



Janine Maria Pereira Ramos Bettega

**Avaliação da atividade antiviral de extratos
nebulizados de *Achyrocline satureioides*
(Lam) DC., Astereceae – marcela**



**Florianópolis
2000.**

Janine Maria Pereira Ramos Bettega

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE
EXTRATOS NEBULIZADOS DE
ACHYROCLINE SATUREIODES
(LAM.) DC., ASTERACEAE - MARCELA**

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

**Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões
Co-orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Monte Barardi**

**Florianópolis
2000.**

**"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS
NEBULIZADOS DE *ACHYROCLINE SATUREIODES*
(LAM.) DC, ASTERACEAE (MARCELA)"**

POR

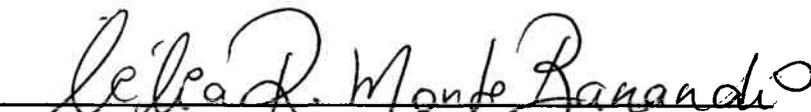
JANINE MARIA PEREIRA RAMOS BETTEGA

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Comissão Examinadora.**

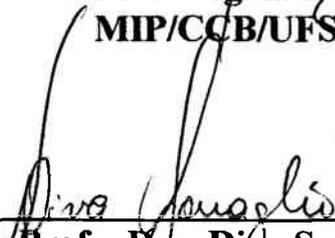
Comissão Examinadora:



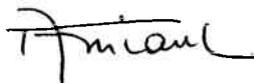
Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões
Orientadora - CIF/CCS/UFSC



Profa. Dra. Célia Regina Monte Barardi
MIP/CCB/UFSC



Profa. Dra. Diwa Sonaglio
CIF/CCS/UFSC



Profa. Dra. Ana Maria Viana - BOT/CCB/UFSC
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC

Florianópolis, março de 2000

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Aplicada, coordenado pelas professoras Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões (Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS) e Dra. Célia Regina Monte Barardi (Departamento de Microbiologia e Parasitologia, CCB), na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.

Seu financiamento provém do CNPq e do PADCTIII/MCT/CNPq.

Recebeu também apoio do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, através de concessão de Bolsa de Mestrado (CAPES).

AGRADECIMENTOS

À professora Cláudia Maria Oliveira Simões, orientadora e amiga, que me orientou não apenas na execução deste trabalho, mas principalmente na conduta em diversas situações, algumas vezes na forma de palavras e outras na forma de exemplos.

À professora Célia Regina Monte Baradi pela orientação, constante presença e amizade.

À toda a equipe do Laboratório de Virologia Aplicada pelo trabalho em conjunto, companheirismo e pelas amizades verdadeiras que fiz aqui, em especial à Ryane, Chelen e Thaís.

Aos professores Mário Steindel e Edmundo Grisard pelo apoio, companheirismo e exemplo de profissionalismo.

Ao colega José Renato Cavallazzi.

À professora Valquíria Linck Bassani e à farmacêutica Melissa Zétola por terem gentilmente cedido os extratos nebulizados de marcela e as misturas dos adjuvantes, sem os quais não seria possível a execução deste trabalho.

À Dra. Marion Burger por ter gentilmente cedido os oligonucleotídeos para a execução de uma importante importante etapa deste trabalho.

À professora Diva Sonaglio pelo apoio.

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

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a execução deste trabalho.

Aos meus pais, pelos primeiros ensinamentos tão importantes, que me apóiam em todos os momentos, bons ou ruins, e que são um porto seguro.

À Suely, José, Ronaldo e Maria de Lourdes, pessoas incríveis, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos em que mais precisei.

Aos meus amores, Luciano e Tatiana, pela compreensão da minha ausência e pelo constante apoio.

Janine

SUMÁRIO

I.	Introdução	1
I.1.	Contextualização do desenvolvimento dos antivirais	1
I.2.	Generalidades sobre <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.)DC. (Asteraceae)	4
I.2.1.	Estudos tecnológicos	4
I.2.2.	Estudos químicos	5
I.2.3.	Estudos farmacológicos	7
I.2.4.	Estudos toxicológicos	9
I.3.	Considerações sobre os vírus	9
I.3.1.	Os vírus	9
I.3.1.1.	Vírus herpéticos humanos	10
I.3.1.1.1.	Patogenia	11
I.3.1.1.2.	Estrutura dos vírus herpéticos	12
I.3.1.1.3.	Ciclo de multiplicação dos vírus herpéticos	13
I.3.1.1.4.	Mecanismo de ação do aciclovir (ACV)	15
I.3.1.2.	Vírus da poliomielite	16
I.3.1.2.1.	Patogenia dos poliovírus	16
I.3.1.2.2.	Estrutura dos poliovírus	16
I.3.1.2.3.	Ciclo de multiplicação dos poliovírus	17
II.	Objetivos	19
III.	Materiais e Métodos	20
III.1.	Extratos de <i>Achyrocline satureioides</i>	20
III.1.1.	Preparação dos extratos nebulizados	20
III.1.2.	Verificação cromatográfica dos extratos	21
III.1.3.	Preparação dos adjuvantes	21
III.2.	Culturas celulares e vírus	22
III.2.1.	Células	22
III.2.2.	Meio de cultura e outros reagentes	22
III.2.3.	Vírus	23
III.2.3.1.	Preparação das suspensões-estoque virais	24
III.2.3.2.	Determinação do título infeccioso viral	24

III.3.	Estudo da citotoxicidade	25
III.3.1.	Avaliação das alterações morfológicas	25
III.3.2.	Viabilidade celular	25
III.4.	Estudo da genotoxicidade	27
III.4.1.	Preparação das suspensões celulares	29
III.4.2.	Preparação dos controles positivos e negativo	29
III.4.3.	Preparação das soluções	31
III.4.3.1.	Peróxido de hidrogênio	31
III.4.3.2.	PBS (Phosphate Buffered Saline), livre de Ca^{2+} e Mg^{2+}	31
III.4.3.3.	Solução de lise	31
III.4.3.4.	Tampão alcalino de eletroforese	32
III.4.3.5.	Tampão de neutralização	32
III.4.3.6.	Solução de brometo de etídeo	32
III.4.4.	Preparação das lâminas	32
III.4.4.1.	Pré-cobertura	32
III.4.4.2.	Primeira camada	32
III.4.4.3.	Segunda camada	33
III.4.5.	Lise das células	33
III.4.6.	Tratamento alcalino e eletroforese	33
III.4.7.	Neutralização e coloração	34
III.4.8.	Análise dos cometas	34
III.4.9.	Análise estatística	36
III.5.	Estudo da atividade antiviral	37
III.5.1.	Inibição do efeito citopático viral	37
III.5.1.1.	Efeito citopático (ECP) viral	37
III.5.1.1.1.	Efeito citopático do vírus herpético do tipo 1	37
III.5.1.1.2.	Efeito citopático do poliovírus	37
III.5.1.2.	Multiplicidade de infecção (MOI)	37
III.5.1.3.	Técnica da inibição do efeito citopático viral	39
III.5.2.	Redução do título infeccioso viral	44
III.5.2.1.	Técnica A: um ciclo de multiplicação viral	44
III.5.2.2.	Técnica B: vários ciclos de multiplicação viral	44

III.5.3.	Estudo do mecanismo da ação anti-herpética	45
III.5.3.1.	Ação virucida	45
III.5.3.2.	Ação sobre os receptores celulares	45
III.5.3.3.	Ação anti-herpética intracelular	46
III.5.3.3.1.	Ação intracelular em função do tempo de adição dos extratos N ₁ , N ₂ e N ₃	46
III.5.3.3.2.	Ação intracelular por inibição da síntese do DNA do HSV-1	46
IV.	Resultados e Discussão	50
IV.1.	Verificação cromatográfica dos extratos	50
IV.2.	Determinação da citotoxicidade	51
IV.2.1.	Alterações das características morfológicas	51
IV.2.2.	Determinação da viabilidade celular	52
IV.3.	Estudo da genotoxicidade	55
IV.4.	Avaliação da atividade antiviral	63
IV.4.1.	Inibição do efeito citopático viral	63
IV.4.2.	Redução do título infeccioso viral	66
IV.4.3.	Elucidação do mecanismo de ação da atividade anti-herpética	72
IV.4.3.1.	Ação virucida	72
IV.4.3.2.	Ação sobre os receptores celulares	73
IV.4.3.3.	Ação anti-herpética intracelular	73
IV.4.3.3.1.	Ação intracelular em função do tempo de adição dos extratos N ₁ , N ₂ e N ₃	73
IV.4.3.3.2.	Ação intracelular por inibição da síntese do DNA do HSV-1	76
V.	Discussão final e perspectivas futuras	79
VI.	Conclusões	83
VII.	Referências bibliográficas	86

Resumo

Achyrocline satureioides (Lam.) DC., Asteraceae, conhecida como marcela, é uma planta medicinal cujas inflorescências são amplamente utilizadas na medicina popular como digestivas, antissépticas, carminativas, antidiarréicas, antiinflamatórias, analgésicas e hipocolesterolêmicas. Neste estudo, foram utilizados três extratos nebulizados de marcela, sendo cada extrato composto de 50% do macerado hidroetanólico das inflorescências a 7,5% (p/v) e 50% dos seguintes adjuvantes: **N**₁=Tween 80[®] e Aerosil 200[®], **N**₂= Tween 80[®], Aerosil 200[®] e Avicel PH 101[®], e **N**₃= Tween 80[®], Aerosil 200[®] e β-ciclodextrina. A citotoxicidade foi inicialmente determinada através do exame microscópico das alterações morfológicas das células VERO, quando em contato com diferentes concentrações dos extratos, e foi posteriormente confirmada pela determinação da viabilidade celular utilizando o método de exclusão com o corante Azul de Trypan. A concentração citotóxica a 50% (CC₅₀) encontrada foi de 65,5 µg/ml para N₁, N₂ e N₃, sendo que nas concentrações abaixo da CC₅₀ não foi detectada genotoxicidade através do Ensaio do Cometa. A atividade antiviral foi determinada através da inibição do efeito citopático do vírus herpético tipo 1 (HSV-1): cepas KOS, VR733/ATCC e 29R/resistente ao aciclovir, e do poliovírus tipo 2. Para cada extrato, foram estimadas as concentrações efetivas a 50% (CE₅₀) e calculados os índices de seletividade (IS=CC₅₀/CE₅₀). Os valores de IS encontrados para as cepas do HSV-1 foram superiores a 8 e o extrato N₂ apresentou maior IS (IS~33) para a cepa KOS, enquanto que para o polio-2, os valores de IS dos três extratos foi de 64. A atividade antiviral foi quantificada através da redução do título infeccioso, em um e em quatro ciclos de multiplicação viral, sendo que os resultados confirmaram aqueles obtidos no teste anterior. Apesar de promissores, os estudos da atividade antipoliovírus não foram levados adiante, uma vez que a pronunciada atividade detectada deve-se aos constituintes flavonoídicos derivados da 3-metil-quercetina, abundantes em extratos de marcela, cujo mecanismo de ação já está bem estabelecido na literatura. Estudos sobre o mecanismo de ação anti-herpética mostraram que os extratos N₁, N₂ e N₃ não são virucidas nem afetaram a adsorção, a penetração, a decapsidação e a montagem dos vírions. Sua ação intracelular não inclui também a inibição da síntese do DNA viral, influenciando, portanto, aqueles eventos que ocorrem entre a segunda e a nona hora do ciclo de multiplicação do HSV-1, ou seja, a transcrição e a tradução do RNAm e das proteínas virais. Esta dificuldade para precisar em qual etapa específica do ciclo de multiplicação do HSV-1 agem tais materiais era de se esperar, já que eles são extratos padronizados, com mais de um composto agindo de forma sinérgica e/ou antagônica, e não substâncias isoladas.

Abstract

Achyrocline satureioides (Lam.) DC., Asteraceae, known as *marcela*, is a medicinal plant which inflorescences are widely used in folk medicine for their digestive, antispasmodic, carminative, antidiarrheic, antiseptic, antiinflammatory, analgesic, and hypocholesterolemic properties. In this study three spray-dried extracts of *marcela* were used, all of them prepared with 50% of an hydroethanolic extract - 7,5% (w/v) - and 50% of adjuvants as following: **N₁**=Tween 80[®] and Aerosil 200[®], **N₂**= Tween 80[®], Aerosil 200[®] and Avicel PH 101[®], and **N₃**= Tween 80[®], Aerosil 200[®] and β -cyclodextrin. Cytotoxicity was determined by microscopic examination of VERO cells morphology in the presence of different concentrations of the extracts and confirmed by counting the cell number by Trypan blue dye exclusion method. The cytotoxic concentration which cause destruction in 50% of the monolayer cells (CC₅₀) was 65,5 μ g/ml for N₁, N₂ and N₃ extracts. Genotoxicity was assessed by using the Comet Assay and it was not detected, in concentrations below the CC₅₀ values. The antiviral activity was evaluated by inhibition of the cytopathic effect (ECP) of herpes simplex virus (HSV-1), strains KOS, VR733/ATCC and 29R/acyclovir resistant, and poliovirus type 2. The concentration which inhibited by 50% the viral ECP (EC₅₀) when compared to the virus control, and the selectivity index (SI= CC₅₀/CE₅₀) values were estimated. The SI values for the different herpesviruses strains were higher than 8 and the N₂ extract presented SI~33 for KOS strain. For poliovirus the extracts N₁, N₂ and N₃ showed values of SI~64. The antiviral activity was quantified by using yield reduction assay and it was expressed as the reduction factor (log₁₀) of the viral titer by comparison with untreated controls. Despite the important detected antipoliovirus activity we discontinued the studies with this virus because the mechanism of this action is well established in the literature. The studies concerning the mechanism of antiherpes activity demonstrated that the extracts N₁, N₂ and N₃ showed no virucidal effect neither activity on attachment, penetration, uncoating and virions assembly. The herpes simplex virus type 1 DNA synthesis was not also inhibited. Therefore, the extracts probably affect the steps occurring between the second and the ninth hour, it means the transcription and translation of mRNA and viral proteins. It was difficult to determine the specific stage of virus replication where the extracts act because even they are standardized they contain a lot of compounds acting synergistically and/or antagonically at several steps at the same time.

I. INTRODUÇÃO

I.1. Contextualização do desenvolvimento dos antivirais

Em contraste ao desenvolvimento dos antibióticos, os ensaios utilizados para o desenvolvimento de compostos antivirais têm encontrado várias dificuldades (NOWOTNY et al., 1997). Isso se deve principalmente à 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 dos vírus, provavelmente são tóxicos às células hospedeiras. Em consequência disso um número reduzido de fármacos antivirais estão disponíveis (VANDEN BERGHE & VLIETINCK, 1991). A terapia anti-herpética disponível compõe-se basicamente de medicamentos a base de idoxuridina, trifluoridina, ibacitabina, vidarabina, citarabina e aciclovir (De CLERCQ, 1993), preferencialmente para infecções causadas pelos vírus herpéticos dos tipos 1 e 2, e de ganciclovir (FAULDS & HEEL, 1990) e valaciclovir (SPRUANCE et al., 1996; PATEL, 1997) para infecções provocadas pelo citomegalovírus.

Em geral, existem duas categorias de agentes antivirais: com ação indireta, incluindo imunomoduladores como os interferons ou seus indutores e as vacinas, que estimulam o mecanismo de defesa das células hospedeiras; e com ação direta, que são os agentes virucidas, que matam os vírus extracelularmente e os compostos que agem em etapas específicas do processo de replicação viral (CHE, 1991).

Um grande avanço na virologia ocorreu com o desenvolvimento das vacinas. A importância das vacinas antivirais é largamente comprovada, já que os programas de vacinação promoveram a erradicação mundial da varíola e o desaparecimento quase completo da poliomielite. Entretanto, existe a possibilidade de complicações pós-vacinação, tendo sido relatados vários casos de doenças devido à reativação viral.

Além disso, a administração de vacinas em indivíduos imunocomprometidos e gestantes deve ser realizada com precaução (FLINT et al., 2000).

Considerando o acima exposto e também o desenvolvimento de resistência viral a alguns medicamentos existentes atualmente (por exemplo, cepas herpéticas resistentes ao aciclovir) (ABAD et al., 1997), há uma forte necessidade de não apenas incrementar a atual quimioterapia antiviral, mas também encontrar novos compostos efetivos contra infecções virais que sejam, ao mesmo tempo, inócuos ou com menor toxicidade às células hospedeiras. Há, também, a necessidade de encontrar substâncias com atividade virucida, uma vez que a maioria dos desinfetantes e antissépticos não eliminam todos os vírus patogênicos após o tempo de exposição recomendado (CHE, 1991; ADAMS & MERLUZZI, 1993).

Os produtos naturais, incluindo o reino vegetal, constituem uma fonte inesgotável de compostos com promissora atividade antiviral, não apenas pelo grande número de espécies com propriedades medicinais inexploradas, mas principalmente pela variedade de metabólitos sintetizados (HUDSON, 1990; CHE, 1991; ABAD et al., 1997). Uma citação interessante de CHU & CUTLER (1992) diz que "... certos compostos antivirais derivados de produtos naturais possuem estruturas que não seriam prognosticadas nem mesmo pelo mais imaginativo dos químicos".

Dos vegetais podem ser retiradas substâncias ativas cuja produção na forma sintética seria muito difícil e dispendiosa, ou ainda podem ser extraídos compostos básicos que, com modificações estruturais, tornam-se mais eficazes e menos tóxicos, ou então que sejam utilizados como protótipos para fármacos sintéticos que possuam atividades farmacológicas semelhantes às originais (HOUGHTON, 1996).

Embora existam relativamente poucos estudos que objetivem o desenvolvimento de antivirais a partir de plantas, esses têm revelado uma frequência inesperada da ocorrência de atividade antiviral desses produtos. Recentemente, um estudo publicado pelo National Cancer Institute (NCI, EUA) mostrou que, durante o

período de 1983-1994, dos 93 compostos anti-infecciosos (antibacterianos, antifúngicos, antimaláricos e antivirais) aprovados para uso em humanos, 63% eram de origem natural. Como conclusão desse importante trabalho, ficou estabelecido que, com base nos dados obtidos e também na rica biodiversidade ainda existente em alguns pontos do planeta, o estudo dos produtos naturais visando à obtenção de novos agentes anti-infecciosos deve ser expandido e apoiado financeiramente (CRAAG, NEWMAN, SNADER, 1997). O grande número de trabalhos publicados nos últimos anos por instituições de pesquisa do mundo inteiro e o aumento do interesse das indústrias farmacêuticas nesta área (ROBBERS, SPEEDIE, TYLER 1996; SHU, 1998; BOURNE et al., 1999; HARVEY, 1999), corroboram a veracidade das conclusões publicadas pelo NCI.

A seleção de espécies vegetais, com base em considerações etnofarmacológicas, tem sido sugerida como estratégia objetivando criar um maior impacto aos programas de triagem de plantas (FARNSWORTH & KAAS, 1981; VANDEN BERGHE & VLIETINCK, 1991; ROMING et al., 1992; BEUSCHER et al., 1994; TAYLOR et al., 1996; SIMÕES et al., 1999; SINDAMBIWE et al., 1999). Contudo, as pesquisas não têm sido extensivas e milhares de plantas ainda precisam ser investigadas.

