrico, como a glicose, cujas hidroxilas são esterificadas, parcialmente ou completamente, pelo ácido gálico (galotaninos) ou pelo ácido hexahidroxidifênico (elagitaninos) (CHUNG et al., 1998). Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de unidades de flavan-3-óis e/ou flavan-3,4-dióis. Essa classe de taninos também é denominada de proantocianidinas, onde são encontradas, por exemplo, catequina, galocatequina, epicatequina e robinetinidol, entre outros, os quais se diferenciam pelo tipo de substituinte da cadeia principal (Figura 3) (BELL; CHARLWOOD, 1980; BRUNETON, 1995; SANTOS; MELLO, 2003).

Os flavan-3-óis são, geralmente, chamados de catequinas, e possuem quatro isômeros, já que a molécula tem dois carbonos assimétricos nas posições C2 e C3. Esses isômeros são as (+) e (-) catequinas, nas quais os grupos 2-fenil e 3-hidróxi são *trans*. A (-)-epigalocatequina e seu derivado 3-galato são os constituintes fenólicos majoritários nos chás verdes, mas os compostos (+)-galocatequina, (+)-catequina, (-)-epicatequina e seus derivados 3-galato também estão presentes, além de quercetina e rutina (CHUNG et al., 1998; ZUANAZZI, 2003).

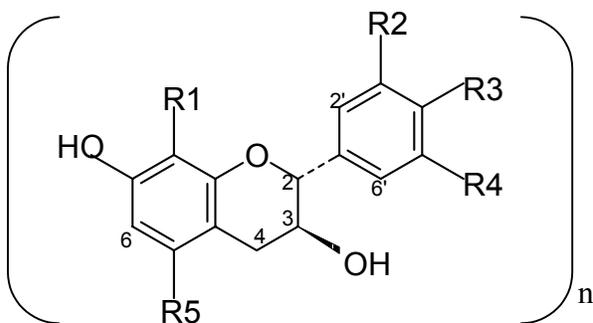


Figura 3: Monômeros básicos dos taninos condensados

d) galatos

O termo “galatos” refere-se aos n-alkil ésteres do ácido gálico, o qual é um ácido fenólico tri-hidroxilado derivado do ácido benzóico. Podem ser usados, geralmente, como antioxidantes em gorduras e óleos para evitar que fiquem rançosos. Também são usados em materiais de embalagem, bem como aditivos em alimentos, balas, gomas de mascar, leite em pó, e como adjuvantes em medicamentos e cosméticos (VAN DER HEIJDEN et al., 1986; MUNOZ et al., 2002; YOSHINO et al., 2002; OW; STUPANS, 2003).

2.3.6 Propriedades farmacológicas

Os compostos fenólicos podem atuar nas plantas como antioxidantes, antimicrobianos, fotoreceptores, atraentes visuais e repelentes de predadores. Existem vários estudos que demonstraram que os flavonóides exibem inúmeras atividades farmacológicas, incluindo antialérgica, antiviral, antiinflamatória, vasodilatadora, entre outras (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; PIETTA, 2000). Contudo, há um grande interesse sobre a atividade antioxidante dos flavonóides, devido a sua habilidade de sequestrar e de reduzir a formação EROS e eletrófilos; de quelar metais e de inibir o processo de nitrosação; potencial de auto-oxidação, produzindo peróxido de hidrogênio na presença de certos metais como ferro e cobre; e sua capacidade de modular a atividade de enzimas como a proteína quinase C e a lipooxigenase (HUANG; FERRARO, 1992; NEWMARK, 1992; MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; PIETTA, 2000).

Muitos flavonóides ingeridos são degradados em ácidos fenólicos, os quais ainda possuem capacidade de captar radicais, e esta habilidade é que está sendo relacionada a suas múltiplas propriedades farmacológicas (PIETTA, 2000).

Os compostos polifenólicos contribuem significativamente, porém não unicamente, para a adstringência dos vinhos, certas frutas e chás, produzindo uma sensação difusa de constrição e secura por toda a boca. As proteínas e os mucopolissacarídeos das membranas e das secreções mucosas são, desta forma, precipitados pelos compostos fenólicos (HASLAM et al., 1992; ZENEBE; PECHANOVA, 2002).

O atual interesse sobre os compostos fenólicos presentes nas frutas, vegetais, chás e vinhos tintos deve-se a uma clara correlação epidemiológica entre o consumo desses na dieta e um baixo risco de desenvolvimento de doenças degenerativas como câncer e doenças cardiovasculares (HUANG; FERRARO, 1992; WEISBURGER, 1992; BLOCK; PATTERSON; SUBAR, 1992; HERTOOG et al., 1993; HERTOOG et al., 1995; MARWICK, 1995; KELI et al., 1996; ANDLAUER; STEHLE; FÜRST, 1998; LAIRON; AMIOT, 1999; ZENEBE; PECHANOVA 2002).

O “paradoxo francês”, ou seja, a aparente compatibilidade entre uma dieta rica em gorduras saturadas e a baixa incidência de doenças cardiovasculares, tem sido atribuída ao consumo regular de vinho tinto, rico em compostos polifenólicos (FRANKEL et al., 1993; RENAUD; DE LORGERIL, 1992; ZENEBE; PECHANOVA 2002). Os compostos fenólicos, presentes nos chás verde, preto e no vinho tinto foram então objetos de extensos estudos relacionados à inibição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), aumento dos níveis de HDL e relaxamento dos vasos sanguíneos, diminuindo assim a pressão arterial (FRANKEL et al., 1993; VAN HET HOF et al., 1997; MIYAGI, 1997; VAN HET HOF et al., 1999).

Os chás verde e preto e suas folhas frescas têm como constituintes majoritários os CF, respectivamente, 10-25%, 8-21% e 30-35%. Os constituintes mais importantes são os flavanóis (catequinas), aí incluídas: (+)-catequina, (-)-epicatequina, (+)-galocatequina, (-)-epigalocatequina, galatos de (-)-epicatequina e de (-)-epigalocatequina, sendo que esta última

corresponde a 50-60% do conteúdo total de catequinas, e parece ser o principal responsável pela atividade antioxidante (LUNDER, 1992).

Embora o consumo moderado de chá verde pareça seguro, e existam evidências de que ele possa efetivamente prevenir a ocorrência de algumas formas de câncer; o mecanismo de ação de seus componentes específicos é ainda pouco compreendido (KAEGI, 1998).

Os estudos relacionados aos mecanismos de ação associados aos efeitos biológicos do chá verde, têm se concentrado na prevenção de mutagenicidade e genotoxicidade, inibição de marcadores bioquímicos de iniciadores e promotores de tumores, efeitos sobre as enzimas de detoxificação, captação de metabólitos ativos de carcinógenos, além da atividade antioxidante, detectada por sua ação captadora de EROS (AHMAD; MUKHTAR, 1999).

Não se tem ainda muito conhecimento sobre a absorção dos CF no trato gastrointestinal, do quanto eles são retidos no organismo, e qual o significado biológico desta biodisponibilidade. A absorção e o metabolismo dos CF são determinados, primariamente, pela sua estrutura química, que depende de fatores tais como estrutura básica, grau de glicosilação/acilação, conjugação com outros CF, peso molecular, grau de polimerização e solubilidade. A grande variabilidade deste grupo de substâncias e sua ocorrência nas plantas como uma mistura complexa geram dificuldades para o estudo da sua biodisponibilidade, efeitos fisiológicos e nutricionais (BRAVO, 1998). Por exemplo, apesar de muitos aspectos do metabolismo e da biodisponibilidade dos flavonóides permanecerem ainda pouco conhecidos, há evidências suficientes que sugerem que alguns deles estão presentes no plasma em concentrações suficientes para apresentarem efeitos biológicos (CROFT, 1998).

A capacidade de ligação dos CF à proteínas pode reduzir a digestibilidade dessas e diminuir a excreção fecal de nitrogênio em humanos. Os taninos presentes também interferem na digestibilidade e, conseqüentemente, ocorre diminuição na absorção de proteínas e lipídeos, alterando a glicemia, a resposta à insulina, diminuindo a excreção de lipídeos e a

absorção do colesterol proveniente da dieta (HOLLMAN et al., 1997). Os polifenóis do chá possuem alta capacidade de ligação com os metais de transição, formando complexos insolúveis com o ferro. Esta ligação ocorre no trato gastrointestinal, inibindo a absorção do ferro, zinco, sódio e alumínio (HOLLMAN et al., 1997; BRAVO, 1998).

Kane et al. (1988) relataram a importância da cadeia carbônica lateral na atividade anti-herpética dos alquil-ésteres do ácido gálico e, que o galato de metila pode interagir com as proteínas virais e alterar a adsorção e penetração do vírion. Além disso, as três hidroxilas da molécula são essenciais para a ação anti-herpética.

Os ésteres do ácido gálico exibiram atividade antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae*, e tal ação poderia estar associada ao equilíbrio entre o grupo hidrofílico polar e a porção apolar hidrofóbica da molécula (FUJITA; KUBO, 2002).

Yoshino et al. (2002) relataram que os alquil-galatos, especialmente o galato de propila, induzem apoptose com fragmentação de DNA em hepatócitos e em algumas células tumorais, além de efeitos tripanocidas, através da inibição da respiração e síntese de ácido nucléico. Além disso, os galatos provocariam efeitos antiproliferativos em tecidos e citotoxicidade, possivelmente devido à ação pró-oxidante desses compostos, através da redução de íons cobre, e não ao efeito antioxidante.

Munoz e colaboradores (2002) afirmaram que quanto maior a cadeia lateral de carbono, maior é a capacidade de sensibilização que leva à dermatite de contato e, quando a sua cadeia lateral tem menos do que quatro átomos de carbono, maior é a reatividade cruzada desses compostos com outros que possuem hidroxilas livres na posição *para*, como o catecol.

As inúmeras atividades biológicas, especialmente a atividade antioxidante, detectadas para o ácido gálico e seus derivados, reforçam a necessidade de estudar sua potencial atividade antiviral e genotoxicidade, a fim de correlacioná-las.

2.4 ATIVIDADE ANTI-HERPÉTICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A atividade antiviral de compostos fenólicos (CF) e/ou preparações ricas em CF há muito tempo tem sido estudada. O primeiro trabalho publicado nesta área trata da ação antiinfluenza (vírus da gripe) de extratos de chá preto (GREEN, 1949).

Estudos da década de 70 (MUCSI et al., 1977; BÉLÁDI et al., 1977) já relatavam a atividade antiviral de flavonóides, especialmente, para vírus envelopados, como o HSV-1, com uma atividade promissora, decorrente de sua baixa toxicidade. Esses resultados de atividade anti-herpética de flavonóides foram, posteriormente, confirmados por Kaul, Middleton e Feskens (1985), e o efeito sinérgico de flavonas e flavonóis contra HSV-1 foi demonstrado por Amoros, Simões e Girre (1992).

A atividade antiviral, mais especificamente anti-herpética, de sucos de uva, vinhos tinto (especialmente) e branco foi relatada por Konowalchuk e Speirs (1976a), que consideraram provável o envolvimento de CF no processo de inativação viral. Os CF, presentes nas cascas e sementes de uvas, são mais abundantes no vinho tinto, e os autores atribuíram a esse fato a menor atividade antiviral detectada para o vinho branco. Os mesmos autores relataram a atividade antiviral, inclusive anti-herpética, de extratos de frutas, como morango e maçã, associando-a à presença de taninos e compostos relacionados, bem como os ácidos tânico, gálico e clorogênico (KONOWALCHUK; SPEIRS, 1976b; KONOWALCHUK; SPEIRS, 1978a; KONOWALCHUK; SPEIRS, 1978b).

Também foi relatada a inibição do crescimento de várias espécies de enterovírus, em cultura celular, por infusões de folhas de chá preto, atribuindo-se tal atividade à presença do ácido tânico e cafeína nessas preparações. Os mesmos autores, num estudo subsequente, confirmaram a atividade antiviral e, mais especificamente, anti-herpética da cafeína e do ácido tânico (JACOB JOHN; MUKUNDAN, 1978 e 1979).

Para o ácido caféico, por exemplo, foi descrita sua atividade inibitória da multiplicação de vírus com genoma DNA (vírus vaccínia, adenovírus, herpesvírus) e RNA (vírus influenza) (POLLIKOFF et al., 1965; GRODZINSKA-ZACHWIEJA et al., 1976). O produto polimerizado da oxidação do ácido caféico também inibiu a replicação dos vírus HSV-1 e HSV-2, sendo a adsorção a fase do ciclo de replicação viral mais sensível à esse composto (THIEL et al., 1983).

Esses estudos prévios mostraram que compostos fenólicos, tais como os ácidos caféico, clorogênico, rosmarínico e os produtos polimerizados da oxidação do ácido caféico possuem uma importante atividade anti-herpética. Esses compostos parecem interferir na adsorção do vírus herpético à célula hospedeira, podendo ser úteis como agentes tópicos para inativação de novas partículas virais infecciosas formadas ou em combinação com outros antivirais (VLIETINCK, 1987).

Vlietinck, Vanden Bergue e Haemers (1988) também consideraram os flavonóides como uma classe interessante e promissora de produtos naturais na descoberta de novos agentes antivirais, já que estudos dos seus mecanismos de ação têm revelado que eles ligam-se ao capsídeo viral e que interferem na síntese de proteínas e do genoma viral, além de que, estudos de relações estrutura-atividade possibilitam encontrar flavonóides menos tóxicos, mais ativos, e com propriedades farmacocinéticas apropriadas, que poderiam ser tão ativos ou até mais do que os fármacos antivirais já existentes. Em geral, acredita-se que os compostos polifenólicos atuam através da associação com proteínas das partículas virais e/ou das superfícies das células hospedeiras, resultando na redução ou prevenção da adsorção viral (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGUE, 1997).

Adicionalmente, Klöcking et al. (2002) detectaram uma significativa atividade anti-HSV-1 para compostos fenólicos polimerizados, semelhantes ao ácido húmico, bem como para compostos fenólicos simples, sendo que os compostos testados mais efetivos, com

índices de seletividade superiores a 10, foram os ácidos caféico, clorogênico, hidrocaféico e o produto da oxidação do ácido diidróxifenilacético.

Middleton, Kandaswami e Theoharides (2000) relataram que os flavonóides, entre suas inúmeras atividades, também pode inibir a replicação do HSV-1, e que esta atividade está relacionada com a presença de hidroxilas nas posições 3', 4', 3, 5 e 7 em suas moléculas.

Fikuchi et al. (1989), após investigarem a inibição do vírus herpético (HSV-1) por taninos e compostos relacionados, sugeriram que a presença de grupamentos polifenólicos, o número de grupamentos hidroxila no anel benzênico e o peso molecular dos compostos são fatores determinantes para a atividade anti-HSV-1.

Meerbach et al (2001) afirmaram que a atividade anti-herpética e anti-HIV de polímeros fenólicos é dependente da presença de um número mínimo de grupos carboxílicos, e o mecanismo de ação antiviral detectada foi relacionado à inibição da adsorção viral.

Chiang et al. (2002) detectaram atividade anti-herpética e antiadenovírus para compostos fenólicos, tais como os ácidos caféico (HSV-1 com IS=671; ADV-3 com IS=727) e clorogênico (ADV-11 com IS=301), os quais apresentaram altos índice de seletividade.

Kane et al. (1988) observaram atividade antiviral para o galato de metila, sendo este composto mais específico para os herpesvírus, com relativa sensibilidade para o HSV-2 > HSV-1 > CMV. Através de análises químicas, foi demonstrado que as hidroxilas e a cadeia carbônica lateral dos alquil-ésteres do ácido gálico foram importantes para a atividade anti-herpética do galato de metila. Também, foi sugerido que esse composto seja usado como modelo para investigações dos mecanismos moleculares de infecção, replicação e inibição desses vírus.

2.5 GENOTOXICIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Os CF apresentam múltiplas atividades, tais como ações genotóxica, carcinogênica, co-carcinogênica e promotora de tumores, apesar de demonstrarem, também, proteção contra danos ao material genético, contra a formação de lesões pré-cancerosas e contra o desenvolvimento de câncer, induzido por uma grande variedade de carcinógenos (STICH, 1991).

Com relação à capacidade dos CF em causar danos ao material genético de um organismo, ou seja, sua genotoxicidade, a literatura científica apresenta resultados bastante contraditórios, obtidos com diferentes modelos experimentais.

Existem muitos trabalhos *in vitro* e *in vivo*, que demonstraram atividade carcinogênica de taninos, bem como ações anticarcinogênica e antimutagênica. Seu potencial anticarcinogênico e antimutagênico poderia estar relacionado às suas propriedades antioxidantes, protegendo os componentes celulares do dano oxidativo, incluindo peroxidação lipídica, quebras simples de DNA e formação da 8-hidróxi-deoxiguanosina (CHUNG et al., 1998).

A iniciação é o evento primordial da carcinogênese, caracterizando-se como uma mutação somática, ou seja, uma alteração do material genético. Esse evento pode ser aumentado, através de inúmeros mecanismos, que modificam o DNA celular, levando à mutagenicidade. Em estudos realizados *in vitro*, fenóis e catecóis não apresentaram genotoxicidade. *In vivo*, as hidroxilas fenólicas livres são conjugadas pelas enzimas de fase II do mecanismo de detoxificação de xenobióticos. Altas doses, no entanto, podem saturar estes sistemas de detoxificação, podendo ser os CF oxidados a quinonas, que são sujeitas a detoxificação pela enzima GSH transferase. A saturação desta enzima pode levar a formação de produtos que sejam reativos ao DNA (WEISBURGER, 1992).

Leanderson et al. (1997) demonstraram que os CF presentes no chá verde (galato de epigallocatequina, epigallocatequina, epicatequina e galato de epicatequina) inibiram quebras simples na fita de DNA, induzidas por oxidação, em cultura de células pulmonares, e supõe-se que esta proteção seja devido ao potencial antioxidante desses compostos.

Existem relatos na literatura da avaliação do efeito de flavonóides e vários agentes antioxidantes nos danos ao DNA gerados por espécies reativas de oxigênio (EROS), através do Ensaio do Cometa (ANDERSON et al., 1994; DUTHIE; JOHNSON; DOBSON, 1997; DUTHIE; DOBSON, 1999).

Anderson et al. (1994) relataram que a enzima catalase aboliu totalmente os danos causados ao DNA pela exposição ao peróxido de hidrogênio, também através do Ensaio do Cometa, e que a enzima superóxido dismutase apresentou pequeno efeito, assim como a vitamina E. A vitamina C induziu danos ao DNA de forma dose-dependente por si só, enquanto que, na presença de peróxido de hidrogênio, ela apresentou um efeito protetor em pequenas doses, mas exacerbou a frequência de danos em altas doses. A silimarina, uma mistura comercialmente disponível de flavonóides de origem vegetal, produziu um efeito protetor.

Duthie, Johnson e Dobson (1997) demonstraram que os flavonóides quercetina, miricetina e silimarina inibiram a proliferação celular e não induziram dano ao DNA, através de geração de EROS. Além disso, a genotoxicidade e a citotoxicidade detectadas não foram associadas com a capacidade antioxidante das enzimas glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase e catalase das células.

Duthie e Dobson (1999) observaram que o peróxido de hidrogênio causou aumento dose-dependente nas quebras de DNA, via geração de EROS, e que a quercetina, entre outros flavonóides, inibiu os danos ao DNA. Ainda, o metabolismo via citocromo P-450 poderia alterar a eficácia dos flavonóides contra os danos oxidativos ao DNA.

Duarte et al. (1999) estudaram o efeito genotóxico do café instantâneo em *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* (teste de Ames) e observaram que tal efeito deve ser resultante da presença de EROS nesses preparados, especialmente peróxido de hidrogênio. Tudo indica que as EROS são aumentadas pela auto-oxidação das substâncias fenólicas, que ocorre preferencialmente em pH acima da neutralidade.

A atividade genotóxica de flavonóides, tais como quercetina, miricetina, galangina e canferol, foi descrita como resultado da geração de EROS pela auto-oxidação desses compostos (DUARTE et al., 1999, SILVA et al., 2002). No entanto, em estudos realizados por Duthie et al. (1997) e Duthie e Dobson (1999), flavonóides como quercetina e miricetina mostraram atividade protetora das quebras simples ao DNA induzidas por peróxido de hidrogênio *in vitro*, avaliada através do Ensaio do Cometa.

Para a avaliação do potencial genotóxico de compostos biologicamente ativos são necessárias técnicas que permitam uma detecção direta e sensível dos danos causados ao DNA, em células individuais. O Ensaio do Cometa, ou *Single Cell Gel (SCG) Assay* é uma técnica usada para a detecção de quebras em fitas simples e sítios álcali-lábeis da molécula de DNA em células individuais que vem ao encontro dessa necessidade (TICE et al., 1990) e, por isso, foi a técnica utilizada na avaliação da genotoxicidade dos compostos fenólicos estudados no presente trabalho.

O Ensaio do Cometa foi inicialmente introduzido por Östling e Johanson (1984), que desenvolveram a técnica original em pH neutro, sendo então sensível ao efeito de quebras na fita dupla da molécula de DNA. No entanto, a técnica mais freqüentemente adotada é aquela adaptada por Singh et al. (1988), na qual o procedimento de Östling e Johanson foi modificado procedendo-se o ensaio a pH>13, através do qual são detectadas quebras na fita simples da molécula de DNA e também sítios álcali-lábeis (ANDERSON; YU; MCGREGOR, 1998). Partindo-se do princípio de que a maioria dos agentes genotóxicos

induzem muito mais quebras em fitas simples do que em dupla fita de DNA, a versão alcalina (pH>13) da técnica apresenta maior sensibilidade para detecção de indução de danos ao DNA (SPEIT; HARTMANN, 1999).

A técnica, resumidamente, consiste na preparação de uma suspensão celular em gel de agarose de baixo ponto de fusão numa concentração final de 0,5 -1,0%, a 35-45⁰C, que é então disposta sobre uma lâmina de microscópio. A seguir, as células são lisadas através da imersão em tampão de pH 10 por um período não inferior a 1h. Antes da eletroforese, as lâminas são submersas num tampão que não contém detergentes, possui baixa salinidade e pH alcalino. Após a eletroforese, as lâminas são lavadas com solução de pH neutro e coradas com um corante fluorescente que se liga ao DNA, para posterior análise dos cometas, que pode ser efetuada tanto através de escores de comprimento da cauda dos cometas como através de analisadores de imagens computadorizados (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995).

As vantagens da técnica incluem: (1) sensibilidade para a detecção de danos ao DNA; (2) coleta de dados de células individuais, permitindo análises estatísticas mais consistentes; (3) necessidade de amostras extremamente pequenas de células; (4) virtualmente, qualquer população de células eucariotas pode vir a ser analisada (TICE et al., 1990), além do que (5) o ensaio é sensível, simples e de baixo custo; (6) os dados podem ser obtidos após poucas horas da amostragem; (7) pode-se avaliar o dano ao DNA em células não-proliferativas e, sendo um ensaio em células individuais, (8) pode-se detectar respostas não uniformes numa população mista de células (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999). Segundo Tice et al. (1990), as únicas desvantagens são a necessidade de suspensões de células individuais, e o fato de que pequenas amostras celulares podem não ser representativas da população celular total.

A análise estatística do Ensaio do Cometa deve ser realizada levando-se em consideração a importância biológica dos dados obtidos, identificando-se o tamanho do efeito,

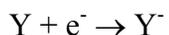
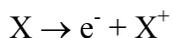
que poderá ser considerado biologicamente importante e relacionando-o com o poder estatístico do estudo (LOVELL; THOMAS; DUBOW, 1999).

2.6 ESTRESSE OXIDATIVO

2.6.1 Espécies reativas de oxigênio

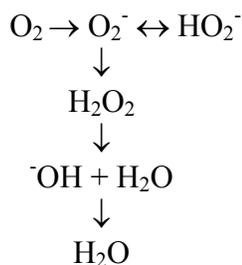
Um dos paradoxos da vida é que o oxigênio não só é essencial para o metabolismo de energia e respiração, mas também está implicado em muitas doenças e condições degenerativas (MARXS, 1985). As diversas patologias, como inflamação, artrite reumatóide, aterosclerose, câncer, envelhecimento, mutações, disfunção renal, mal de Parkinson, doença de Alzheimer, lesão pós-isquemia e reperfusão do cérebro, fígado, pulmões coração, pele, intestino, rins, pâncreas e músculos, estão relacionadas às diversas formas reduzidas de oxigênio que são altamente reativas e danosas aos organismos. Estas espécies são denominadas de espécies reativas de oxigênio (EROS) (KEHRER, 1993; GROOT; RAUEN, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

As EROS são classificadas em radicais livres (RL) e não radicais livres. Os RL são moléculas ou fragmentos de moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais externos, apresentando uma alta reatividade química, que, por sua vez, tendem a formar pares estáveis. As EROS são formadas em consequência de reduções univalentes e sequenciais da molécula de oxigênio molecular, associadas a distintos processos bioquímicos que ocorrem em praticamente todos os compartimentos celulares. As espécies radicalares são as de maior interesse nas áreas médica e biológica. Os radicais podem ser formados pela perda ou ganho de um elétron de uma molécula não radicalar (FLECHA, 1990; PUNCHARD; KELLY, 1996, HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).



As EROS incluem: os radicais livres de oxigênio (RLO) radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), radical hidroxila (HO^{\bullet}), radicais lipídicos (L) e outros (X) peróxi radicais (LOO^{\bullet} e XOO^{\bullet}); peróxido de hidrogênio (H_2O_2), lipoperóxido (LOOH), oxigênio singlete (1O_2) e ácido hipocloroso (HOCl). Todas as EROS são potencialmente muito tóxicas às células devido à sua natureza altamente reativa, permitindo a combinação com outras moléculas como enzimas, receptores, canais iônicos, causando oxidação diretamente, inibindo ou inativando suas funções normais (PUNCHARD; KELLY, 1996).

As EROS são formadas através da redução parcial do oxigênio até a água, que ocorre através de sucessivas reações univalentes (Esquema 1). A transferência de um elétron para o O_2 produz o primeiro intermediário reativo, o radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) que sofre dismutação espontânea a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Qualquer reação posterior requer a quebra das ligações entre os átomos de O_2 para formar o radical hidroxila (HO^{\bullet}), que pode ser catalisada por metais de transição, através da reação de Fenton, ou pela combinação de $O_2^{\bullet -}$ com o H_2O_2 (GUTTERIDGE, 1999).



Esquema 1: Demonstração esquemática da ativação do oxigênio (McKersie, 1996).