Com o intuito de contribuir para a resolução deste problema e com base em resultados preliminares que indicaram atividade antiviral para duas plantas medicinais brasileiras: falsa-melissa- *Lippia alba* (Miller) N.E. Brown ex. Britt & Wils. (Verbenaceae) e marcela- *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae) (SIMÕES, 1992; ABAD et al., 1997), propusemo-nos inicialmente a realizar uma avaliação complementar de tal atividade com esses dois vegetais. Entretanto, com o aprofundamento dos estudos vimos que a falsa-melissa não apresentava resultados que justificassem essa continuidade (SIMÕES et al., 1999b). Assim sendo, esse trabalho trata somente dos resultados obtidos com a marcela.

I.2. Generalidades sobre *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Asteraceae)

Achyrocline satureioides é uma planta medicinal denominada popularmente de marcela ou macela. Suas inflorescências são amplamente utilizadas na medicina popular de vários países: Uruguai, Paraguai, Argentina e também no Sul do Brasil como digestivas, antiespasmódicas, carminativas, eupépticas, antidiarréicas, antissépticas, antiinflamatórias e hipocolesterolêmicas; externamente são utilizadas como antissépticas e antiinflamatórias (SIMÕES et al., 1986a).

I.2.1. Estudos tecnológicos

O desenvolvimento de um fitoterápico visa obter formas farmacêuticas que preservem o potencial químico e terapêutico do vegetal (BASSANI, 1990). Para que a eficácia e a segurança dos produtos fitoterápicos sejam asseguradas é indispensável que a qualidade e a estabilidade das matérias-primas respeitem parâmetros previamente estabelecidos (PETROVICK et al., 1988). Os estudos multidisciplinares dos vegetais (fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos) constituem etapas preliminares indispensáveis ao desenvolvimento de medicamentos a partir de plantas. Esses estudos preliminares, geralmente incipientes para as plantas medicinais brasileiras, representam uma das mais importantes limitações para o avanço das pesquisas nesta área.

O desenvolvimento tecnológico de extratos de marcela iniciou-se com a padronização de soluções extrativas hidroetanólicas e o estabelecimento de métodos para o controle da qualidade da matéria-prima e do produto acabado (SONAGLIO, 1987). Esse estudo levou em consideração vários fatores, tais como a relação entre a quantidade de sumidades floridas, a concentração de etanol no solvente extrator e o tempo de maceração utilizado. Posteriormente, PETROVICK & KNORST (1991) e De PAULA et al. (1998) desenvolveram formas farmacêuticas plásticas contendo soluções extrativas concentradas de marcela.

Existem várias maneiras de se obter extratos secos, sendo os mais conhecidos e utilizados os processos de liofilização e nebulização. Os extratos secos nebulizados têm especial interesse para a produção de fitoterápicos por apresentarem características particulares, tais como maior estabilidade, fácil manipulação e boa solubilidade, quando comparados com extratos líquidos.

A nebulização é uma técnica de secagem de líquidos por dispersão, onde o líquido a ser seco é finamente dividido numa corrente de ar quente, à pressão reduzida, com a produção de um pó seco (MASTERS, 1976). Na preparação desse tipo de extrato seco é indispensável a adição de adjuvantes à solução extrativa, os quais devem se caracterizar por sua inércia química, inocuidade e termoestabilidade (PUECH, 1991).

TEIXEIRA (1996) desenvolveu três extratos secos nebulizados, a partir de soluções hidroetanólicas a 80% preparadas com as fluorescências de marcela. Como adjuvantes foram utilizados o polissorbato 80 (Tween 80[®]), que foi adicionado às três soluções extrativas e, também, a cada uma delas: dióxido de silício coloidal (Aerosil 200[®]), dióxido de silício coloidal e celulose microcristalina (Avicel PH 101[®]) e dióxido de silício coloidal e β -ciclodextrina, originando, respectivamente, os extratos secos nebulizados N₁, N₂ e N₃, que serão utilizados neste trabalho de pesquisa.

1.2.2. Estudos químicos

A composição química da marcela foi extensivamente estudada por diversos pesquisadores, tendo sido descrita a presença dos seguintes constituintes:

- **Compostos flavonoídicos:** isognafalina (HÄNSEL & OHLENDORF, 1971; WAGNER & HORHAMMER, 1971); gnafalina (WAGNER & HORHAMMER, 1971), galangina (FERRARO, NORBEDO, COUSSIO, 1981); quercetina; 3-O-metilquercetina; 3-O-metilgalangina, luteolina (FERRARO et al., 1981; SIMÕES, 1984); 7,4'-diidroxí-5-O-metilflavanona e seu derivado 7-O-glucosídeo

- (SIMÕES, 1984); 5,7,8-trimetoxiflavona; 3,5,7,8-tetrametoxiflavona; 7-hidroxi-3,6,7-trimetoxiflavona e alnustina (MESQUITA et al., 1986); quercetagenina; tamarixetina e seu derivado 7-O-glucosídeo; 3,7-dimetoxiquercetina e seu derivado 7-O-glucosídeo (BROUSSALIS et al., 1988); 3,5-diidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona e 3,5-diidroxi-7,8-dimetoxiflavona (LIMA, 1990);
- **Ácidos fenólicos:** ácidos caféico; clorogênico e isoclorogênico (SIMÕES, 1984; BROUSSALIS et al., 1988), assim como dois ésteres da calerianina (3,4-diidroxiálcoolbenzílico-4-glucosídeo): um com o ácido caféico e outro com o ácido protocatéquico (FERRARO, NORBEDO, COUSSIO, 1981);
 - **Constituintes do óleo volátil,** com predomínio do α -pineno (BASSANI, 1990);
 - **Constituintes diversos** como derivados da fenilpirona (HIRSCHMANN, 1984), uma kawapirona: a nor-yangonina (KALOGA, HÄNSEL, CYBULSKI, 1983) e minerais (PUHLMANN, 1989; BASSANI, 1990);
 - **Polissacarídeos** (WAGNER et al., 1985; PUHLMANN, 1989).

Conforme o método de extração ou transformação empregados, diferentes quantidades de compostos químicos são extraídos. A tabela 1 mostra a composição química quantitativa dos extratos nebulizados de marcela (N₁, N₂ e N₃).

Tabela 1. Composição química quantitativa de extratos nebulizados de *Achyrocline satureioides*.

Extratos nebulizados♣	Flavonóides totais (%m/m)	Quercetina (% m/m)	Luteolina + 3-O-metilquercetina (% m/m)
N ₁	5,74	0,9391	0,7294
N ₂	5,54	0,9325	0,7417
N ₃	5,38	0,7454	0,5893

Fonte: TEIXEIRA (1996)

♣ Para maiores informações sobre esses extratos, ver página 20.

I.2.3. Estudos farmacológicos

Algumas atividades farmacológicas podem ser mais ou menos ressaltadas dependendo do método de extração utilizado. O extrato etanólico demonstrou, principalmente, efeitos antiedematogênico e antiespasmódico, enquanto que o extrato aquoso apresentou atividade imunomodulatória. A ação antiedematogênica foi também relatada para os extratos aquosos. A Tabela 2 mostra alguns resultados das investigações farmacológicas realizadas com este vegetal.

MENTZ & SCHENKEL (1989) analisaram as indicações populares desta planta comparando-as com informações coletadas por uma indústria farmacêutica gaúcha e os resultados mostraram que ambas as informações eram concordantes. Os estudos etnofarmacológicos têm confirmado a maioria dos usos preconizados na medicina popular para a marcela.

Os estudos que relacionam as atividades farmacológicas com a composição química da marcela demonstraram que os efeitos nos distúrbio gastrintestinais e edematogênicos podem estar relacionados com a presença de flavonóides. As atividades antiespasmódica e antiedematogênica foram atribuídas à quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina (SIMÕES, 1984; TEIXEIRA, 1996). A atividade imunoestimulante foi atribuída aos polissacarídeos (PUHLMANN, 1989; SANTOS, 1996), enquanto que quercetina, luteolina, ácido caféico, 3-O-metilquercetina e seus derivados exibiram atividade antiviral (MUSCI, 1984; CASTRILLO & CARRASCO, 1987; De MEYER et al., 1991).

Tabela 2. Atividades farmacológicas detectadas para *Achyrocline satureioides*.

Atividade	Parte da planta	Extrato	Referências
antimicrobiana	inflorescências	hidroetanólico	LIMA, 1990; GUTKIND et al., 1981
	folhas	dioxânico	SANTOS, 1996
antiespasmódica	inflorescências	aquoso/ hidroetanólico	LANGELOH & SCHENKEL, 1982; SIMÕES et al., 1988
	folhas/caules	aquoso	SIMÕES, RECH, LAPA, 1986b
analgésica	inflorescências	aquoso etanólico	TEIXEIRA, 1996 e SIMÕES, 1984
antiedematogênica	inflorescências	aquoso/etanólico	TEIXEIRA, 1996 SIMÕES, 1988
		hidroetanólico	SONAGLIO, 1987 SIMÕES, 1984
sedativa	inflorescências	aquoso/etanólico	SIMÕES, 1984
imunoestimulante	inflorescências	aquoso	PUHLMANN, 1989
antiviral	inflorescências	aquoso/ hidrometanólico	SIMÕES, 1992

I.2.4. Estudos toxicológicos

Os estudos de toxicidade aguda dos extratos aquosos, preparados a frio e a quente, e do extrato etanólico das sumidades floridas foram realizados por SIMÕES (1984) e SONAGLIO (1987), não tendo sido encontrada toxicidade, nas condições dos experimentos.

A atividade mutagênica da quercetina isolada da marcela foi relatada (LIMA, 1990), não tendo sido detectada atividade mutagênica para 3,5-diidroxí-6,7,8-trimetoxiflavona e 3,5-diidroxí-7,8-dimetoxiflavona, também isoladas deste vegetal. A atividade mutagênica do infuso de inflorescências de marcela foi verificada por VARGAS et al. (1990), que observaram atividade genotóxica direta no teste de Ames, resultado este atribuído à presença de quercetina e ácido caféico nos extratos. A toxicidade destes extratos, contudo, não foi estudada em sistemas eucarióticos.

I.3. Considerações sobre vírus

I.3.1. Os vírus

(PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1993; TORTORA, FUNKE, CASE, 1998)

Os vírus não são considerados entidades celulares, pois não possuem maquinaria bioquímica própria e dependem completamente das células hospedeiras para produção de energia e síntese de macromoléculas. São, portanto parasitas celulares absolutos. Esses microorganismos são ubíquos e versáteis, sendo capazes de infectar todos os tipos de células e de bactérias (bacteriófagos) até animais (protozoários, insetos e vertebrados) e vegetais.

Essas entidades infecciosas consistem de um genoma DNA ou RNA, nunca ambos, 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 *vírión* 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.

Os vírus produzem infecções em células-alvo definidas, principalmente, pela especificidade dos receptores na superfície dessas células e dos próprios vírus.

1.3.1.1. Vírus herpéticos humanos

(ROIZMAN., 1996; TORTORA et al., 1998; LUPI, SILVA, PEREIRA Jr, 2000)

Os vírus herpéticos são altamente disseminados na natureza. Aproximadamente 100 vírus da família Herpesviridae já foram caracterizados, sendo que existem oito vírus herpéticos humanos (Tabela 3). Além disso, o vírus herpético B de macacos pode também infectar o homem causando encefalite mortal.

Tabela 3. Vírus herpéticos humanos caracterizados até o presente

Subfamília/gênero	Nome oficial
<u>Alphaherpesvirinae</u>	
<i>Herpes simplex 1</i>	Herpesvírus humano-1
<i>Herpes simplex 2</i>	Herpesvírus humano-2
<i>Varicella zoster</i>	Herpesvírus humano-3
<u>Betaherpesvirinae</u>	
<i>Citomegalovírus</i>	Herpesvírus humano-5
<i>Roseolovirus</i>	Herpesvírus humano-6
-x-x-x-x-x-x-x	Herpesvírus humano-7
<u>Gamaherpesvirinae</u>	
<i>Epstein- Barr</i>	Herpesvírus humano-4
-x-x-x-x-x-xx-	Herpesvírus humano-8

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 das características dessa família. Durante o período de recorrência herpética, os vírus são inacessíveis ao sistema imune e aos medicamentos atualmente disponíveis. Em pacientes imunocomprometidos, as infecções latentes são freqüentemente reativadas.

I.3.1.1.1. Patogenia

(CLEMENTS, TIMBURY, GRIFFTHS, 1990)

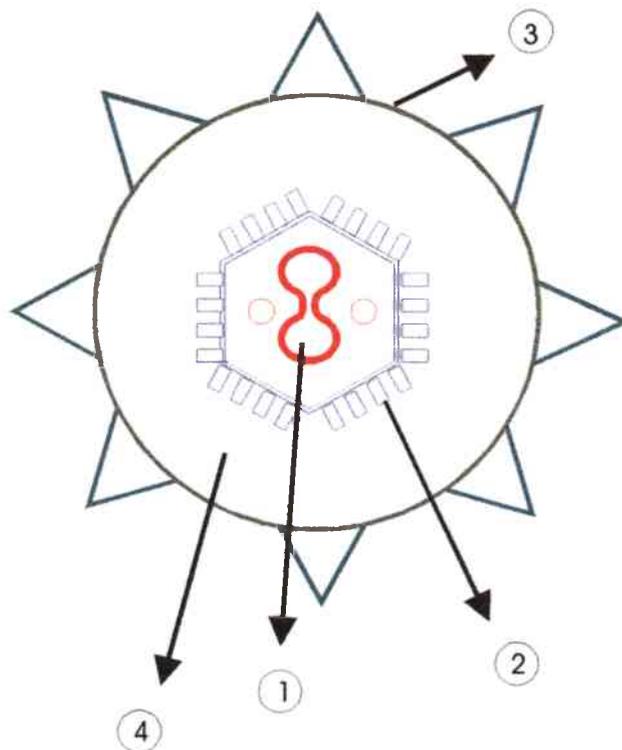
Na infecção primária causada pelos vírus herpéticos, o vírus penetra no corpo por invasão das mucosas ou soluções de descontinuidade da pele. Muitos indivíduos são infectados já em idade precoce. O vírus sofre, então, replicação nas células situadas na base do local de entrada, podendo ou não produzir lesões vesiculares. Após, o vírus dissemina-se para células nervosas adjacentes. No neurônio, o nucleocapsídeo é encaminhado para o núcleo, iniciando a infecção latente. Nessa fase, o genoma viral está reprimido e integrado ao DNA da célula. O vírus pode, então, ser ativado por vários estímulos, tais como estresse, febre, trauma, mudanças hormonais, exposição solar, etc., e depois passar retrogradamente pelo nervo, causando lesões características em sítios específicos da pele e mucosas.

Os principais sintomas das infecções causadas pelos vírus herpéticos do tipo 1 (HSV-1) são: infecções cutâneo-mucosas que são as mais comumente causadas por esse vírus (herpes labial), gengivomastites, faringotonsilites, querato-conjuntivites, encefalites, infecções genitais (sendo que 80% dessas últimas são causadas pelo HSV-2, mas também podem ser atribuídas ao HSV-1) e infecções neonatais.

I.3.1.1.2. Estrutura dos vírus herpéticos

(ROIZMAN, 1996; LUPI et al., 2000)

Os vírus herpéticos são envelopados, com capsídeo icosaédrico, possuindo aproximadamente 150 nm de diâmetro. Seu genoma é constituído de DNA linear de dupla fita. Esse genoma viral é dividido em duas partes: L (long) e S (small), cada qual sustentada por dois grupos de repetições invertidas que permitem que as regiões L e S invertam-se entre si para fornecerem quatro diferentes configurações ou isômeros. Sua morfologia característica é mostrada na Figura 1.



1. Cerne de DNA (fita dupla)
2. Capsídeo protéico envolvendo o cerne, com simetria icosaédrica, constituída 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. Estrutura dos vírus herpéticos tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2).

Esquema modificado de TORTORA et al., 1998.

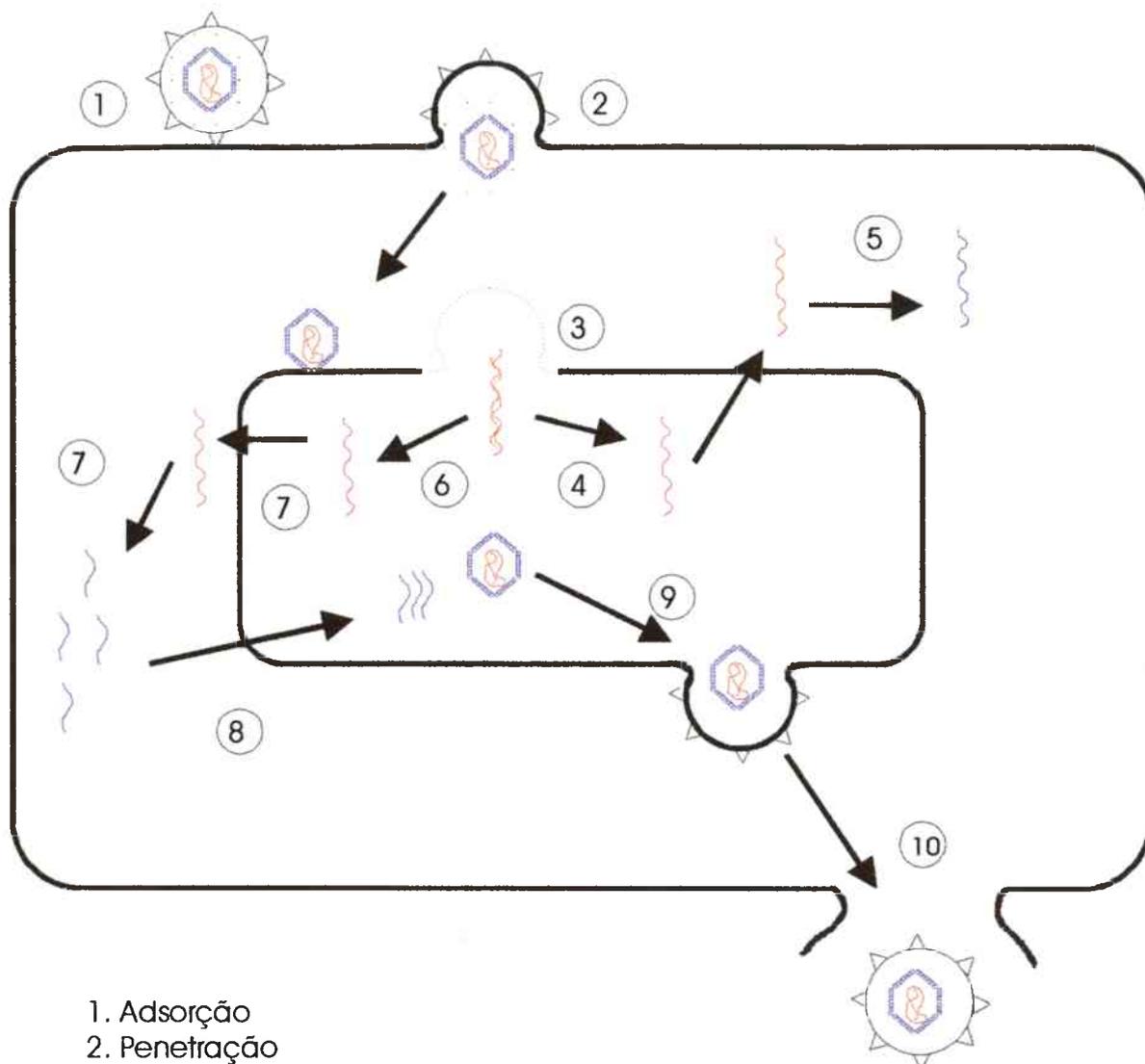
I.3.1.1.3. Ciclo de multiplicação dos vírus herpéticos

(PELCZAR et al., 1993; MADIGADIGAN, MARTINKO, PARKER, 1997)

O ciclo de multiplicação dos vírus herpéticos consiste nas seguintes etapas principais:

- **Adsorção-** ocorre a ligação específica dos receptores superficiais das células hospedeiras com as glicoproteínas do envelope viral.
- **Penetração e desnudamento-** o HSV pode penetrar na célula por fusão com a membrana ou por endocitose, permitindo a liberação do material genético no citoplasma celular e iniciando a replicação viral.
- **Transcrição, tradução e replicação-** a transcrição e a síntese protéica ocorrem 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 outras que iniciam a degradação do RNAm celular. O DNA é replicado por um mecanismo circular para produzir um composto linear. 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 e sofrem exocitose.

O ciclo de multiplicação dos vírus herpéticos está esquematizado na Figura 2.



1. Adsorção
2. Penetração
3. Desnudamento
4. Transcrição inicial
5. Tradução das proteínas precoces
6. Replicação do DNA viral
7. Transcrição e tradução das proteínas tardias estruturais
8. Reunião das partículas virais no núcleo
9. Brotamento a partir da membrana modificada do núcleo
10. Liberação dos vírions

Figura 2. Esquema do ciclo de multiplicação dos vírus herpéticos, modificado de WHITE & FENNER, 1994.

I.3.1.1.4. Mecanismo de ação do aciclovir (ACV)

(ELION et al., 1977; SCHAEFFER, 1978)

O mecanismo de ação deste fármaco será descrito, pois o aciclovir é o fármaco de escolha para o tratamento das infecções causadas pelo HSV-1 e HSV-2, e será utilizado neste trabalho como controle positivo para os testes antivirais.

O ACV difere do nucleosídeo guanósina por possuir uma cadeia lateral acíclica (hidroximetil). Para tornar-se ativo, precisa ser fosforilado, o que ocorre somente em células infectadas por vírus herpéticos.

O ACV tem ação seletiva sobre os vírus herpéticos, pois esses induzem a atividade de uma timidina cinase (TC) nas células que infectam. A TC catalisa a fosforilação do ACV em monofosfato e as enzimas celulares completam a fosforilação em trifosfato. A atividade deste medicamento contra os vírus herpéticos está diretamente relacionada à sua capacidade indutora de TC. Os HSV-1 e 2 são os indutores mais ativos de TC e são facilmente inibidos pelo ACV. O citomegalovírus e o vírus Epstein-Barr não induzem TC e são fracamente inibidos pelo ACV *in vitro*, o que indica que a inibição *in vivo* só poderá ocorrer com concentrações altíssimas de ACV. O vírus da Varicela Zoster tem atividade indutora de TC intermediária.

O trifosfato de ACV inibe a replicação viral através da competição com o trifosfato de guanósina pela DNA polimerase viral. Essa enzima incorpora o trifosfato de ACV à cadeia do DNA em formação, provocando a interrupção do alongamento, uma vez que o ACV não possui a hidroxila em 3', essencial à incorporação dos demais nucleotídeos à cadeia do DNA. O ACV é 100X mais seletivo para a DNA polimerase viral do que para a enzima celular, o que explica sua reduzida toxicidade. O ACV não elimina o vírus do hospedeiro e deve ser usado nas recidivas.

I.3.1.2. Vírus da poliomielite

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

Picornaviridae é uma das maiores famílias de vírus e inclui alguns dos mais importantes vírus humanos e animais, mas apenas os representantes dos gêneros *Enterovirus* e *Rhinovirus* causam doenças em humanos. Os poliovírus pertencem ao gênero *Enterovirus*.

Como o nome indica, esses vírus são pequenos (pico), com material genético do tipo RNA, e possuem uma estrutura de vírus nu.

Os capsídeos dos enterovírus são muito estáveis em condições ambientais adversas e no trato gastrintestinal, o que facilita sua transmissão orofecal.

I.3.1.2.1. Patogenia dos poliovírus

Geralmente, as infecções causadas pelos poliovírus são assintomáticas, mas podem variar de sintomas semelhantes aos de uma gripe comum até os da doença paralítica (poliomielite).

Não existe tratamento antiviral específico contra os poliovírus, mas a prevenção por meio da vacina SABIN (vírus atenuados) ou, em casos especiais, como nos imunodeprimidos, a vacina SALK (vírus inativados) é muito eficaz e vem erradicando a doença em quase todo o mundo. Aliás, esse é o objetivo da OMS para o ano 2003 (FLINT et al., 2000). Os poliovírus são utilizados em pesquisa como modelo de vírus com genoma RNA.

I.3.1.2.2. Estrutura dos poliovírus

Os poliovírus são pequenos, aproximadamente 30 nm de diâmetro, e possuem um filamento de RNA(+) circundado por um capsídeo icosaédrico com 12 vértices

pentaméricos, sendo cada um composto de 5 unidades protéicas protoméricas. Os capsídeos são estáveis ao calor, detergentes e ácidos.

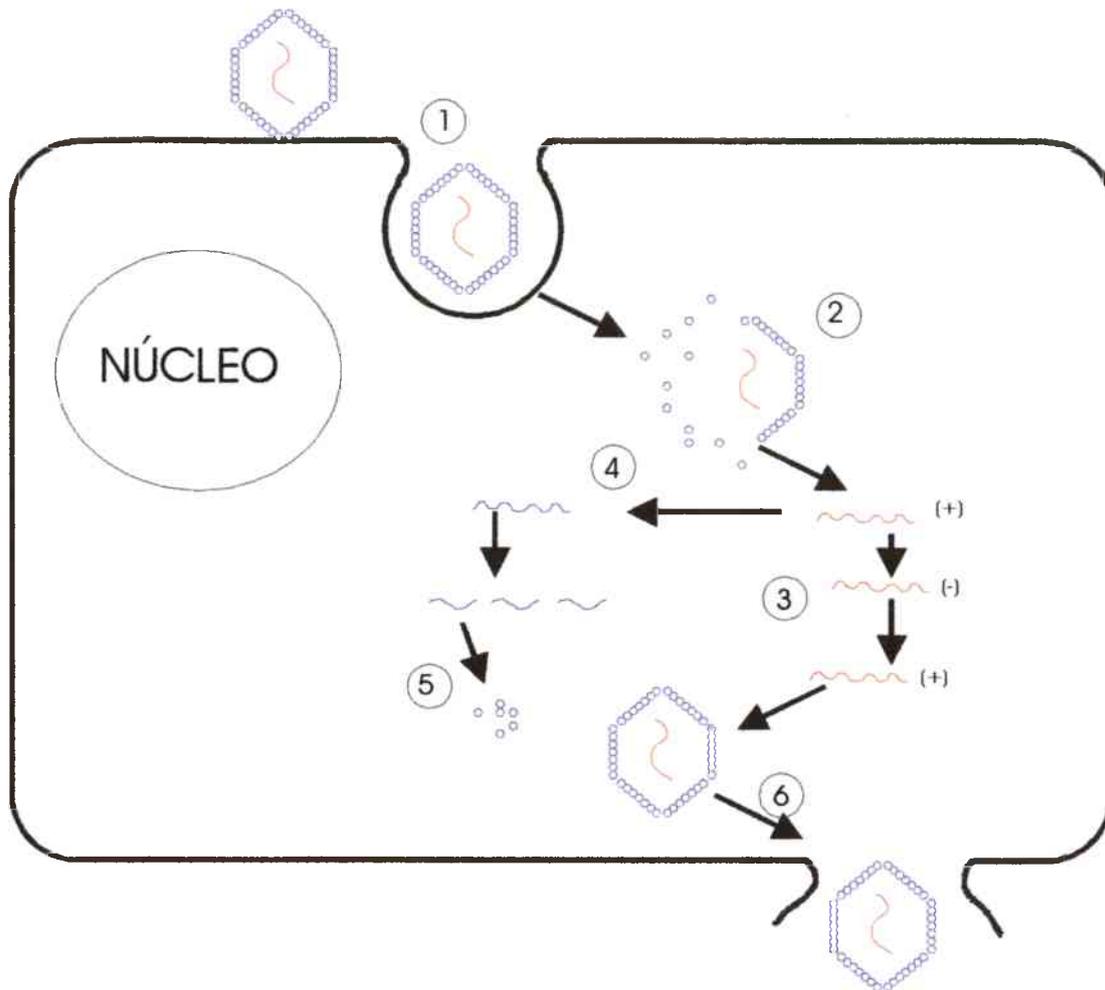
O filamento único de RNA assemelha-se ao RNAm, possuindo 7.400 bases e uma cauda poli A. O genoma por si só é infectante e pode iniciar a replicação viral.

I.3.1.2.3. Ciclo de multiplicação dos poliovírus

O ciclo de multiplicação dos poliovírus consiste nas seguintes etapas principais:

- **Adsorção-** a especificidade da interação dos poliovírus com os receptores celulares é o principal determinante do tecido alvo. As proteínas dos vértices do vírion contêm uma depressão, que se liga ao receptor.
- **Decapsidação e penetração-** após a ligação com o receptor, o polipeptídeo VP₄ é liberado e a estrutura do capsídeo é enfraquecida. O vírus é interiorizado por endocitose e os vírions dissociam-se liberando o genoma no citoplasma.
- **Tradução e replicação-** o RNA(+) liga-se aos ribossomos, sintetizando uma poliproteína após 10-15 min. de infecção, que é clivada por proteases. Uma RNA-polimerase-RNA-dependente (replicase) gera um filamento de RNA(-), a partir do qual novos RNAm são formados.
- **Montagem e liberação dos vírus-** como o genoma viral está sendo replicado e transcrito, as proteínas estruturais VP₁₋₄ são clivadas e reunidas em protômeros. Doze pentâmeros unem-se e formam o procapsídeo. O genoma é inserido ao capsídeo no citoplasma e os vírus são liberados por ocasião da lise celular.

O ciclo de multiplicação dos poliovírus está esquematizado na Figura 3.



1. Adsorção e penetração
2. Decapsidação
3. Replicação do RNA viral
4. Tradução (poliproteína)
5. Montagem dos vírions
6. Liberação dos vírions

Figura 3. Esquema do ciclo de multiplicação do vírus da poliomielite, modificado e adaptado de MAMMETE (1992).

II. OBJETIVOS

- Avaliar a citotoxicidade, frente a células VERO, dos extratos nebulizados de marcela (N₁, N₂ e N₃) através de diferentes metodologias.
- Avaliar a genotoxicidade provocada em células VERO pelos extratos N₁, N₂ e N₃ utilizando o Ensaio do Cometa.
- Avaliar a atividade destes extratos na inibição da replicação do vírus herpético humano do tipo 1 (HSV-1) e do vírus da poliomielite tipo 2 (polio-2), através de metodologias diversas.
- Determinar em qual etapa do ciclo de multiplicação do vírus HSV-1 ocorre a ação anti-herpética.

III. MATERIAIS e MÉTODOS

Os materiais descartáveis utilizados, tais como frascos e placas de cultura, tubos plásticos, ponteiros, etc. são originários da NUNC; os sais são da SIGMA e os solventes e reagentes, em geral, da MERCK. Os materiais e reagentes de outras procedências serão especificados oportunamente.

III.1. Extratos de *Achyrocline satureioides*

III.1.1. Preparação dos extratos nebulizados

Foram utilizados os extratos secos nebulizados padronizados por TEIXEIRA (1996)^{*}, os quais foram obtidos a partir de macerados hidroetanólicos 80% (v/v) preparados com 7,5% (p/v) de inflorescências de marcela. Cada grama de extrato contém:

N₁ :	extrato de marcela.....	0,5g
	polissorbato 80 (Tween 80 [®]).....	0,10g
	dióxido de silício (Aerosil 200 [®]).....	0,40g
N₂ :	extrato de marcela.....	0,5g
	polissorbato 80 (Tween 80 [®]).....	0,10g
	dióxido de silício (Aerosil 200 [®]).....	0,20g
	celulose microcristalina (Avicel PH 101 [®]).....	0,20g
N₃ :	extrato de marcela.....	0,5g
	polissorbato 80 (Tween 80 [®]).....	0,10g
	dióxido de silício (Aerosil 200 [®]).....	0,20g
	β-ciclodextrina.....	0,20g

^{*} A preparação desses extratos foi realizada na Faculdade de Farmácia (UFRGS), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Valquíria Linck Bassani.

A partir dos extratos nebulizados foram preparadas soluções-mãe de 1mg/ml em 5% de DMSO, completando o volume com Meio 199 e armazenadas a 4°C para posterior utilização. Os extratos nebulizados foram conservados ao abrigo da luz e da umidade.

III.1.2. Verificação cromatográfica dos extratos

Com o objetivo de verificar a presença de flavonóides e confirmar a integridade química dos extratos foi realizada uma avaliação cromatográfica em camada delgada.

Técnica: utilizou-se uma placa cromatográfica de celulose como fase estacionária e uma mistura de clorofórmio: ácido acético glacial: água (50:40:5) como fase móvel. As soluções de referência utilizadas foram quercetina (Q), luteolina (L) e 3-O-metilquercetina (MQ), que são os flavonóides majoritários presentes nos extratos hidroetanólicos de marcela. O cromatograma foi desenvolvido até a altura de aproximadamente 10cm, em câmara saturada. Após secagem da placa, a detecção das manchas foi realizada sob luz ultravioleta a 360 nm.

III.1.3. Preparação dos adjuvantes

Com o propósito de verificar a influência das diferentes combinações dos adjuvantes na citotoxicidade dos extratos nebulizados, foram utilizadas preparações nebulizadas* contendo somente os adjuvantes nas mesmas proporções dos extratos N₁, N₂ e N₃. As misturas de adjuvantes foram denominadas A₁ (polissorbato 80, dióxido de silício 1:4); A₂ (polissorbato 80, dióxido de silício e celulose microcristalina 1:2:2) e A₃ (polissorbato 80, dióxido de silício e β-ciclodextrina 1:2:2).

* A nebulização das misturas dos adjuvantes foi realizada na Faculdade de Farmácia (UFRGS), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Valquíria Linck Bassani.

III.2. Culturas celulares e vírus

III.2.1. Células

As células utilizadas foram as células VERO (ATCC: CCL81), que são culturas contínuas de fibroblastos de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*). Estas células foram escolhidas porque são permissivas aos vírus utilizados neste estudo, permitindo sua multiplicação e com efeito citopático bem visível ao microscópio ótico invertido.

III.2.2. Meio de cultura e outros reagentes

Utilizou-se para o crescimento e manutenção das células o Meio 199 (Sigma), adicionado de bicarbonato de sódio e antibióticos/antifúngico: penicilina G e sulfato de estreptomicina/anfotericina B (Gibco-BRL) na concentração final de 100U/ml, 100µg/ml e 0,25µg/ml, respectivamente.

Os antibióticos e antifúngicos são utilizados em culturas celulares para reduzir a contaminação por bactérias e leveduras. As concentrações recomendadas não devem ser aumentadas, pois tais produtos podem se tornar citotóxicos.

O pH do meio deve ser de 7,2 a 7,4, o que condiciona o uso de uma estufa de CO₂ (atmosfera com 5% de CO₂), uma vez que os frascos de cultura e placas de microtitulação não são herméticos. A concentração de CO₂ é particularmente importante quando o sistema tampão utilizado for HCO₃/CO₂. A atmosfera da estufa deve estar úmida a fim de prevenir a evaporação e o aumento da osmolaridade do meio. A utilização de meios sintéticos em pó facilita muito a preparação dos meios de cultura, pois é preciso apenas adicionar água e filtrar em condições assépticas, sendo a qualidade dessa água um fator extremamente importante. Neste trabalho foi sempre utilizada água ultra-pura, obtida a partir de um sistema de purificação (Milli-Q[®], Millipore).

Sabe-se que, quando as células são cultivadas em presença de um meio de cultura, elas estão aptas apenas a sobreviver e não a reproduzir-se. A divisão celular

é significativamente aumentada quando adiciona-se soro de origem animal extraído de indivíduos jovens. O soro é uma mistura extremamente complexa de substâncias liberadas por todos os tipos de célula do doador. Assim, o Meio 199 utilizado nas culturas celulares foi adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB-Gibco-BRL) para o crescimento e 5% para a manutenção das células.

A tripsina é uma enzima que faz parte do grupo das proteases, as quais catalisam reações de quebra das cadeias polipeptídicas em pontos mais ou menos específicos. A tripsina rompe a cadeia peptídica quando os aminoácidos da porção aminoterminal são L-lisina ou L-leucina. Essa enzima não requer a presença de cofatores e é utilizada para liberar as células do suporte da cultura. Porém, a ação da tripsina deve ser bloqueada após o descolamento das células para evitar a citólise. A adição de meio de cultura contendo SFB às células dissociadas inibe a ação lítica da tripsina. Nos experimentos, utilizou-se uma solução de tripsina em EDTA a 0,05% (NaCl 0,8%; KCl 0,04%; dextrose 0,1%; NaHCO₃ 0,058%; tripsina 0,05%; vermelho de fenol 0,045% e EDTA 0,02%).

III.2.3. Vírus

Os experimentos foram realizados com os seguintes vírus:

➤ **Vírus com genoma DNA:**

- Vírus herpéticos tipo-1
 - HSV-1 cepa KOS (Universidade de Rennes, França)
 - HSV-1 cepa VR733 (ATCC)
 - HSV-1 cepa 29 R (resistente ao aciclovir) (Universidade de Rennes, França)

➤ **Vírus com genoma RNA:**

- Poliovírus tipo 2 (Instituto Adolfo Lutz, SP)

III.2.3.1 Preparação das suspensões-estoques virais

Técnica: num frasco de cultura, uma suspensão viral já existente foi inoculada às células VERO. Após adsorção virai, durante 1h, a 37°C, em estufa de CO₂, o excesso da suspensão viral (partículas virais que não penetraram nas células) foi retirado e o Meio 199 sem SFB foi adicionado. As células infectadas foram incubadas até a destruição do tapete celular. É importante que a incubação seja feita durante um período bem preciso, correspondendo a 3 ou 4 ciclos de multiplicação viral, pois quando o tapete celular é destruído e os vírions são liberados, o título infeccioso pode cair rapidamente (1 ciclo de multiplicação dos vírus herpéticos= 18h; 1 ciclo de multiplicação dos poliovírus= 8h). Para completar o rompimento das células, o conteúdo do frasco foi congelado e descongelado 3X. A suspensão viral foi centrifugada, para precipitação dos fragmentos celulares, e o sobrenadante foi aliquotado em tubos estéreis e armazenados a -80°C até utilização.