O peróxido de hidrogênio não é considerado um radical livre pois não apresenta elétrons desemparelhados em seu orbital, mas adquire importância na lesão celular pela sua capacidade de reagir com o ferro (Reação de Fenton), gerando radical hidroxila ou radical

ânion superóxido. A reação de Haber-Weiss é representada pela seguinte equação (KEHRER, 1993; YOSHIDA, 1996): $O_2^- + H_2O_2 + H^+ \rightarrow OH + OH^- + O_2$.

A reação se propaga de forma muito lenta e isoladamente tem pouco significado biológico. Todavia, na presença de certos metais de transição (ferro, cobre), o radical hidroxila pode ser formado mais rapidamente, como na reação seguinte, descrita por Fenton (KEHRER, 1993; YOSHIDA, 1996, HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999): $Fe^{3+} + O_2 \rightarrow Fe^{2+} + O_2^- // 2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 // Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH + OH^-$.

Os RL são produzidos no organismo como parte do metabolismo normal. Em geral, são altamente reativos e podem atacar membranas lipídicas, por exemplo, gerando um radical de carbono, que por sua vez, reage com oxigênio produzindo um radical peroxil, que pode atacar ácidos graxos adjacentes, gerando novos radicais de carbono. Esse processo origina uma cadeia de reações, de forma que um único radical pode danificar várias moléculas através da iniciação da peroxidação lipídica. Devido ao potencial danoso das EROS, o organismo possui inúmeros mecanismos de defesa antioxidante que inclui enzimas como a superóxido dismutase e a catalase, proteínas de transporte e reserva de cobre e ferro, e antioxidantes tanto hidro quanto lipossolúveis (YOSHIDA, 1996; GROOT; RAUEN, 1998; HALLIWELL, 2000). Em circunstâncias normais, a produção de componentes celulares modificados oxidativamente ocorre num nível comparável ao de remoção e/ou reparo dos mesmos, mantendo um estado estacionário de dano reduzido (DAVIES, 1991). Antioxidantes exógenos, não enzimáticos, também podem neutralizar as EROS, e incluem as vitaminas A, C e E e os flavonóides (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; RIETJENS et al., 2002).

O estresse oxidativo é, então, o desequilíbrio entre a geração e a detoxificação de EROS. Este desequilíbrio pode ocorrer quando as defesas antioxidantes não são capazes de compensar a produção de EROS, podendo ser resultante de estresse fisiológico ou da ação de agentes tóxicos. Nessas situações, os efeitos tóxicos das EROS se manifestam, produzindo

primeiramente danos celulares reversíveis, mas podendo desencadear danos irreversíveis e até mesmo morte celular (CADENAS, 1985; SIES, 1985; FLECHA, 1990; HALLIWELL, 1994).

O estresse oxidativo resulta em dano oxidativo ao DNA, lipídios e proteínas, e suas conseqüências dependem de vários fatores como o tecido afetado, a magnitude do estresse, a exposição prévia dos sistemas biológicos ao insulto oxidativo, e a presença simultânea de outro tipo de estresse, fisiológico ou não. Seu resultado pode, portanto, ser uma resistência aumentada ao estresse oxidativo, à morte tecidual, ou a mutações, que podem levar ao desenvolvimento de câncer ou envelhecimento precoce (FLOYD, 1991).

Dentre as fontes biológicas mais significativas de EROS está a formação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) no transporte de elétrons (e^-) da cadeia respiratória, que ocorre na membrana mitocondrial. A conversão do oxigênio em água requer transferência de elétrons, sendo os produtos dessas reações o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os radicais peroxila (LOO^{\bullet}) e hidroxila (HO^{\bullet}), sendo o último o maior pró-oxidante gerador de danos nos sistemas celulares. As membranas microssomais e nucleares são outras fontes celulares de geração de EROS, através de sistemas de transporte de elétrons como o citocromo P-450 (PRIOR; CAO, 1999).

2.6.2. Atividade de captação de espécies reativas de oxigênio

As EROS são altamente reativas e, portanto, têm uma vida muito curta pelo fato de conterem um ou mais elétrons desemparelhados. Contudo, isto é ainda uma diferença considerável na sua reatividade e tempo de vida, por exemplo, o ânion $O_2^{\bullet-}$ reage rapidamente com poucas moléculas, enquanto que OH^{\bullet} é tão instável que reage no seu local de formação. Os radicais ROO^{\bullet} e RO^{\bullet} têm reatividade intermediária. O tempo de vida muito curto destas moléculas implica na dificuldade de mensurá-los. As EROS podem ser geradas *in vitro*, por

meios enzimáticos, como no sistema xantina oxidase/XO, ou não enzimáticos, através da ação de metais de transição ou radiação ionizante. Os compostos fenólicos podem interferir com as reações de formação e propagação de EROS. De modo geral, os compostos fenólicos são excelentes doadores de hidrogênio ou elétrons e o composto-radical formado é relativamente estável devido ao deslocamento do elétron e ligação intramolecular de hidrogênio (COS et al., 2000).

Diversos estudos descreveram a interação dos compostos fenólicos com o radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (Figura 4), que é estável e freqüentemente usado nos estudos de ressonância de spin de elétrons. O ensaio com DPPH fornece informações sobre a reatividade dos compostos fenólicos com um radical livre estável (SANG et al., 2002; SROKA; CISOWSKI, 2003). Devido a esse elétron desemparelhado, o DPPH tem uma forte absorção quando solubilizado em etanol, a 517nm. No momento que este elétron começa a se emparelhar, a absorção desaparece e o grau resultante de descoloração é estequiométrico e corresponde ao número de elétrons captados (VIVOT et al, 2001).

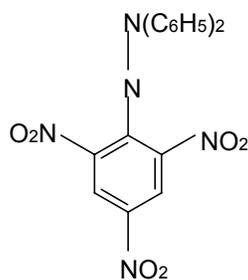


Figura 4: Estrutura do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

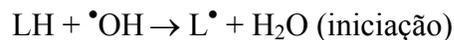
2.6.3 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica serve como um sinal do estresse oxidativo celular e tem sido reconhecida por contribuir com danos oxidativos no organismo que culmina em vários

processos patológicos, como inflamação e doenças crônicas como aterosclerose e câncer (SEVANIAN; URSINI, 2000).

A peroxidação lipídica é definida como uma deteriorização dos lipídeos polinsaturados. As membranas celulares são constituídas por ácidos graxos polinsaturados e possuem uma estrutura de bicamada lipídica onde os lipídeos, parte apolar, situam-se externamente e, a porção polar, em contato com a água, situa-se internamente (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

O processo de peroxidação lipídica é iniciado pelas EROS, especialmente pelo radical hidroxila, e inclui três eventos principais: iniciação, propagação e término, os quais estão representados a seguir (WAGNER; BUETTNER; BURNS, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999):



A reação inicia-se com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH), contendo, pelo menos, duas ligações duplas metilênicas intercaladas. Tal seqüestro pode ser realizado pelo $\bullet\text{OH}$ (radical hidroxila) ou pelo $\text{LO}\bullet$ (radical alcóxila), conseqüentemente formando $\text{L}\bullet$ (radical lipídico), e com o concomitante rearranjo das ligações duplas (conjugação de dienos). Na primeira equação de propagação, o $\text{L}\bullet$ reage rapidamente com o oxigênio, resultando em $\text{LOO}\bullet$ (radical peróxila), que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o radical lipídico na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais ($\text{L}\bullet$ e $\text{LOO}\bullet$) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até destruírem-se a si próprios (SLATER, 1984; SHAHIDI;

WANASUNDARA, 1992; ERNSTER; HOCHSTEIN, 1994; WAGNER; BUETTNER; BURNS, 1994; YOSHIDA, 1996; GUTTERIDGE, 1999; SEVANIAN; URSINI, 2000).

A menos que seja interrompida pelos antioxidantes, esta seqüência de reações resulta em destruição da membrana e morte celular (YOSHIDA, 1996). Entre os produtos de degradação estão os aldeídos, tal como o dialdeído malônico, e os hidrocarbonetos. Por exemplo, o dialdeído malônico pode ser dosado através do ácido tiobarbitúrico (TBA) e, é amplamente usado como indicador de ocorrência de lipoperoxidação (YOSHIDA, 1996; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Cabe aqui ressaltar que os ácidos graxos são instáveis na presença de ferro ou outro metal, pois há a conversão de hidroperóxidos lipídicos em radicais altamente reativos (alcoxila e peroxila), que, por sua vez, iniciam nova cadeia de reações (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A consequência mais comum da peroxidação lipídica das membranas envolve a perturbação das funções essenciais das organelas e membranas celulares. Isso inclui processos de transporte, manutenção de gradientes de íons e metabólitos e sinais de transdução mediados por receptores. A peroxidação lipídica pode também ser causa de dano ao DNA e proteínas (ERNSTER; HOCHSTEIN, 1994).

2.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Pode-se definir como antioxidante qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, inibe ou evita significativamente sua oxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; ARUOMA et al., 1995; MAXWELL, 1995).

De acordo com suas funções, os antioxidantes, endógenos ou não, podem ser divididos em: antioxidantes preventivos, que reduzem a geração de RL e EROS decompondo hidroperóxido e peróxido de hidrogênio, seqüestrando íons metálicos ou extinguindo e

dismutando EROS; antioxidantes seqüestradores de RL, que inibem a iniciação das reações oxidativas e quebram a cascata de propagação; e antioxidantes que atuam no reparo e adaptação ao dano oxidativo (NIKI, 1991).

Assim, uma substância pode exercer atividade antioxidante *in vivo* captando RL diretamente, inibindo a formação de EROS, ou ainda alterando os níveis endógenos de defesas antioxidantes (HALLIWELL, 1994).

Muitas das atividades biológicas dos CF podem estar relacionadas ao seu potencial antioxidante, que é atribuído à capacidade de quelar metais, inibir a enzima lipooxigenase e seqüestrar EROS (DECKER, 1997; MIDDLETON,; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000).

A significância biológica dos antioxidantes presentes na dieta pode ser dividida em duas fases. A primeira seria a prevenção da auto-oxidação de ácidos graxos polinsaturados, já que os RL formados nesse processo podem ser tóxicos, com detrimento à saúde. A segunda fase seria o retardo da peroxidação lipídica em vários tecidos que, por sua vez, forma RL também tóxicos (PRATT, 1992).

O uso de terapia antioxidante tem se demonstrado benéfica nos casos em que a doença está associada com o aumento da peroxidação lipídica e/ou oxidação de proteínas ou DNA; quando a atividade oxidativa é um fator central na patofisiologia da doença; quando há deficiência no status antioxidante; quando o agente oxidante tem capacidade de alcançar o sítio de dano oxidativo e causar verdadeiro impacto no processo oxidativo; e ainda quando possa ser administrada em doses toleráveis e seguras. Exemplos clínicos onde a terapia antioxidante parece ser benéfica são: aterosclerose, injúria de isquemia-reperusão, transplantes, *diabetes mellitus*, doenças inflamatórias, câncer, hipertensão, terapia intensiva, doenças neurológicas como mal de Parkinson, exercícios físicos exaustivos e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (MAXWELL, 1995).

Os compostos clássicos com atividade antioxidante incluem tocoferóis (vitamina E), flavonóides, derivados do ácido cinâmico (ácidos caféico, ferúlico, clorogênico e vários outros), além de ácidos orgânicos fosfatados e polifuncionais (PRATT, 1992).

É de grande importância entender que um composto não pode ser classificado como um antioxidante baseado em um único experimento, porque ele pode atuar como um pró-oxidante em outro sistema. Por exemplo, o dietilestilbestrol é um inibidor da peroxidação lipídica *in vitro*, mas pode acelerar o dano oxidativo ao DNA *in vivo*. Por isso, é recomendado usar uma bateria de testes envolvendo DNA, lipídeos, proteínas e carboidratos para determinar tanto as propriedades antioxidantes como pró-oxidantes (COS et al., 2000).

Entretanto, os CF também podem promover reações oxidativas *in vitro*. Eles atuam como pró-oxidantes através da quelação de metais, de forma que a atividade catalítica desses últimos é mantida ou aumentada, ou através da redução de metais, o que aumenta sua habilidade em formar RL através dos peróxidos. Alguns dos efeitos pró-oxidantes dos CF são atribuídos ao fato de que eles podem se submeter a reações de auto-oxidação quando dissolvidos em tampões aquosos. Solventes orgânicos, como DMSO e etanol, são poderosos captadores de OH^\bullet . Esta auto-oxidação pode ser medida pelo consumo de oxigênio. Um composto pró-oxidante é capaz de reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} , resultando na geração de OH^\bullet . A atividade pró-oxidante é explicada pela ação do EDTA, que altera o potencial redox e solubilidade do ferro, conseqüentemente, quelantes de ferro influenciam na capacidade antioxidante ou pró-oxidante dos compostos fenólicos. A desoxiribose, um açúcar que faz parte da composição do DNA, degrada o dialdeído malônico, o qual é medido com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Existem estudos que afirmam que alguns CF aceleram o dano ao DNA, pela redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} , e que as atividades antioxidantes e pró-oxidantes dos CF com o método baseado na oxidação do DMSO pelo OH^\bullet , gerada pela reação de Fenton, forma um composto estável chamado de ácido metanosulfínico (MAS), o qual é derivado do sal

diazônio. Os CF com ação pró-oxidante produzem H_2O_2 durante sua auto-oxidação e, portanto, estimulam a reação de Fenton (DECKER, 1997; COS et al., 2000).

A maior evidência de que os CF atuam como antioxidantes primários (ou seja, como aceptores de RL, interrompendo a cadeia de reações oxidativas) é sua habilidade de atuar tanto em sistemas catalisados quanto não catalisados por metais, em sistemas catalisados por moléculas relativamente grandes como heme, além de serem efetivos contra reações catalisadas pela enzima lipooxigenase (PRATT, 1992).

Numerosos flavonóides complexam eficazmente íons metálicos, tais como Fe^{2+} e Cu^+ , que são conhecidos por induzirem estresse oxidativo em sistemas biológicos, atuando como catalisadores nos danos causados por espécies reativas de oxigênio. A reação química que ilustra esse fato é conhecida como reação de Fenton, que origina radicais hidroxila altamente reativos. A atividade antioxidante pode ser medida através do efeito inibitório do $FeCl_2/H_2O_2$ (Reação de Fenton), a qual induz dano no DNA (ZHU et al, 2002).

Os taninos e outros compostos fenólicos podem atuar como doadores de prótons aos RL lipídicos no processo de peroxidação, além de inibirem a peroxidação catalisada pela lipooxigenase. Dessa forma, eles podem ser também capazes de inibir a injúria metabólica decorrente desse processo, bem como inibir a citotoxicidade induzida por diferentes agentes químicos (OKUDA; YOSHIDA; HATANO, 1992).

Os antioxidantes fenólicos formam um radical fenoxil quando reagem com espécies oxidadas, havendo a deslocalização do elétron desemparelhado na molécula de oxigênio fenólico. Estes radicais formados não são reativos devido a ressonância de sua estrutura química, ou seja, devido à redução da densidade eletrônica do elétron desemparelhado em todas as formas isoméricas dos CF (SIMIC, 1991). A estabilização pode ocorrer em decorrência, além da deslocalização eletrônica, da formação de pontes de hidrogênio

intramoleculares, ou da oxidação subsequente à reação com outro radical lipídico (CROFT, 1998).

Os CF possuem ainda a capacidade de quelar íons metálicos e, dessa forma, prevenir a formação de espécies radicalares catalisada por metais, dependendo de sua estrutura química e proximidade ou adjacência de grupamentos hidroxila (RICE-EVANS, 1996).

Robak e Gryglewski (1988) demonstraram que flavonóides são sequestradores do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), inibem a formação de produtos da peroxidação lipídica (possivelmente em decorrência da atividade anterior), e que alguns são também inibidores da enzima xantina oxidase, importante fonte biológica de $O_2^{\bullet-}$.

Os dados obtidos em estudos *in vitro* indicam claramente que as catequinas e outros compostos fenólicos, como os flavonóides, podem atuar como potentes antioxidantes. Entretanto, a eficácia do consumo de chá-verde e seus componentes em alterar o status antioxidante *in vivo* é função de suas concentrações e das quantidades consumidas, sendo necessária a ingestão de 8-10 xícaras diárias de chá para se alcançar um nível efetivo no status antioxidante (PRIOR; CAO, 1999).

A administração oral de (-)-epicatequina, segundo Da Silva, Piskula e Terao (1998), aumentou a resistência oxidativa do plasma de ratos. Seus resultados demonstraram que esse CF possui atividade antioxidante, mesmo após sua absorção intestinal e conversão metabólica por conjugação e O-metilação, e que seus metabólitos podem, então, contribuir para as funções fisiológicas dos CF presentes no chá-verde.

As evidências de que os CF da dieta são benéficos à saúde são bastante fortes, entretanto, a relação entre suas atividades biológicas e suas propriedades antioxidantes necessita ser estudada de forma mais aprofundada. O fato de que esses compostos possam atuar como antioxidantes e também como pró-oxidantes indica que, em certas condições e em

certos tecidos, os CF podem representar mais riscos do que benefícios em aspectos oxidativos (DECKER, 1997).

3. OBJETIVOS

GERAL:

Relacionar a atividade antioxidante com a genotoxicidade e a atividade anti-herpética de compostos fenólicos.

ESPECÍFICOS:

- Avaliar a citotoxicidade dos compostos fenólicos selecionados em células VERO, através da determinação da viabilidade celular, usando o ensaio colorimétrico com o sal de tetrazolium.
- Avaliar a capacidade dos compostos fenólicos selecionados de inibir a replicação viral (HSV-1, cepas KOS e 29-R), através do ensaio colorimétrico com o sal de tetrazolium.
- Avaliar a genotoxicidade dos compostos fenólicos selecionados em células VERO, através do Ensaio do Cometa.
- Avaliar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos selecionados, através do ensaio de captação do radical livre DPPH.
- Avaliar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos selecionados, através do ensaio de inibição da peroxidação lipídica *in vitro* (teste de TBARS).
- Relacionar, quando possível, a estrutura química dos compostos fenólicos selecionados com a citotoxicidade, genotoxicidade, atividade anti-herpética, e atividade antioxidante.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Culturas celulares

4.1.1 Células

Foram utilizadas as células VERO (ATCC: CCL 81), que são culturas contínuas de fibroblastos de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*). Essas células foram escolhidas porque são permissivas ao HSV-1, possibilitando sua multiplicação e demonstrando efeito citopático bem visível e reprodutível ao microscópio invertido (HU; HSIUNG, 1989).

4.1.2 Meio de cultura e outros reagentes

Meio de cultura: o meio utilizado para o crescimento e manutenção das células foi o Meio MEM (“Minimal Essential Medium”), adicionado de bicarbonato de sódio. O meio MEM contém quase todos os aminoácidos e vitaminas, vários constituintes de ácidos nucléicos, metabólitos intermediários e fatores de crescimento acessórios. O pH do meio pode variar entre 7,2 a 7,4, como o pH sanguíneo, o que condiciona o uso de uma incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de O₂, já que o sistema tampão utilizado é HCO₃/CO₂. A atmosfera umidificada da estufa previne a evaporação e o aumento da osmolaridade do meio.

Soro fetal bovino (SFB): foi adicionado ao meio de cultura 5% de SFB (Gibco BRL) para promoção do crescimento e para manutenção da linhagem celular. As culturas celulares infectadas com vírus foram mantidas com meio MEM não suplementado com SFB, já que

alguns componentes do soro sabidamente inibem o ciclo de replicação viral (FRESHNEY, 1999).

Tripsina: essa enzima proteolítica foi o agente de dispersão celular utilizado para a formação de subculturas dos tapetes celulares, tanto para a manutenção da cultura como para a realização dos experimentos em placas de múltiplas cavidades. A solução utilizada foi a de tripsina de pâncreas de porco 1:250 (Sigma) preparada em uma solução de EDTA a 0,25%.

Antibióticos e antifúngico: (Gibco BRL: 10.000U penicilina, 10.000µg estreptomicina, 25µg anfotericina B) foram adicionados, na proporção de 1%, ao meio de cultura para evitar a contaminação das culturas por bactérias, fungos e leveduras.

4.2 Vírus

4.2.1 Origem das cepas

Os experimentos foram realizados com as seguintes cepas do Herpesvírus Humano do tipo 1 (HSV-1): cepa KOS e cepa 29-R (resistente ao aciclovir), ambas provenientes da Universidade de Rennes, França.

4.2.2 Preparação das suspensões-estoques virais

Num frasco de cultura de 75cm², uma monocamada celular confluenta formada 24h após a tripsinização, foi lavada 3X com tampão fosfato salino (PBS) e 1mL de uma suspensão viral já existente foi inoculado às células. O frasco foi incubado a 37°C em estufa de CO₂ por 1h para permitir a adsorção e penetração viral e o inóculo foi retirado por sucção a vácuo, cuidadosamente. Em seguida, foi adicionado meio MEM sem SFB e incubado novamente nas

mesmas condições até o aparecimento do efeito citopático, o qual foi monitorado pelo microscópio invertido a cada ciclo de replicação viral (=18h). É importante respeitar o tempo de cada ciclo, pois quando o tapete celular é destruído, os vírions liberados no meio sofrem e o título infeccioso cai rapidamente. Após a destruição total do tapete celular, o frasco foi congelado a -80°C e para completar o rompimento das células e a liberação das partículas virais, o conteúdo do frasco foi descongelado (37°C) e congelado (-80°C) por 3X. A suspensão foi centrifugada a $350\times g$, durante 10 min, e o sobrenadante foi aliquoteado em microtubos estéreis, que foram armazenados a -80°C .

4.2.3 Determinação do título infeccioso viral

A determinação do título infeccioso das suspensões virais é um procedimento padrão e imprescindível à subsequente avaliação adequada de qualquer atividade antiviral. Esta determinação consiste em contar o número de partículas virais, por unidade de volume, capazes de infectar células permissivas. Tal determinação foi efetuada segundo o método das diluições limites, com cálculo do ponto de infecção 50%, de acordo com a metodologia clássica de Reed e Muench (1938).

Antes de descrever este método, alguns conceitos devem ser considerados segundo Burleson, Chambers e Wiedbrauk (1992):

Infectividade viral: capacidade que uma partícula viral possui de invadir uma célula e parasitá-la para se replicar.

Título: número de partículas virais infecciosas por unidade de volume.

Unidade infecciosa: menor quantidade de vírus que produz efeito reconhecível na célula hospedeira.

Efeito citopático (ECP): conjunto das lesões provocadas por uma partícula viral nas células onde ela se multiplica. O ECP do HSV-1 se expressa pelo aparecimento de células arredondadas, brilhantes, freqüentemente ligadas entre si por prolongamentos citoplasmáticos, formando os focos. Esses focos têm aspectos característicos de cachos de uva, que se estendem pelo tapete celular, desorganizando-o (GIRARD; HIRTH, 1989; CONDIT, 2001).

Procedimento: A partir de uma suspensão-estoque viral, foi preparada uma série de diluições na razão de 1:10 em tubos de microtitulação, com meio MEM sem SFB (225µL de meio + 25µL da suspensão viral). Esta série de diluições foi adicionada ao tapete celular previamente formado e o efeito citopático viral foi observado microscopicamente. A titulação foi realizada em placas de microtitulação de 96 cavidades, contendo uma monocamada de células VERO (2,5 x 10⁵ células/mL), na razão de oito cavidades por cada diluição, cada cavidade contendo 200µL da suspensão viral. Após incubação a 37°C, durante 72h (= 4 ciclos de multiplicação do HSV-1; cada ciclo = 18h), foi contado o número de cavidades onde houve ou não efeito citopático. Foi então determinada a diluição que produz resposta positiva em 50% das amostras (TCID₅₀ = 50% *tissue culture infectious dose* = ID₅₀ = dose infectante 50%).

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, pelas seguintes fórmulas:

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

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

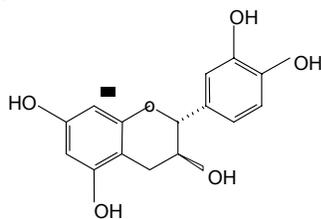
O valor encontrado foi multiplicado pelo volume adicionado a cada cavidade, no caso, 200 μ L e obteve-se o valor de TCID₅₀/mL.

O TCID₅₀ não revela quantas unidades infecciosas estão presentes, mas somente se esta dose ou diluição produz ECP em cerca de 50% das unidades experimentais (no caso, cada cavidade). A partir do valor de TCID₅₀ pode-se calcular a multiplicidade de infecção (MOI), que é a relação entre o título infeccioso e a quantidade de células.

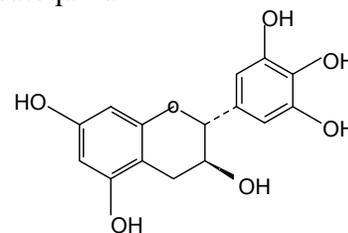
4.3 Compostos fenólicos testados

Amostras utilizadas para a avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, atividades anti-herpética e antioxidante:

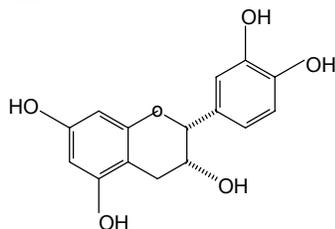
1. Catequina



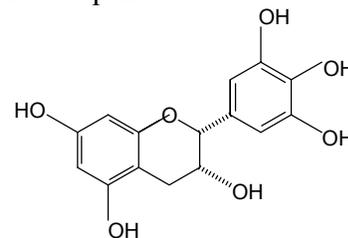
2. Galocatequina



3. Epicatequina

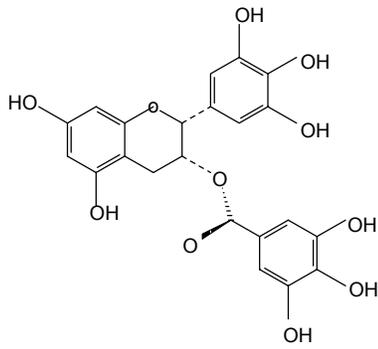


4. Epigalocatequina

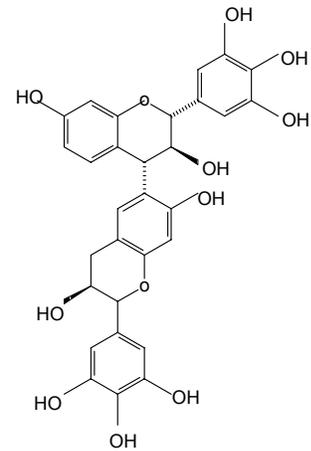
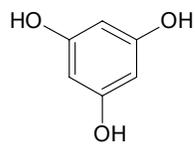


5. Galato de epigalocatequina

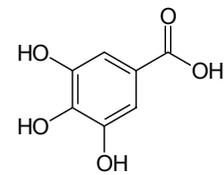
6. Robinetinidol(4 α -6)galocatequina



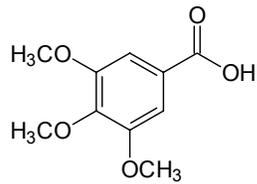
7. 1,3,5-trihidróxibenzeno



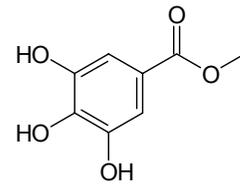
8. Ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidróxibenzóico)



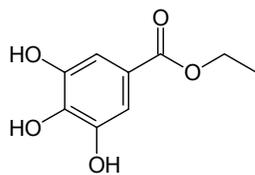
9. Ácido 3,4,5-trimetóxibenzóico



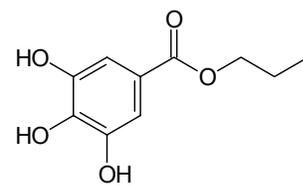
10. Galato de metila



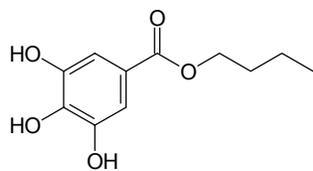
11. Galato de etila



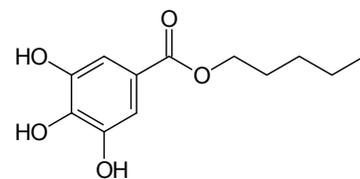
12. Galato de propila



13. Galato de butila

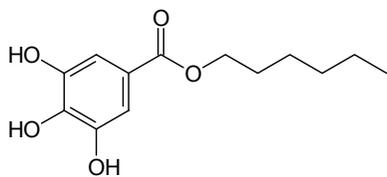


14. Galato de pentila

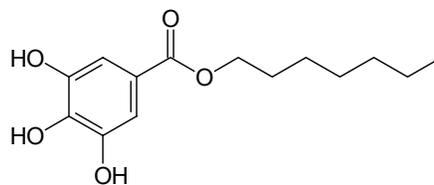


15. Galato de hexila

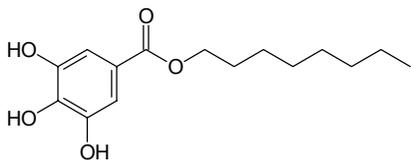
16. Galato de heptila



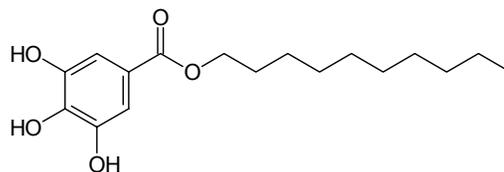
17. Galato de octila



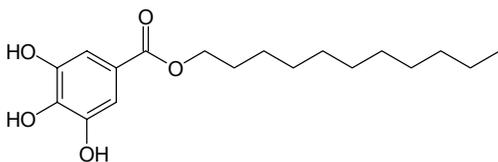
18. Galato de decila



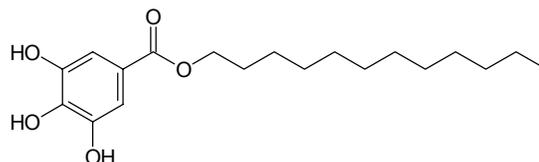
19. Galato de undecila



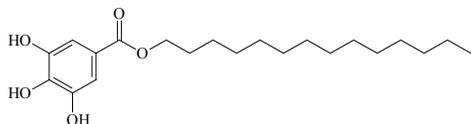
20. Galato de dodecila



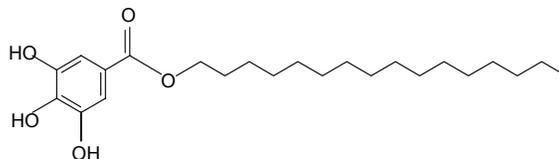
21. Galato de tetradecila



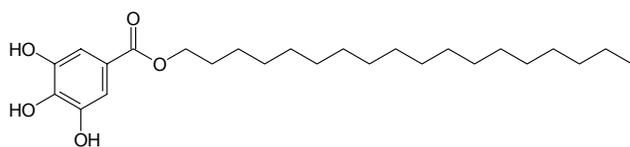
22. Galato de cetila



23. Galato de octadecila

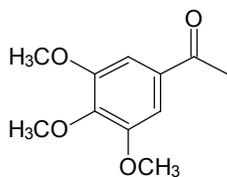


24. 4-metóxiacetofenona

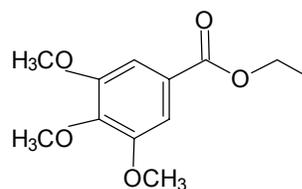


25. 3,4,5-trimetóxiacetofenona

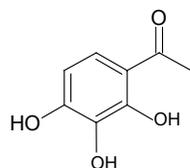
26. 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila



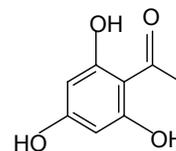
27. Galacetofenona(2,3,4-trihidroxiacetofenona)



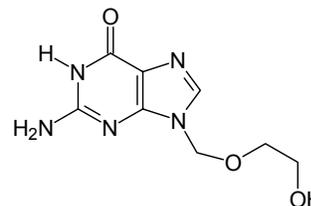
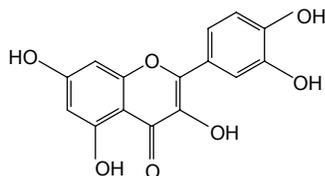
28. Floroacetofenona



29. Quercetina



30. Aciclovir



As amostras 1, 2, 3, 4 e 29 foram obtidas da Extrasynthèse; as amostras 5 e 30 foram obtidas da Sigma; a amostra 6 foi cedida pelo Professor Doutor João Carlos Palazzo de Mello da Universidade Estadual de Maringá (DE MELLO; PETEREIT; NAHRSTEDT, 1995); e as amostras 7 a 28 foram sintetizadas no Laboratório de Síntese Estrutura e Atividade, LABSEAT, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, por Paulo César Leal, sob a orientação dos Professores Doutores Ricardo Nunes e Rosendo Yunes.

4.3.1. Preparação das soluções-mãe

Foram pesados 10mg de cada amostra, a qual foi dissolvida em dimetilsulfóxido, concentração final de, no máximo, 1% (DMSO, Merck) + qsp 10mL de meio MEM. Portanto, a concentração final de cada solução-mãe foi de 1mg/mL. Cada solução foi filtrada em condições assépticas num tubo estéril usando filtro (Millipore) de 0,2 μ m. Em seguida, essas soluções foram mantidas sob refrigeração a 4°C e protegidas da luz até seu uso.

4.4 Avaliação da citotoxicidade

4.4.1 Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)

Neste trabalho foi utilizado o ensaio do MTT padronizado por Freitas (2001), com modificações propostas por Andrighetti-Fhröner et al (2003).

Procedimento: Células VERO foram cultivadas em placas de microtitulação de 96 cavidades ($2,5 \times 10^5$ células/mL, 100µL/cavidade) até confluência (24h) usando meio MEM suplementado com 5% de SFB, a 37°C/5%CO₂. O meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 200µL dos materiais-teste diluídos (razão 1:2, a partir de 1mg/mL) / cavidade. Foram feitos controles celulares (200µL meio MEM/cavidade) e branco (100µL de DMSO/cavidade). Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C/5%CO₂, por 96h, e então foi aspirado todo o meio e adicionados 50µL da solução de MTT (Sigma) a 1mg/mL em meio MEM/cavidade, e as placas foram incubadas por mais 4h, nas mesmas condições. Após o período de incubação, foi retirado o meio contendo MTT de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células, e adicionados 100µL de DMSO (Nuclear)/cavidade para solubilizar os sais de formazan. A placa foi agitada, levemente, à temperatura ambiente, por 10 min, para que todo o formazan fosse solubilizado e a absorbância medida a 540nm em leitor tipo ELISA (Bio-Tek, El_x 800).

Os valores de absorbância medidos para cada concentração de cada material-teste (DO_{amostra}) foram transformados em porcentagem (x%) em relação ao controle celular (DO_{controle celular}), o qual é considerado 100% viável, através da seguinte fórmula:

$$x\% = \frac{DO_{amostra} \times 100}{DO_{controle\ celular}}$$

Em seguida, os percentuais calculados, referentes às diferentes concentrações das amostras, foram inseridos num gráfico, onde através da análise de regressão, foi possível calcular os valores de CC_{50} , ou seja, a concentração de cada amostra que reduziu em 50% a viabilidade celular. Os valores de CC_{50} calculados representam a média de três experimentos independentes \pm erro padrão da média.

4.5 Avaliação da potencial atividade antiviral *in vitro*

4.5.1 Avaliação da atividade anti-herpética através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)

Procedimento: Células VERO foram cultivadas em placas de microtitulação de 96 cavidades ($2,5 \times 10^5$ células/mL, 100 μ L/cavidade) até confluência (24h) usando meio MEM suplementado com 5% de SFB, a 37°C/5%CO₂. O meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100 μ L das diferentes concentrações dos materiais-teste diluídos (razão 1:2 a partir do valor de CC_{50} de cada amostra obtido anteriormente) + 100 μ L da suspensão viral/cavidade. Foram feitos controle celular (200 μ L meio MEM/cavidade), controle viral (100 μ L suspensão viral + 100 μ L meio/cavidade), controle positivo [100 μ L suspensão viral + 100 μ L aciclovir (10 μ g/mL)/cavidade] e branco (100 μ L DMSO/cavidade). Após, as placas foram incubadas a 37°C/5%CO₂, por 96h, e então foi aspirado todo o meio e adicionados 50 μ L de MTT (Sigma) a 1mg/mL em meio MEM/cavidade e, as placas foram incubadas por mais 4h, nas mesmas condições. Após o período de incubação, foi retirado o meio contendo MTT de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células, e adicionados 100 μ L de DMSO (Nuclear)/cavidade para solubilizar os sais de formazan. A placa foi agitada,

levemente, à temperatura ambiente, por 10min, para que todo o formazan fosse solubilizado e a absorbância medida a 540nm em leitor tipo ELISA (Bio-Tek, El_x 800).

Os valores de absorbância medidos para cada concentração de cada material-teste (DO_{amostra}) foram transformados em porcentagem (x%) em relação ao controle celular e ao controle viral, através da seguinte fórmula:

$$x\% = \frac{DO_{amostra} - DO_{controle_viral}}{DO_{controle\ celular} - DO_{controle\ viral}} \times 100$$

Em seguida, os percentuais calculados, conforme a fórmula acima, referentes às diferentes concentrações das amostras, foram inseridos num gráfico, onde através da análise de regressão, foi possível calcular os valores de CE₅₀, ou seja, a concentração de cada amostra que manteve 50% das células viáveis na presença da infecção viral.

Com posse dos valores de CC₅₀ e CE₅₀ foi possível calcular o índice de seletividade (IS) de cada amostra em relação a cada cepa viral utilizada, através da seguinte fórmula:

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

4.6 Avaliação da genotoxicidade através do Ensaio do Cometa

Para a avaliação da genotoxicidade dos CF foi utilizado o Ensaio do Cometa, segundo a técnica alcalina originalmente proposta por Singh et al. (1988), com algumas modificações na preparação das lâminas propostas por Klaude et al. (1996) e, de acordo com as recomendações do *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* (TICE et al., 2000).

Procedimento: Foram cultivadas células VERO, em placas de 24 cavidades (2,5 x 10⁵ células/mL, 1mL/cavidade), que formaram uma monocamada confluenta em 24h. Após o tapete formado, cada uma das amostras foi adicionada à placa (500µL/cavidade), a qual foi

incubada durante 90min, a 37⁰C/5% CO₂, para a avaliação da indução de genotoxicidade por exposição aguda das células aos compostos. As duas concentrações utilizadas, C1 (cepa KOS) e C2 (cepa 29-R), (cada concentração em triplicata) foram aquelas nas quais se observou previamente alguma atividade anti-herpética, mas que não causaram citotoxicidade, (CE₅₀), conforme apresentado na Tabela 3.

Os controles positivos consistiram em lâminas preparadas com células VERO tratadas com uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 200 e 100μM, durante 90min, a 37⁰C/5% CO₂. A titulação da solução a 30% de H₂O₂ por permanganometria, foi realizada periodicamente, para garantir a concentração dos controles positivos.

Os controles negativos consistiram em lâminas preparadas com células VERO não tratadas, ou seja, contendo apenas meio de manutenção, submetidas ao mesmo tratamento que as demais.

4.6.1 Preparação da suspensão celular

Após os tratamentos, o tapete celular de cada cavidade das placas foi lavado 3X com tampão PBS e então tripsinizado. Em cada cavidade, foram adicionados 150μl da solução de tripsina:EDTA para a obtenção da suspensão celular e a ação da tripsina foi interrompida pela adição de meio MEM/5% SFB (500μL/cavidade). A suspensão celular foi recolhida e centrifugada a 350xg por 3min. Após descartar, cuidadosamente, o sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio MEM de forma a obter uma suspensão de aproximadamente 1x10⁶ células/ml. Essa suspensão celular foi, posteriormente, adicionada à agarose de baixo ponto de fusão (Gibco BRL) para formar a segunda camada sobre as lâminas. Foram utilizadas duas lâminas por tratamento.

Tabela 3: Concentrações das amostras utilizadas para a avaliação da genotoxicidade através do Ensaio do Cometa.

	AMOSTRA	C1 (µM)	C2 (µM)
1	Catequina	630,00	629,38
2	Galocatequina	103,32	140,11
3	Epicatequina	458,57	107,14
4	Epigalocatequina	173,56	70,42
5	Galato de epigalocatequina	1107,69	697,92
6	Robinetinidol(4 α -6)galocatequina	69,85	72,19
7	1,3,5-trihidróxibenzeno	7384,98	6732,38
8	Ácido gálico	404,30	789,91
9	Ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico	3083,36	693,17
10	Galato de metila	295,15	882,05
11	Galato de etila	673,71	510,47
12	Galato de propila	1462,02	98,63
13	Galato de butila	273,01	94,86
14	Galato de pentila	177,73	83,41
15	Galato de hexila	429,30	560,25
16	Galato de heptila	179,76	243,23
17	Galato de octila	2353,70	673,93
18	Galato de decila	869,32	2468,96
19	Galato de undecila	1733,85	767,08
20	Galato de dodecila	847,48	2288,50
21	Galato de tetradecila	513,25	348,00
22	Galato de cetila	256,60	867,32
23	Galato de octadecila	757,12	638,26
24	4-metóxiacetofenona	6159,82	1164,08
25	3,4,5-trimetóxiacetofenona	2460,04	393,92
26	3,4,5-trimetóxi benzoato de etila	94,32	600,50
27	Galacetofenona(2,3,4-trihidróxiacetofenona)	3500,95	978,35
28	Floroacetofenona	409,28	250,97
29	Quercetina	184,57	145,63
30	Aciclovir	535,30	812,52

4.6.2 Preparação das lâminas

Conforme as modificações propostas por Klaude et al. (1996), foram utilizadas lâminas de microscópio foscas apenas numa das extremidades, desengorduradas, e que já

tiveram uma primeira camada de agarose formada com uma solução de agarose de ponto de fusão normal (Gibco BRL) a 1,5% em PBS livre de íons cálcio e magnésio e deixadas à temperatura de 4°C para secagem.

A vantagem da utilização de lâminas lisas, como descrito acima, é de que não há formação de *background*, tão comum quando se utilizam lâminas foscas, além do que, após a eletroforese, as lâminas podem ser secas e fixadas em metanol, o que permite a estocagem das mesmas até a análise. Após coloração e análise, as lâminas podem, ainda, ser secas novamente e guardadas sem que haja perda importante de material ou alteração na aparência dos cometas.

Foram usados 40µL da suspensão celular, previamente preparada e tratada, e 60µl de solução de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% em PBS livre de íons cálcio e magnésio, mantida a 37°C, para cada lâmina. Uma lamínula de 24x60mm foi colocada sobre cada lâmina, imediatamente, para que a agarose não secasse, antes de se espalhar por toda a lâmina. As lâminas foram deixadas a 4°C, por 15min, para a solidificação da agarose.

4.6.3 Lise celular

Em seguida, foram retiradas as lamínulas, e as lâminas foram submersas numa solução de lise gelada (4°C), recém-preparada (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris-HCl 10mM, qsp de NaOH 10N para obter pH 10) adicionada de 10% DMSO e 1% Triton X-100.

A solução de lise é uma solução detergente contendo altas concentrações de sais, que promove a desintegração das membranas celulares. As lâminas podem permanecer nesta solução, no mínimo, por 1h e, no máximo, por 30 dias.

4.6.4 Tratamento alcalino e eletroforese

Após a lise celular, as lâminas foram submetidas ao tratamento alcalino em solução tampão de pH=13 (300mM NaOH e 1mM EDTA), previamente refrigerada, por 30min, em banho de gelo.

A corrida de eletroforese foi feita numa cuba horizontal disposta num banho de gelo, com voltagem constante (25Volts) e amperagem de 280-300mA, por 30min.

Durante o tratamento alcalino, ocorre o relaxamento e desespiralização dos sítios de rompimento da molécula de DNA (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

4.6.5 Neutralização

Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas 3X com uma solução de neutralização (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5), por 5min cada.

4.6.6 Coloração

As lâminas foram coradas com 30µl de uma solução aquosa de brometo de etídeo a 20µg/ml e foram cobertas com lamínulas. O brometo de etídeo é um agente intercalante de DNA que emite fluorescência quando exposto à radiação UV (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

4.6.7 Análise dos cometas

Após coradas, as lâminas foram avaliadas, imediatamente, em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40), com filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm, com aumento de 400X.

A análise dos cometas foi realizada visualmente, conforme a classificação proposta por Kobayashi et al. (1995), seguindo algumas modificações introduzidas por Miyamae et al. (1998a).

Através da análise microscópica, os cometas foram classificados em cinco categorias: **classe I**, sem cauda; **classe II**, cometas com pequenas caudas (comprimento da cauda menor que 25% do diâmetro da cabeça); **classe III**, cometas com caudas médias (comprimento da cauda entre 25% e 100% do diâmetro da cabeça); **classe IV**, cometas com caudas longas (comprimento da cauda maior do que o diâmetro da cabeça); e **classe V**, cometas mal definidos ou com cabeças pequenas (KOBAYASHI et al., 1995).

Cinquenta células foram analisadas, ao acaso, na região central de cada lâmina e diferenciadas visualmente em cinco classes, utilizando-se um escore, onde foram atribuídos valores 0, 1, 2, 3 e 4 para as classes I, II, III, IV e V, respectivamente (COLLINS et al., 1997a; DA SILVA et al., 2000; SILVA et al., 2002) (Figura 5). Desta forma, o escore total variou de zero (cinquenta núcleos intactos) a 200 (cinquenta núcleos totalmente danificados). Os cometas localizados nas bordas do gel não foram quantificados a fim de evitar resultados falso-positivos.

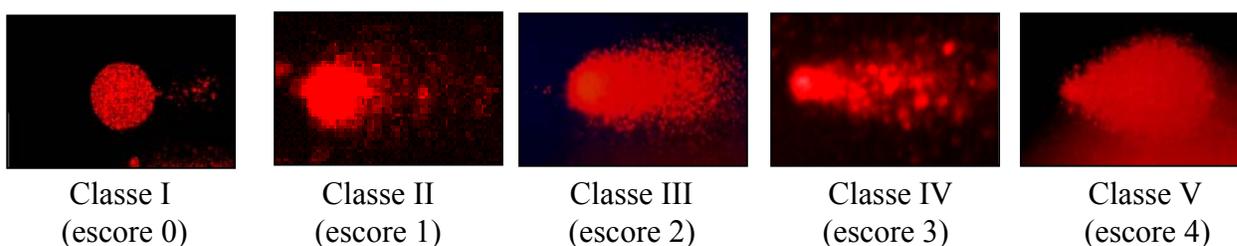


Figura 5: Diferenciação das classes dos cometas. Fonte: autora.

4.6.8 Análise estatística

Cada experimento foi realizado em triplicata e para cada tratamento foram feitas duas lâminas, tendo sido avaliadas, aleatoriamente, 50 células/lâmina.

As diferenças, estatisticamente significativas ou não dos tratamentos, com relação aos controles negativos, foram avaliadas através do teste *t* de Student, com nível de significância de 5%.

4.6.9 Avaliação da viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular através do teste de exclusão pelo azul de Trypan apenas indica a presença de células mortas com membranas desintegradas ao final dos tratamentos. Este é um corante que só penetra nas células mortas, cujas membranas não podem mais excluí-lo. Este fenômeno de permeabilidade de membrana celular permite estimar indiretamente o grau de integridade da mesma. O percentual de células não coradas representa o índice de viabilidade celular. A determinação da sobrevivência das células é mais relevante com relação ao significado biológico do ensaio, já que a genotoxicidade é mais importante quando ocorre em células capazes de sobreviverem ao dano, de forma que se recomenda efetuar o Ensaio do Cometa, se possível, com amostras com viabilidade celular acima de 70% (HELBIG; SPEIT, 1997; TICE et al, 2000).

Procedimento: as células do tapete celular, previamente tratadas com a maior concentração selecionada entre C1 e C2 de cada amostra (Tabela 3), por 90min/37°C, foram tripsinizadas e ressuspensas, de forma a se obter uma suspensão celular de 1×10^6 células/mL. Em seguida, 50µL dessa suspensão foram colocados num microtubo e adicionados de 50µL da solução de azul de Trypan a 0,4% em PBS. Após 5 min, a 37°C, foi

colocada uma alíquota numa câmara de Neubauer e as células foram observadas ao microscópio, diferenciando-se proporcionalmente as células viáveis das inviáveis, em relação aos controlos celulares.

4.7 Avaliação da atividade antioxidante de compostos fenólicos

(Esta avaliação foi realizada por Tiago Opala Vieira e Rober Rosso, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski-Pasa, no Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas, CIF, CCS, Universidade Federal de Santa Catarina).

Existem muitas maneiras de se estudar as EROS, mas a mensuração direta das mesmas é muito difícil em decorrência da sua alta reatividade e do fato do seu tempo de meia-vida ser relativamente curto. A avaliação da atividade antioxidante, no entanto, é incompleta se desacompanhada da mensuração dos sistemas de defesa contra as mesmas, ou seja, enzimas e agentes antioxidantes. Dada a natureza da atividade enzimática e o potencial de interação entre diferentes sistemas, o efeito global do sistema antioxidante é, provavelmente, muito maior e mais importante do que cada componente individual (PUNCHARD; KELLY, 1996).

Assim, neste trabalho foram usadas duas técnicas para avaliar a atividade antioxidante dos compostos fenólicos selecionados: o ensaio de captação do radical livre DPPH e o ensaio de inibição da peroxidação lipídica.

4.7.1 Ensaio de captação do radical livre DPPH

Neste ensaio, os compostos que possuem atividade antioxidante reagem com o radical livre estável [1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH)], que apresenta uma absorção máxima a 517nm, resultando na produção de [1,1-difenil-2-picril hidrazina], que é evidenciada por uma

alteração na absorvância. Este radical é usado como ferramenta para estudar a ação de compostos seqüestradores de radicais livres, sendo uma técnica que independe de qualquer atividade enzimática (VIVOT et al., 2001).

Procedimento: misturas contendo 5 μ L de cada amostra dissolvida em 316 μ M de DPPH em solução etanólica (95 μ L, concentração final de DPPH = 300 μ M) foram colocadas numa placa de microtitulação de 96 cavidades, incubada por 30min/37°C e a absorvância foi medida a 515nm. As concentrações intermediárias dos compostos utilizados para a avaliação da reatividade dos mesmos com DPPH foram 0, 25, 30, 50, 80, 100, 150, 200 e 300 μ M. Em alguns casos, quando a reatividade era alta, foi necessário utilizar as concentrações de 1, 5 e 10 μ M. O percentual de captação das amostras tratadas foi determinado comparando a amostra com o controle (100%), na presença única do DPPH. Os valores de CE₅₀ representam a concentração da amostra que é necessária para captar 50% dos radicais livres DPPH, e foram calculadas por análise de regressão.

4.7.2 Avaliação da peroxidação lipídica

Um dos métodos mais usados para medir a peroxidação lipídica *in vitro* é a determinação da formação de dialdeído malônico (MDA), composto majoritário que resulta da decomposição de endoperóxidos lipídicos. Uma molécula de MDA reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), com eliminação de duas moléculas de água, formando um pigmento rosa cristalino, que pode ser medido espectrofotometricamente, com absorvância máxima a 532- 535nm. Como outras substâncias resultantes da peroxidação lipídica também reagem com o TBA, nas condições experimentais preconizadas, refere-se ao ensaio como detecção de substâncias que reagem com o TBA (TBARS) (BIRD; DRAPER, 1984b; AUST, 1994).