III.2.3.2. Determinação do título infeccioso viral

Estabelecer o título infeccioso de uma suspensão viral significa contar o número de partículas virais capazes de infectar células permissivas. O título infeccioso dos vírus foi determinado pelo método das diluições limites, de acordo com a metodologia clássica de REED & MUENCH (1938).

Técnica: diluições seriadas, na razão de 1:10, foram preparadas a partir de uma suspensão viral, cujo título deve ser determinado. Essas diluições foram inoculadas ao tapete celular previamente formado em placas de microtitulação de 96 cavidades e incubadas, a 37°C, durante 4 ciclos de multiplicação (=72h para HSV-1 e 32h para poliovírus). O título foi determinado através da avaliação microscópica das células, nas quais as diferentes concentrações virais causaram ou não efeito citopático. A concentração que produz resposta positiva em 50% ou 100% das amostras é denominada dose infectante a 50% (DI₅₀) ou 100% (DI₁₀₀) ou TCID/ml (= *Tissue Culture Infectious Dose*).

Para aumentar o título infeccioso viral é necessário realizar uma nova infecção com a suspensão estoque viral, conforme item anterior e após deve-se efetuar uma nova titulação.

III.3. Estudo da citotoxicidade

III.3.1. Avaliação das alterações morfológicas

A citotoxicidade consiste na desorganização do tapete celular e no aspecto granuloso e arredondado das células com conseqüente aparecimento de alterações morfológicas (STREISSLE, SCHWOBEL, HEWLETT, 1981).

Técnica: uma suspensão celular contendo aproximadamente 250.000 células/ml foi preparada e distribuída em placas de microtitulação de 96 cavidades (100 µl/cavidade). Após 24h de incubação, a 37°C, em estufa de CO₂, formou-se um tapete celular confluyente. A partir das soluções-mãe dos extratos N₁, N₂ e N₃ foram preparadas diluições seriadas na razão de 1:2 (cada diluição foi feita em triplicata) e adicionadas às cavidades contendo tapete celular. Foram realizados também os controles celulares (CC), contendo apenas Meio 199. Em seguida, as placas foram incubadas durante 72h, a 37°C, e a aparência dos tapetes celulares foi comparada com aquela dos CC, ao microscópio invertido (Coleman XDP-1). Um exemplo deste experimento está esquematizado na Figura 4.

Esta técnica permite estimar a concentração citotóxica em 50% das células (CC₅₀) em relação aos controles celulares.

III.3.2. Viabilidade celular

Diferentes técnicas de coloração (cristal violeta, eosina, vermelho neutro, azul de Trypan, etc.) são usualmente utilizadas para avaliar a citotoxicidade de substâncias. Neste trabalho foi utilizado o teste de exclusão com o azul de Trypan, que é um corante que só penetra nas células mortas cujas membranas não podem mais excluí-lo. Este fenômeno de permeabilidade da membrana celular permite estimar indiretamente o grau de integridade da mesma. O percentual de células não

coradas representa o índice de viabilidade celular (WALUM, STENBERG, JENSSEN, 1990).

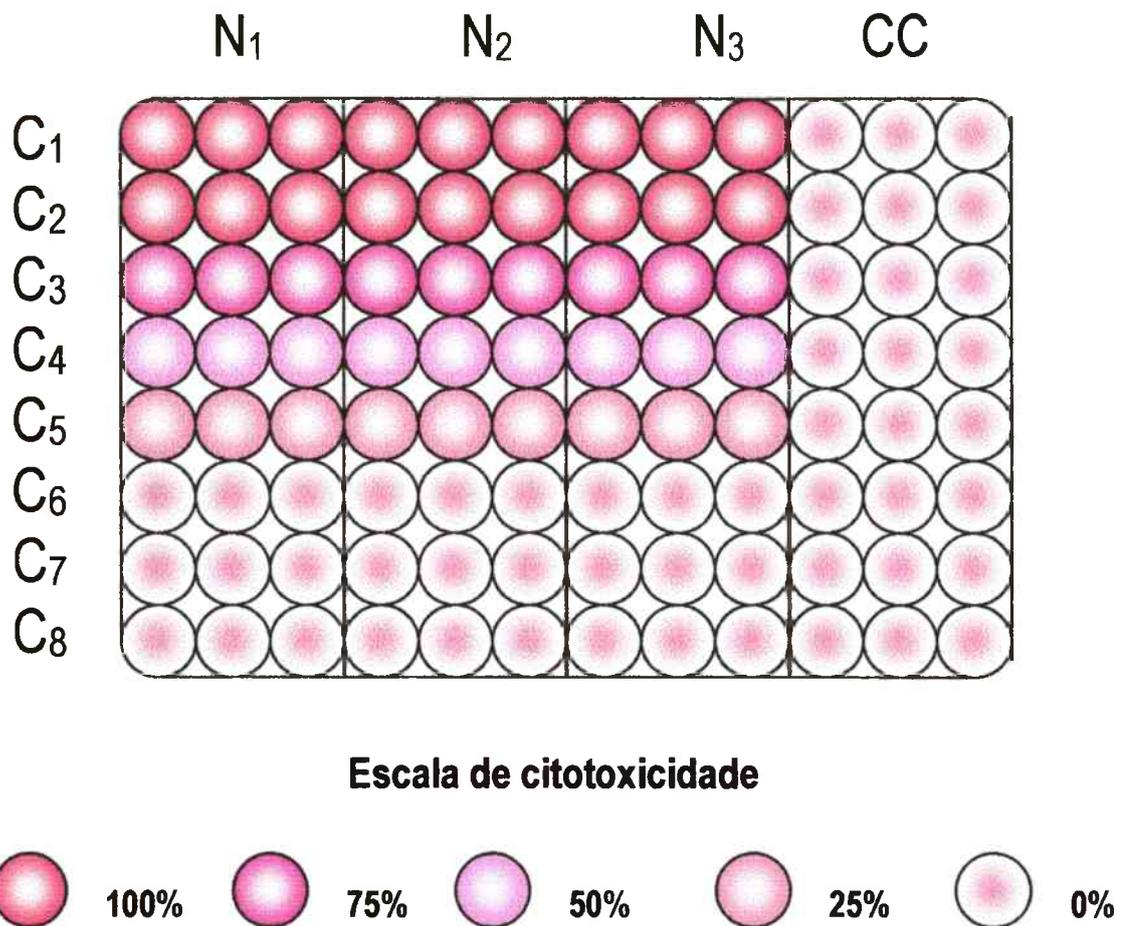


Figura 4. Disposição da placa de microtitulação usada para a determinação da citotoxicidade das diferentes concentrações dos extratos nebulizados de marcela, em células VERO:

- N₁ (C₁ a C₈):** diferentes concentrações do extrato N₁ diluído em Meio 199
- N₂ (C₁ a C₈):** diferentes concentrações do extrato N₂ diluído em Meio 199
- N₃ (C₁ a C₈):** diferentes concentrações do extrato N₃ diluído em Meio 199
- CC:** controle celular contendo apenas Meio 199
- C₁ a C₈:** concentrações das soluções a testar; diluições realizadas numa progressão geométrica de razão ½.

Técnica: uma suspensão celular contendo aproximadamente 250.000 células/ml foi preparada e distribuída em placas de microtitulação de 6 cavidades, sendo adicionados 3ml desta suspensão em cada cavidade da placa. Após incubação de 24h, a 37°C, formou-se um tapete celular uniforme. O Meio 199 foi substituído pelas diluições dos extratos N₁, N₂ e N₃ (cada diluição foi feita em triplicata). As concentrações utilizadas foram iguais ou inferiores a CC₅₀ de cada extrato, a fim de confirmar a citotoxicidade detectada pelo método anterior. Após incubação de 72h, a 37°C, o tapete celular foi dissociado por tripsinização. A tripsina foi então inativada através da adição de Meio 199 contendo SFB e a suspensão celular foi recolhida e centrifugada a 350Xg durante 15min. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso num volume de Meio 199 sem SFB, suficiente para formar uma suspensão celular contendo 2.10⁶ células/ml. Sob lâmina e lamínula foram adicionados 25µl da suspensão celular e 25µl do corante azul de Trypan (solução a 1% em PBS), esperou-se 5min e foi feita a contagem de 100 células por lâmina, no microscópio invertido, estabelecendo-se os percentuais de células viáveis e não viáveis.

III.4. Estudo da genotoxicidade

Os agentes genotóxicos podem ser definidos funcionalmente por possuírem a habilidade de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética. Desta forma, as medidas de genotoxicidade incluem, principalmente, danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas (COMBES, 1992).

A sensibilidade e a capacidade de medir danos no DNA de células individuais têm tornado o Ensaio do Cometa uma importante ferramenta na detecção da genotoxicidade de compostos de interesse.

Neste trabalho, foi adotada a técnica do Cometa/SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis), proposta por SINGH et al. (1988) com algumas modificações (TICE & STAUSS, 1995), cujo esquema pode ser visualizado na Figura 5.

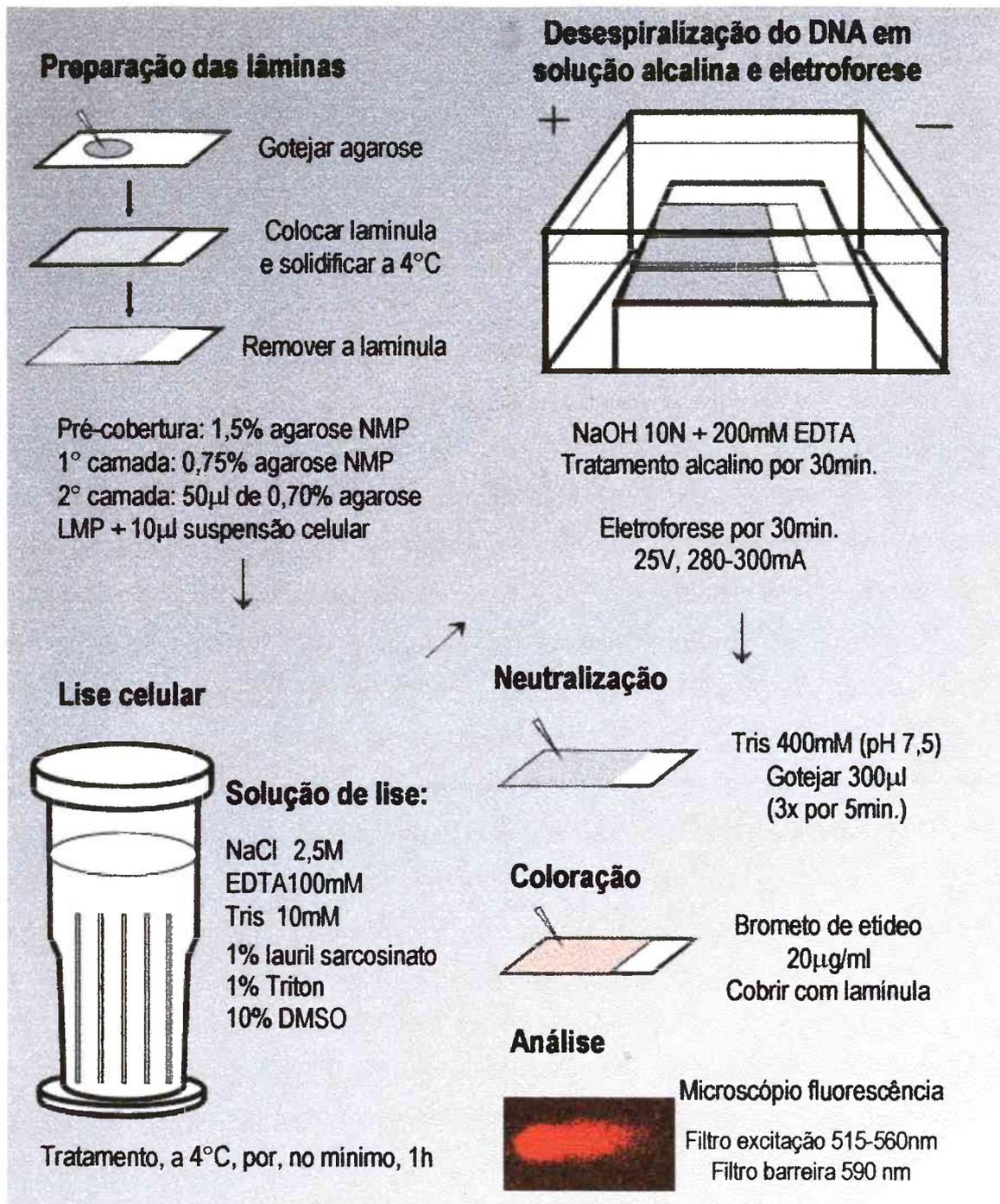


Figura 5. Esquema dos procedimentos empregados no Ensaio do Cometa, modificado de SIMAZAKI, 1999.

NMP= Normal Melting Point (= ponto de fusão normal)

LMP= Low Melting Point (= baixo ponto de fusão)

III.4.1. Preparação das suspensões celulares

Técnica: foram preparadas suspensões celulares, contendo aproximadamente 2.10^6 células/ml, que foram distribuídas em placas de microtitulação de 6 cavidades (3ml por cavidade). Após 24h, a 37°C , formou-se uma monocamada confluyente e foram adicionadas às células diferentes concentrações dos extratos N_1 , N_2 e N_3 , inferiores às CC_{50} previamente estabelecidas, durante diferentes períodos de incubação (24, 48 e 72h), de acordo com o esquema da Figura 6. Também foram preparados controles positivos e negativo. Após contato com os extratos, o Meio 199 contendo diferentes concentrações dos extratos foi retirado, as células foram lavadas 3X com PBS e submetidas a tripsinização. Após, as suspensões celulares foram centrifugadas e ressuspensas em Meio 199 sem SFB na quantidade exata para a obtenção de suspensões celulares contendo 2.10^6 células/ml.

III.4.2. Preparação dos controles positivos e negativo

Os controles positivos e negativo, além de auxiliarem na verificação e monitoramento das condições experimentais, funcionam como padrões no estabelecimento da classificação dos danos no DNA.

Como controle positivo foi utilizado o peróxido do hidrogênio (H_2O_2), que é conhecido por causar danos no DNA através da geração de radicais de oxigênio (ANDERSON et al., 1994). Duas hipóteses são sugeridas para explicar o dano induzido pelo H_2O_2 . A primeira é a formação de radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) através do processo de catálise por metais de transição, tipicamente Fe^{2+} , sendo esta reação denominada reação de Fenton (DREHER & JUNOD, 1996). A segunda hipótese seria a habilidade dos radicais ($\cdot\text{OH}$) e outras formas que provocam estresse oxidativo em causar danos no DNA, através da ativação de uma série de eventos metabólicos celulares, permitindo a atividade de enzimas nucleases, as quais clivam a cadeia de DNA. Ambos os mecanismos podem ocorrer simultaneamente (HALLIWELL & ARUOMA, 1991).

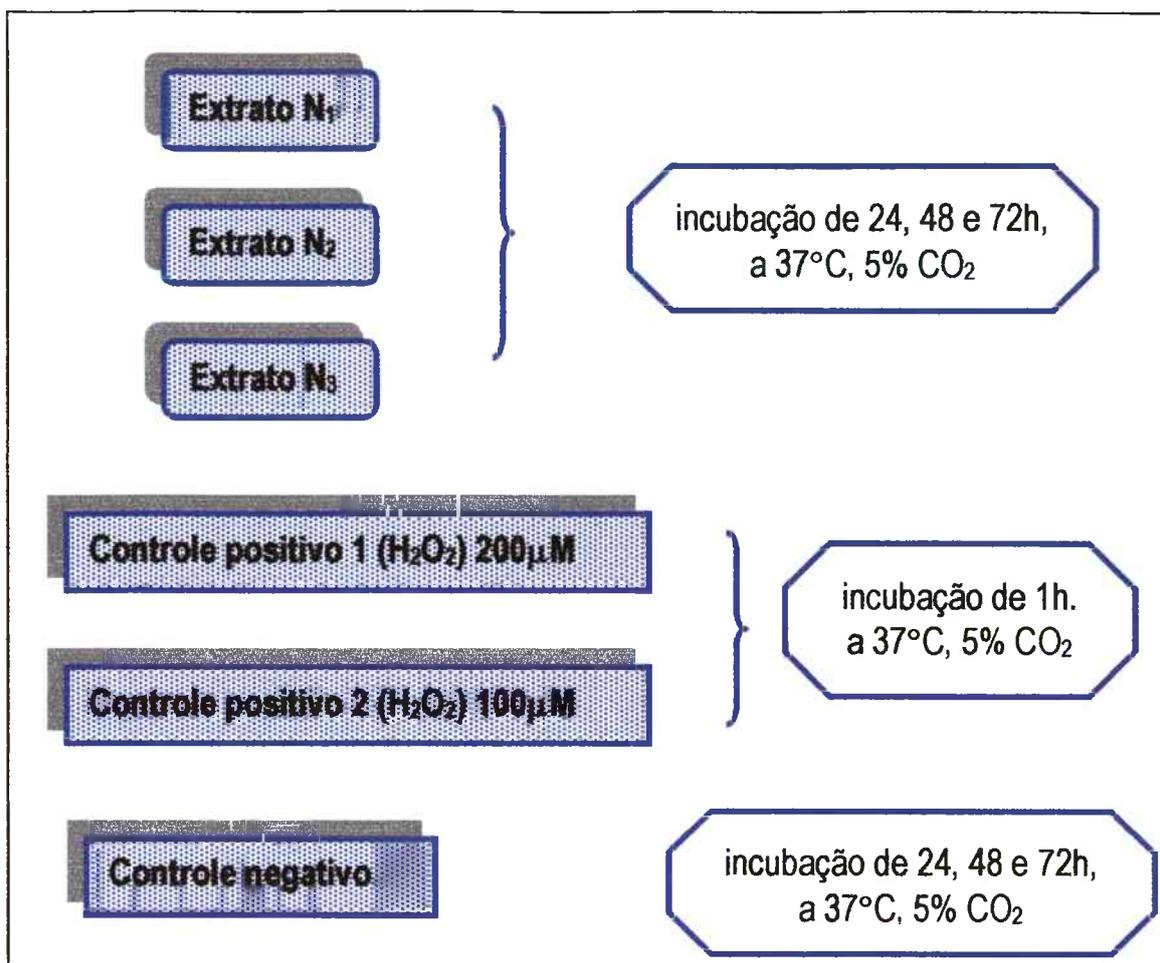


Figura 6. Tratamento das culturas celulares com extratos nebulizados de marcela N₁, N₂ e N₃ e controles positivos e negativo utilizados na realização da Técnica do Cometa. H₂O₂= peróxido de hidrogênio

Os controles positivos (H₂O₂) foram preparados nas concentrações de 200µM (controle positivo 1) e de 100µM (controle positivo 2) a partir de uma solução a 30% de H₂O₂ (Vetec), que foram então incubadas com as células, a 37°C, durante 1h.

O controle negativo consiste em células contendo apenas Meio 199.

III.4.3. Preparação das soluções

III.4.3.1. Peróxido de hidrogênio (PM=34,01; solução a 30%=8,8M)

- preparo da **solução 1** ($1 \cdot 10^5 \mu\text{M}$): 22,7 μl da solução a 30% q.s.p. 2,0ml meio sem SFB
- preparo da **solução 2** ($1 \cdot 10^4 \mu\text{M}$): 100 μl da solução 1 q.s.p. 1,0ml meio sem SFB
- preparo da **solução 200 μM** : 200 μl da solução 2 q.s.p. 10,0ml de meio sem SFB
- preparo da **solução 100 μM** : 100 μl da solução 2 q.s.p. 10,0ml de meio sem SFB

III.4.3.2. PBS (Phosphate Buffered Saline), livre de Ca^{2+} e Mg^{2+}

10 ml de PBS livre de Ca^{2+} , Mg^{2+} (Dulbecco) q.s.p. 1000 ml de água Milli-Q; confirmar o pH 7,4 e armazenar a 4°C.

III.4.3.3. Solução de lise

2,5M NaCl	146,1g
100mM EDTA	37,2g
10mM Tris-HCl	1,2g
1% lauril sarcosinato de sódio (Fluka)	10,0ml

- adicionar 700ml de água Milli-Q
- ajustar pH 10,0 com NaOH
- completar com água Milli-Q até 890 ml

Solução final de lise (100 ml): adicionar 1 ml de Triton X-100 e 10 ml de DMSO em 89 ml da solução preparada conforme descrito acima, refrigerar por, no mínimo, 1h antes de usar.

III.4.3.4. Tampão alcalino de eletroforese

30ml NaOH 10N, 5ml EDTA 200mM, q.s.p. 1000ml de H₂O Milli-Q, ajustar pH 13,0 com NaOH e refrigerar, no mínimo, 1h antes de usar. O volume a utilizar depende da capacidade da cuba de eletroforese.

III.4.3.5. Tampão de neutralização

0,4M de Tris-HCl (48,5 g), q.s.p. 1000ml de água Milli-Q, ajustar pH 7,5 com HCl concentrado e armazenar à temperatura ambiente.

III.4.3.6. Solução de brometo de etídeo

1ml da solução estoque de brometo de etídeo (10X concentrada: 200µg/ml), q.s.p. 10ml de água Milli-Q e armazenar à temperatura ambiente.

Obs.: composto tóxico. Manipulação cuidadosa com luvas!

III.4.4. Preparação das lâminas

III.4.4.1. Pré-cobertura

Lâminas esmerilhadas foram mergulhadas numa suspensão de agarose a 1,5 % em PBS livre de Ca²⁺ e Mg²⁺, com ponto de fusão normal (Normal Melting Agarose= NMA, Gibco-BRL). Após, o lado liso das lâminas foi limpo e as mesmas foram secas à temperatura ambiente.

III.4.4.2. Primeira camada

Foram adicionados às lâminas contendo pré-cobertura 300µl de uma suspensão de agarose a 0,75% em PBS livre de Ca²⁺ e Mg²⁺, com ponto de fusão normal (Normal Melting Agarose= NMA, Gibco-BRL). Em seguida, as lamínulas (24x50 mm) foram colocadas sobre as lâminas e os conjuntos foram armazenados numa câmara úmida a 4°C.

III.4.4.3. Segunda camada

Num microtubo tipo Eppendorf foram misturados 10 μ l de uma suspensão celular (obtida conforme item III.4.1) com 90 μ l de uma suspensão de agarose com baixo ponto de fusão (Low Melting Agarose= LMA, Gibco-BRL) a 0,75% em PBS livre de Ca²⁺ e Mg²⁺, a 37°C.

As lamínulas das lâminas, já com a primeira camada, foram retiradas e a mistura descrita acima foi gotejada e as mesmas lamínulas foram imediatamente recolocadas. As lâminas permaneceram a 4°C, durante 5min, para o endurecimento da agarose. Após, as lamínulas foram retiradas e as lâminas mergulhadas na solução de lise num recipiente adequado. Os passos subseqüentes foram realizados ao abrigo da luz, pois o DNA é susceptível aos efeitos da luz.

Nota: O ambiente deve ser escuro e a solução deve estar a 4°C antes do uso.

III.4.5. Lise das células

Depois de devidamente preparadas, as lâminas foram mergulhadas numa solução de lise a 4°C e ali permaneceram por, no mínimo, 2h. Essa solução contém detergente e altas concentrações de sais, que promovem a desintegração das membranas celulares.

III.4.6. Tratamento alcalino e eletroforese

Após a lise, as lâminas foram acomodadas numa cuba horizontal de eletroforese e as células foram tratadas com tampão alcalino (pH 13,0) durante 30min, a 4°C. Durante o tratamento alcalino, ocorre o relaxamento e desespiralização dos sítios de rompimento da molécula de DNA (ROJAS, LOPEZ, VALVERDE, 1999).

A eletroforese foi realizada em corrente elétrica de 300 mA e 25 V, por 30min.

III.4.7. Neutralização e coloração

Após a corrida eletroforética, as lâminas foram neutralizadas através da sua lavagem 3X com o tampão de neutralização, por 5min cada. Em seguida, as lâminas foram coradas com 700 μ l de uma solução diluída de brometo de etídeo (um agente intercalante de DNA que emite fluorescência quando exposto à radiação UV) e observadas ao microscópio de fluorescência (Olympus BX 40) em aumento de 200x, a 515-560 nm, com filtro de barreira (590nm).

III.4.8. Análise dos cometas

As células podem ser analisadas por diferentes metodologias, como por exemplo, através de monitores equipados com analisadores de imagens ou o uso de lentes objetivas milimetradas, as quais podem medir a distância da cauda até o núcleo do cometa, ou ainda através da utilização de microscópios com *scanner* a laser para medir as diferenças nos danos do DNA de células isoladas (KOBAYASHI et al., 1995). Um parâmetro geralmente usado é o momento da cauda (*tail moment*), introduzido por OLIVE, BANATH, DURAND (1990), que é o comprimento da cauda *versus* percentual do DNA migrado ou intensidade da cauda. Contudo, é um consenso entre os investigadores que não existe uma maneira apropriada de calcular o *tail moment*. No entanto, métodos mais simples também são utilizados. Os resultados obtidos através da análise visual mostraram estreita correlação com a análise de imagens computadorizadas (KOBAYASHI et al., 1995; COLLINS, et al., 1997). A classificação de células lesadas, em vários graus de migração do DNA, foi estabelecida por vários autores e, neste trabalho, foi utilizada aquela preconizada por KOBAYASHI et al. (1995), com algumas modificações (MIYAMAE et al., 1998a).

No microscópio de fluorescência foram examinadas 100 células para cada concentração dos três extratos N₁, N₂ e N₃, e os danos foram classificados em função da forma e do comprimento das caudas dos cometas (Figura 7): **tipo 1**, sem cauda; **tipo 2**, cometas com pequenas caudas (caudas com comprimento < 25% do diâmetro

da cabeça); **tipo 3**, cometas com caudas de tamanho médio (caudas com comprimento entre 25% e 100% do diâmetro da cabeça); **tipo 4**, cometas com caudas longas (comprimento da cauda > diâmetro da cabeça); **tipo 5** cometas mal definidos (a) ou com cabeça pequena (b).

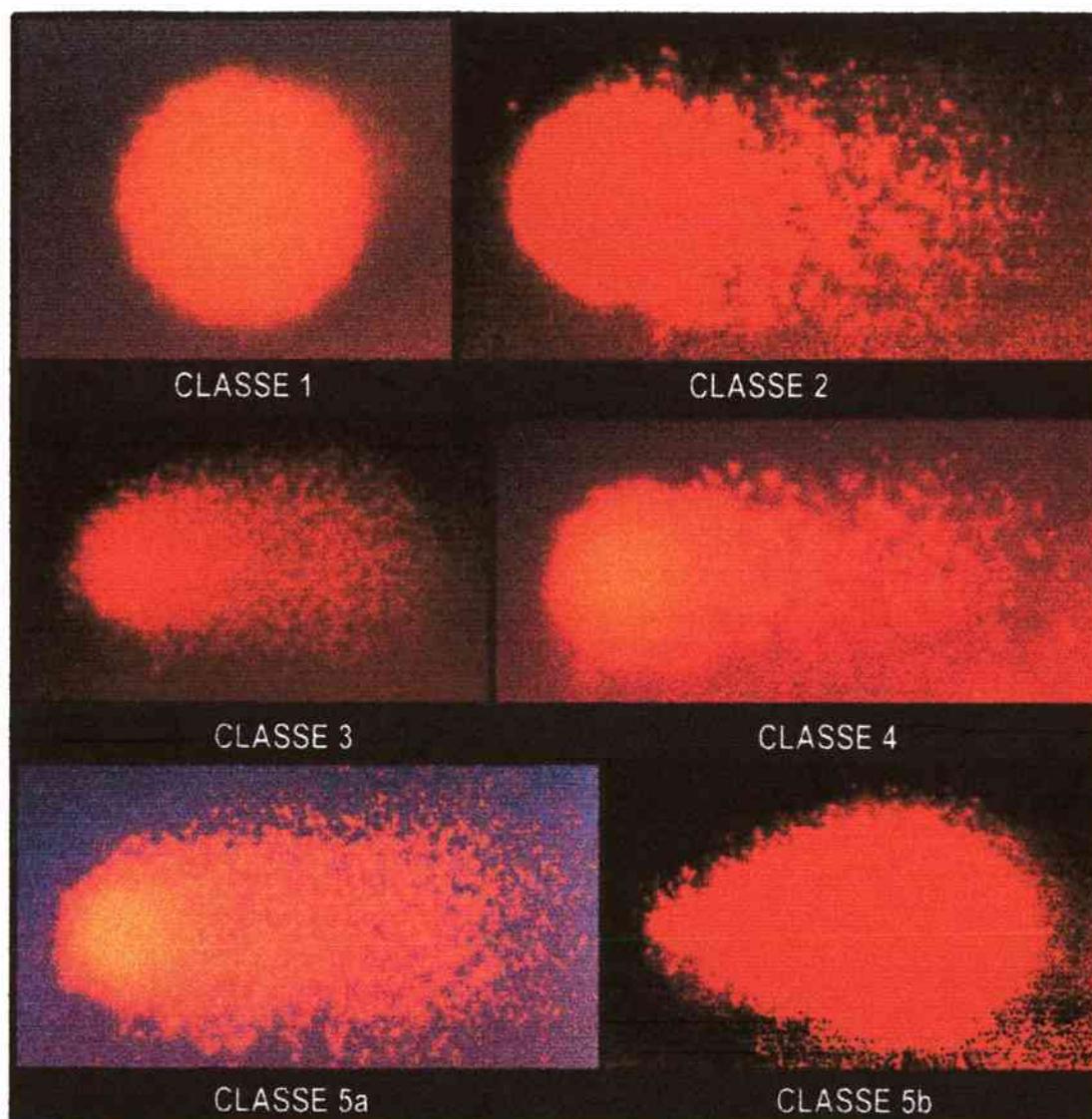


Figura 7. Classificação dos cometas em função da forma e do comprimento da cauda, segundo KOBAYASHI et al. (1995), com algumas modificações (MIYAMAE et al., 1998a).

Após a classificação das células, cada uma pertencendo a uma das cinco classes, foi realizado um escore visual (MIYAMAE et al., 1998a), no qual foram atribuídos valores de 0 a 4 (zero para núcleos intactos e quatro para núcleos com dano máximo). Desta forma, o escore total para 100 células variou de zero (totalmente sem danos) a 400 (totalmente danificadas).

III.4.9. Análise estatística

Na análise estatística foram consideradas duas variáveis: extratos nebulizados testados: N₁, N₂ e N₃ e tempos de exposição de 24, 48 e 72h, sendo que as interações entre os fatores devem ser levadas em consideração.

Cada tratamento foi realizado em triplicata, isto é, para cada experimento foram confeccionadas três lâminas e 100 células de cada lâmina foram analisadas ao acaso.

O efeito dos tratamentos das células em relação à intensidade e frequência da formação de cometas foi analisado utilizando a análise das variâncias (ANOVA), com nível de significância de 5%. Após, foi utilizado o teste de separação de médias de TUKEY. 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%.

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).

III.5. Estudo da atividade antiviral

III.5.1. Inibição do efeito citopático viral

III.5.1.1. Efeito citopático (ECP) viral

O efeito citopático viral foi definido por ENDERS, WELLER, ROBBINS (1949) como sendo todas as lesões provocadas por um vírus nas células onde ele se multiplica. A maioria dos vírus provoca modificações celulares específicas e fáceis de observar ao microscópio.

III.5.1.1.1. Efeito citopático do vírus herpético do tipo-1

O ECP do vírus HSV-1 é caracterizado pelo aparecimento de células arredondadas, brilhantes, freqüentemente ligadas umas às outras por prolongamentos citoplasmáticos, formando os chamados *focos*, que têm um aspecto característico de "cachos de uva", que se estendem rapidamente sobre o tapete celular infectado (GIRARD & HIRTH, 1989).

III.5.1.1.2. Efeito citopático do poliovírus

O efeito citopático provocado pelo poliovírus se traduz por células arredondadas ou piriformes, que se destacam do seu suporte, vacuolizam-se e acabam por se romper ou se encolher na forma de massas cristalinas. As células infectadas são refringentes, com citoplasma vacuolizado e granuloso, repleto de vírions, que estão sob a forma de inclusões eosinófilas (GIRARD & HIRTH, 1989).

III.5.1.2. Multiplicidade de infecção (MOI)

Anteriormente à realização dos testes antivirais é imprescindível a obtenção de suspensões-estoque virais devidamente tituladas. O passo seguinte é a determinação da concentração da suspensão viral a ser usada nos testes.

A multiplicidade de infecção (MOI) é a razão entre o número de partículas virais infecciosas e o número de células utilizadas. Por exemplo, se o MOI=1, existe uma partícula viral para cada célula, isto é, uma relação vírus-célula hospedeira bastante alta. No decorrer do trabalho, os valores de MOI estão indicados para cada experimento.

Exemplo de cálculo do TCID₁₀₀/ml:

- se a menor concentração que destruiu 100% do tapete celular durante a titulação viral foi de 1×10^2
- se a quantidade da suspensão-estoque viral usada durante a titulação, em cada cavidade, foi de $25 \mu\text{l}$
- se o número de células/ml for de 250.000.

concentração viral	volume utilizado na titulação
1×10^2	$25 \mu\text{l}$
X.....	$1000 \mu\text{l}$ (1ml)

$X = 4 \times 10^3 \text{ TCID}_{100}/\text{ml}$
--

Cálculo do MOI:

$$\text{MOI} = \frac{4 \times 10^3 \text{ TCID}_{100}/\text{ml}}{2,5 \times 10^5 \text{ células/ml}}$$

$\text{MOI} = 0,016$

Cálculo da concentração a ser utilizada com o MOI desejado (por exemplo 0,01 e 1):

MOI	conc. viral
0,016-----	1×10^{-2}
0,01-----	X

$X = 6,25 \times 10^{-3}$

MOI	conc. viral
0,016-----	1×10^{-2}
1-----	X

$X = 0,625$

III.5.1.3. Técnica da inibição do efeito citopático viral

Técnica: Uma suspensão celular contendo aproximadamente 250.000 células/ml foi preparada e distribuída numa placa de microtitulação de 96 cavidades, sendo adicionados 100 μ l dessa suspensão em cada cavidade. Após incubação de 24h, a 37°C, formou-se um tapete celular uniforme. Foram então, adicionados simultaneamente 100 μ l dos extratos N₁, N₂ e N₃, em diferentes concentrações (iguais ou inferiores aos valores de CC₅₀), e 100 μ l da suspensão viral (MOI=0,01). Foram preparados ainda, os controles virais (CV), que confirmam a virulência da suspensão viral, os controles celulares (CC), que atestam a integridade do tapete celular na ausência de extratos e vírus, e os controles com aciclovir (C_{ACV}), mostrando a inibição completa da multiplicação viral, no caso do HSV-1. Após incubação, a 37°C, durante 4 ciclos de multiplicação dos vírus, as leituras foram feitas ao microscópio invertido e o ECP provocado pelos vírus foi comparado com os controles. Um exemplo deste experimento está esquematizado na Figura 8.

A inibição do ECP foi avaliada de acordo com a proposição de SIDWELL (1986), segundo uma escala que vai de 1 a 4, conforme o grau de destruição celular:

ESCALA

ECP= 0	células unidas, espalhadas, transparentes e idênticas às dos controles celulares
ECP= 1	pequenos focos de infecção virai; a superfície das células mortas é igual a $\pm 25\%$ do tapete celular completo
ECP= 2	$\pm 50\%$ do tapete celular encontra-se destruído
ECP= 3	$\pm 75\%$ do tapete celular encontra-se destruído
ECP= 4	\pm todas as células do tapete estão destruídas

Essa escala pode ser melhor compreendida observando-se as Figuras 9 e 10, nas quais as células VERO, infectadas com HSV-1 e com poliovírus, respectivamente, exibem o ECP em diferentes intensidades.

A metodologia apresentada permitiu estimar o percentual de inibição do efeito citopático em relação aos controles virais. A concentração que inibiu 50% do ECP foi denominada de concentração efetiva a 50% (CE₅₀).

Com posse dos valores de CC₅₀ e CE₅₀, foram calculados os IS (índices de seletividade), que consistem na relação entre CC₅₀ e CE₅₀ ($IS = CC_{50}/CE_{50}$). Quanto maior o valor de IS, mais seguro do ponto de vista toxicológico será o material estudado. Segundo a literatura, valores de $IS > 4$ indicam que o produto avaliado merece ser melhor investigado em relação a atividade antiviral detectada (TSUCHIYA et al., 1985; SIDWELL, 1986).