Procedimento: os microsomas foram obtidos por centrifugações diferenciais pela agregação com cálcio. Os fígados foram homogeneizados em tampão tris-sacarose 10mM, pH 7,4 e centrifugados a 600Xg por 5min/4°C. A fração mitocondrial foi obtida do sobrenadante e centrifugada a 12.000Xg por 10min. A fração microsomal foi obtida pela precipitação do sobrenadante da fração mitocondrial usando 80mM de cloreto de cálcio. O precipitado foi lavado com 15mM de cloreto de potássio/10mM de Tris, pH 7,4 e centrifugado a 25.000Xg por 15min. Depois de lavados, os microsomas foram ressuspensos em 20% de glicerol em tampão fosfato de sódio 0,1M (SCHENKMAN; CINTI, 1978). A fração foi então congelada a -170°C, em nitrogênio líquido, para posterior análise e determinação da concentração de proteínas, realizada segundo o método de LOWRY et al. (1951). As amostras foram diluídas e adicionadas a uma solução contendo carbonato de sódio 2% em hidróxido de sódio 0,4%, tartarato de sódio 0,02% e sulfato de cobre 0,01%. Após um período de incubação de 10min à temperatura ambiente (25 °C), foi adicionado reagente de Folin nas amostras, para que estas fossem incubadas por mais 30 min na mesma temperatura. A leitura foi realizada em 660nm e as concentrações obtidas através de curva padrão utilizando albumina sérica bovina (BSA). A lipoperoxidação foi induzida pela adição de 25µM de FeSO₄ e 500µM de ascorbato a um meio de reação contendo 2mg/mL de proteína microsomal e 0,1M de tampão Tris-HCl, pH 7,4 (SANZ et al., 1994). As amostras foram incubadas por 60min/37°C e posteriormente 1mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,76% foi adicionado. As amostras foram então incubadas por 30min/100°C. Após a incubação, o material foi resfriado durante 30min/5°C, e posteriormente, centrifugado por 5min a 10.000Xg, e a peroxidação lipídica foi determinada pelo método do ácido tiobarbitúrico (OHKAWA, 1979; BIRD; DRAPER, 1984b). As concentrações intermediárias dos compostos utilizados para a avaliação da inibição da peroxidação lipídica foram 0, 25, 30, 50, 80, 100, 150, 200 e 300µM. As concentrações das substâncias que reagiram com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram calculadas utilizando-se

o coeficiente de extinção de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 535nm e foram expressas em nmol/mg de proteína (BUEGE; AUST, 1978).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da citotoxicidade

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 sua sobrevivência, multiplicação e realização de suas funções metabólicas. Assim, a reação das células frente a um composto, *in vitro*, se traduz pela desorganização do tapete celular e aspecto granuloso e arredondado das células (STREISSLE et al., 1981). A intensidade da lesão celular depende de vários fatores, tais como a concentração do material testado, o tempo de exposição, o tipo de célula, a capacidade do composto em penetrar na célula, etc (HU; HSIUNG, 1989).

Antes de avaliar a atividade antiviral de um composto, é necessário fazer uma avaliação da sua possível toxicidade em relação às células em questão. O composto antiviral ideal é aquele que inibe o ciclo de replicação do vírus sem interferir na célula hospedeira, de forma que esta seja capaz de se recuperar da infecção e manter suas atividades metabólicas (VANDEN BERGHE; VLIETINCK; VAN HOOFF, 1986). A relação entre os efeitos farmacológicos e tóxicos de um composto é um requisito importante quando se está verificando sua aplicabilidade como agente terapêutico (MELO, 2000).

A realização de testes de citotoxicidade *in vitro* de novos compostos é importante nos estágios iniciais de desenvolvimento de fármacos (PUTNAM; BOMBICK; DOOLITTLE, 2002), ou seja, a avaliação da habilidade de um composto em causar alterações ou, até mesmo, morte celular, como consequência dos danos de suas funções celulares. Esses testes são também importantes para definir os intervalos das concentrações a serem utilizadas em

avaliações posteriores e para fornecer informações sobre outros parâmetros a serem pesquisados, como a genotoxicidade e potenciais atividades farmacológicas (EISENBRAND et al., 2002).

Os ensaios mais freqüentemente utilizados para a avaliação da citotoxicidade baseiam-se na alteração da permeabilidade celular, nas funções mitocondriais e nas alterações da morfologia celular e da proliferação celular. Esses ensaios já estão estabelecidos para muitos tipos de células e avaliam diferentes aspectos das funções celulares (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997; WILSON, 2000; EISENBRAND et al., 2002).

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, as quais reduzem este composto em suas mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto formazan de coloração azul-escuro, insolúvel em água, que fica armazenado no citoplasma celular. 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 (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986; BARILE, 1994).

O ensaio é apropriado para uma variedade de linhagens celulares, que exibem crescimento exponencial em cultura e alto nível de atividade mitocondrial. Deve-se levar em consideração que alguns compostos afetam seletivamente a mitocôndria, resultando em uma superestimação da toxicidade, já que o MTT sofre conversão enzimática em células viáveis e outros compostos podem inibir este processo, fazendo com que o composto pareça mais tóxico do que ele realmente é (BARILE, 1994; SMEE, 2002).

Os testes de citotoxicidade foram realizados com células em crescimento e não em monocamadas com células em fase estacionária, por três razões. Primeira, os efeitos tóxicos

no ciclo celular podem desaparecer; segunda, o metabolismo de células estacionárias é geralmente menor; e terceira, a alta densidade celular da monocamada pode influenciar a disponibilidade dos alvos (COS et al., 2001).

A avaliação da citotoxicidade dos compostos fenólicos frente às células VERO foi realizada através da avaliação da viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico com MTT, conforme metodologia descrita no item 4.4.1. Os valores de CC_{50} , obtidos através da análise de regressão, estão demonstrados na Tabela 4 e Figura 6.

Foi observado que, quanto maior a cadeia carbônica lateral dos ésteres do ácido gálico, menor era a solubilidade em meio aquoso (meio de cultura). Esse fato dificultou a solubilização dos compostos com mais de dez carbonos na cadeia lateral, apesar do uso prévio do DMSO, que foi, em alguns casos, acrescido de agitação em aparelho de ultra-som (Fisher Scientific), fazendo com que o composto estivesse menos disponível às células, resultando, portanto, numa subestimativa da citotoxicidade. As demais amostras foram solubilizadas sem dificuldade.

De acordo com Habtemariam (1995), compostos contendo hidroxilas interagem com ferro e outros metais de transição (presentes no meio de cultura + soro), induzindo a redução do MTT, ou seja, aumentando sua coloração azulada. Além disso, alguns flavonóides, como a quercetina, podem induzir a proliferação celular e, conseqüentemente, aumentar a conversão do MTT a formazan (LUNA et al., 1996). Shahidi e Wanasundara (1992) afirmaram que o galato de propila pode quelar íons ferro e formar complexos de coloração azul-escura. Assim, esses fatos poderiam contribuir para a superestimativa dos valores de CC_{50} (citotoxicidade) dos compostos fenólicos testados por esta metodologia.

Tabela 4: Resultados da determinação da citotoxicidade dos compostos fenólicos selecionados, em células VERO, através do ensaio colorimétrico com MTT.

AMOSTRA	CC ₅₀ (μM)*
1 Catequina	1186,10 ± 78,58
2 Galocatequina	379,40 ± 32,12
3 Epicatequina	644,23 ± 52,35
4 Epigalocatequina	901,40 ± 69,58
5 Galato de epigalocatequina	1417,23 ± 151,21
6 Robinetinidol(4α-6)galocatequina	364,05 ± 25,65
7 1,3,5-trihidróxibenzeno	>7929,58
8 Ácido gálico	1048,14 ± 95,58
9 Ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico	3026,25 ± 236,58
10 Galato de metila	3388,24 ± 256,32
11 Galato de etila	2712,52 ± 215,23
12 Galato de propila	1809,00 ± 156,23
13 Galato de butila	1594,42 ± 145,62
14 Galato de pentila	1063,77 ± 89,69
15 Galato de hexila	1963,74 ± 145,69
16 Galato de heptila	1070,89 ± 98,98
17 Galato de octila	2092,83 ± 154,78
18 Galato de decila	>3221,75
19 Galato de undecila	>3082,52
20 Galato de dodecila	>2954,73
21 Galato de tetradecila	>2728,59
22 Galato de cetila	>2534,53
23 Galato de octadecila	>2366,30
24 4-metóxiacetofenona	>6659,12
25 3,4,5-trimetóxiacetofenona	2974,69 ± 258,98
26 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila	3161,21 ± 321,23
27 Galacetofenona(2,3,4-trihidróxiacetofenona)	3096,70 ± 236,52
28 Floroacetofenona	1596,97 ± 145,56
29 Quercetina	204,65 ± 20,32
30 Aciclovir	2390,01 ± 214,42

*Concentração citotóxica a 50%: os valores representam a média de três experimentos independentes ± erro padrão da média

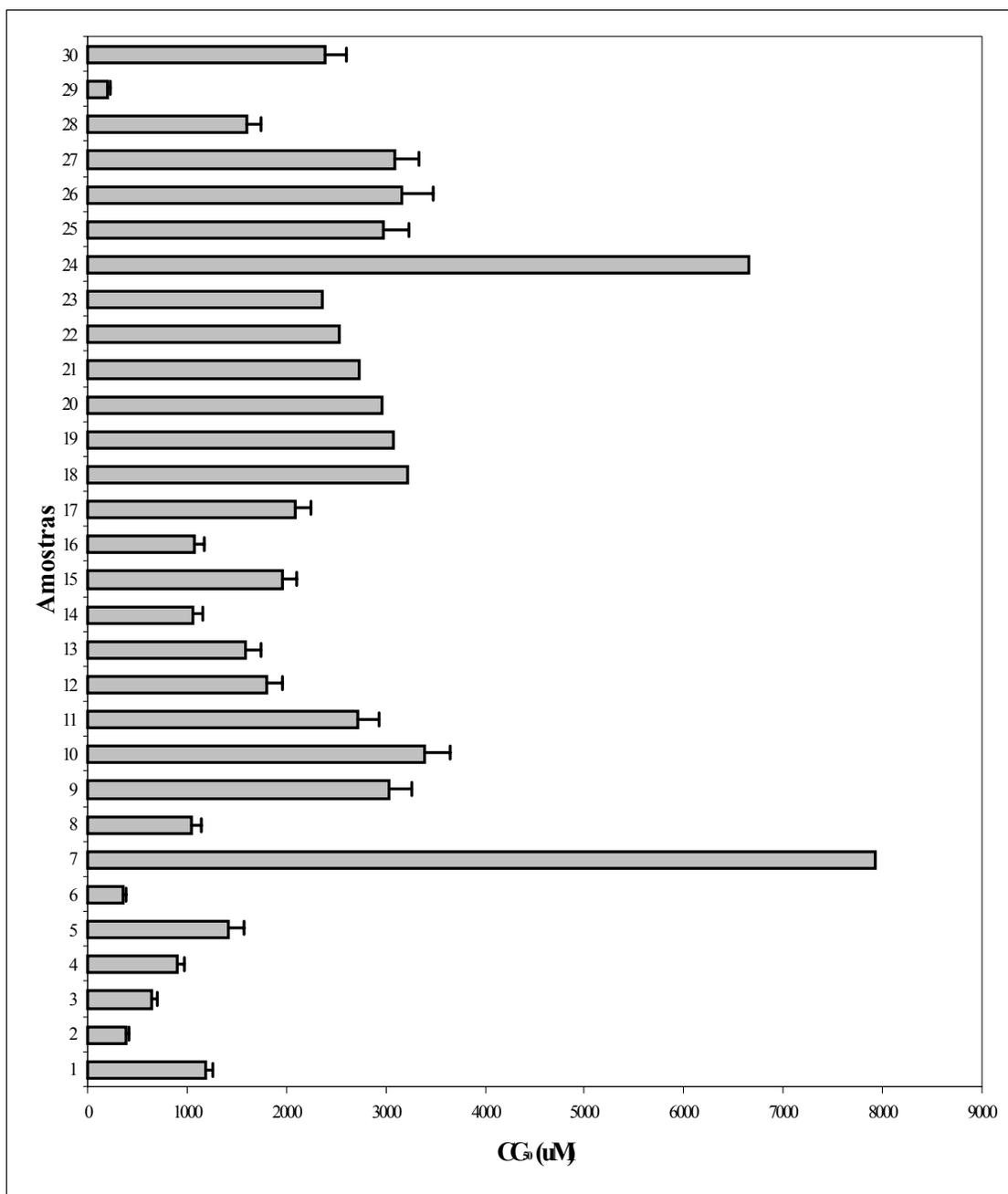


Figura 6: Resultados da determinação da citotoxicidade dos compostos fenólicos selecionados, em células VERO, através do ensaio colorimétrico com MTT.

Observou-se que as moléculas com grande número de hidroxilas livres apresentaram maior toxicidade às células VERO. Este é o caso do robinetinidol(4 α -6)galocatequina (**6**), com onze hidroxilas livres. A quercetina (**29**), apesar de ter o mesmo número de hidroxilas livres que a catequina (**1**) e a epicatequina (**3**), apresenta maior hidrofobicidade, e portanto, maior permeabilidade à membrana celular (JOHNSON; LOO, 2000). Cos et al. (2000) também explicaram esse fato pela presença de ligações duplas entre os C2 e C3 do anel C da

carbonila em C4 da quercetina. A galocatequina (**2**), com maior citotoxicidade, e a epigalocatequina (**4**), ambas com seis hidroxilas livres, também apresentaram diferença de toxicidade devido à localização das hidroxilas. Os n-álquil ésteres de ácido gálico (**8, 10 a 23**), 1,3,5-trihidróxibenzeno (**7**) e floroacetofenona (**28**), com apenas três hidroxilas livres, apresentaram menor citotoxicidade em comparação com os demais compostos. As demais substâncias, sem hidroxilas livres, também foram pouco citotóxicas em relação às moléculas com mais de cinco hidroxilas livres.

5.2 Avaliação da atividade antiviral *in vitro*

De Clercq (1982) realizou um estudo comparativo da susceptibilidade do HSV-1 em infectar diferentes tipos de células e concluiu que as linhagens provenientes de células humanas eram mais susceptíveis que as linhagens felinas e símias. De acordo com estes resultados pode-se supor que, se uma substância inibe a replicação do vírus HSV-1 em células VERO (símia), sua ação antiviral em células humanas será ainda mais efetiva.

Inúmeras metodologias são utilizadas para a avaliação da atividade antiviral de compostos em culturas celulares, os quais incluem a quantificação visual da atividade antiviral baseada na inibição do efeito citopático induzido por vírus (SIMÕES; AMOROS; GIRRE, 1999; SEMPLE et al., 2001; HUHEIHEL et al., 2002; MA et al., 2002), ou por medidas menos subjetivas, como o ensaio colorimétrico com MTT (KODAMA et al., 1996; BEDOYA et al., 2001; BETANCUR-GALVIS et al., 2002; FORTIN et al., 2002) ou avaliações fluorimétricas (SMEE et al., 2002).

O ensaio com MTT vem sendo rotineiramente utilizado para a detecção de citotoxicidade e atividade antiviral de compostos sintéticos e de origem natural (SUDO et al.,

1994; BEDARD et al., 1999; SERKEDJIEVA; IVANCHEVA, 1999; BARRIO; PARRA, 2000; KANEKO et al., 2001; BETANCUR-GALVIS et al., 2001; BETANCUR-GALVIS et al., 2002).

Vírus que causam infecções líticas, tais como o HSV-1, causam destruição das células cultivadas *in vitro*, as quais podem descolar da placa de cultura. Assim, o ensaio colorimétrico com MTT pode ser, potencialmente, utilizado para a quantificação desta destruição celular ou a ausência da mesma, devido à presença do agente antiviral (SMEE et al., 2002). Esta técnica apresenta as seguintes vantagens: um grande número de compostos podem ser testados rapidamente e o ensaio pode ser automatizado; a facilidade para realizar o experimento, com uma avaliação mais objetiva do que a avaliação da inibição do efeito citopático viral; a possibilidade da avaliação simultânea da citotoxicidade e da atividade antiviral, sendo este um método tão sensível quanto o método de redução das placas de lise (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991; SUDO et al, 1994; SMEE et al., 2002).

O uso de um controle positivo nos ensaios de detecção da atividade antiviral permite demonstrar se estes foram realizados adequadamente e num nível aceitável de sensibilidade, sendo considerado ainda um padrão, com o qual a atividade das amostras em teste pode ser comparada. O ideal é que o fármaco controle positivo seja aquele usado na clínica (SIDWELL, 1986); neste trabalho, foi utilizado o aciclovir a 10µg/mL, em todos os experimentos.

A atividade antiviral dos compostos fenólicos foi realizada através do ensaio colorimétrico com MTT, conforme metodologia descrita no item 4.5.1. Os valores de CE₅₀ obtidos para cada cepa testada do HSV-1, através de análise de regressão, estão demonstrados na Tabela 5 e Figura 7.

Tabela 5: Resultados da determinação da atividade anti-herpética dos compostos fenólicos selecionados, em células VERO infectadas com o vírus HSV-1 (cepas KOS e 29-R), através do ensaio colorimétrico com MTT.

AMOSTRA	HSV-1 cepa KOS	HSV-1 cepa 29-R
	CE ₅₀ (μM)*	CE ₅₀ (μM)*
1 Catequina	630,00 ± 52,32	629,38 ± 25,69
2 Galocatequina	103,32 ± 8,56	140,11 ± 11,45
3 Epicatequina	458,57 ± 23,25	107,14 ± 9,85
4 Epigalocatequina	173,56 ± 21,21	70,42 ± 5,45
5 Galato de epigalocatequina	1107,69 ± 85,69	697,92 ± 58,89
6 Robinetinidol(4α-6)galocatequina	69,85 ± 5,23	72,19 ± 5,69
7 1,3,5-trihidróxibenzeno	7384,98 ± 256,58	6732,38 ± 569,98
8 Ácido gálico	404,30 ± 38,56	789,91 ± 45,58
9 Ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico	3083,36 ± 231,23	693,17 ± 56,98
10 Galato de metila	295,15 ± 22,12	882,05 ± 65,23
11 Galato de etila	673,71 ± 56,23	510,47 ± 41,25
12 Galato de propila	1462,02 ± 145,26	98,63 ± 8,56
13 Galato de butila	273,01 ± 21,23	94,86 ± 8,57
14 Galato de pentila	177,73 ± 15,62	83,41 ± 5,63
15 Galato de hexila	429,30 ± 42,12	560,25 ± 54,21
16 Galato de heptila	179,76 ± 14,52	243,23 ± 21,23
17 Galato de octila	2353,70 ± 241,21	673,93 ± 56,23
18 Galato de decila	869,32 ± 85,69	2468,96 ± 152,32
19 Galato de undecila	1733,85 ± 121,32	767,08 ± 74,52
20 Galato de dodecila	847,48 ± 45,65	2288,50 ± 154,87
21 Galato de tetradecila	513,25 ± 21,21	348,00 ± 32,69
22 Galato de cetila	256,60 ± 23,23	867,32 ± 69,87
23 Galato de octadecila	757,12 ± 25,23	638,26 ± 61,23
24 4-metóxiacetofenona	6159,82 ± 521,23	1164,08 ± 56,21
25 3,4,5-trimetóxiacetofenona	2460,04 ± 212,32	393,92 ± 23,69
26 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila	94,32 ± 8,56	600,50 ± 24,56
27 Galacetofenona(2,3,4-trihidróxiacetofenona)	3500,95 ± 236,52	978,35 ± 86,98
28 Floroacetofenona	409,28 ± 36,52	250,97 ± 21,45
29 Quercetina	184,57 ± 15,23	145,63 ± 14,23
30 Aciclovir	535,30 ± 45,21	812,52 ± 45,89

* Concentração efetiva a 50% representada pela média de três experimentos independentes ± erro padrão da média

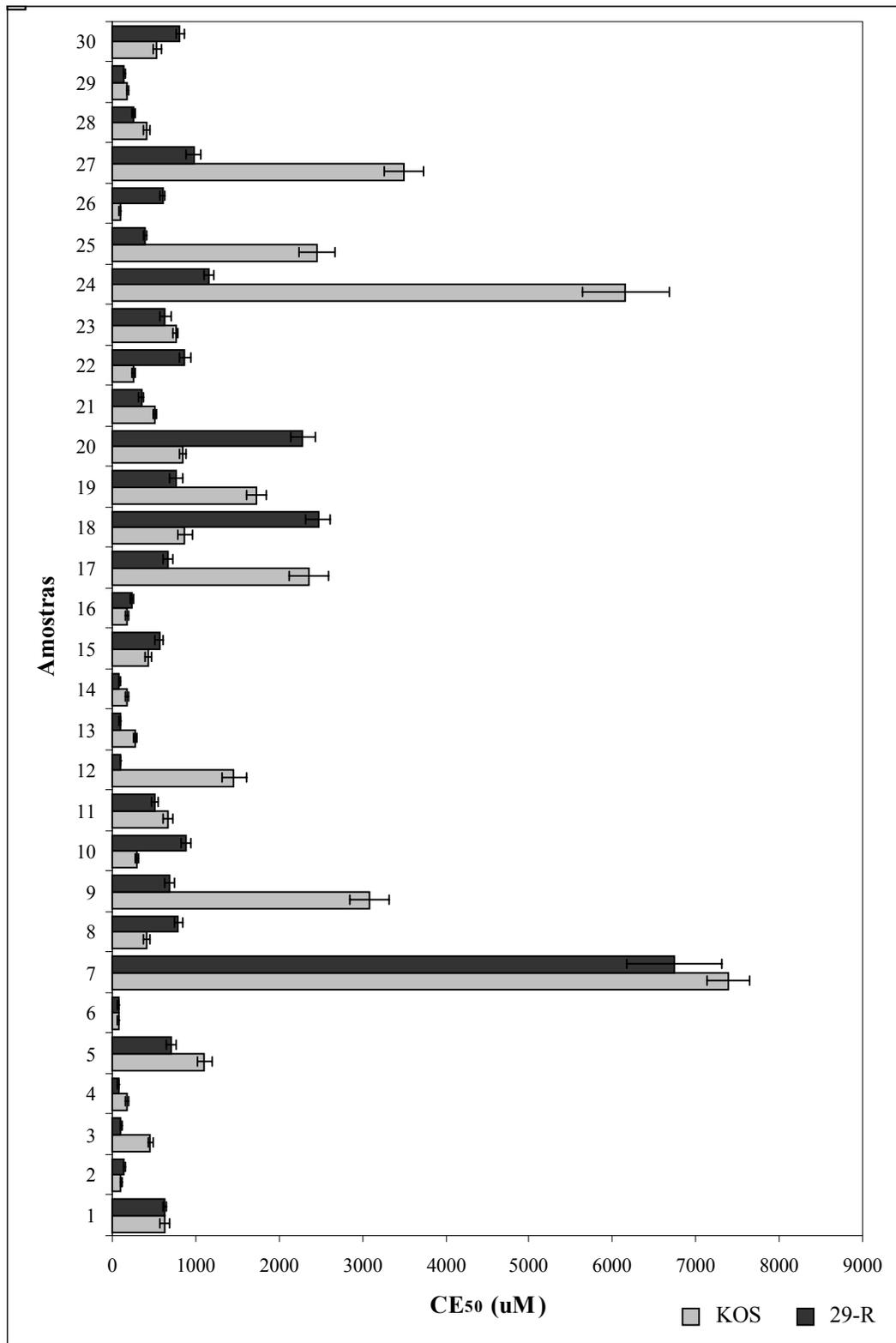


Figura 7: Resultados da determinação da atividade anti-herpética dos compostos fenólicos selecionados, em células VERO infectadas com o vírus HSV-1 (cepas KOS e 29-R), através do ensaio colorimétrico com MTT.

Ao utilizar o ensaio com MTT para avaliar a atividade antiviral é proposto que se obtenha 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 à diferença entre os valores da densidade óptica (DO) (ou viabilidade celular) dos controles viral e celular. O ideal é que, ao final do tempo de incubação da placa, o controle celular continue viável, enquanto que o controle viral esteja totalmente destruído. Qualquer porcentagem de viabilidade celular detectada nos testes será conferida à ação antiviral da amostra e o grau desta proteção poderá ser calculado para cada concentração do material testado (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991).

Contudo, observou-se que com as concentrações virais e com o tempo de incubação utilizados nestes experimentos, os controles virais apresentaram viabilidade (medida pela formação de formazan) em torno de 50-70% (dados não mostrados), apesar dos mesmos controles apresentarem efeitos citopáticos, característicos da infecção herpética, com 100% de destruição do tapete celular, evidenciados pela microscopia. Estes resultados mostram que o percentual de viabilidade celular não se correlaciona com o percentual de inibição do efeito citopático. Isto pode ter ocorrido por causa da concentração de vírus utilizada (multiplicidade de infecção = 0,5), a qual foi calculada a partir do título viral, obtido por uma metodologia que não verifica viabilidade celular, mas apenas efeito citopático em 72h (= 4 ciclos de replicação viral). Takeuchi, Baba e Shigeta (1991), afirmaram também que em experimentos com o HSV-1, foi possível encontrar a relação $(DO)_{cv}/(DO)_{cc} \geq 0,3$, resultado este que condiz com os valores de razão (=0,4) encontrados nesse trabalho.

Estabelecer o título infeccioso de uma suspensão viral significa contar o número de partículas virais capazes de infectar células permissivas. O título infeccioso viral foi determinado pelo método das diluições-limite, de acordo com a metodologia clássica de Reed e Muench (1938), e foram determinados os títulos $5 \times 10^{6.625}$ TCID₅₀/mL (HSV-1, cepa KOS) e $5 \times 10^{6.5}$ TCID₅₀/mL (HSV-1, cepa 29-R). Da mesma forma que outros métodos de titulação, o método de diluição limite tem a vantagem de medir a infectividade, mas é importante

observar que a unidade de infectividade medida por este método pode corresponder a mais do que uma partícula infecciosa (CONDIT, 2001).

É importante ressaltar que o ensaio com MTT, por medir produtos formados nas mitocôndrias das células, permite verificar a viabilidade das mesmas apenas quando estas organelas continuam viáveis, apesar da infecção viral, ou seja, mesmo os tapetes estando visualmente destruídos, o ensaio com MTT demonstrou que células infectadas ainda estavam viáveis, devido, principalmente, à incapacidade do vírus em interferir com a viabilidade das mitocôndrias, no período de tempo estudado (96h). Um tempo maior de exposição do vírus às células, ou uma maior quantidade de vírus utilizada para a infecção, faria com que a maquinaria de respiração da célula fosse possivelmente afetada e, conseqüentemente, menos formazan teria sido formado, levando a menores valores de absorbância e, conseqüentemente, a valores da razão $(DO)_{cv}/(DO)_{cc}$ em torno de 0,2.

Observou-se que todas as amostras apresentaram alguma atividade anti-herpética (cepas KOS e 29-R), nas concentrações não citotóxicas testadas, com exceção do ácido 3,4,5-trimetóxicbenzóico (9), galato de octila (17) e galacetofenona(2,3,4-trihidróxiacetofenona) (27) em relação à cepa KOS.

A partir dos valores de CC_{50} e CE_{50} de cada amostra, foram calculados os índices de seletividade ($IS=CC_{50}/CE_{50}$) que, quando superiores a 4, indicam uma promissora atividade antiviral (Tabelas 6 e 7 e Figura 8) (SIDWELL et al., 1986). O baixo valor do IS ($=2,94$) do aciclovir (30) para o vírus HSV-1 cepa 29-R, deve-se a resistência desta cepa ao fármaco. Em relação ao vírus HSV-1 cepa KOS, apesar do valor de CE_{50} encontrado ($=535,30\mu M$), o aciclovir inibiu o efeito citopático viral na concentração de $4,44\mu M$ ($=10\mu g/mL$), que foi a concentração utilizada nos controles positivos. Isso se deve ao fato de que os percentuais de inibição do efeito citopático viral não equivalem aos percentuais de viabilidade celular verificados nesse trabalho.