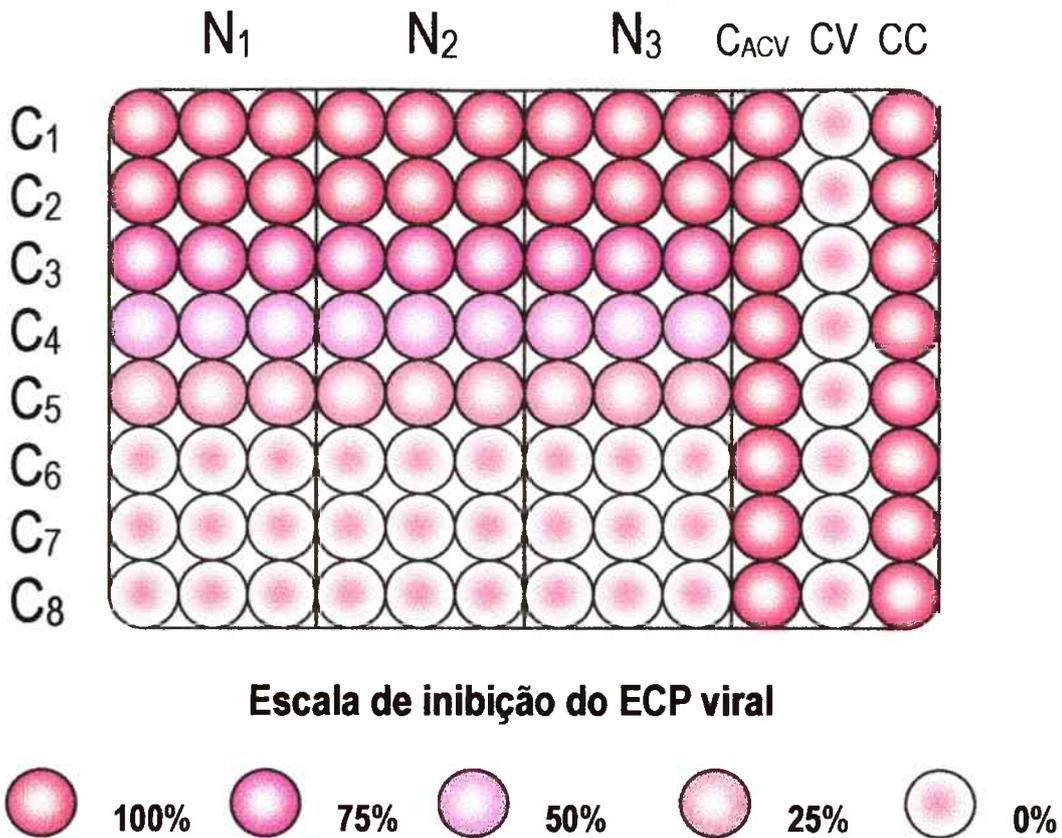


Figura 8. Disposição da placa de microtitulação usada para a determinação da inibição do efeito citopático viral das diferentes concentrações dos extratos nebulizados de marcela, em células VERO:

- N₁ (C₁ a C₈):** diferentes concentrações do extrato N₁ e suspensão viral com MOI definido
- N₂ (C₁ a C₈):** diferentes concentrações do extrato N₂ e suspensão viral com MOI definido
- N₃ (C₁ a C₈):** diferentes concentrações do extrato N₃ e suspensão viral com MOI definido
- CV:** controle viral contendo somente suspensão viral
- C_{ACV}:** controle de inibição do ECP viral contendo diversas concentrações de aciclovir (10,0 a 0,078 μg/ml) e suspensão viral com MOI definido, no caso do HSV-1
- CC:** controle celular contendo apenas meio 199
- C₁ a C₈:** concentrações das soluções a testar; diluições realizadas numa progressão geométrica de razão ½.

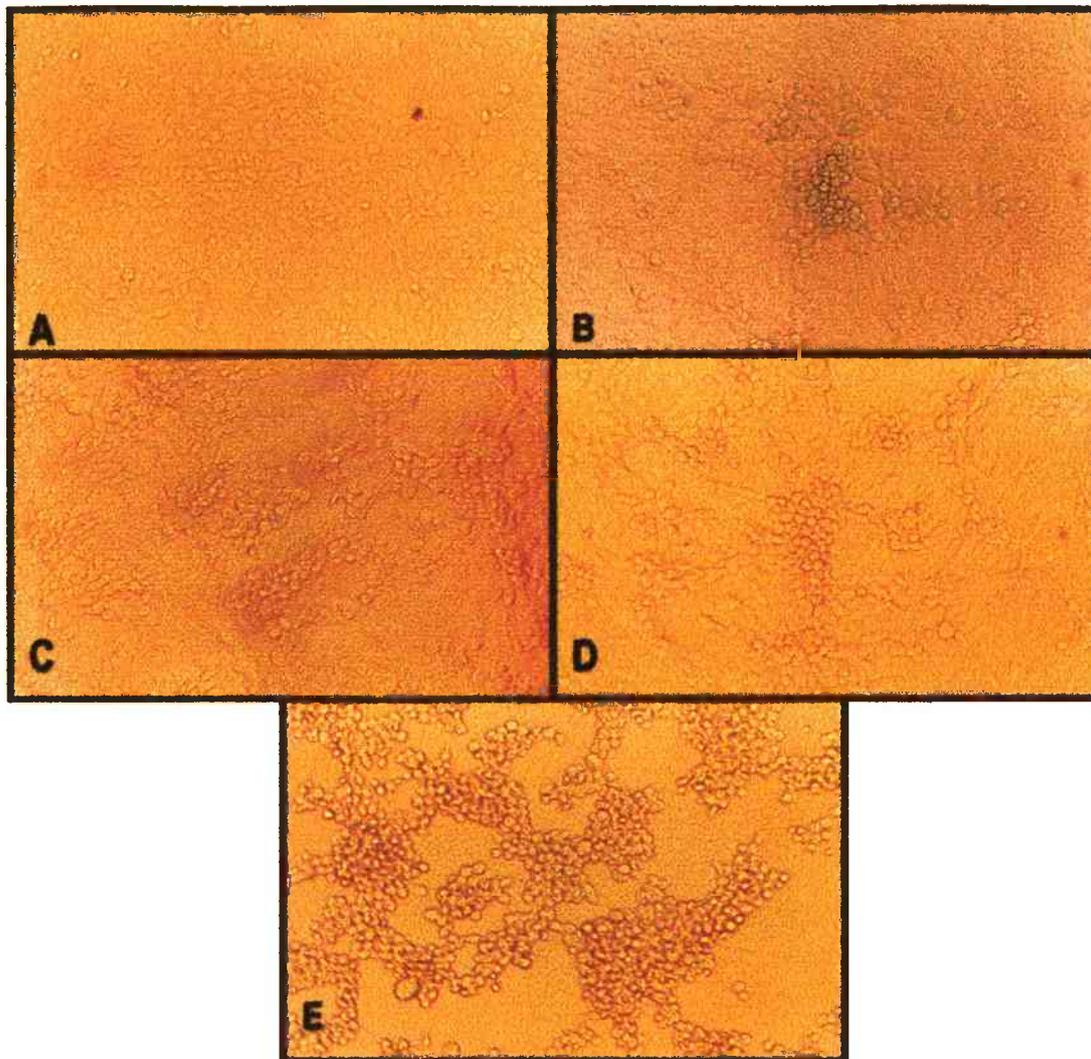


Figura 9. Escala de inibição do efeito citopático (ECP) do HSV-1 em células VERO.

A. tapete celular intacto; **B.** um foco de infecção ou ~ 25% de destruição do tapete celular; **C.** ~ 50% de destruição do tapete celular, **D.** ~ 75% de destruição do tapete celular, **E.** ~ 100% de destruição do tapete celular. Aumento de 250X, microscópio invertido.

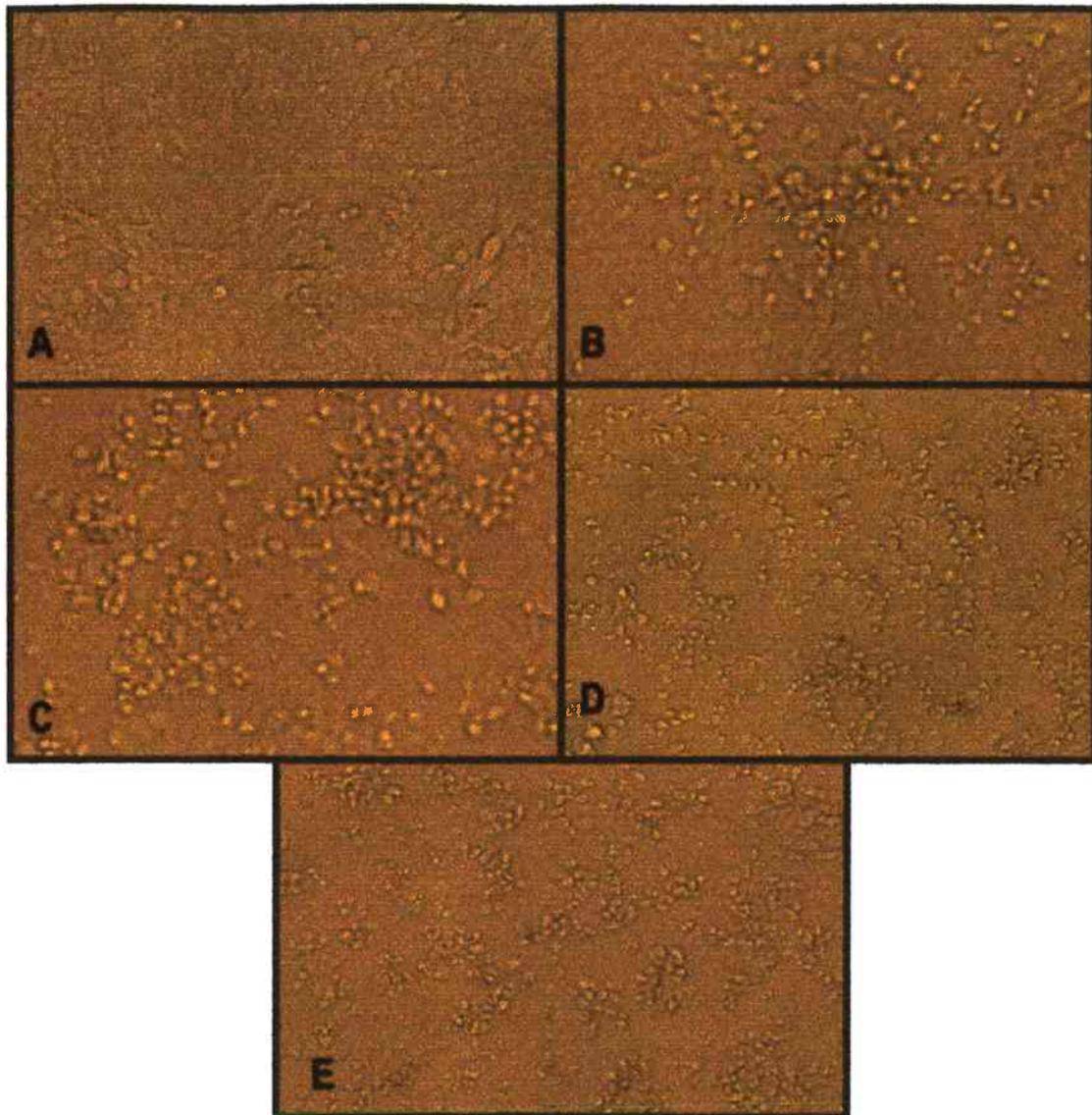


Figura 10. Escala de inibição do efeito citopático (ECP) do poliovírus tipo 2 em células VERO. **A.** tapete celular intacto; **B.** um foco de infecção ou ~ 25% de destruição do tapete celular; **C.** ~ 50% de destruição do tapete celular, **D.** ~ 75% de destruição do tapete celular, **E.** ~ 100% de destruição do tapete celular. Aumento de 250X, microscópio invertido.

III.5.2. Redução do título infeccioso viral

Esta é uma técnica semiquantitativa e foi utilizada em um e em vários ciclos de multiplicação viral, de acordo com a metodologia clássica de REED & MUENCH (1938).

III.5.2.1. Técnica A: um ciclo de multiplicação

Uma suspensão celular contendo aproximadamente 250.000 células/ml foi preparada e distribuída numa placa de microtitulação de 96 cavidades (100µl/cavidade). Após incubação de 24h, a 37°C, formou-se um tapete celular uniforme. Foram inoculados 100 µl da suspensão estoque viral em cada cavidade a fim de obter uma MOI próxima de 1. Após 1h de adsorção, à temperatura ambiente, os vírus em excesso foram eliminados através da lavagem do tapete celular com tampão PBS. Em seguida, foram adicionados à placa os extratos N₁, N₂ e N₃ diluídos em Meio 199 adicionado de 2% de SFB. Foram realizados, ainda, os controles celulares e o controle positivo com aciclovir (para os experimentos realizados com o HSV-1), cuja atividade é bem conhecida na terapêutica. As placas foram incubadas, a 37°C, durante 18h para o HSV-1 e 8h para o poliovírus (= 1 ciclo de multiplicação). Após, as placas foram congeladas e descongeladas 3X. Os conteúdos das cavidades idênticas foram reunidos e centrifugados a 350Xg para eliminar os resíduos celulares. Os títulos infecciosos foram determinados conforme já descrito. A atividade antiviral das substâncias foi expressa pela redução do título infeccioso (em log₁₀), com relação aos controles virais. A inibição de 1log₁₀ = 90% de inibição, 2log₁₀ = 99% de inibição, 3log₁₀ = 99,9% de inibição, 4log₁₀ = 99,99% de inibição e ≥ 5log₁₀ = 100% de inibição.

III.5.2.2. Técnica B: vários ciclos de multiplicação

Para realização deste teste, os vírus, com baixa multiplicidade de infecção (MOI=0,01) e os extratos N₁, N₂ e N₃ (em diferentes concentrações), foram

adicionados simultaneamente às culturas celulares (esta é uma diferença em relação à técnica anterior, onde os vírus ficavam em contato prévio com as células durante 1h). As placas foram incubadas, a 37°C, durante 72h para o HSV-1 e 32h para o poliovírus (=4 ciclos de multiplicação viral). A multiplicação dos vírus foi interrompida por congelamento das placas e após foram realizadas as titulações, conforme descrito anteriormente.

III.5.3. Estudo do mecanismo da ação anti-herpética

III.5.3.1. Ação virucida

Técnica: em microtubos tipo Eppendorf foram misturados 100µl da suspensão estoque viral com 100µl dos extratos N₁, N₂ e N₃, em diferentes concentrações (iguais ou inferiores aos valores das suas CC₅₀), durante 2h, a 37°C. Após, os títulos infecciosos foram determinados, conforme já descrito, e a redução dos mesmos produzidos pelas diferentes concentrações dos extratos em estudo foi avaliada com relação aos controles virais.

III.5.3.2. Ação sobre os receptores celulares

Para investigar a ação dos extratos nebulizados de marcela N₁, N₂ e N₃ sobre os receptores celulares, foram usadas duas técnicas:

Técnica A: Uma suspensão celular contendo aproximadamente 250.000 células/ml foi preparada e distribuída numa placa de microtitulação de 96 cavidades (100µl/cavidade). Após incubação de 24h, a 37°C, formou-se um tapete celular uniforme. 100 µl de cada concentração dos extratos N₁, N₂ e N₃ foram adicionados às culturas e incubadas, a 37°C, durante 3h para o HSV-1 e 1,5h para o poliovírus. Após o tempo de incubação, os extratos foram retirados e foram adicionados 100µl da suspensão viral (MOI= 0,01). As placas foram incubadas durante 4 ciclos de

multiplicação viral, congeladas e descongeladas 3X e as titulações foram realizadas conforme descrito anteriormente. A redução do título infeccioso viral foi determinada e expressa em \log_{10} , com relação aos controles virais.

Técnica B: idêntica à anterior, com exceção do tempo de incubação dos extratos N_1 , N_2 e N_3 com as células, que foi de 24h para o HSV-1.

III.5.3.3. Ação anti-herpética intracelular

III.5.3.3.1. Ação intracelular em função do tempo de adição dos extratos N_1 , N_2 e N_3

A técnica utilizada é a mesma descrita no item III.5.2.1., porém variando o tempo de adição de cada substância (SIMÕES, AMOROS, GIRRE, 1999a). Em seguida, um resumo desta técnica é apresentado:

- inoculação das culturas celulares com as suspensões-estoque virais (MOI=1),
- incubação à temperatura ambiente durante 1h,
- remoção do excesso de vírus (que não penetraram nas células) e lavagem das células com tampão PBS,
- adição dos extratos N_1 , N_2 e N_3 : 1; 1,5; 3; 6; 9 e 12h após a infecção viral,
- incubação por um período de 18h (= 1 ciclo de multiplicação do vírus HSV-1),
- congelamento, descongelamento, centrifugação, titulação e comparação da redução dos títulos infecciosos virais.

III.5.3.3.2. Ação intracelular por inibição da síntese do DNA do HSV-1

ETAPA 1: Preparação das culturas celulares infectadas pelo vírus HSV-1

Técnica: suspensões celulares contendo aproximadamente 250.000 células VERO/ml foram preparadas e distribuídas em placas de 6 cavidades (3ml/cavidade). Após 24h, a 37°C, formou-se um tapete celular uniforme. O meio nutritivo foi retirado

e a suspensão estoque do HSV-1 foi inoculada em cada cavidade (exceto naquela que serve de controle celular), a fim de se obter multiplicidade de infecção (MOI=1). Durante 1h de contato, à temperatura ambiente, ocorreu a adsorção e penetração viral nas células. Em seguida, foram adicionados às cavidades 3ml dos extratos N₁, N₂ e N₃ diluídos em Meio 199 sem SFB, em concentrações inferiores às CC₅₀, sendo realizados, ainda, o CV, C_{ACV} e CC. Quando se completou o efeito citopático (32h= 2 ciclos de multiplicação), as placas foram congeladas a -80°C até sua utilização. O rompimento das membranas celulares foi promovido pelo congelamento e descongelamento das culturas por 3X e a clarificação foi realizada por centrifugação branda. Os sobrenadantes contendo as suspensões virais, ou fluidos infecciosos, foram usados na extração do DNA do HSV-1, que servirá de molde para as reações de PCR.

ETAPA 2: Extração do DNA viral a partir dos fluidos infecciosos

O DNA do HSV-1 foi extraído utilizando-se duas técnicas:

Técnica A: extração de ácidos nucléicos utilizando fenol-clorofórmio através da metodologia proposta por SAMBROOK, FRITSC, MANIATS (1989). Aproximadamente 500µl dos fluidos infecciosos foram colocados em tubos tipo Eppendorff e foi adicionado o mesmo volume de FREON 113 (Triclorofluoretano, Aldrich). Os conteúdos foram agitados durante 30seg e centrifugados a 30.000Xg por 5min, à temperatura ambiente. Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, acrescida de dodecil sulfato de sódio a 1% (SDS, Gibco-BRL) e incubada a 37°C durante 30min. Em seguida, adicionou-se 500µl da mistura dos solventes fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção 25:24:1, agitou-se por 30seg e centrifugou-se como descrito acima. Para a precipitação dos ácidos nucléicos adicionou-se à fase aquosa acetato de sódio 3M (pH 5,3), na concentração final de 10% e 3 volumes de etanol absoluto a -20°C, sendo as amostras incubadas a

-20°C durante 2h ou a -80°C durante 30min. Após precipitação, as amostras de DNA foram centrifugadas a 30.000Xg durante 20min a 4°C e a fase aquosa foi descartada. Cada amostra foi adicionada de 3 volumes de etanol a 70% mantido a -20°C, homogeneizada levemente e centrifugada conforme descrito anteriormente. A fase aquosa foi novamente descartada, o tubo vertido sob papel absorvente e o DNA precipitado foi seco ao ar. Ao precipitado foram adicionados 50µl de água Milli-Q estéril e este foi armazenado a -20°C até sua utilização nas reações de PCR.