Tabela 6: Índices de seletividade dos compostos fenólicos selecionados, em relação ao vírus HSV-1, cepa KOS.

AMOSTRAS		CC ₅₀ (µM)	CE ₅₀ * (µM)	IS**
1	Catequina	1186,10	630,00	1,88
2	Galocatequina	379,40	103,32	3,67
3	Epicatequina	644,23	458,57	1,40
4	Epigalocatequina	901,40	173,56	5,19
5	Galato de epigalocatequina	1417,23	1107,69	1,28
6	Robinetinidol(4α-6)galocatequina	364,05	69,85	5,21
7	1,3,5-trihidróxibenzeno	>7929,58	7384,98	>1,07
8	Ácido gálico	1048,14	404,30	2,59
9	Ácido 3,4,5-trimetóxiibenzoico	3026,25	3083,36	0,98
10	Galato de metila	3388,24	295,15	11,48
11	Galato de etila	2712,52	673,71	4,03
12	Galato de propila	1809,00	1462,02	1,24
13	Galato de butila	1594,42	273,01	6,33
14	Galato de pentila	1063,77	177,73	5,99
15	Galato de hexila	1963,74	429,30	4,57
16	Galato de heptila	1070,89	179,76	5,96
17	Galato de octila	2092,83	2353,70	0,89
18	Galato de decila	>3221,75	869,32	>3,71
19	Galato de undecila	>3082,52	1733,85	>1,78
20	Galato de dodecila	>2954,73	847,48	>3,49
21	Galato de tetradecila	>2728,59	513,25	>5,32
22	Galato de cetila	>2534,53	256,60	>9,88
23	Galato de octadecila	>2366,30	757,12	>3,13
24	4-metóxiacetofenona	>6659,12	6159,82	>1,08
25	3,4,5-trimetóxiacetofenona	2974,69	2460,04	1,21
26	3,4,5-trimetóxiibenzoato de etila	3161,21	94,32	33,52
27	Galacetofenona(2,3,4-trihidróxiacetofenona)	3096,70	3500,95	0,88
28	Floroacetofenona	1596,97	409,28	3,90
29	Quercetina	204,65	184,57	1,11
30	Aciclovir	2390,01	535,30	4,46

* Título infeccioso viral utilizado: $5 \times 10^{6,625}$ TCID₅₀/mL.

** IS=CC₅₀/CE₅₀

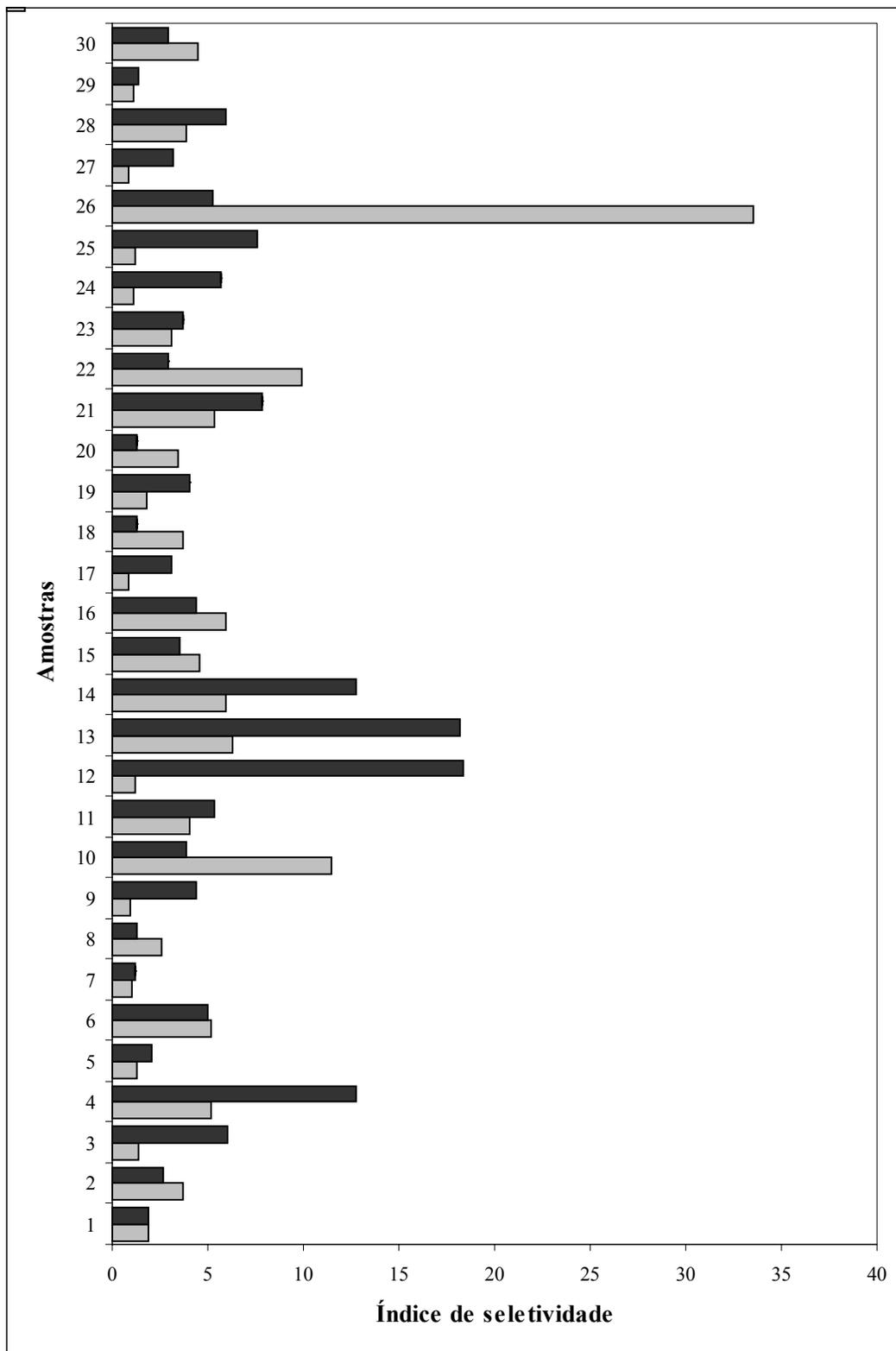


Figura 8: Índices de seletividade dos compostos fenólicos selecionados, em relação ao vírus HSV-1, cepa KOS e 29-R.

Tabela 7: Índices de seletividade dos compostos fenólicos selecionados, em relação ao vírus HSV-1, cepa 29-R.

AMOSTRAS	CC ₅₀ (µM)	CE ₅₀ * (µM)	IS**
1 Catequina	1186,10	629,38	1,88
2 Galocatequina	379,40	140,11	2,71
3 Epicatequina	644,23	107,14	6,01
4 Epigalocatequina	901,40	70,42	12,80
5 Galato de epigalocatequina	1417,23	697,92	2,03
6 Robinetinidol(4α-6)galocatequina	364,05	72,19	5,04
7 1,3,5-trihidróxibenzeno	>7929,58	6732,38	>1,18
8 Ácido gálico	1048,14	789,91	1,33
9 Ácido 3,4,5-trimetóxi benzoico	3026,25	693,17	4,37
10 Galato de metila	3388,24	882,05	3,84
11 Galato de etila	2712,52	510,47	5,31
12 Galato de propila	1809,00	98,63	18,34
13 Galato de butila	1594,42	94,86	18,21
14 Galato de pentila	1063,77	83,41	12,75
15 Galato de hexila	1963,74	560,25	3,51
16 Galato de heptila	1070,89	243,23	4,40
17 Galato de octila	2092,83	673,93	3,11
18 Galato de decila	>3221,75	2468,96	>1,30
19 Galato de undecila	>3082,52	767,08	>4,02
20 Galato de dodecila	>2954,73	2288,50	>1,29
21 Galato de tetradecila	>2728,59	348,00	>7,84
22 Galato de cetila	>2534,53	867,32	>2,92
23 Galato de octadecila	>2366,30	638,26	>3,71
24 4-metoxiacetofenona	>6659,12	1164,08	>5,72
25 3,4,5-trimetóxiacetofenona	2974,69	393,92	7,55
26 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila	3161,21	600,50	5,26
27 Galacetofenona(2,3,4-trihidróxiacetofenona)	3096,70	978,35	3,17
28 Floroacetofenona	1596,97	250,97	5,94
29 Quercetina	204,65	145,63	1,41
30 Aciclovir	2390,01	812,52	2,94

* Título infeccioso viral utilizado: $5 \times 10^{6,5}$ TCID₅₀/mL.

** IS=CC₅₀/CE₅₀

Os índices de seletividade permitem estabelecer algumas relações estrutura X atividade, bem como identificar características estruturais responsáveis pela atividade

biológica do composto em estudo (BETANCUR-GALVIS et al., 2001). Quando possível, estabeleceu-se tais relações, relatadas a seguir.

Em relação à atividade anti-herpética, foi observado que apenas a quantidade de hidroxilas livres é um parâmetro insuficiente para relacionar a estrutura química da molécula com tal atividade, já que foram encontrados bons índices de seletividade em moléculas com nenhuma ou várias hidroxilas livres, como por exemplo a 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila (26) (IS=33,52, cepa KOS; IS=5,26, cepa 29-R) e robinetinidol(4 α -6)galocatequina (6) (IS=5,21, cepa KOS; IS=5,04, cepa 29-R), com nenhuma e onze hidroxilas livres, respectivamente. Isso revela que cada substância se comportou de maneira particular, dependendo de vários fatores. Sugere-se, portanto, que os ensaios sejam realizados ao mesmo tempo e que o preparo das soluções-mãe seja realizado extemporaneamente, para que eventuais processos de auto-oxidação dos CF sejam evitados ao máximo, possibilitando uma avaliação adequada dos seus efeitos.

5.3 Avaliação da genotoxicidade

A sensibilidade do Ensaio do Cometa permite utilizá-lo como uma potente ferramenta para o estudo de genotoxicidade, já que aproximadamente 85% dos estudos realizados nessa área encontraram resultados positivos, apesar de que mais estudos são necessários para a investigação da persistência e do reparo dos danos observados (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

Para selecionar as concentrações das amostras a serem testadas no Ensaio do Cometa, foi necessário determinar a citotoxicidade das mesmas em ensaios preliminares, já que concentrações citotóxicas podem produzir resultados falso-positivos (HARTMANN et al., 2001). Neste caso, foram utilizadas as concentrações que protegeram em 50% (CE₅₀) as

células VERO das infecções herpéticas, correspondentes a cada cepa viral utilizada, e conseqüentemente, não foram usadas concentrações citotóxicas.

É enfaticamente recomendado que seja incluída alguma medida de citotoxicidade em qualquer estudo de genotoxicidade realizado através do Ensaio do Cometa (SPEIT; HARTMANN, 1999). Segundo o *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures*, após o tratamento das células com a amostra, a viabilidade celular deve ser superior a 70% (TICE et al., 2000), verificada através do teste de exclusão do corante azul de Trypan (SINGH et al., 1991; KOBAYASHI et al., 1995; DUTHIE; DOBSON, 1999; SPEIT; HARTMANN, 1999; TICE et al., 2000; KASSIE et al., 2001; OLIVE, 2002; PARK; JIN; HYUN, 2002). A viabilidade celular superior a 70% elimina, em grande parte, a possibilidade de se estar observando células em apoptose, as quais são vistas como cometas de classe IV e V.

Para a determinação da viabilidade celular pelo método de exclusão com azul de Trypan, foram utilizadas as maiores concentrações, de cada um dos compostos, testadas no Ensaio do Cometa (Tabela 3), para cada amostra. A viabilidade celular foi determinada imediatamente após o tratamento das células com os diferentes compostos (conforme metodologia descrita no item 4.6.9) e, em todos os casos, foi superior a 90% (Tabela 8), o que permitiu o uso do Ensaio do Cometa para a avaliação dos efeitos genotóxicos das amostras e garantiu a confiabilidade dos resultados obtidos.

Tabela 8: Resultados da determinação da viabilidade das células VERO tratadas com os compostos fenólicos selecionados, através do teste de exclusão com azul de Trypan.

AMOSTRAS	Concentração (µM)*	Viabilidade celular (%)**
1 Catequina	630,00	91 ± 2
2 Galocatequina	140,11	92 ± 3
3 Epicatequina	458,57	95 ± 2
4 Epigalocatequina	173,56	90 ± 5
5 Galato de epigalocatequina	1107,69	91 ± 2
6 Robinetinidol(4α-6)galocatequina	72,19	92 ± 2
7 1,3,5-trihidróxibenzeno	7384,98	92 ± 2
8 Ácido gálico	789,91	97 ± 1
9 Ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico	3083,36	91 ± 2
10 Galato de metila	882,05	98 ± 2
11 Ggalato de etila	673,71	95 ± 2
12 Galato de propila	1462,02	96 ± 2
13 Galato de butila	273,01	94 ± 4
14 Galato de pentila	177,73	92 ± 3
15 Galato de hexila	560,25	95 ± 2
16 Galato de heptila	243,23	95 ± 1
17 Galato de octila	2353,70	94 ± 2
18 Galato de decila	2468,96	96 ± 4
19 Galato de undecila	1733,85	95 ± 3
20 Galato de dodecila	2288,50	97 ± 1
21 Galato de tetradecila	513,25	98 ± 2
22 Galato de cetila	867,32	95 ± 2
23 Galato de octadecila	757,12	98 ± 1
24 4-metóxiacetofenona	6159,82	97 ± 2
25 3,4,5-trimetóxiacetofenona	2460,04	96 ± 3
26 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila	600,50	95 ± 2
27 Galacetofenona(2,3,4-trihidróxiacetofenona)	3500,95	95 ± 4
28 Floroacetofenona	409,28	95 ± 4
29 Quercetina	184,57	90 ± 4
30 Aciclovir	184,57	93 ± 3
Controle positivo (H ₂ O ₂)	200	91 ± 5
Controle negativo	-	98 ± 2

* As concentrações testadas representam os maiores valores de CE₅₀ obtidos, independentemente da cepa viral do HSV-1.

** Os valores representam a média de três experimentos independentes ± erro padrão da média.

A morte celular pode influenciar a estimativa dos danos provocados, pois a dispersão do DNA degradado de células mortas também é detectado pelo Ensaio do Cometa (MIYAMAE et al., 1998b, ALBERTINI et al., 2000), tornando-se difícil a distinção entre células em apoptose e células danificadas por um agente químico ou físico através dessa

técnica (HENDERSON et al., 1998), embora alguns pesquisadores afirmem que isto seja possível (ANDERSON et al., 1998; HARTMANN et al., 2001). Segundo Hartmann e Speit (1997) células mortas poderiam ser identificadas por sua morfologia distinta, quando comparadas com células que exibem dano no DNA. Esta morfologia peculiar resultaria da extensiva fragmentação da cromatina, de modo que nenhum núcleo (cabeça) do cometa aparecesse claramente definido e somente a cauda fosse visível, parecendo uma “mancha” ou núcleo de células não detectáveis. Para a avaliação dos efeitos genotóxicos é recomendado que estas células sejam registradas separadamente, mas descartadas da avaliação, partindo-se do princípio de que representam células mortas (SPEIT; HARTMANN, 1999; KISKINIS; SUTER; HARTMANN, 2002). A avaliação destas estruturas pode fornecer um parâmetro independente de toxicidade do material em teste, sendo que as concentrações que provocam mais que 15% destas “manchas” são consideradas muito tóxicas e devem ser descartadas (HARTMANN et al., 2001; KISKINIS; SUTER; HARTMANN, 2002).

Neste estudo, não foram observadas “manchas” em quantidade suficiente para descartar qualquer resultado, já que haviam sido feito dois estudos de viabilidade anteriores, através dos ensaios com MTT e com azul de Trypan, o que eliminou a possibilidade de se estar trabalhando com amostras em concentrações citotóxicas. Além disso, não foram consideradas as células localizadas nas bordas das lâminas, já que nestas regiões há um excesso de “manchas” representando células danificadas por outro agente (por ex. calor), que não a amostra em teste. Portanto, foram contabilizados apenas os cometas localizados na região central da lâmina, os quais indicam os reais efeitos genotóxicos da amostra testada.

Os efeitos ao DNA das células utilizadas, provenientes do tratamento com duas concentrações (CE_{50} de cada cepa viral) dos compostos, duas concentrações de peróxido de hidrogênio (controle positivo) e meio MEM (controle negativo) estão representados na Tabela

9 e Figura 9. A avaliação da genotoxicidade das amostras foi realizada como descrito no item 4.6

Observou-se através dos resultados apresentados na Tabela 9 e Figura 9 que quanto maior a concentração da amostra, maior o grau de genotoxicidade. No entanto, a floroacetofenona **(28)** (250,97 e 409,28 μ M), quercetina **(29)** (145,63 e 184,57 μ M), epigallocatequina **(4)** (70,42 μ M), galato de cetila **(22)** (256,60 μ M) e aciclovir **(30)** (535,30 e 812,52 μ M) não mostraram genotoxicidade nas concentrações testadas. Não foi possível, através desses resultados, avaliar a diferença de genotoxicidade entre as diferentes substâncias, pois para isso, deveria ser utilizada a mesma concentração para todas. Através deste trabalho, foi possível avaliar os danos ao DNA celular nas concentrações que mostraram atividade anti-herpética, sendo observado que a genotoxicidade nem sempre contribuiu para tal atividade, como o exemplo da floroacetofenona **(28)**, que não causou genotoxicidade, porém, teve atividade contra o HSV-1. Deste modo, a genotoxicidade não significou presença ou ausência de atividade anti-herpética.

É importante salientar que o efeito genotóxico do ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico **(9)**, galato de octila **(17)** e galacetofenona(2,3,4-trihidróxiacetofenona) **(27)**, referentes a C1, pode ser devido ao fato de estas concentrações utilizadas serem superiores a CC_{50} (valor de citotoxicidade obtido pelo ensaio com MTT).

Tabela 9: Resultados da avaliação da genotoxicidade dos compostos fenólicos selecionados frente às células VERO, tratadas com duas diferentes concentrações (C1 e C2), pelo Ensaio do Cometa

AMOSTRAS	C1 (µM)	escore*	C2 (µM)	escore*
1 Catequina	630,00	130±14	629,38	133±13
2 Galocatequina	103,32	63±6	140,11	80±8
3 Epicatequina	458,57	128±11	107,14	58±5
4 Epigalocatequina	173,56	59±6	70,42 ^a	40±3
5 Galato de epigalocatequina	1107,69	193±7	697,92	183±17
6 Robinetinidol(4a-6)galocatequina	69,85	48±5	72,19	53±5
7 1,3,5-Trihidroxibenzeno	7384,98	56±5	6732,38	52±4
8 Ácido gálico	404,30	70±7	789,91	78±8
9 Ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico	3083,36	145±13	693,17	77±8
10 Galato de metila	295,15	128±12	882,05	160±15
11 Galato de etila	673,71	161±16	510,47	150±14
12 Galato de propila	1462,02	195±5	98,63	72±7
13 Galato de butila	273,01	170±11	94,86	157±15
14 Galato de pentila	177,73	183±14	83,41	128±12
15 Galato de hexila	429,30	114±10	560,25	165±13
16 Galato de heptila	179,76	55±4	243,23	53±2
17 Galato de octila	2353,70	144±13	673,93	52±5
18 Galato de decila	869,32	56±6	2468,96	115±15
19 Galato de undecila	1733,85	91±8	767,08	74±7
20 Galato de dodecila	847,48	77±8	2288,50	81±8
21 Galato de tetradecila	513,25	118±11	348,00	75±7
22 Galato de cetila	256,60 ^a	43±3	867,32	58±4
23 Galato de octadecila	757,12	193±7	638,26	145±15
24 4-metóxiacetofenona	6159,82	128±12	1164,08	69±9
25 3,4,5-trimetóxiacetofenona	2460,04	94±10	393,92	58±5
26 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila	94,32	56±6	600,50	82±8
27 Galacetofenona(2,3,4-trihidroxiacetofenona)	3500,95	103±10	978,35	72±7
28 Floroacetofenona	409,28 ^a	44±2	250,97 ^a	37±3
29 Quercetina	184,57 ^a	11±2	145,63 ^a	10±3
30 Aciclovir	535,30 ^a	11±9	812,52 ^a	15±2
Controle positivo (H ₂ O ₂)	100	153±15	200	198±2
Controle negativo	-	10±5	-	10±5

*Os escores estão representados pela média ± erro padrão da média de três experimentos independentes.

^a Não apresenta diferenças significativas (p<0,05, *t*-Student) em relação ao controle negativo.

C1: valor de CE₅₀ em relação ao HSV-1 cepa KOS. C2: valor de CE₅₀ em relação ao HSV-1 cepa 29-R.

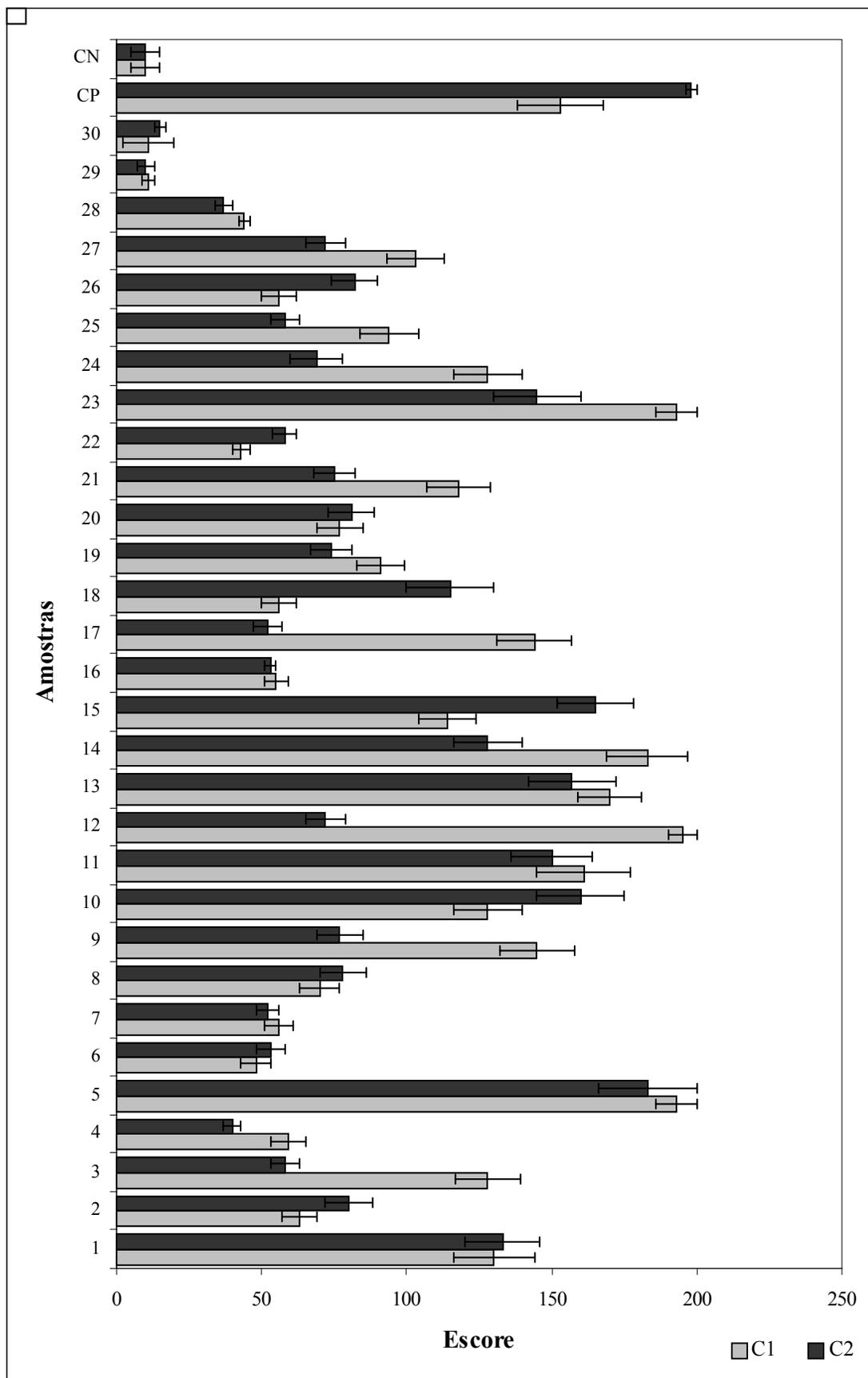


Figura 9: Resultados da avaliação da genotoxicidade dos compostos fenólicos selecionados frente às células VERO, tratadas com duas diferentes concentrações (C1 e C2), pelo Ensaio do Cometa. CN: controle negativo. CP: controle positivo.

Os CF apresentam múltiplas atividades, tais como ações carcinogênica, co-carcinogênica e promotora de tumores, além de genotoxicidade, apesar de demonstrarem, também, proteção contra danos ao material genético, contra a formação de lesões pré-cancerosas e contra o desenvolvimento de câncer induzido por uma grande variedade de carcinógenos. De acordo com Cheng et al. (2002), células infectadas com vírus herpéticos, cujo DNA possui cromossomas instáveis, e tratadas com antioxidantes, como os CF, podem ter as aberrações do DNA reduzidas. A genotoxicidade dos CF pode ser influenciada por inúmeros fatores, tais como a presença de metais de transição, incluindo os íons manganês, cobre e ferro, além de enzimas catalase e peroxidase.

Os testes de genotoxicidade foram realizados na ausência de soro, já que componentes deste, por exemplo, íons metálicos, podem afetar a resposta do teste devido ao seu tratamento químico. Neste caso, há a indução de dano via geração de radicais hidroxila com metais de transição, demonstrada pela reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$). O ferro é o metal de transição mais abundante nos sistemas biológicos e se complexa com proteínas. O dano ao DNA induzido por estresse oxidativo na presença de H_2O_2 pode ser detectado através do Ensaio do Cometa. Ainda, este ensaio pode ser usado para a investigação de danos ao DNA causado por interações entre antioxidantes e EROS (ANDERSON et al., 1994).

Speit et al (1999) demonstraram que, na temperatura ambiente, o Ensaio do Cometa foi considerado mais sensível do que a 4°C, porém sem reprodutibilidade, devido à fácil variação de temperatura. No entanto, quando realizado a 4°C, este ensaio é considerado mais confiável, pois é feito em condições de temperatura controladas e reprodutíveis (ALBERTINI et al., 2000). Portanto, os testes podem ser feitos à temperatura ambiente, desde que essas condições sejam controladas e constantes. Para garantir a reprodutibilidade dos testes, os mesmos foram feitos usando-se tampão de eletroforese gelado e banho de gelo. Neste estudo, tanto o tratamento alcalino quanto a eletroforese foram realizados em 30min. A duração do

tratamento alcalino e da eletroforese varia consideravelmente entre os estudos e entre os pesquisadores (TICE et al., 2000), sendo que os tempos de 20, 30, e 40min são os mais utilizados (SPEIT et al., 1999), e variam conforme a voltagem utilizada na eletroforese (JOHNSON; LOO, 2000).

Após a neutralização, as lâminas foram coradas e lidas imediatamente a fim de evitar a difusão do DNA no gel, pois isso pode resultar na má resolução dos cometas, impossibilitando sua classificação.

A seleção do aumento mais apropriado para a leitura depende do tipo de célula a ser avaliada, da variação da resposta de migração a ser medida e da restrição do microscópio utilizado. Neste trabalho, os cometas foram avaliados num microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40), com aumento de 400X, a 515-560nm, com filtro de barreira de 590nm. É importante ressaltar que os cometas foram examinados inicialmente com o aumento de 200X, mas só foi possível classificá-los com segurança, com aumento de 400X, pois no aumento de 200X as classes I e II e as classes II e III pareciam ser muito semelhantes e poderiam levar a erros no escore total da amostra (MCNAMEE, 2000; KAMER; RINKEVICH, 2002).

Para assegurar a qualidade, foram incluídas entre as amostras células tratadas com um agente que, conhecidamente, induz danos ao DNA (controle positivo), e para a comparação dos resultados foram incluídas entre as amostras células não tratadas (controle negativo). Desta forma, se garantiu a reprodutibilidade experimental e a detecção apropriada dos danos ao DNA (LOVELL; THOPMAS; DOBOW, 1999; ALBERTINI et al., 2000; OLIVE, 2002).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi utilizado como controle positivo do experimento, em duas concentrações: 100 e 200 μ M. Os danos provocados ao DNA celular pelo H_2O_2 foram significativamente maiores do que os danos causados ao DNA das células do controle negativo ($p < 0,05$) (Tabela 9 e Figura 9). O H_2O_2 induz aumento dos danos ao DNA proporcionalmente ao aumento da concentração do mesmo (SINGH et al., 1991;

ANDERSON et al., 1994; FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEIL, 1995; DUTHIE et al., 1997; MACCARTHY et al., 1997; HENDERSON, et al., 1998) e uma resposta celular heterogênea, ou seja, conduzindo à formação de diferentes classes de cometas (SINGH et al., 1991; TICE et al., 1991).

Após a coleta, as células foram imediatamente processadas, pois um tempo muito longo poderia diminuir os danos ao DNA, o que ocorre naturalmente através do processo de reparo (especialmente os sítios álcali-lábeis) ou pela perda de células com maior dano, através da apoptose ou necrose (ALBERTINI et al., 2000). Observou-se também, que quanto mais tempo as lâminas permaneceram na solução de lise, menor foi a resolução dos cometas ao microscópio, além da maior facilidade da agarose em descolar da lâmina, após o processo de eletroforese; o ideal é que as lâminas sejam lidas no prazo de uma semana.

A avaliação de 50 células/lâmina e, pelo menos, duas lâminas por tratamento, permite uma medida confiável da variabilidade entre as lâminas. O uso de lâminas codificadas é crítico para eliminar uma potencial sugestividade na avaliação dos danos ao DNA (LOVELL; THOMAS ; DUBOW, 1999). Segundo o *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* (TICE et al., 2000), pelo menos duas culturas de células independentes devem ser testadas para cada concentração da amostra, incluindo controles positivos e negativos. Neste trabalho foram realizadas três culturas independentes e foram confeccionadas duas lâminas para cada tratamento; todas as lâminas foram codificadas e avaliadas sem o conhecimento dos códigos.

A avaliação paralela dos danos causados ao DNA, realizada através da análise visual e de um programa computadorizado de análise de imagens, mostrou uma estreita correlação entre os escores visuais e os computadorizados, comprovando que, embora o programa analisador de imagens seja uma ferramenta interessante, mas de alto custo, o escore visual também fornece informações confiáveis e úteis para a análise estatística dos resultados

(COLLINS, AI-GUO; DUTHIE, 1997; COLLINS et al., 1997b, COLLINS, 2000). Kobayashi et al. (1995) compararam o desempenho e a sensibilidade da análise microscópica e da análise computadorizada de imagens e concluíram que, além dos escores obtidos pela análise visual e da classificação dos cometas em cinco classes terem apresentado uma boa correlação com os dados obtidos através da análise computadorizada, a primeira avaliação foi tanto quanto ou até mais sensível do que a outra, além de apresentar as vantagens de maior rapidez, simplicidade e não necessitar de equipamento especial, o qual não dispomos. Por esses motivos, a análise visual foi escolhida para a avaliação dos resultados.

A genotoxicidade dos CF, em relação às células VERO, nem sempre se deva à presença de hidroxilas livres na molécula. Esse fato foi observado com a 4-metóxiacetofenona **(24)** ($>1164,08\mu\text{M}$), a 3,4,5-trimetóxiacetofenona **(25)** ($>393,92\mu\text{M}$), e o 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila **(26)** ($>94,32\mu\text{M}$), que apesar de não possuírem hidroxilas livres, apresentaram genotoxicidade nas concentrações testadas. A epigalocatequina **(4)** ($<70,42\mu\text{M}$), a floracetofenona **(28)** ($<409,28\mu\text{M}$), a quercetina **(29)** ($<184,57\mu\text{M}$) e o galato de cetila **(22)** ($<256,60\mu\text{M}$), apesar de terem hidroxilas, foram estatisticamente semelhantes ao controle negativo ($p<0,05$), indicando ausência de genotoxicidade (Tabela 9 e Figura 9).

5.4 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade de um composto antioxidante pode ser estimada, quantitativamente, através da determinação de produtos primários e secundários da auto-oxidação de lipídeos ou pelo monitoramento de outras variáveis. Geralmente, isto ocorre via formação de hidroperóxidos ou via produção de produtos secundários da auto-oxidação, por métodos químicos ou sensoriais (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992).

Para encontrar a estrutura química ótima para um antioxidante é importante testar uma grande quantidade de compostos com diferentes estruturas básicas, já que a conformação molecular pode ser um dos fatores que influenciam tal atividade (SILVA et al., 2000).

Neste trabalho foi avaliada a capacidade dos compostos fenólicos de captar radicais livres, no caso o radical DPPH, e de inibir a peroxidação lipídica, pelo teste do TBARS (*Thiobarbituric Acid Reacting Substances*), a fim de relacionar tais propriedades com a atividade anti-herpética e a genotoxicidade dos mesmos. Para a realização destes testes foram usadas concentrações inferiores aos valores de CC_{50} , porém sem ultrapassar a concentração máxima de $300\mu\text{M}$, já que dificilmente concentrações superiores, na faixa milimolar, estarão disponíveis no plasma. As concentrações dos CF testados que captam 50% dos radicais livres DPPH e as concentrações que inibem 50% a peroxidação lipídica foram obtidas segundo as metodologias constantes nos itens 4.7.1 e 4.7.2, e encontram-se nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

5.4.1 Ensaio de captação do radical livre DPPH

Os resultados apresentados na Tabela 10 e Figura 10 mostram que, ao comparar-se a capacidade de captar o radical livre DPPH da quercetina (que pode ser considerada como uma espécie de controle positivo neste teste), com a dos CF testados, todos aqueles que apresentaram tal habilidade o fazem em concentrações relativamente próximas à da quercetina, indicando serem promissores candidatos ao aprofundamento dos estudos da atividade antioxidante.

A capacidade de captação de radicais DPPH por CF, em geral, é influenciada pela configuração espacial e pelo número de hidroxilas fenólicas, que são centros de ativação de

moléculas para o fornecimento de átomos de hidrogênio que reagirão com o radical DPPH (ACKER, et al., 1996; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). O galato de epigallocatequina (**5**) com oito hidroxilas fenólicas, foi o mais potente captador de radicais DPPH, enquanto que a quercetina (**29**), com cinco hidroxilas fenólicas, foi menos potente. No entanto, a maior hidrofobicidade da quercetina, que facilita sua permeabilidade na membrana das células, a torna tão potente quanto o galato de epigallocatequina (JOHNSON; LOO, 2000). Essa afirmação confere com os resultados apresentados na Tabela 10 e Figura 10.

Num estudo mais recente realizado por Cos et al. (1998), foi demonstrado que a inibição da atividade da enzima xantina-oxidase e a habilidade de seqüestrar diretamente o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) serviram de modelo para o estabelecimento de relações estrutura-atividade e conseqüente classificação dos CF testados. Os autores observaram que as hidroxilas nos C-5 e C-7 e a dupla ligação entre C-2 e C-3 dos flavonóides foram essenciais para a alta atividade inibitória da xantina-oxidase e que a hidroxila no C-3 e no C-3' do anel B foram fundamentais para a atividade captadora de $O_2^{\bullet-}$.

Rice-Evans (1999) afirmou que a propriedade antioxidante dos CF é definida pelo arranjo estrutural de suas hidroxilas fenólicas. *In vitro*, alguns CF demonstraram maior atividade, em termos de concentrações molares, do que alguns antioxidantes clássicos como as vitaminas C e E, com relação à habilidade de seqüestrar diretamente um radical livre catiônico formado pelo ABTS [ácido 6-sulfônico 2,2-azinobis-(3-ethyl benzothiazolino)]. A seguinte hierarquia de potencial antioxidante foi demonstrada: galato de epigallocatequina = galato de epicatequina > epigallocatequina > ácido gálico > epicatequina = catequina.

A capacidade de captação de radicais livres dos CF está associada à habilidade de formação de radicais mais estáveis, e sabe-se que compostos aromáticos contendo hidroxilas, especialmente aqueles com função *orto*-di-hidróxi no anel B, comportam-se como excelentes

captadores de radicais (FAUCONNEU et al., 1997), como é o caso da quercetina, confirmado neste trabalho.

Tabela 10: Resultados da determinação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos selecionados, através da capacidade de captar os radicais livres DPPH.

	AMOSTRAS	CE ₅₀ (μM)*
1	Catequina	33 ± 2
2	Galocatequina	NT
3	Epicatequina	23 ± 2,5
4	Epigalocatequina	NT
5	Galato de epigalocatequina	11 ± 0,30
6	Robinetinidol(4α-6)galocatequina	NT
7	1,3,5-trihidróxibenzeno	>300**
8	Ácido gálico	23 ± 1,76
9	Ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico	-
10	Galato de metila	25 ± 0,33
11	Galato de etila	25 ± 0,33
12	Galato de propila	24 ± 1,20
13	Galato de butila	27 ± 0,67
14	Galato de pentila	20 ± 1,00
15	Galato de hexila	21 ± 1,00
16	Galato de heptila	20 ± 1,00
17	Galato de octila	23 ± 1,47
18	Galato de decila	17 ± 1,65
19	Galato de undecila	18 ± 1,53
20	Galato de dodecila	24 ± 1,76
21	Galato de tetradecila	20 ± 1,73
22	Galato de cetila	20 ± 0,33
23	Galato de octadecila	31 ± 1,86
24	4-metóxiacetofenona	-
25	3,4,5-trimetóxiacetofenona	-
26	3,4,5-trimetóxi benzoato de etila	-
27	Galacetofenona(2,3,4-trihidróxiacetofenona)	25 ± 1,38
28	Floroacetofenona	>300**
29	Quercetina	17 ± 0,67
30	Aciclovir	-

*Os valores representam a média de três experimentos independentes ± erro padrão da média

(-): sem reatividade na concentração máxima testada (300μM)

(NT): não testado

** Inibiu no máximo 50% da absorbância do DPPH com 300μM

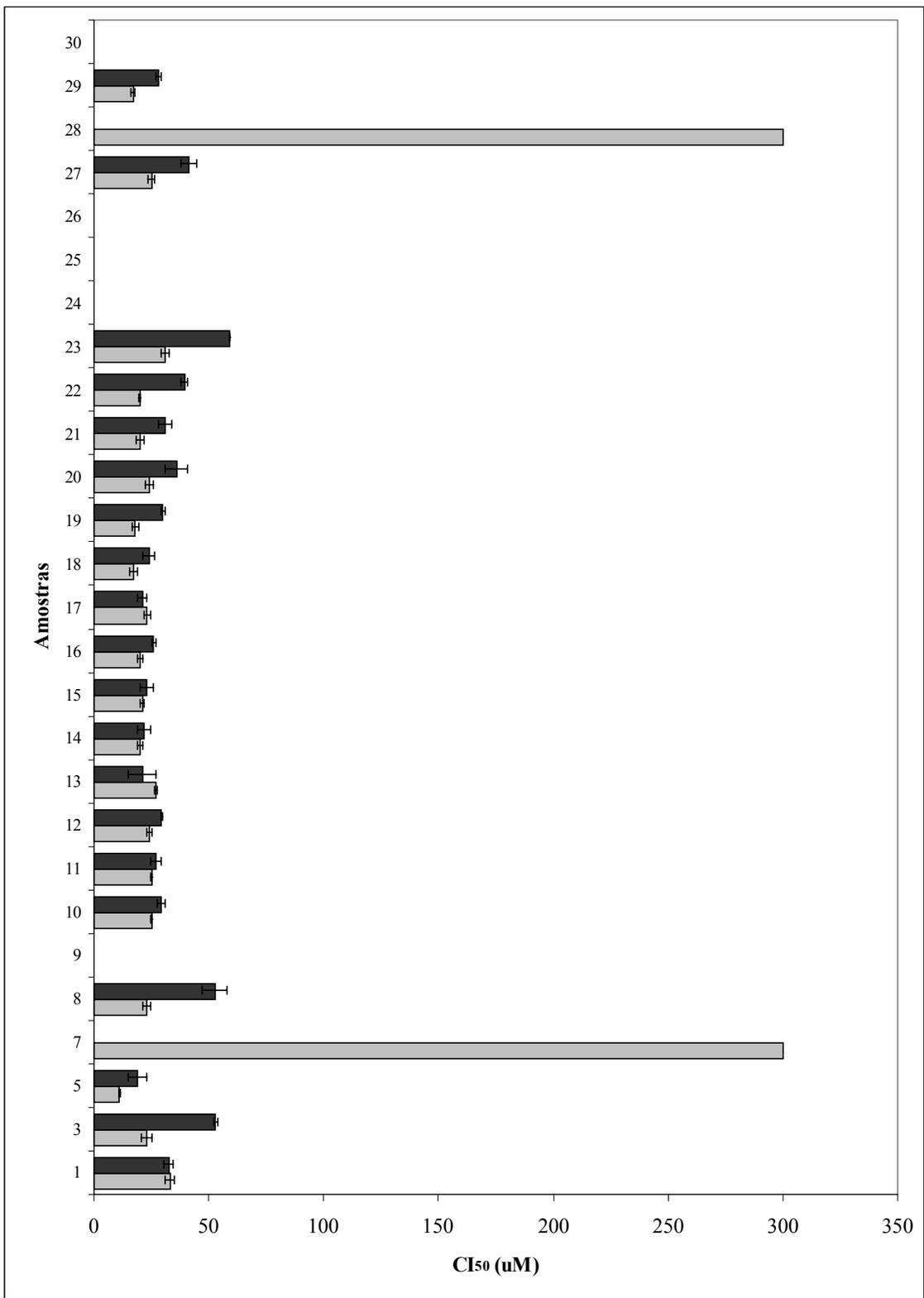


Figura 10: Resultados da determinação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos seleccionados, através da capacidade de captar os radicais livres DPPH e da capacidade de inibir a peroxidação lipídica (TBARS).

Com relação à habilidade de captar radicais livres DPPH, observou-se que todas as amostras testadas apresentaram atividade, pois conseguiram captar tais radicais em baixas concentrações (Tabela 10 e Figura 10), com exceção do aciclovir (30), 4-metóxiacetofenona (24), ácido 3,4,5-trimetóxi-benzóico (9), 3,4,5-trimetóxi-benzoato de etila (26) e 3,4,5-trimetóxiacetofenona (25). Essas amostras não tiveram reatividade na concentração máxima testada de 300 μ M, possivelmente por não apresentarem hidroxilas livres no anel aromático, as quais são responsáveis pela reatividade com o radical DPPH. A floroacetofenona (28) e o 1,3,5-trihidróxi-benzeno (7), apesar de possuírem três hidroxilas livres na molécula, captaram no máximo 50% da absorção do DPPH com 300 μ M. A captação do radical DPPH por essas amostras, em concentrações superiores a 300 μ M, poderia ser devida à localização destes grupos, a qual não favoreceu a captação dos radicais livres em menor concentração. De acordo com Sroka e Cisowski (2003), a capacidade de captação de radicais livres está relacionada ao número de hidroxilas livres no anel aromático dos CF, sendo que a forte atividade antioxidante dos mesmos está relacionada ao sistema de substituição das hidroxilas nas posições *orto* e *para*, enquanto que as hidroxilas em posição *meta* possuem uma fraca atividade. O número de hidroxilas ligadas ao anel aromático e suas posições são, provavelmente, os fatores mais importantes, mas não os únicos, que influenciam tal atividade; a natureza dos substituintes (carboxila, carbonila, acetila) e sua posição em relação às hidroxilas, também, poderia influenciar (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992).

Com relação aos flavonóides existem três fatores determinantes da sua capacidade de captar radicais livres (SANG et al., 2002):

- presença da estrutura *orto*-di-hidroxila no anel B, a qual confere bastante estabilidade ao radical e participa na deslocalização eletrônica;
- presença da dupla ligação C2-C3 em conjunção com função oxigenada no C4 do anel C, que é responsável pelo deslocamento eletrônico do anel B, onde os radicais

fenoxil produzidos são estabilizados pelo efeito de ressonância do núcleo aromático;

- presença de grupos OH em C3 e C5 e de função oxigenada no C4 dos anéis A e C, os quais são requisitos para a captação de radicais.

A quercetina, por exemplo, satisfaz todos esses requisitos e sua atividade antioxidante (Tabelas 10 e 11) é maior do que a da catequina, a qual carece dos aspectos estruturais favoráveis presentes na quercetina.

De acordo com Chen et al (2000), a atividade captadora do radical DPPH diminui na seguinte ordem: galato de epigalocatequina (8 OH) > galato de epicatequina (7 OH) > epigalocatequina (6 OH) > epicatequina (5 OH). Nos resultados apresentados na Tabela 10 e Figura 10, a reatividade com o radical DPPH seguiu a seguinte ordem: galato de epigalocatequina (8 OH) > epicatequina (5 OH) > catequina (5 OH), conseqüentemente, pode-se sugerir que a quantidade de hidroxilas na molécula influencia sua atividade captadora de radicais DPPH.

No caso de compostos com três grupos hidroxilas no anel B (por ex. galato de epigalocatequina), não há deslocalização eletrônica entre o anel A e B, devido à saturação do anel heterocíclico e, portanto, a capacidade antioxidante deve-se fundamentalmente à presença de grupos hidroxilas livres (COS et al., 2000). A presença das hidroxilas no anel B é de maior significância na capacidade do composto em seqüestrar as EROS. Os grupos hidroxila do anel B doam hidrogênio para os radicais hidroxila e peroxil, estabilizando-os e gerando um radical estável (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

5.4.2 Avaliação da peroxidação lipídica

Devido ao significado biológico das membranas celulares, a inibição da peroxidação lipídica deve ser um dos primeiros testes usados para determinar a atividade antioxidante de um composto qualquer. É necessário considerar que medidas de atividade antioxidante em concentrações milimolares não são significantes, já que essas concentrações dificilmente seriam obtidas em nível plasmático. Conseqüentemente, somente os compostos que possuem atividade antioxidante em concentrações, no mínimo, micromolares são promissores (COS et al., 2001).

Como dito anteriormente, a peroxidação lipídica é um processo que causa danos aos ácidos graxos insaturados, leva ao aumento da fluidez das membranas, modificações em sua permeabilidade e, conseqüentemente, provocando algumas outras patologias. Este processo pode ser efetivamente atenuado por compostos fenólicos, os quais são conhecidos por serem captadores de várias espécies de oxigênio, como o radical hidroxila e o oxigênio singlete, ambos muito tóxicos. A eficiência destes compostos depende de muitos fatores, como o número de grupos hidroxilas ligado ao anel aromático, o sítio de ligação, e a posição das hidroxilas no anel aromático (SROKA; CISOWSKI, 2003).

O efeito da concentração do antioxidante nos níveis de auto-oxidação depende de muitos fatores, incluindo sua estrutura, as condições de oxidação e a natureza das substâncias que estão sendo oxidadas. A perda da atividade antioxidante de CF, em altas concentrações, pode fazer com que os mesmos se comportem como pró-oxidantes (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992).

Os resultados apresentados na Tabela 11 e Figura 10 mostram que ao comparar-se a capacidade de inibição da peroxidação lipídica da quercetina (também considerada como uma espécie de controle positivo neste teste), com a dos CF testados, todos aqueles que

apresentaram tal habilidade o fazem em concentrações relativamente próximas à da quercetina, indicando serem promissores candidatos ao aprofundamento de estudos da atividade antioxidante.

Na Tabela 11 estão representados os valores de CI_{50} dos diferentes compostos fenólicos testados, obtidos através do ensaio de TBARS.

Tabela 11: Resultados da determinação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos selecionados, através da capacidade de inibir a peroxidação lipídica, usando o teste de TBARS.

AMOSTRAS	CI ₅₀ (μM)*
1 Catequina	32,50 ± 2,04
2 Galocatequina	NT
3 Epicatequina	53 ± 1,00
4 Epigalocatequina	NT
5 Galato de epigalocatequina	19 ± 4,16
6 Robinetinidol(4α-6)galocatequina	NT
7 1,3,5-trihidróxibenzeno	-
8 Ácido gálico	52,50 ± 5,50
9 Ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico	-
10 Galato de metila	29 ± 1,73
11 Galato de etila	27 ± 2,32
12 Galato de propila	29,50 ± 0,50
13 Galato de butila	21 ± 6,00
14 Galato de pentila	22 ± 2,85
15 Galato de hexila	23 ± 3,00
16 Galato de heptila	26 ± 1,00
17 Galato de octila	21 ± 2,00
18 Galato de decila	24 ± 2,52
19 Galato de undecila	30 ± 0,88
20 Galato de dodecila	36 ± 5,00
21 Galato de tetradecila	31 ± 3,00
22 Galato de cetila	39,50 ± 1,50
23 Galato de octadecila	59**
24 4-metóxiacetofenona	-
25 3,4,5-trimetóxiacetofenona	-
26 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila	-
27 Galacetofenona(2,3,4-trihidróxiacetofenona)	41,50 ± 3,50
28 Floroacetofenona	-
29 Quercetina	28 ± 1,00
30 Aciclovir	-

*os valores representam a média de três experimentos independentes ± erro padrão da média

**não houve reprodução da primeira determinação

(-): sem reatividade na concentração máxima testada (300μM)

(NT): não testado

Através do ensaio de inibição da peroxidação lipídica, observou-se que as moléculas que não possuem hidroxilas livres, não apresentaram inibição da peroxidação lipídica. Esse é o caso do aciclovir (**30**), ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico (**9**), 4-metóxiacetofenona (**24**), 3,4,5-

trimetóxiacetofenona (**25**) e 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila (**26**). No caso dos CF com hidroxilas em posições alternadas [1,3,5-trihidróxibenzeno (**7**) e floroacetofenona (**28**)], também não houve inibição da peroxidação lipídica na concentração de 300 μ M. Esse fato comprovou que a presença de hidroxilas livres tem influência na atividade antioxidante dos CF e que a localização dessas hidroxilas na molécula pode condicionar maior ou menor potencial antioxidante.

Observou-se, através dos resultados apresentados nas Tabelas 10 e 11 e Figura 10, que as amostras testadas comportaram-se de forma muito semelhante, tanto no ensaio de captação de radicais livres DPPH como no teste de inibição da peroxidação lipídica, o que sugere potencial antioxidante e indica que mais estudos devem ser realizados para confirmá-lo.

5.5 Determinação das possíveis correlações entre as atividades detectadas

5.5.1 Atividade antioxidante x atividade anti-herpética

Skulachev (1998) sugeriu que a função das EROS na defesa antiviral é causar apoptose (morte celular programada), impedindo a propagação do vírus. A célula infectada ativa a geração de ânion superóxido e de H₂O₂ pelo sistema xantina-oxidase e NADPH-oxidase intracelular. No entanto, o H₂O₂ se difunde para células vizinhas, devido à alta permeabilidade da membrana, induzindo apoptose também nessas células. Desta forma, as células infectadas e suas adjacentes são eliminadas a fim de deter o processo infeccioso. Entretanto, atendendo os aspectos evolutivos, alguns vírus desenvolveram mecanismos que propiciam sua sobrevivência. Os herpesvírus possuem uma proteína específica, ICP-4, que previne o aumento dos níveis de EROS durante a infecção, de modo a bloquear a apoptose e propagar a infecção. De acordo com esses conceitos, substâncias que possuem a capacidade

de captar EROS e, portanto, impedir seus efeitos no organismo, podem inibir a morte celular, conseqüentemente inibindo os efeitos dos vírus nas células.

A estimulação da proliferação celular em resposta ao aumento dos níveis de EROS pode ser um mecanismo de correção de danos oxidativos ao DNA (SKULACHEV, 1998). Esse fato poderia explicar a menor citotoxicidade de compostos com poucas hidroxilas livres, as quais geram EROS numa quantidade que estimula a proliferação celular e não em quantidade suficiente para provocar danos que não possam ser corrigidos. Ainda, estes compostos poderiam captar EROS, evitando a apoptose das células.

5.5.2 Atividade antioxidante x genotoxicidade

Deve-se considerar que antioxidantes hidrossolúveis são capazes de captar radicais apenas em meio aquoso e não os radicais lipofílicos, que estão em membranas ou lipoproteínas (NIKI, 1991). Este fato poderia explicar a genotoxicidade nas células VERO provocada por alguns CF, os quais foram dissolvidos em meio aquoso. A geração de radicais lipofílicos poderiam provocar danos ao DNA celular e alguns CF dissolvidos em meio aquoso não poderiam conseguir atuar como antioxidantes eficientes, a fim de evitar os danos genotóxicos. Os ensaios de captação de radicais DPPH e peroxidação lipídica realizados nesse trabalho utilizaram CF dissolvidos em DPPH em solução etanólica e, por isso, demonstraram melhor a atividade antioxidante.