Técnica B: o DNA viral dos fluidos infecciosos foi liberado por fervura a 99°C, por 10min.

ETAPA 3: Reação de PCR

Para a detecção do DNA do HSV-1 foi utilizado basicamente o protocolo descrito por AURELIUS et al. (1991). A região conservada do DNA do vírus herpético, correspondente ao gene da glicoproteína D, foi amplificada utilizando-se o seguinte par de oligonucleotídeos: HSV 1-1 (5'ATC ACG GTA GCC CGG CCG TGT GAC A 3') e HSV-1-2 (5'CAT ACC GGA ACG CAC CAC ACA A 3')*. Num volume final de 50µl, a mistura reacional continha 22mM Tris-HCl (pH=8,4), 55mM KCl, 1,65mM MgCl₂, 220µM de dGTP, 220µM de dATP, 220µM de dTTP, 220µM de dCTP, 22U *Taq* DNA polimerase (PCR SuperMix, Gibco-BRL), 0,2 nmoles do par de oligonucleotídeos HSV-1-1 e HSV-1-2 e o DNA molde extraído dos fluidos infecciosos.

Após, cada tubo recebeu uma camada de óleo mineral, sendo as reações realizadas num termociclador modelo MiniCycler™, MJ Research.

As condições térmicas da reação com estes iniciadores foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 5min, anelamento a 55°C por 30seg e extensão a

* Os oligonucleotídeos foram gentilmente cedidos pela Dra Marion Burger (LACEN PR) e posteriormente sintetizados pela Gibco-BRL.

72°C por 60seg; seguindo-se 33 ciclos de desnaturação a 95°C por 30seg, anelamento a 55°C por 30seg e extensão a 72°C por 60seg . Foi realizado ainda um passo final de extensão, a 72°C por 10min, sendo, então, mantidos a 4°C até sua utilização.

ETAPA 4: Detecção do DNA amplificado

O produto de PCR do HSV-1, um fragmento de DNA de 222 pares de bases (pb), foi detectado por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% (SAMBROK et al., 1989). 5µl de cada produto de amplificação foram diluídos em 3µl do tampão de aplicação (solução do azul de bromofenol a 0,25% e sacarose a 40% p/v em água) e aplicados em géis de agarose a 1% (Gibco-BRL) em tampão Tris-borato-EDTA (TBE) na concentração final de Tris-HCl 0,09M; ácido bórico 0,09M e EDTA 0,02M. A corrida eletroforética foi realizada a 100V, com tampão de corrida TBE na mesma concentração acima mencionada. Após coloração com brometo de etídeo na concentração de 0,5µg/ml, por aproximadamente 5min, o DNA amplificado foi visualizado sob luz UV e comparado com um marcador de peso molecular de DNA que vai de 100 a 1500 pb (100pb ladder, Gibco-BRL).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Verificação cromatográfica dos extratos

A verificação da presença de flavonóides e a confirmação da integridade química dos extratos N₁, N₂ e N₃, através de cromatografia em camada delgada (CCD), foram realizadas segundo técnica descrita por SONAGLIO (1987). O resultado encontra-se esquematizado na Figura 11.

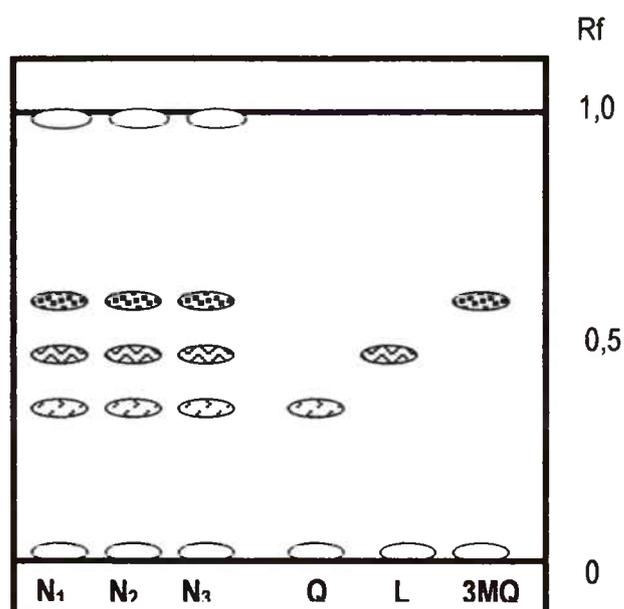


Figura 11. Representação gráfica do perfil cromatográfico dos extratos nebulizados de marcela (N₁, N₂ e N₃). Fase estacionária: celulose; fase móvel: clorofórmio: ácido acético: água (50: 45: 5); detecção: luz UV 360nm.

Padrões:

Q= quercetina, L= luteolina, 3MQ= 3-O-metilquercetina.

A CCD apresentou as manchas características dos flavonóides majoritários presentes nos extratos estudados, comparando-se com as manchas dos respectivos padrões.

IV.2. Determinação da citotoxicidade

O ideal, para qualquer fármaco anti-infeccioso, é que seja efetivo contra um determinado patógeno e, ao mesmo tempo, inócuo às células hospedeiras. Por esse motivo, anteriormente à avaliação da atividade antiviral de um produto qualquer, é imprescindível a determinação da sua citotoxicidade.

A citotoxicidade foi definida por NARDONE (1977) como sendo o conjunto de alterações da homeostase celular que provoca uma série de modificações que interferem na capacidade das células de se adaptar, sobreviver, reproduzir-se e realizar suas funções específicas. Esta definição mostra a extensão dos eventuais efeitos citotóxicos que um produto qualquer pode causar a uma célula.

A avaliação da citotoxicidade é um problema complexo, pois todas as substâncias interagem, em diferentes níveis, com as células alvo e podem provocar algum tipo de dano celular temporário ou permanente. 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 produto de penetrar na célula, etc (HU & HSIUNG, 1989).

A determinação da citotoxicidade dos extratos nebulizados N₁, N₂ e N₃ foi realizada utilizando-se as técnicas de avaliação das alterações morfológicas celulares e de determinação da viabilidade celular, de acordo com as metodologias descritas em Materiais e Métodos. Nesses testes, as culturas celulares foram incubadas, durante 24, 48 e 72h, a 37°C, na presença de diferentes concentrações dos extratos.

IV.2.1. Alterações das características morfológicas

Após o tempo de incubação de 72h, o aspecto dos tapetes celulares tratados com os extratos nebulizados N₁, N₂ e N₃ foi comparado àquele dos controles celulares e pode-se estimar os valores de CC₅₀ (concentração citotóxica a 50%), que foram de 62,5µg/ml para os três extratos nebulizados. Embora esses extratos difiram na composição e concentração dos adjuvantes, eles apresentaram os mesmos valores

de CC_{50} . Realizou-se, então, um experimento idêntico com preparações nebulizadas sem o extrato de marcela, contendo somente as misturas dos adjuvantes (A_1 , A_2 e A_3) nas mesmas proporções dos extratos N_1 , N_2 e N_3 . A visualização microscópica dos tapetes celulares adicionados das misturas de adjuvantes A_1 , A_2 e A_3 , após 72h, não mostrou alterações morfológicas, com relação aos controles celulares, a partir da concentração de $125\mu\text{g/ml}$ (acima da CC_{50}). Isto significa que a citotoxicidade na concentração de $62,5\ \mu\text{g/ml}$ encontrada para os extratos nebulizados N_1 , N_2 e N_3 deve-se exclusivamente à presença do extrato seco de marcela.

O fato dos valores obtidos de CC_{50} serem idênticos para os três extratos nebulizados também indica que os adjuvantes não influenciaram nas alterações celulares morfológicas observáveis ao microscópio invertido.

IV.2.2. Determinação da viabilidade celular

Com o objetivo de avaliar o efeito dos extratos nebulizados N_1 , N_2 e N_3 na viabilidade celular, foi utilizado o teste de exclusão com o corante Azul de Trypan, que só penetra nas células mortas cujas membranas não podem excluí-lo. As culturas celulares foram tratadas com três concentrações de cada extrato (iguais e inferiores à CC_{50}) durante 24, 48 e 72h. Foram analisadas 100 células em cada experimento e os percentuais de células não coradas representam a viabilidade celular. Os ensaios foram realizados em triplicata e a representação gráfica dos resultados obtidos encontram-se na Figura 12.

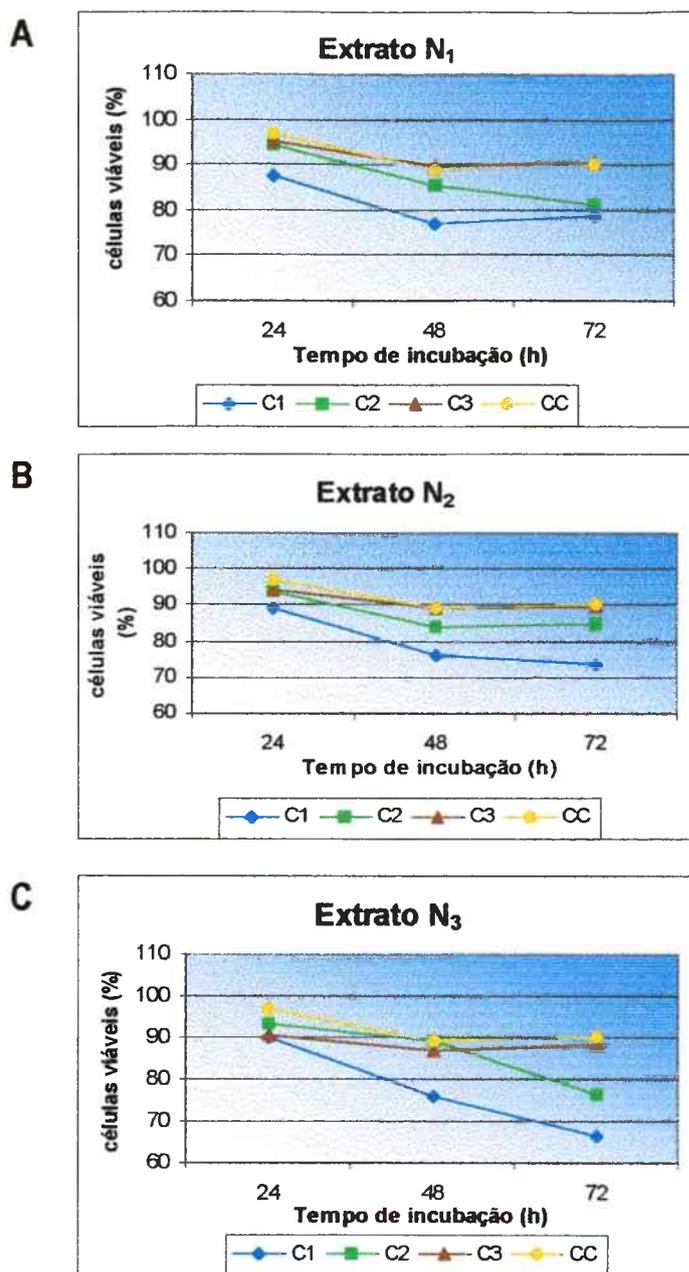


Figura 12. Avaliação da viabilidade celular dos extratos nebulizados de marcela (A-N₁, B-N₂ e C-N₃). C₁, C₂ e C₃= concentrações dos extratos (iguais e inferiores à CC₅₀: 62,5; 31,2 e 15,6µg/ml, respectivamente). CC= controle celular.

Para os três extratos N₁, N₂ e N₃, a viabilidade celular foi dependente da concentração e do tempo de incubação. Basicamente, as concentrações C₁ (62,5 µg/ml) e C₂ (31,25 µg/ml) mostraram percentuais de viabilidade celular menores do que a concentração C₃ (15,62 µg/ml) e o controle celular. Esses últimos mostraram valores de viabilidade celular semelhantes (Figura 12).

Comparando os resultados obtidos com as duas metodologias utilizadas para a determinação da citotoxicidade dos extratos N₁, N₂ e N₃: avaliação das características morfológicas das culturas (A) e determinação da viabilidade celular (B), verificou-se em 72h de incubação:

- **Extrato N₁**
 - C₁⇒ (A) destruição de 50% do tapete celular, (B) ~21% de células inviáveis
 - C₂⇒ (A) destruição de 25% do tapete celular, (B) ~18% de células inviáveis
 - C₃⇒ (A) não houve destruição do tapete, (B) ~ 10% de células inviáveis
 - CC⇒ (A) não houve destruição do tapete, (B) ~ 10% de células inviáveis

- **Extrato N₂**
 - C₁⇒ (A) destruição de 50% do tapete celular, (B) ~27% de células inviáveis
 - C₂⇒ (A) destruição de 25% do tapete celular, (B) ~25% de células inviáveis
 - C₃⇒ (A) não houve destruição do tapete, (B) ~ 10% de células inviáveis
 - CC⇒ (A) não houve destruição do tapete, (B) ~ 10% de células inviáveis

- **Extrato N₃**
 - C₁⇒ (A) destruição de 50% do tapete celular, (B) ~34% de células inviáveis
 - C₂⇒ (A) destruição de 25% do tapete celular, (B) ~24% de células inviáveis
 - C₃⇒ (A) não houve destruição do tapete, (B) ~ 10% de células inviáveis
 - CC⇒ (A) não houve destruição do tapete, (B) ~ 10% de células inviáveis

De posse destes resultados pode-se concluir que a concentração C₃ dos extratos testados é aparentemente desprovida de citotoxicidade, uma vez que os resultados dos testes de viabilidade celular (B) e de alterações morfológicas (A) são

idênticos aos dos controles celulares. Na avaliação da viabilidade celular - método (B) - observou-se praticamente os mesmos percentuais de células inviáveis para as concentrações C_1 e C_2 ; porém, na concentração C_2 , as duas metodologias apresentaram praticamente os mesmos resultados, sendo que na concentração C_1 , o método (B) apresentou resultados que indicam menor citotoxicidade, talvez por se tratar de uma técnica quantitativa, mais precisa, enquanto que o outro método- (A) - carrega uma certa subjetividade, já que é uma avaliação visual.

IV.3. Estudo da genotoxicidade através do Ensaio do Cometa

Os flavonóides têm sido intensivamente estudados sob o ponto de vista do seu potencial genotóxico e/ou carcinogênico (BROWN, 1980; MAC GREGOR et al., 1983). Embora a mutagenicidade de alguns flavonóides, como a quercetina, seja bem estabelecida em sistemas procarióticos (NAGAO et al., 1981; ELLIGER, HENIKA, MAC GREGOR., 1984), os limitados estudos realizados em sistemas eucarióticos, têm mostrado resultados conflitantes (RUEFF et al., 1986; POPP & SCHIMMER, 1991). Um exemplo desses resultados contraditórios são os trabalhos publicados pela mesma equipe de pesquisadores. DUTHIE, JOHNSON, DOBSON (1997a) afirmaram que a quercetina induziu quebras no DNA, de maneira dose-dependente, em células HepG2 e em linfócitos humanos. No mesmo ano, DUTHIE et al. (1997b) relataram que a quercetina e outros flavonóides exerceram efeito protetor em linfócitos humanos previamente expostos ao peróxido de hidrogênio, considerado um indutor de genotoxicidade.

Para o estudo da genotoxicidade de produtos de interesse, tem-se usado internacionalmente o Ensaio do Cometa. Sua sensibilidade e capacidade de medir danos no DNA de células individuais têm tornado essa técnica uma importante ferramenta nesta área. No presente estudo, a avaliação da genotoxicidade dos

extratos nebulizados de marcela (N₁, N₂ e N₃) foi realizada utilizando esta metodologia.

Nas últimas décadas, a pesquisa de novas tecnologias para a verificação de danos no DNA de células eucarióticas tem sido muito incrementada. RYDBERG & JOHANSON (1978) foram os primeiros a quantificar diretamente o dano no DNA de células individuais. Para melhorar a sensibilidade da detecção de danos causados no DNA, ÖSTLING & JOHANSON (1984) desenvolveram uma técnica de eletroforese em microgel, na qual as células eram lisadas, misturadas com agarose e submetidas à eletroforese em condições neutras, permitindo a detecção de quebras em fitas duplas do DNA celular.

SINGH et al. (1988) modificaram a técnica de ÖSTLING & JOHANSON (1984), utilizando uma eletroforese alcalina (pH~13) capaz de detectar quebras em fitas simples de DNA e em sítios instáveis em meio básico (=alkali labile) de células individuais. Essa versão é a mais comumente citada na literatura, sendo conhecida como **Single Cell Gel Electrophoresis Technique** (SCGE) ou Ensaio do Cometa. OLIVE et al. (1990) desenvolveram um processo de lise celular, também em condições alcalinas, seguido de eletroforese em pH=12,3. Os métodos de SINGH e de OLIVE e seus respectivos colaboradores são idênticos no princípio e similares na prática, mas o protocolo que utiliza pH=13 mostrou ser mais sensível (TICE & STRAUSS, 1995; GREEN et al., 1996) e foi, por isso, adotado neste trabalho.

A técnica descrita por SINGH et al. (1988), com algumas modificações (TICE & STRAUSS, 1995), foi utilizada para a avaliação da atividade genotóxica dos extratos nebulizados de marcela em células VERO. Nessa técnica, as células suspensas em gel de agarose são acomodadas em lâminas de microscópio, lisadas por detergentes e altas concentrações de sais, e o DNA liberado é submetido a um tratamento alcalino para promover o relaxamento da molécula superespiralizada de DNA, seguido de eletroforese em condições alcalinas. Os núcleos intactos das células que não sofreram lesões não migram, enquanto que os fragmentos de DNA

de núcleos lesados migram para o ânodo. Quando a lâmina é corada com um corante que se liga ao DNA, os núcleos aparecem na forma de cometas, com cabeça e cauda fluorescentes. A forma e comprimento da cauda indicam a intensidade do dano ao DNA nuclear.

O Ensaio do Cometa, por ser um ensaio desenvolvido recentemente, está sendo validado gradualmente, uma vez que diversas variáveis não são ainda padronizadas. Desta forma, durante a realização dos experimentos, foram encontradas certas dificuldades, em especial relacionadas com a concentração e tempo de exposição à tripsina. Estudos realizados por SINGH et al. (1991) indicaram que a tripsina aumenta a fragmentação do DNA e que a remoção das células em cultura através de raspagem (= *scraping*) resultou em menor indução de danos. No presente trabalho, procurou-se minimizar os danos causados no DNA das células utilizando uma solução de tripsina-EDTA a 0,05%, ao invés de uma solução de tripsina-PBS a 0,1%, como é citado na literatura (SINGH et al., 1991), e por um período de exposição mínimo, não superior a 5min.