De acordo com Johnson e Loo (2000), compostos que não causaram genotoxicidade, como a quercetina, conseguiram inibir o dano oxidativo induzido pelo H_2O_2 , pela quelação de íons metálicos. Além disso, os possíveis efeitos pró-oxidantes em altas concentrações dos CF poderiam ser devidos a presença de íons metálicos, os quais geram EROS. Esses fatos foram verificados nesses experimentos onde CF com atividade antioxidante demonstraram certo

grau de genotoxicidade. Os compostos que não apresentaram efeitos antioxidantes [4-metóxiacetofenona (24), ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico (9), 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila (26) e 3,4,5-trimetóxiacetofenona (25)] poderiam não ter sido capazes de quelar íons metálicos, conseqüentemente, causando dano ao DNA, através da geração de EROS.

5.5.3 Atividade antioxidante x genotoxicidade x atividade anti-herpética

Appel (1993) afirmou que os radicais hidroxila formados durante a oxidação dos CF possuem ação tóxica, pois são responsáveis pela ruptura da integridade da membrana celular. Desse modo, a presença de EROS pode levar ao dano tanto no DNA como na membrana celular. Portanto, concentrações de CF que geram EROS poderiam atuar como pró-oxidantes, contribuindo para a citotoxicidade e genotoxicidade nas células, enquanto que, concentrações de CF que atuam como antioxidantes, captariam ou inibiriam a formação de EROS.

Além da concentração, a forma de preparo e armazenamento das soluções de CF poderia contribuir para seu efeito antioxidante. Wee et al. (2003) afirmaram que o H_2O_2 pode ser gerado por CF em meio MEM a $37^\circ C/5\% CO_2$, e que não há inibição desta formação por EDTA, o qual não quela íons metálicos suficientemente. Esse fato poderia explicar os danos oxidativos ao DNA de alguns CF, dissolvidos em meio MEM sem EDTA, nas concentrações testadas. Além disso, a geração de H_2O_2 pelos CF em meio MEM, através de reações com íons metálicos e outros constituintes do meio de cultura, poderia ter influenciado a atividade anti-herpética desses compostos. Nesse caso, a presença do H_2O_2 , proveniente do meio+CF, poderia ter induzido apoptose das células infectadas antes mesmo do vírus poder replicar-se e disseminar-se para outras células. Ainda, a genotoxicidade detectada para alguns dos CF testados poderia ser devido à presença de H_2O_2 procedente do meio+CF.

A genotoxicidade e a atividade anti-herpética, de compostos sem atividade antioxidante, pode ser devido a uma ação antiviral que não depende da captação de EROS. Essa afirmação é baseada no fato de que isto ocorreu com o aciclovir e com outras substâncias que não possuem hidroxilas livres em sua molécula, como a 4-metóxiacetofenona **(24)**, ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico **(9)**, 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila **(26)** e 3,4,5-trimetóxiacetofenona **(25)**.

As atividades anti-herpética e de proteção contra danos oxidativos ao DNA, não podem ser relacionadas, unicamente, com o potencial antioxidante dos CF, já que esses podem sofrer variações e não se comportarem como tal.

6. CONCLUSÕES

- A presença de hidroxilas livres contribui para a citotoxicidade dos CF testados;
- Os CF testados tiveram atividade anti-herpética (cepa KOS e 29-R) inferior a concentração citotóxica, com exceção do ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico, galato de octila e galacetofenona(2,3,4-trihidroxiacetofenona), que tiveram atividade anti-herpética (cepa KOS) somente acima da concentração citotóxica;
- Os compostos 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila, galato de metila, galato de cetila, galato de butila, galato de pentila, galato de heptila, galato de tetradecila, robinetinidol(4 α -6)galocatequina, epigalocatequina e galato de hexila tiveram índices de seletividade maior que 4 e superiores ao aciclovir para o HSV-1 cepa KOS, na ordem decrescente apresentada;
- O galato de propila, galato de butila, epigalocatequina, galato de pentila, galato de tetradecila, 3,4,5-trimetóxiacetofenona, epicatequina, floroacetofenona, 4-metóxiacetofenona, galato de etila, 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila, robinetinidol(4 α -6)galocatequina, galato de heptila, ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico e galato de undecila tiveram índices de seletividade maior que 4 e superiores ao aciclovir para o HSV-1 cepa 29-R, na ordem decrescente apresentada;
- A quantidade de hidroxilas livres é um parâmetro insuficiente para relacionar a estrutura química dos CF com a atividade anti-herpética;
- As células tratadas com os CF apresentaram viabilidade celular superior a 90%, verificada através do método de exclusão com azul de Trypan;

- A genotoxicidade dos CF não está relacionada, unicamente, com a presença de hidroxilas livres na molécula: a 4-metóxiacetofenona, a 3,4,5-trimetóxiacetofenona e o 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila, não possuem hidroxilas livres, mas apresentaram genotoxicidade nas concentrações testadas; a epigalocatequina, a floroacetofenona, a quercetina e o galato de cetila, possuem hidroxilas, mas não apresentaram genotoxicidade;
- As amostras tiveram reatividade com o radical DPPH com exceção do ácido 3,4,5-trimetóxi benzoico, 4-metóxiacetofenona, 3,4,5-trimetóxiacetofenona, 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila e aciclovir, possivelmente devido a ausência de radicais hidroxila livres no anel aromático,
- A floroacetofenona e 1,3,5-trihidroxibenzeno tiveram reatividade com o radical DPPH em concentrações acima de 300 μ M, possivelmente devido a localização dos grupos hidroxila em posições alternadas;
- A atividade captadora de radicais DPPH foi proporcional à quantidade de hidroxilas livres na molécula testada;
- As amostras inibiram a peroxidação lipídica (teste de TBARS), com exceção do ácido 3,4,5-trimetóxi benzoico, 4-metóxiacetofenona, 3,4,5-trimetóxiacetofenona, 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila e aciclovir, possivelmente devido a ausência de radicais hidroxila livres no anel aromático;
- A floroacetofenona e o 1,3,5-trihidróxibenzeno não conseguiram inibir a peroxidação lipídica na concentração máxima de 300 μ M, possivelmente devido as posições alternadas dos grupos hidroxilas;

- A eficiência dos compostos fenólicos como antioxidantes é diversa e depende de muitos fatores, como o número de grupos hidroxila ligado ao anel aromático, o local de ligação, a posição das hidroxilas no anel aromático e os substituintes em relação as hidroxilas;
- Os ensaios de captação de radicais DPPH e de inibição da peroxidação lipídica tiveram resultados semelhantes, mostrando a importância dos grupos hidroxilas na atividade antioxidante dos CF;
- O galato de cetila, floroacetofenona, quercetina e aciclovir não apresentaram genotoxicidade na concentração anti-herpética (HSV-1 cepa KOS);
- A floroacetofenona, epigalocatequina, quercetina e aciclovir não apresentaram genotoxicidade na concentração anti-herpética (HSV-1 cepa 29-R);
- O galato de metila, galato de etila, galato de butila, galato de pentila, galato de hexila, galato de heptila, galato de tetradecila, galato de cetila apresentaram atividade antioxidante, genotoxicidade e índices de seletividade superiores a 4 (HSV-1, cepa KOS).
- O 3,4,5-trimetóxiibenzoato de etila, o robinetinidol(4 α -6)galocatequina, e epigalocatequina apresentaram genotoxicidade, índices de seletividade superiores a 4 (HSV-1, cepa KOS), e não apresentaram atividade antioxidante.
- O galato de etila, galato de propila, galato de butilia, galato de pentila, galato de heptila, galato de undecila, galato de tetradecila e epicatequina apresentaram atividade antioxidante, genotoxicidade e índices de seletividade superiores a 4 (HSV-1, cepa 29-R).

- A floroacetofenona, 4-metóxiacetofenona, ácido 3,4,5-trimetóxi benzóico, 3,4,5-trimetóxi benzoato de etila, 3,4,5-trimetóxiacetofenona apresentaram genotoxicidade, índices de seletividade superiores a 4 (HSV-1, cepa 29-R), e não apresentaram atividade antioxidante.
- O galato de cetila apresentou atividade antioxidante e anti-herpética (HSV-1, cepa KOS), e não apresentou genotoxicidade.
- As atividades anti-herpética e de proteção contra danos oxidativos ao DNA, não podem ser relacionadas, unicamente, com o potencial antioxidante dos CF, já que esses compostos podem sofrer variações e não se comportarem como tal.

7. PERSPECTIVAS

- Estudar as possíveis relações estrutura-atividade dos compostos fenólicos, a fim de estabelecer as características químicas que melhor contribuem para as atividades abordadas.
- Sintetizar moléculas com estruturas químicas que favoreçam sua atividade farmacológica e que diminuam sua degradação.
- Adicionar radicais às estruturas dos compostos fenólicos (como por exemplo, fosfato) que conhecidamente favorece a atividade anti-herpética.
- Identificar a máxima concentração não genotóxica de cada composto fenólico, através do teste de um número maior de concentrações.
- Verificar se a genotoxicidade detectada para esses compostos está relacionada unicamente com a interação com metais de transição.
- Verificar o dano ao DNA de células infectadas pelo HSV-1 e tratadas com diferentes concentrações dos compostos fenólicos.
- Verificar o possível dano ao DNA viral causado por diferentes concentrações de compostos fenólicos.
- Selecionar os compostos com índices de seletividade superiores ao do aciclovir para estudos anti-herpéticos mais detalhados.
- Selecionar os compostos com bons índices de seletividade para estudos anti-herpéticos em cepas resistentes ao aciclovir.
- Verificar a presença de vírus nas células tratadas com os compostos fenólicos.
- Avaliar a toxicidade dos compostos fenólicos em outros tipos de células.
- Avaliar a atividade antiviral dos compostos fenólicos em outros modelos virais.
- Avaliar a ação antioxidante através de testes que envolvam sistemas enzimáticos.

- Avaliar a possível ação pró-oxidante dos compostos fenólicos.

8. REFERÊNCIAS

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

ABDEL-KADER M.S. Phenolic constituents of *Ononis vaginalis* roots. *Planta Medica*, v.67, n.4, p.388-390, 2001.

ACKER, S. A. B. E.; BERG, D. J. V. D.; TROMP, M. N.J.L.; GRIFFIOEN, D.H.; BENNEKOM, W.P.V.; VIJGH, W.J.F.V.D.; BAST, A. structural aspects of antioxidant activity of flavonóides. *Free Radical Biology and Medicine*, v.20, n.3, p.331-342, 1996.

AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Green tea polyphenols and cancer: biologic mechanism and practical implications. *Nutrition Reviews*, v. 57, n. 3, p. 78-83, 1999.

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.G.; TICE, R.; WATER, M.D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*, v.463, p.111-172, 2000.

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. *Journal of Natural Products*, v. 55, n. 12, p. 1732-1740, 1992.

ANDERSON, D.; YU, T.; MCGREGOR, D. Review: comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis*, v. 13, n. 6, p. 539-555, 1998.

ANDERSON, D.; YU, T.W.; PHILLIPS, B. J.; SCHMEZER, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutation Research*, v. 307, p. 261-271, 1994.

ANDLAUER, W.; STEHLE, P.; FÜRST, P. Chemoprevention - a novel approach in dietetics. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 1, n. 6, p. 539-547, 1998.

ANDRIGHETTI-FROHNER C.R.; ANTONIO R.V.; CRECZYNSKI-PASA T.B.; BARARDI C.R.; SIMÕES C.M.O. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 6, p. 843-848, 2003.

ARUOMA O.I., SPENCER J.P.; BUTLER J.; HALLIWELL B. Reaction of plant-derived and synthetic antioxidants with trichloromethylperoxyl radicals. *Free Radical Research*, v.22, n.2, p.187-190, 1995.

AUST, S. D. Thiobarbituric acid assay reactants. *In*: TYSON, C. A.; FRAZIER, J. M. (eds.) *Methods in toxicology*. v. 1B - *In vitro* toxicity indicators. San Diego : Academic, 1994. p. 367-376.

- BARILE, F. A.; In vitro cytotoxicology: mechanisms and methods. Florida: CRC, 1994. 222p.
- BARRIO, M.R.; PARRA, F. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. Journal of Ethnopharmacology. V.72, p.317-322, 2000.
- BEDOYA, L.M.; PALOMINO-SANCHEZ, S.; ABAD, M..J.; BERMEJO, P.; ALCAMI, J. Anti-HIV activity of medicinal plant extracts. Journal of Ethnopharmacology, v.77, p.113-116, 2001.
- BÉLÁDI, R.; PUSZTAI, R.; MUCSI, I.; BAKAY, M.; GÁBOR, M. Activity of some flavonoids against viruses. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 284, p. 358-364, 1977.
- BELL, A. E.; CHARLWOOD, B. V. Secondary Plant Products, Nova York : Springer, 1980. 674 p., p. 329-402.
- BERDARD, J.; MAY, S.; BARBEAU, D.; YUEN, L.; RANDO, R.F; BOWLIN, T.L. A high throughput colorimetric cell proliferation assay for the identification of human cytomegalovirus inhibitors. Antiviral Research. V.41. p.35-43, 1999.
- BETANCUR-GALVIS L.; ZULUAGA C.; ARNO M.; GONZALEZ M.A.; ZARAGOZA R.J. Structure-activity relationship of in vitro antiviral and cytotoxic activity of semisynthetic analogues of scopadulane diterpenes. Journal of Natural Products, v.64, n.10, p.1318-1321, 2001.
- BETANCUR-GALVIS L.A.; MORALES G.E.; FORERO J.E.; ROLDAN J. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the Euphorbia genus. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.97, v.4, p.541-546, 2002.
- BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. In: PACKER, L. (ed.) Methods in enzymology - Oxygen radicals in biological systems. v. 105. San Diego : Academic, 1984a. p. 298-305.
- BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. Methods in Enzymology. v.90, p.105-10, 1984b.
- BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. Nutrition and Cancer, v. 18, n. 1, p. 1-29, 1992.
- BRADY, R. C.; BERNSTEIN, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. Antiviral Research. V. 61. p.73-81, 2004.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews, v. 56, n.11, p. 317-333, 1998.
- BRUNETON, J. Eléments de phytochimie et de pharmacognosie. 2 ed. Paris : Lavoisier, 1995. 584 p., p. 123-184.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology. v.52, p.302-10, 1978.

BURKE J. R.; FESEN, M. R.; MAZUNDER, A.; WANG, J.; CAROTHERS, A. M.; GRUNBERGER, D.; DRISCOLL, J.; KOHN, K.; POMMIER, Y. Hydroxylated aromatic inhibitors of HIV-1 integrase. *Journal of Medical Chemistry*. V. 38, p.4171-4178, 1995.

BURLESON, F. G.; CHAMBERTS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. *Virology: a laboratory manual*. San Diego: Academic, 1992. 250.p.

CADENAS, E. Oxidative stress and formation of excited species. *In: SIES, H. (ed.) Oxidative Stress*. London : Academic, 1985. p. 311-330.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. *In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). Farmacognosia - da planta ao medicamento*. Porto Alegre/ Florianópolis : Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 2003. 1102p., p. 519-536.

CASSADY, K. A.; WHITLEY, R. J. New therapeutic approaches to the alphaherpesvirus infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. V. 39. p.119-128, 1997.

CHARLTON, J. L. Antiviral activity of lignans. *Journal of Natural Products*. V.61, p.1447-1451, 1998.

CHE, C.-T. Plants as a source of potential antiviral agents. *In: WAGNER, H.; FARNSWORTH, N. R. (eds.) Economic and medicinal plant research*. v. 5. London : Academic, 1991. p. 167- 251.

CHEN C; TANG H.R; SUTCLIFFE L.H; BELTON P.S. Green tea polyphenols react with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radicals in the bilayer of liposomes: direct evidence from electron spin resonance studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, n.11, p.5710-5714, 2000.

CHIANG, L.C.; CHIANG, M. Y.; NG, L. T.; LIN, C. C. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. *Antiviral Research*. V. 55, p.53-62, 2002.

CHUNG, K.; WONG, T. Y.; WEI, C. HUANG, Y.; LIN, Y. Tanins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 38, n. 6, p. 421-464, 1998.

CLEMENTS, J. B.; TIMBURY, M. C.; GRIFFITHS, P. D. Herpesviridae. *In: COLLIER, L. H.; TIMBURY, M. C. (eds.) Topley & Wilson's. Principles of bacteriology, virology and immunity*. 8 ed. v. 4. London : Edward Arnold, 1990. p. 415-429.

COLLINS, A. R.; AI-GUO, M.; DUTHIE, S. J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. *Mutation Research*. V. 336, p.69-77, 1995.

COLLINS, A. R.; DOBSON, V. L.; DUSINSKÁ, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research*, v. 375, p. 183-193, 1997a.

COLLINS, A.; DUSINSKÁ, M.; FRANKLIN, M.; SOMOROVSKÁ, M.; PETROVSKÁ, H.; DUTHIE, S.; FILLION, L.; PANAYIOTIDIS, M.; RASLOVÁ, K.; VAUGHAN, N. Comet assay in human biomonitoring

studies: reliability, validation and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 30, p. 139-146, 1997b.

CONDIT, R.C. Principles of Virology. In: *Fields Virology*. Edina: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. CD-ROM.

COS P.; CALOMME M.; SINDAMBIWE J.B.; DE BRUYNE T.; CIMANGA K.; PIETERS L.; VLIETINCK A.J.; VANDEN BERGHE D. Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. *Planta Medica*, v.67, n.6, p.515-519, 2001.

COS, P.; CALOMME, M.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J.; VANDEN BERGUE. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as antioxidant and pro-oxidant compounds. In: RAHMAN. *Studies in Natural Products Chemistry*. Pakistan: Elsevier, 2000. p. 307-341.

COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J. P.; CIMANGA, K.; POEL, B. V.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J.; VANDEN BERGUE, D. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xantine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, v. 61, p. 71-76, 1998.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, v. 60, p. 52-60, 1997.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 854, p. 435-442, 1998.

DA SILVA, A. G. Propriedades gerais dos herpesvirus. In: LUPI, O.; DA SILVA, A. G.; PEREIRA JR, A. C. *Herpes - clínica, diagnóstico e tratamento*. Rio de Janeiro : Medsi, 2000. 278 p., p. 1-13.

DA SILVA, E. L.; PISKULA, M.; TERAQ, J. Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of (-)-epicatechin. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 24, n. 7/8, p. 1209-1216, 1998.

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 transport. *Journal of General Virology*, v.67, n.9, p.1831-1850, 1986.

DAVIES, K. J. A. Oxidative damage & repair: introduction and overview. In: DAVIES, K. J. A. (ed.) *Oxidative damage and repair - chemical, biological and medical aspects*. Oxford : Pergamon, 1991. p. xvii-xxvi.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs: current state of the art. *Journal of Clinical Virology*. V.22, p.73-89, 2001.

DE CLERCQ, E. Comparative efficacy of antiherpes drugs in different cell lines. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 21, n.4, p. 661-663, 1982.

DE MELLO, J. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, v. 42, n.3, p.857-862, 1995.

DECKER, E. Phenolics: prooxidants or antioxidants? - a brief critical review. *Nutrition Reviews*, v. 55, n. 11, p. 396-407, 1997.

DENIZOT, F.; LANG, R.; Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *Journal of Immunological Methods*. V. 89. p.271-277, 1986.

DIWU Z. Novel therapeutic and diagnostic applications of hypocrellins and hypericins. *Photochemistry and Photobiology*, v.61, n.6, 1995.

DUARTE, M. P.; LAIRES, A.; GASPAR, J.; LEÃO, D.; OLIVEIRA, J. S.; RUEFF, J. Genotoxicity of instant coffee: possible involvement of phenolic compounds. *Mutation Research*, v. 442, p. 43-51, 1999.

DUTHIE, S. J.; COLLINS, A. R.; DUTHIE, G. G.; DOBSON, V. L. Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human lymphocytes. *Mutation Research*, v. 393, p. 223-231, 1997.

DUTHIE, S. J.; JOHNSON, W.; DOBSON, V. L. The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) and growth in human cells. *Mutation Research*, v. 390, p.141-151, 1997.

DUTHIE, S. J.; DOBSON, V. J. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack *in vitro*. *European Journal of Nutrition*, v. 38, p. 28-34, 1999.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C. PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of *in vitro* toxicology. *Food and Chemical Toxicology*. V.40. p.193-236, 2002.

ERDELMEIER C.A.; CINATL J. JR.; RABENAU H.; DOERR H.W.; BIBER A.; KOCH E. Antiviral and antiphlogistic activities of Hamamelis virginiana bark. *Planta Medica*, v.62, n.3, p.241-245, 1996.

ERNSTER, L.; HOCHSTEIN, P. Membrane lipid peroxidation: cellular mechanisms and toxicological implications. *In: TYSON, C. A.; FRAZIER, J. M. (eds.) Methods in toxicology. v. 1B - In vitro toxicity indicators. San Diego : Academic, 1994. p. 33-45.*

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, v. 339, p. 37-59, 1995.

FAUCONNEAU B; WAFFO-TEGUO P; HUGUET F; BARRIER L; DECENDIT A; MERILLON J.M. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using *in vitro* tests. *Life Science*, v.61, n.21, p.2103-2110, 1997.

FERREA, G.; CANESA, A.; SAMPIETRO, F.; CRUCIANI, M.; ROMUSSI, G.; BASSETI, D. *In vitro* activity of a *Combretum micranthum* extract against herpes simplex virus type 1 and 2. *Antiviral Research*. V.21, p.317-325, 1993.

FIELD, A. K.; BIRON, K. K. "The End of Innocence" revisited: Resistance of herpesviruses to antiviral drugs. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 7, n. 1, p. 1-13, 1994.

FIKUCHI, K.; SAKAGAMI, H.; OKUDA, T.; HATANO, T.; TANUMA, S.; KITAJIMA, K.; INOUE, Y.; INOUE, S.; ICHIKAWA, S.; NONOYAMA, M.; KONNO, K. Inhibition of herpes simplex virus infection by tannins and related compounds. *Antiviral Research*, v. 11, p. 285-298, 1989.

FLECHA, B. S. G. Éstrés oxidativo en patologia humana. Métodos de estudio de aplicación clínica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, v. XXIV, n.1, p. 67-74, 1990.

FLOYD, R. A. DNA damage and repair. *In: DAVIES, K. A. (ed.) Oxidative damage and repair - chemical, biological and medical aspects.* Oxford : Pergamon, 1991. p. 175-180.

FORTIN, H.; VIGOR, C.; LOHEZIC-LE DEVEHAT, L. F.; ROBIN, V.; LE BOSSE, B.; BOUSTIE, J.; AMOROS, M. *In vitro* activity of thirty-six plants from La Reunion island. *Fitoterapia*. V. 73. p.346-350, 2002.

FRANKEL, E. N.; KANNER, J.; GERMAN, J. B.; PARKS, E.; KINSELLA, J. E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, v. 341, n. 8843, p. 454-457, 1993.

FREITAS, A. M. Avaliação da atividade antiviral de extratos de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, Araucariaceae. 2001. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

FRESHNEY, R. I. *Culture of Animal Cells. A Multimedia Guide.* Wiley-Liss, 1999.

FUJITA K.; KUBO I. Plasma membrane injury induced by nonyl gallate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, v.92, n.6, p.1035-1042, 2002.

GIRARD, M.; HIRTH, L. *Virologie moléculaire.* 2^{ème}. Paris : Doin, 1989.

GREEN, R. H. Inhibition of multiplication of influenza virus by extracts of tea. *Proceedings of the Society of Experimental Biology*, v. 71, p. 84-85, 1949.

GRODZINSKA-ZACHWIEJA, Z.; ZGORNIAK-NOWOSIELSKA, I.; MARCISZEWSKA, M.; GATKIEWICZ, A. Antiviral activity of caffeic acid *in vitro* studies. *Acta Biologica Cracoviensia*, v. XIX, p. 29-37, 1976.

GROOT, H.; RAUEN, U. tissue injury by reative oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental Clinical Pharmacology*, v.12, p.249-255, 1998.

GUTTERIDGE J.M. Does redox regulation of cell function explain why antioxidants perform so poorly as therapeutic agents? *Redox Report*, v.4, n.3, p.129-131, 1999.

MEERBACH A.; NEYTS J.; BALZARINI J.; HELBIG B.; DE CLERCQ E.; WUTZLER P. *In vitro* activity of polyhydroxycarboxylates against herpesviruses and HIV. *Antiviral Chemistry Chemotherapy*, v. 12, n.6, 2001.

HABTEMARIAM S. Cytotoxicity of diterpenes from *Premna schimperi* and *Premna oligotricha*. *Planta Medica*, v.61, n.4, p.368-369, 1995.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet*, v. 344, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *American Journal of Clinical Nutrition*, v.72 n.5 p. 1082-1087, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 280, n.1, p. 1-8, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3a ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HARTMANN, A.; KISKINIS, E.; FJALLMAN, A.; WILLI, S. Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline Comet assay. *Mutation Research*, v.497, p.199-212, 2001.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (Comet assay). *Toxicology Letters*. V.90, p.183-188, 1997.

HARVEY, A. L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? *Trends in Pharmacological Sciences*. V. 20, p-196-198, 1999.

HASLAM, E.; LILLEY, T. H.; WARMINSKI, E.; LIAO, H.; CAI, Y.; MARTIN, R.; GAFFNEY, S. H.; GOULDING, P. N. LUCK, G. Polyphenol complexation - a study in molecular recognition. *In*: HO, C.; LEE, C. Y.; HUANG, M. (eds.) *Phenolic compounds in food and their effects on health. I - Analysis, occurrence, and chemistry*. Nova York : American Chemical Society, 1992. 338 p., p. 9-50.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; OTSULA, H.; TAKEDA, Y. Antiviral activity of 5,6,7-trimethoxyflavone and its potentiation of the antiherpes activity of aciclovir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. V.39, p.51-59, 2001.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.13, p.572-584, 2002.

HELBIG, R.; SPEIT, G. DNA effects in repair-deficient V79 Chinese hamster cells studied with the comet assay. *Mutation Research*, v. 377, p. 279-286, 1997.

HENDERSON, L.; WOLFREYS, A.; FEDYK, J.; BOURNER, C.; WINDEBANK, S. The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*. V.13. n.1, p.89-94, 1998.

HERTOG, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet*, v. 342, p. 1007-1011, 1993.

HERTOG, M. G. L.; KROMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; FIDANZA, F.; GIAMPAOLI, S.; JANSEN, A.; MENOTTI, A.; NEDELJKOVIC, S.; PEKKARINEN, M.; SIMIC, B.; TOSHIMA, H.; FESKENS, E.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Flavonoid intake and long-term risk of

coronary heart disease and cancer in seven countries study. Journal of American Medical Association, v. 155, n. 4, p. 381-386, 1995.

HOLLMAN P.C.; TIJBURG L.B.; YANG C.S. Bioavailability of flavonoids from tea. Critical Review Food Science Nutrition, v.37, n.8, p.719-738, 1997.

HOUGHTON, P. Use of a small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. Phytoterapy Research, v. 14, p.419-423, 2000.

HOUGHTON,P. J. Medicinal plants and the control of parasites: compounds with anti-HIV activity from plants. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. v.90, p. 601-604, 1996.

HU J.M.; HSIUNG G.D. Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. Antiviral Research, v.11, n.5-6, p.217-232, 1989.

HUANG, M.; FERRARO, T. Phenolic compounds in food and cancer prevention. *In: HO, C.; LEE, C. Y.;* HUANG, M. (eds.) Phenolic compounds in food and their effects on health. II - Antioxidants and cancer prevention. Nova York : American Chemical Society, 1992. 402 p., p. 8-34.

HUDSON, J. B.; GRAHAM, E. A.; HARRIS, L.; ASHWOOD-SMITH, M. J. The unusual UVA-dependent antiviral properties of the furoisocoumarin, coriandrin. Photochemistry and Photobiology. V.57. p.491-496, 1993.

HUHEIHEL, M.; ISHANU, V.; TAL, J.; ARAD, S. Activity of *Porphyridium* sp. Polysaccharide against herpes simplex virus *in vitro* and *in vivo*. Journal of Biochemistry and Biophysical Methods. v.50. p.189-200, 2002.

JACOB JOHN, T.; MUKUNDAN, P. Virus inhibition by tea, caffeine and tannic acid. Indian Journal of Medical Research, p. 542-545, April 1979.

JOHN T.J; MUKUNDAN P. Virus inhibition by tea, caffeine and tannic acid. Indian Journal Medicinal Research, v.69, p.542-545, 1979.

JOHNSON M.K.; LOO G. Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. Mutation Research, v.459, n.3, p.211-218, 2000.

KAEGI, E. Unconventional therapies for cancer: 2. Green tea. Canadian Medical Association, v. 158, n.8, p. 1033-1035, 1998.

KAMER, I.; RINKEVICH, B. *in vitro* application of the comet assay for aquatic genotoxicity: considering a primary culture versus a cell line. Toxicology *in vitro*. v.16, p.177-184, 2002.

KANE, C. J. M.; MENNA, J. H.; SUNG, C.-C.; YEH, Y.-C. Methyl gallate, methyl-3,4,5-trihydroxy-benzoate, is a potent and highly specific inhibitor of herpes simplex virus *in vitro*. II. Antiviral activity of methyl gallate and its derivatives. Bioscience Reports, v. 8, n. 1, p. 95-101, 1988.

KANEKO, H.; KEIICHIRO, K.; MORI, S.; SHIGETA, S. antiviral activity of NMSO₃ against adenovirus *in vitro*. *Antiviral Research*. V.52, p.281-288, 2001.

KASSIE, F.; LAKY, B.; NOBIS, E.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of methyl isothiocyanate. *Mutation Research*. V. 490, p.1-9, 2001.

KAUL, T. N.; MIDDLETON JR, E.; OGRA, P. L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal of Medical Virology*, v. 15, p. 71-79, 1985.

KEHRER, J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Reviews in Toxicology*, v.23, n.1, p.21-48, 1993.

KELI, S. O.; HERTOGE, M. G. L.; FESKENS, E. J. M.; KROMHOUT, D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Journal of American Medical Association*, v. 156, n. 6, p. 637-642, 1996.

KISKINIS, E.; SUTER, W.; HARTMANN, A. High throughput Comet assay using 96-well plates. *Mutagenesis*. V.17. p.37-43, 2002.

KLAUDE, M.; ERIKSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*, v. 363, p. 89-96, 1996.

KLOCKING R; HELBIG B; SCHOTZ G; SCHACKE M; WUTZLER P. Anti-HSV-1 activity of synthetic humic acid-like polymers derived from p-diphenolic starting compounds. *Antiviral Chemistry Chemotherapy*, v.13, n.4, p.241-249, 2002.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun.*, v. 2, n. 3, p. 103-115, 1995.

KODAMA, E.; SHIGETA, S.; SUZUKI, T.; DE CLERCQ, E. Application of a gastric cancer cell line (MKN-28) for anti-adenovirus screening using the MTT method. *Antiviral Research*, v.31. p.159-164, 1996.

KÖNIG, B.; DUSTMANN, J. H. The caffeoylics as a new family of natural antiviral compounds. *Naturwissenschaften*, v. 72, p. 659-661, 1985.

KONOWALCHUCK, J.; SPEIRS, J. I. Antiviral activity of fruit extracts. *Journal of Food Science*, v. 41, p. 1013-1017, 1976b.

KONOWALCHUCK, J.; SPEIRS, J. I. Antiviral effect of apple beverages. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 36, n. 6, p. 798-801, 1978b.

KONOWALCHUCK, J.; SPEIRS, J. I. Antiviral effect of commercial juices and beverages. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 35, n. 6, p. 1219-1220, 1978a.

- KONOWALCHUCK, J.; SPEIRS, J. I. Virus inactivation by grapes and wines. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 22, n. 6, p. 757-763, 1976a.
- LARION, D.; AMIOT, M. J. Flavonoids in food and natural antioxidants in wine. *Current Opinion in Lipidology*, v. 10, n.1, p. 23-28, 1999.
- LEANDERSON, P.; FARESJÖ, A. O.; TAGESSON, C. Green tea polyphenols inhibit oxidant-induced DNA strand breakage in cultured lung cells. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 23, n. 2, p. 235-242, 1997.
- LOVELL, D. P.; THOMAS, G.; DUBOW, R. Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* comet studies. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, v. 19, p. 109-119, 1999.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*, v.193, p.265-275, 1951.
- LUNA E.A.; BORNANCINI E.R.; TAIT R.J.; THOMPSON D.O.; STOBAUGH J.F.; RAJEWSKI R.A.; STELLA V.J. Evaluation of the utility of capillary electrophoresis for the analysis of sulfobutyl ether beta-cyclodextrin mixtures. *Journal of Pharmacological Biomedicine Anal*, v.15, n.1, p.63-71, 1996.
- LUNDER, T. L. Catechins of green tea. *In: HO, C.; LEE, C. Y.; HUANG, M. (eds.) Phenolic compounds in food and their effects on health. II - Antioxidants and cancer prevention. Nova York : American Chemical Society, 1992. 402 p., p. 114-120.*
- LUPI, O.; PEREIRA JR, A. C. Herpes simples. *In: LUPI, O.; DA SILVA, A. G.; PEREIRA JR, A. C. Herpes - clínica, diagnóstico e tratamento. Rio de Janeiro : Medsi, 2000. 278 p., p. 43-70.*
- MA, S. C.; DU, J.; BUT, P.P.H.; DENG, X. L.; ZHANG, Y. W.; OOI, V.E.C.; XU, X.X.; LEE, S.H.S.; LEE, S.F. Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus. *Journal of Ethnopharmacology*, v.79, p.205-211, 2002.
- MACMAHON, J. B. et al. Michellamine B, a novel plant alkaloid, inhibits human immunodeficiency virus-induced cell killing by at least two distinct mechanisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 39, p. 484-488, 1995.
- MACRAE W.D; HUDSON J.B; TOWERS G.H. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. *Journal Ethnopharmacology*, v.22, n.2, p.143-172, 1988.
- MARTINEZ-FLORES H.E.; FIGUEROA J.D.; MARTINEZ-BUSTOS F.; GONZALEZ-HERNANDEZ J.; RODRIQUEZ GARCIA M.E.; BANOS LOPEZ A.M.; GARNICA-ROMO M.G. Physical properties and composition of femurs of rat fed with diets based on corn tortillas made from different processes. *International Journal Food Science Nutrition*, v.53, n.2, p.155-162, 2002.
- MARWICK, C. Learning how phytochemicals help fight disease. *Journal of American Medical Association*, v. 274, n. 17, p. 1328-1330, 1995.

MARX, J.L. oxygen free radicals linked to many diseases. *Science*, v.235, p.529-531, 1987.

MAXWELL S.R. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*, v.49, n.3, p.345-361, 1995.

MCCARTHY, P.J.; SWEETMAN, S.F.; MCKENNA, P.G.; MCKELVEY-MARTIN, V.J. Evaluation of manual and image analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay. *Mutagenesis*. V.12. n.4, p.209-214, 1997.

MCKERSIE, B. D. oxidative stress. *Net, Canadá*, dec. 1996. disponível em <http://www.agronomy.psu.edu/courses/agro518/oxygen.htm>. Acesso em 30 nov. 2003.

McNAMEE, J. P.; McLEAN, J. R. N.; FERRAROTTO, C. L.; BELLIER, P. V. Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutation Research*. V. 466. p.63-69, 2000.

MELO, P.S.; MARIA, S. S.; VIDAL, B. C.; HAUN, M.; DURAN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In vitro Cellular & Developmental Biology: Animal*. V.36, p.639-453, 2000.

MIDDLETON, E; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, v52, p.673-751, 2000.

MIYAGI, Y.; MIWA, K.; INOUE, H. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. *American Journal of Cardiology*, v. 80, p. 1627-1631, 1997.

MIYAMAE, Y.; YAMAMOTO, M.; SASAKI, Y. F.; KOBAYASHI, H.; IGARASHI-SOGA, M.; SHIMOI, K.; HAYASHI, M. Evaluation of a tissue homogenization that isolates nuclei for the *in vivo* single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. *Mutation Research*, v. 418, p. 131-140, 1998a.

MIYAMAE, Y.; ZAIKEN, K.; OHARA, K.; MINE, Y.; SASAKI, Y. F. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (comet) assay I. Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. *Mutation Research*, v. 415, p. 229-235, 1998b.

MONTANHA, J. A.; AMOROS, M.; BOUSTIE, J.; GIRRE, L. Anti-herpes activity of aporphine alkaloids. *Planta Medica*, v.61, p.419-424, 1995.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation na cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. V. 65. p.55-63, 1983.

MUCSI, I.; BÉLÁDI, R.; PUSZTAI, R.; BAKAY, M.; GÁBOR, M. Antiviral effect of flavonoids. *Proceedings of the 5th Hungarian Bioflavonoid Symposium*, p. 401-409, 1977.

MUNOZ, D.; AUDICANA, M.; GASTAMINZA, G.; FERNÁNDEZ E. Dermatitis de contacto por galatos. *Alergol Inmunol Clin*, v. 17, p. 173-177, 2002.

NARDONE, R. M. Toxicity testing *in vitro*. In: ROTBBLAT, G. H.; CRISTOFALO, V. J. (Ed). Growth, nutrition and metabolism of cells in culture. New York: Academic, 1977. p.471-495.

NEWMARK, H. L. Plant phenolic compounds as inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. In: HO, C.; LEE, C. Y.; HUANG, M. (eds.) Phenolic compounds in food and their effects on health. II - Antioxidants and cancer prevention. Nova York : American Chemical Society, 1992. 402 p., p. 48-52.

NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. Current Opinion in Chemical Biology. V.6, p. 297-305, 2002.

NIKI, E. Antioxidant compounds. In: DAVIES, K. J. A. (ed.) Oxidative damage and repair - chemical, biological and medical aspects. Oxford : Pergamon, 1991. p. 57-64.

OHKAWA, H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry. v.95, p.351-8, 1979.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Antioxidant effects of tannins and related polyphenols. In: HO, C.; LEE, C. Y.; HUANG, M. (eds.) Phenolic compounds in food and their effects on health. II - Antioxidants and cancer prevention. Nova York : American Chemical Society, 1992. 402 p., p. 87-97.

OLIVE, P.L. The Comet assay: an overview of techniques. In: DIDENKO, V.V.(Ed). Methods in Molecular Biology. Totawa: Humana, v.203, p179-194, 2002.

OLIVE, P.L. The Comet assay: an overview of techniques. In: DIDENKO, V.V.(Ed). Methods in Molecular Biology. Totawa: Humana, v.203, p. 179-194, 2002.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical Biophysical Research Communications, v. 123, p. 291-298, 1984.

OW Y.Y.; STUPANS I. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. Current Drug Metabolism, v.4, n.3, p.241-248, 2003.

PARK, K. J.; JIN, H. H.; HYUN, C. K. Antigenotoxicity of peptides produced from silk fibrion. Process Biochemistry. V. 38 p.411-418, 2002.

PETERHANS E. Oxidants and antioxidants in viral diseases: disease mechanisms and metabolic regulation. Journal of Nutrition, v.127, p.962-965, 1997.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products. V.63.p. 1035-1042, 2000.

POLLIKOFF, R.; LIBERMAN, M.; COCHRAN, K. W.; PASCALE, A. M. Effect of caffeic acid on mouse and ferret lung infected with influenza A virus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p. 561-566, 1965.

PRATT, D. E. Natural antioxidants from plant material. *In*: HO, C.; LEE, C. Y.; HUANG, M. (eds.) Phenolic compounds in food and their effects on health. II - Antioxidants and cancer prevention. Nova York : American Chemical Society, 1992. 402 p., p. 54-71.

PRIOR, R. L.; CAO, G. Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering *in vivo* antioxidant status. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 220, n. 4, p. 255-261, 1999.

PUNCHARD, N. A.; KELLY, F. J. Free radicals - a functional approach. Oxford : IRL, 1996. p. 1-8.

PUTNAM, K. P.; BOMBICK, D. W.; DOOLITTLE, D. J. Evaluation of eight *in vitro* assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology In vitro*. v.16, p. 599-607, 2002.

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

RENAUD, S.; DE LORGERIL, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, v. 339, p. 1523-1526, 1992.

RICE-EVANS, C. Implications of the mechanism of action of tea polyphenols as antioxidants *in vitro* for chemoprevention in humans. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 220, n. 4, p. 262-266, 1999.

RICE-EVANS, C. Plant polyphenols: free radical scavengers or chain-breaking antioxidants? *Biochemical Society Symposium*, v. 61, p. 103-116, 1996.

RIETJENS, I.M.C.; BOERSMA, M.G.; HAAN, L.; SPENKELINK, B.; AWAD, H. M.; CNUBBEN, N. H. P.; ZANDEN, J.J.V.; WOULDE, H.V.; ALINK, G.M.; HOEMAN, J.H. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental Toxicology and Farmacology*, v.11. p.321-333, 2002.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology*, v. 37, n. 5, p. 837-841, 1988.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. Baltimore : Williams & Wilkins, 1997.

ROBIN, V.; BOUSTIE, M.; AMOROS, M.; GIRRE, L. *In vitro* antiviral activity of seven *Psiadia* species, Asteraceae: isolation of two antipoliiovirus flavonóides from *Psiadia dentate*. *Pharmaceutical Pharmacological Communications*. V.4, p-61-64, 1998.

ROIZMAN, B. Herpesviridae. *In*: FIELDS, B. N.; KNIFE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. (eds.) *Fields Virology*. 3 ed. v. 2. Philadelphia : Lippincott-Raven, 1996. p. 2221-2341.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Review: Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B*, v. 722, p. 225-254, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3 ed. New York: CSHL Press, 2001.

SANG S.; CHENG X.; STARK R.E.; ROSEN R.T.; YANG C.S.; HO C.T. Chemical studies on antioxidant mechanism of tea catechins: analysis of radical reaction products of catechin and epicatechin with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Bioorganical Medicine and Chemistry*, v.10, n.7, p.2233-2237, 2002.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. *In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). Farmacognosia - da planta ao medicamento*. Porto Alegre/ Florianópolis : Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 2003. 1102p., p. 615-656.

SCHENKMAN, J.B.; CINT, D.L. Preparation of microsomes with calcium. *Methods Enzymology*, v.52, p.83-89, 1978.

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

SERKEDJIEVA, J.; IVANCHEVA, S. Antiherpes virus activity of extract from the medicinal plant *Geranium sinaica* L. *Journal of Ethnopharmacology*. V.64, p.59-68, 1999.

SEVANIAN, A.; URSINI, F. Lipid peroxidation in membranes and low-density-lipoproteins: similarities and differences. *Free Radical Biology and Medicine*, v.29, n.3/4, p.306-311, 2000.

SHAHAT A.A.; COS P.; DE BRUYNE.; APERS S.; HAMMOUDA F.M.; ISMAIL S.I.; AZZAM S.; CLAEYS M.; GOOVAERTS E.; PIETERS L.; VANDEN BERGHE D.; VLIETINCK A.J. Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. *Planta Medica*, v.68, n.6, p.539-541, 2002.

SHAHAT, A. A.; ISMAIL, S. I.; HAMMOUDA, F. M.; AZZAM, S. A.; LEMIÉRE, G.; DE BRUYNE, T.; DESWAEF, S.; VLIETINCK, A. Anti-HIV activity of flavonóides and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. *Phytomedicine*. V.5, p.133-136, 1998.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.32 (1), p.67-103, 1992.

SIDWELL, R. W. Determination of antiviral activity. *Drugs Pharmaceutical Science*, v. 27, p. 433-480, 1986.

SIES, H. Oxidative Stress: introductory remarks. *In: SIES, H. (ed.) Oxidative stress*. London : Academic, 1985. p. 1-8.

SILVA, F.A.M.; BORGES, F.; GUIMARÃES, C.; LIMA, J.L.F.C.; MATOS, C.; REIS, S. Phenolic acids and derivates: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physiochemical parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. V.48, p.2122-2126, 2000.

SILVA, J.; HERRMANN, S.M.; HEUSER, V.; PERES, W.; POSSA MARRONI, N.; GONZÁLES-GALLEGO, J.; ERDTMANN, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*. V.40 p.941-947, 2002.

SIMIC, M. G. Antioxidant compounds: an overview. *In: DAVIES, K. A. (ed.) Oxidative damage and repair - chemical, biological and medical aspects*. Oxford : Pergamon, 1991. p.47-56.

SIMÕES, C. M. O.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. *Phytotherapy Research*. V.21, p.317-325, 1999.

SIMÕES, C. M. O.; AMOROS, M.; GIRRE, L.; GLEYE, J.; FAUVEL, M. T. H. Antiviral activity of ternatin and meliternatin, 3-methoxyflavones from species of Rutaceae. *Journal of Natural Products*. V.53, p.989-992, 1990.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, v. 175, p. 184-191, 1988.

SINGH, N. P.; TICE, R. R.; STEPHENS, R. E.; SCHNEIDER, E. L. A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutation Research*, v. 252, p. 289-296, 1991.

SKULACHEV VP. Possible role of reactive oxygen species in antiviral defense. *Biochemistry (Mosc)*, v.63, n.12, p.1438-1440, 1998.

SLATER, T. F. Overview of methods used for detection lipid peroxidation. *In: PACKER, L. (ed.) Methods in enzymology - Oxygen radicals in biological systems*. v. 105. San Diego : Academic, 1984. p. 283-292.

SMEE, D. F.; MORRISON, A.C.; BARNARD, D. L.; SIDWELL, R. W. Comparison of colorimetric, fluorimetric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. *Journal of Virological Methods*. V.106, p.71-79, 2002.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell test) - a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *In: HENDERSON, D. S. Methods in Molecular Biology*, v. 113: DNA repair protocols: eukaryotic systems. Totowa : Human, 1999. P. 203-211.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*. V. 41. p. 753-758, 2003.

STICH, H. F. The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds. *Mutation Research*, v. 259, p. 307-324, 1991.

STREISSLE, G.; SCHWOBEL, W.; HEWLETT, G. Evaluation of antiviral compounds in cell cultures with acute or persistent virus infections. *Advanced Cell Culture*, v. 1, p. 67-90, 1981.

SUDO, K.; KONNO, K.; YOKOTA, T.; SHIGETA, S. A sensitive assay system for screening antiviral compounds against herpes simplex virus type 1 and type 2. *Journal of Virological Methods*. V. 49. p.169-178, 1994.

TAKEUCHI, H.; BABA, M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. *Journal of Virological Methods*. V.33, p.61-71, 1991.

THIEL, K. D.; HELBIG, B.; SPROSSIG, M.; KLÖCKING, R.; WUTZLER, P. Antiviral activity of enzymatically oxidized caffeic acid against herpesvirus hominis type 1 and type 2. *Acta Virologica*, v. 27, p. 200-208, 1983.

TICE R.R.; ANDREWS P.W.; HIRAI O.; SINGH N.P. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Advances Experimental Medicine Biology*, v.283, p.157-164, 1991.

TICE, R. R.; ANDREWS, P. W.; HIRAI, O.; SINGH, N. P. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *In: WITMER, C. M. Advances in Experimental Medicine and Biology: Biological Reactive Intermediates IV*, v. 283. New York : Plenum, 1990. p. 157-164.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single Cell Gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v.35, p.206-221, 2000.

TOYOKUNI S.; TANAKA T.; KAWAGUCHI W.; FANG N.R.; OZEKI M.; AKATSUKA S.; HIAI H.; ARUOMA O.I.; BAHORUN T. Effects of the phenolic contents of Mauritian endemic plant extracts on promoter activities of antioxidant enzymes. *Free Radical Research*, v.37, n.11 p.1215-1224, 2003.

VAN DER HEIJDEN C.A.; JANSSEN P.J.; STRIK J.J. Toxicology of gallates: a review and evaluation. *Food and Chemical Toxicology*, v.24, n.10-11, p.1067-1070, 1986.

VAN DER MEEREN H.L. Dodecyl gallate, permitted in food, is a strong sensitizer. *Contact Dermatitis*, v.16, n.5, p.260-262, 1987.

VAN HET HOF, K. H.; BOER, H. S. M.; WISEMAN, S. A.; LIEN, N.; WESTSTRATE, J. A.; TIJBURG, L. B. M. Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 66, p. 1125-1132, 1997.

VAN HET HOF, K. H.; WISEMAN, S. A.; YANG, C. S.; TIJBURG, L. B. M. Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 220, n. 4, p. 203-209, 1999.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A.J.; VAN HOOFF, L. Plant products as potential antiviral agents. *Bulletin de l'Institut Pasteur*. V. 84, p.101-105, 1986.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (eds.) Methods in Plant Biochemistry*, v. 6 - Assays for bioactivity. London : Academic, 1991. p. 47-69.

VIVOT, E.; MUNOZ, J. D.; CRUANES, M. C.; CRUANES, M. J.; TAPIA, A.; HIRSCHMANN, G. S.; MARTINEZ, E.; SAPIO, O.; GATTUSO, M.; ZACCHINO, S. Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. *Affinis*. Its morphological and micrographic characteristics. *Journal of Ethnopharmacology*. V. 76. p. 65-71, 2001.

VLIETINCK, A. J. Present status and perspectives of plant constituents as antimicrobial, antiviral and antiparasitic agents. *In: BREIMER, D. D.; SPEISER, P. (eds.) Topics in Pharmaceutical Sciences*. London : Elsevier, 1987. p. 249-262.

VLIETINCK, A. J.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; PIETERS, L. A. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection. *Planta Medica*, v. 64, p. 97-109, 1997.

VLIETINCK, A. J.; DE BRUYNE, T.; VANDEN BERGUE, D. A. Plant substances as antiviral agents. *Current Organic Chemistry*, v. 1, p. 307-344, 1997.

VLIETINCK, A. J.; VANDEN BERGUE, D. A.; HAEMERS, A. Present status and prospects of flavonoids as anti-viral agents. *Progress of Clinical and Biological Research*, v. 215, p. 283-299, 1988.

VOYLES, B. A. *The biology of viruses*. St. Louis : Mosby-Year Book, 1993. 386 p.

WAGNER, B. A.; BUETTNER, G. R.; BURNS, C. P. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry*, v.33., p.4449-4453, 1994.

WEE, L. M.; LONG, L. H.; WHITEMAN, M.; HALLIWELL, B. factors affecting the ascorbate and phenolic dependent generation of hydrogen peroxide in Dulbecco's Modified Eagles Medium. *Free Radical Research*. V. 37(10). p.1123-1130, 2003.

WEISBURGER, J. H. Mutagenesis, carcinogenesis and chemopreventive effects of phenols and catechols. *In: HO, C.; LEE, C. Y.; HUANG, M. (eds.) Phenolic compounds in food and their effects on health. II - Antioxidants and cancer prevention*. New York : American Chemical Society, 1992. 402 p., p. 35-47.

WHITE, D. O.; FENNER, F. J. *Medical Virology*. 4 ed. San Diego : Academic, 1994.

WILDMAN R.E; MAO S. Tissue-specific alterations in lipoprotein lipase activity in copper-deficient rats. *Biologic Trace Elemental Research*, v.80, n.3, p.221-229, 2001.

WILSON, A. P. Cytotoxicity and viability assays. *In: MASTERS, J. R. W. Animal Cell Culture*. 3rd.ed. Oxford: University, 2000. p.175-219.

YAMAMOTO, N.; FURUKAUWA, H.; ITO, Y.; YOSHIDA, S.; MAENO, K.; NISHIYAMA, Y. Antiherpes virus activity of citrusine-I, a new acridone alkaloid and related compounds. *Antiviral Research*. V.12, p.21-36, 1989.

YOSHIDA, W.B. Radicais livres na síndrome da isquemia e reperfusão. *Cirurgia Vascular Angiologia*, v.12, p.82-95, 1996.

YOSHINO, M.; HANEDA, M.; NARUSE, M.; HTAY, H.H.; IWATA, S.; TSUBOUCHI, R.; MURAKAMI, K. Prooxidant action of gallic acid compounds: cooper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Toxicology in vitro*, v.16 p.705-709, 2002.

ZENEBE W, PECHANOVA O. Effects of red wine polyphenolic compounds on the cardiovascular system. *Bratisl Lek Listy*, v.103, n.4-5, p.159-165, 2002.

ZHU, Q. Y.; HACKMAN, R. M.; ENSUNSA, J.L.; HOLT, R.R.; KEEN, C.L. Antioxidative activities of oolong tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.50, p.6929-6934, 2002.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. *In*: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.) *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis : Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 2003. p. 577-614.