No decorrer deste estudo, duas variáveis foram levadas em consideração: (a) extratos nebulizados N₁, N₂ e N₃, todos nas concentrações não citotóxicas (C₃=15,6µg/ml) e (b) diferentes tempos de incubação desses extratos com as células (24, 48 e 72h).

É importante realizar os testes com a concentração não citotóxica de cada extrato nebulizado, uma vez que a literatura indica que a concentração máxima a ser testada deve produzir uma viabilidade celular maior do que 75%, a fim de evitar resultados falso-positivos (ANDERSON, YU, MAC GREGOR, 1998). A morte celular pode influenciar na estimativa dos danos provocados, porque a migração do DNA de células mortas também é detectada pelo Ensaio do Cometa (células apoptóticas) (MIYAMAE et al., 1998b). É difícil a distinção entre células em apoptose e células danificadas por algum agente químico ou físico através dessa técnica, embora certos pesquisadores afirmem que isto seja possível (ANDERSON et al., 1998). A

citotoxicidade dos extratos nebulizados N₁, N₂ e N₃ foi estimada usando-se o teste de exclusão do Azul de Trypan, sendo que a concentração C₃ dos três extratos apresentou percentuais de células viáveis iguais aos dos controles celulares.

Os tempos de incubação foram escolhidos em função da permanência dos extratos nebulizados em contato com as células VERO infectadas com os vírus herpéticos durante 4 ciclos de multiplicação (72h). Na avaliação da atividade antiviral dos extratos N₁, N₂ e N₃, as culturas são monitoradas a 24, 48 e 72h, sendo interessante a determinação da genotoxicidade nesse mesmo período de tempo. Porém, a fase do ciclo celular e os mecanismos celulares de reparo devem ser levados em consideração. Qualquer célula eucariótica tem a capacidade de reparar diferentes tipos de danos causados no DNA, incluindo quebras de dupla e simples fita; por exemplo, 50% dos danos causados por radiações ionizantes são reparados em 15min e o reparo completo ocorre entre 1 a 2h (TICE & STRAUSS,1995). Vários compostos químicos, com diferentes mecanismos mutagênicos, provocaram danos na molécula de DNA imediatamente após, 21 e 45h após o tratamento de células de linfoma de rato (MIYAMAE et al., 1998b). Com relação às células VERO, o início das reações de reparo não está determinado, sendo que, após 24h, provavelmente, os mecanismos de reparo já começaram.

Durante os experimentos, as células ficaram em contato com os diferentes extratos, em diferentes tempos de incubação e cada tratamento foi realizado em triplicata. Cem células de cada lâmina foram analisadas ao acaso e classificadas visualmente em 5 classes segundo KOBAYASHI et al. (1995), modificado por (MIYAMAE et al., 1998a). Após, utilizou-se um escore no qual foram atribuídos valores de 0 a 4 para as classes 1, 2, 3, 4 e 5. Desta forma, o escore total para 100 células variou de zero (núcleos intactos) a 400 (núcleos totalmente danificados). A representação gráfica dos resultados obtidos encontra-se na Figura 13.

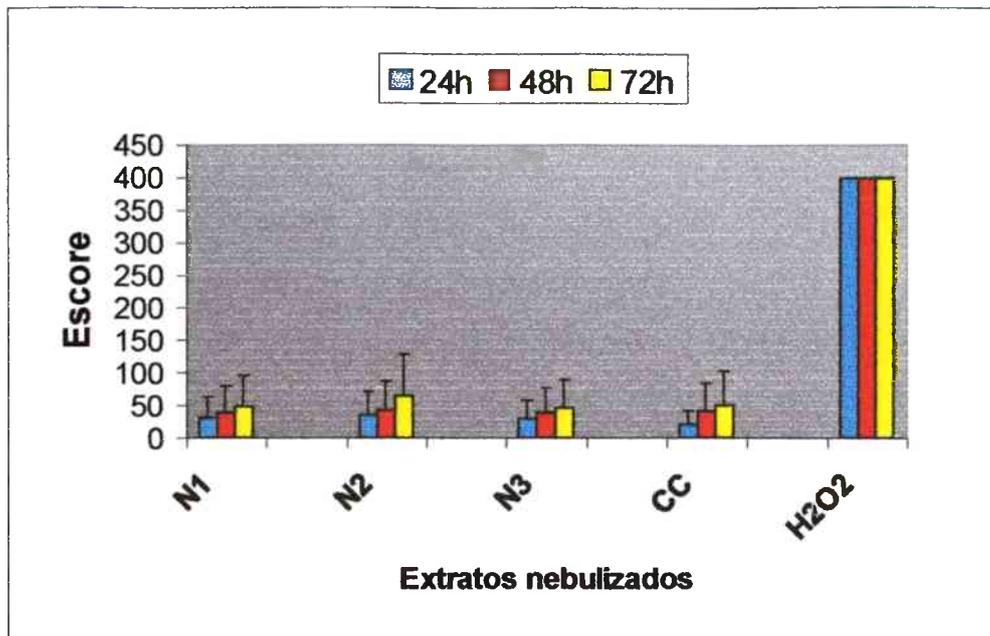


Figura 13. Avaliação da genotoxicidade dos extratos nebulizados de marcela (N₁, N₂ e N₃), utilizando o Ensaio de Cometa. CC= controle celular, H₂O₂= controle com peróxido de hidrogênio (100 μ M). Tempos de incubação: 24, 48 e 72h.

A influência dos extratos nebulizados N₁, N₂ e N₃, nos diferentes tempos de incubação, e as possíveis interações dessas variáveis foram analisadas estatisticamente utilizando-se o teste-*t* de Student para a comparação entre os tratamentos e os controles celulares (Tabela 3), e o teste de análise de variâncias ANOVA, seguido do teste de TUKEY para a separação de médias, num intervalo de significância de 0,05, para a comparação entre os tratamentos (Tabela 4).

Tabela 3. Análise estatística dos resultados obtidos no Ensaio do Cometa utilizando-se os extratos nebulizados de marcela N₁, N₂ e N₃, em diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72h), através do teste-*t* de Student para comparação entre os controles celulares (CC) e os diferentes tratamentos.

Extratos/tempo	Valores de <i>t</i>		
	24h	48h	72h
N ₁	0,072	0,014	0,021
N ₂	0,104	0,011	0,095
N ₃	0,058	0,023	0,039
<i>t</i> tabelado <i>t</i> _{0,05} (GL)	3,18	3,18	3,18

GL= graus de liberdade, neste caso GL=3.

- Se $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}} = t_{\text{calculado}}$ está fora do nível de significância, isto é, os valores comparados são estatisticamente diferentes, considerando $\alpha = 0,05$.
- Se $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}} = t_{\text{calculado}}$ está dentro do nível de significância, isto é, os valores comparados são estatisticamente semelhantes, considerando $\alpha = 0,05$.

Observa-se que todos os valores de $t_{\text{calculados}}$ são menores do que os valores de $t_{\text{tabelados}}$; portanto, os resultados obtidos com os extratos N₁, N₂ e N₃, em diferentes tempos de incubação, são estatisticamente idênticos aos respectivos controles celulares.

Tabela 4. Análise de variâncias (ANOVA) dos resultados obtidos no Ensaio do Cometa utilizando-se os extratos nebulizados de marcela, N₁, N₂ e N₃, em diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72h).

Causas de variação	GL	SQ	QM	F teste	α
Fator A (extratos)	2	540,67	270,33	1,66	0,217
Fator B (tempos)	2	1891,55	945,78	5,82	0,011
Interação A x B	4	228,44	57,11	0,351	0,84
Erro	18	2925,33	162,52	-	
Total	26	5586,0	-	-	

GL= graus de liberdade; SQ= soma dos quadrados; QM= quadrado médio; F teste= SQ/QM;

α = nível de significância.

- **Fator A:** não houve diferença estatisticamente significativa entre os extratos N₁, N₂ e N₃, considerando $\alpha=0,05$.
- **Fator B:** houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos de incubação de 24, 48 e 72h, considerando $\alpha=0,05$.
- **Interação A x B:** não houve diferença estatisticamente significativa entre as interações dos fatores A e B, considerando $\alpha=0,05$.

Observa-se que apenas os tempos de incubação (fator B) influenciaram os resultados obtidos no Ensaio do Cometa; assim, somente o fator B foi submetido ao teste de separação de médias (TUKEY).

Separação de médias utilizando o teste de TUKEY:

Fator B	24h	X	
	48h		X
	72h		X

O teste de separação de médias indica que os resultados obtidos em 24h são estatisticamente diferentes daqueles obtidos em 48 e 72h, que são, por sua vez, estatisticamente semelhantes.

A análise dos dados através da análise das variâncias (ANOVA), seguida do teste de separação de médias (TUKEY) indicou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os extratos N₁, N₂ e N₃, mas essa diferença ocorreu para os diferentes tempos de incubação, ou seja, quanto maior o tempo de contato com os extratos, maior é a formação de cometas. Porém, a diferença estatística entre os tempos de incubação também é detectada nos controles celulares, indicando que a formação de cometas ocorreu por morte espontânea das células com o passar do tempo, e não devido à presença dos extratos nebulizados. Além disso, a comparação estatística entre os tratamentos e os controles celulares, para cada tempo de incubação, utilizando o teste-*t* de Student, indicou que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos, considerando $\alpha=0,05$. Isto significa que os extratos nebulizados N₁, N₂ e N₃, na concentração utilizada (15,6 $\mu\text{g/ml}$), não induziram a formação de cometas em células VERO.

Desta forma, pode-se concluir que, em 48 e 72h de incubação não se consegue diferenciar os danos provocados no DNA pelos extratos N₁, N₂ e N₃ daqueles originados de células mortas espontaneamente e que, provavelmente, os mecanismos de reparo do DNA das células já foram acionados. Isso não ocorreu em 24h de incubação, parecendo ser esse um tempo adequado para a avaliação da genotoxicidade em cultura de células VERO.

O Ensaio do Cometa é uma importante ferramenta no estudo da genotoxicidade, mas aproximadamente 85% dos resultados obtidos nessa área foram positivos, sendo que novas pesquisas são necessárias para a investigação da persistência e do reparo dos danos observados. A correlação dos dados obtidos com outras técnicas se faz necessária para confirmar o significado biológico desses

achados. A esse respeito, HELBIG & SPEIT (1997) e COLLINS et al. (1997), comentaram que as quebras de fitas simples de DNA observadas na versão alcalina do Ensaio do Cometa são rapidamente reparadas, não apresentando lesões mutagênicas letais, e que as conseqüências biológicas desses resultados devem ser analisadas com precaução.

IV.4. Avaliação da atividade antiviral

IV.4.1. Inibição do efeito citopático viral

O efeito citopático (ECP) viral é definido como o conjunto de alterações provocadas por um vírus nas células onde ele se multiplica. Os vírus herpéticos e os poliovírus modificam as características morfológicas das células VERO de maneira específica e facilmente distinguíveis ao microscópio invertido.

A avaliação da inibição do ECP viral provocada pelos extratos nebulizados de marcela foi realizada através da técnica descrita em *Materiais e Métodos*. Preferiu-se utilizar esta técnica e não aquela de redução do número de placas de lise, pois essa última preconiza a adição de carboximetilcelulose (CMC) no meio de cultura após a adsorção e penetração dos vírus no interior das células. A CMC aumenta a viscosidade do sobrenadante das culturas, o que poderia dificultar a interação célula-extrato. Alguns trabalhos, comparando ambas as técnicas, indicaram que os resultados obtidos no estudo de substâncias com atividade antiviral conhecida, foram contraditórios. Estes relatos indicam ainda que as duas metodologias revelam aspectos diferentes da infecção viral, e deve-se considerar também as condições experimentais que influenciam os resultados, tais como os tipos de células e de vírus utilizados, multiplicidade de infecção viral, tempo de incubação, etc. (SIDWELL, 1986; HU & HSIUNG, 1989).

Os resultados obtidos na avaliação da inibição do ECP viral pelos extratos nebulizados de marcela N₁, N₂ e N₃ encontram-se na Tabela 5 e na Figura 14.

Tabela 5. Avaliação da inibição do efeito citopático (ECP) viral provocada pelos extratos nebulizados de marcela (N₁, N₂ e N₃), frente aos vírus herpéticos (cepas KOS, VR733 e 29R) e ao poliovírus tipo 2.

Extratos de marcela	CC ₅₀ (µg/ml)	CE ₅₀ , µg/ml, (IS)			
		HSV-1, cepa KOS	HSV-1, cepa VR733	HSV-1, cepa 29R	Poliovírus tipo 2
N ₁	62,5	7,8 (8,0)	3,9 (16,0)	5,8 (10,7)	0,98 (63,8)
N ₂	62,5	1,9 (32,9)	3,9 (16,0)	3,9 (16,0)	0,98 (63,8)
N ₃	62,5	5,8 (10,7)	5,8 (10,7)	7,8 (16,0)	0,98 (63,8)

CC₅₀= concentração citotóxica a 50%; CE₅₀= concentração efetiva a 50%
IS= índice de seletividade (IS= CC₅₀ / CE₅₀)

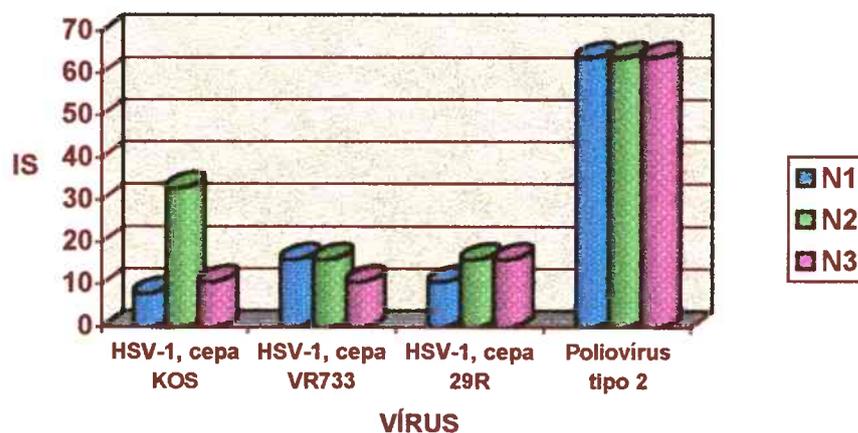


Figura 14. Comparação dos índices de seletividade (IS) obtidos para os extratos nebulizados de marcela (N₁, N₂ e N₃) frente aos vírus herpéticos (cepas KOS, VR733 e 29R) e ao poliovírus tipo 2.

Conhecendo os valores de CC_{50} e CE_{50} pode-se calcular os índices de seletividade ($IS = CC_{50} / CE_{50}$) destes extratos. Quanto maior o IS do extrato, mais ativo ele será contra o vírus, sendo, ao mesmo tempo, menos tóxico às células hospedeiras.

Os resultados obtidos com os extratos nebulizados N_1 , N_2 e N_3 frente aos vírus herpéticos apresentaram certa homogeneidade, com exceção do extrato N_2 frente à cepa KOS, que apresentou um valor de IS mais elevado do que aqueles dos demais extratos. Isto poderia ser explicado pelas diferentes composições dos adjuvantes nos três extratos, já que a concentração da solução hidroetanólica de marcela é a mesma para os três extratos.

A influência dos adjuvantes na preparação dos extratos secos nebulizados se manifesta de forma diversa nas características físicas, físico-químicas e biofarmacêuticas das preparações. Os estudos realizados por TEIXEIRA (1996), visando à padronização dos extratos nebulizados de marcela aqui avaliados, indicaram que o extrato contendo dióxido de silício coloidal como adjuvante (N_1) apresentou as melhores características de rendimento, umidade residual, recuperação de flavonóides e estabilidade física frente à umidade, enquanto que o extrato seco nebulizado contendo esse adjuvante e β -ciclodextrina (N_3) apresentou as melhores características antiedematogênicas e o extrato contendo celulose microcristalina (N_2) apresentou maior densidade.

O extrato N_2 é constituído de polissorbato 80, dióxido de silício coloidal e celulose microcristalina como adjuvantes de nebulização. Do ponto de vista farmacotécnico, num estudo realizado com os extratos N_1 , N_2 e N_3 , cujo objetivo era indicar qual desses três extratos melhor influenciaria a preparação de uma pomada, De PAULA et al. (1998) relataram que o extrato N_2 foi aquele que apresentou melhor índice de espalhabilidade (imprescindível para a manutenção da qualidade de preparações destinadas à aplicação na pele) e o melhor índice de óleo (indica

indiretamente a probabilidade de quebra do sistema tipo emulsão), quando incorporado a uma pomada à base de monoestearato de glicerila.

Tudo indica que a mistura de adjuvantes do extrato nebulizado N₂ proporcionou uma melhor interação desse com as células infectadas, permitindo observar-se assim uma atividade anti-herpética mais pronunciada. Assim sendo, a convergência dos resultados obtidos no recente estudo galênico, acima referenciado, e aqueles obtidos neste trabalho de detecção de atividade anti-herpética mostra que esforços futuros devem ser envidados para dar seguimento aos estudos desta atividade farmacológica com este extrato padronizado.

Os resultados obtidos para o poliovírus-2 foram idênticos para os três extratos (IS=60) e são mais elevados do que os resultados obtidos para os vírus herpéticos (Figura 14). Esse fato será discutido no próximo item.

IV.4.2. Redução do título infeccioso viral

Com o propósito de confirmar e, sobretudo, quantificar a atividade antiviral encontrada com a técnica anterior, utilizou-se a metodologia de redução do título infeccioso viral com um e com vários ciclos de multiplicação viral, sendo que com um ciclo de multiplicação utilizou-se MOI=1, enquanto que com quatro ciclos utilizou-se MOIs de 0,2 e 0,01. Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 15, 16 e 17, respectivamente.

Como era de se esperar, as reduções do título infeccioso viral provocadas pelos extratos nebulizados N₁, N₂ e N₃ foram mais significativas com quatro ciclos de multiplicação, pois num período maior de exposição às células, ocorre também uma maior produção de partículas virais, sendo mais fácil a detecção desta redução, com relação aos controles virais.

Os resultados obtidos na avaliação da inibição do ECP viral foram confirmados pela técnica de redução do título infeccioso viral, sendo que o extrato N₂ mostrou-se novamente mais ativo contra o HSV-1, cepa KOS. Nos experimentos realizados com essa cepa do HSV-1, em vários ciclos de multiplicação, a redução do título foi melhor detectada, já que o valor obtido na titulação da suspensão viral inicial (10^5 TCID₁₀₀/ml) era mais elevado do que para as demais cepas (10^3 e 10^2 TCID₁₀₀/ml para as cepas VR733 e 29R, respectivamente). Acredita-se ainda que a maior atividade detectada contra o HSV-1 pelo extrato N₂ deve-se, conforme mencionado no item anterior, às características farmacotécnicas conferidas pela composição dos seus adjuvantes.

De forma geral, a redução do título infeccioso viral pelos três extratos, em um e quatro ciclos de multiplicação do HSV-1, foi detectada até a concentração C₃, e a partir da concentração C₄ observa-se que a redução do título infeccioso foi bem menos acentuada ou não mais ocorreu (Figuras 15, 16 e 17).

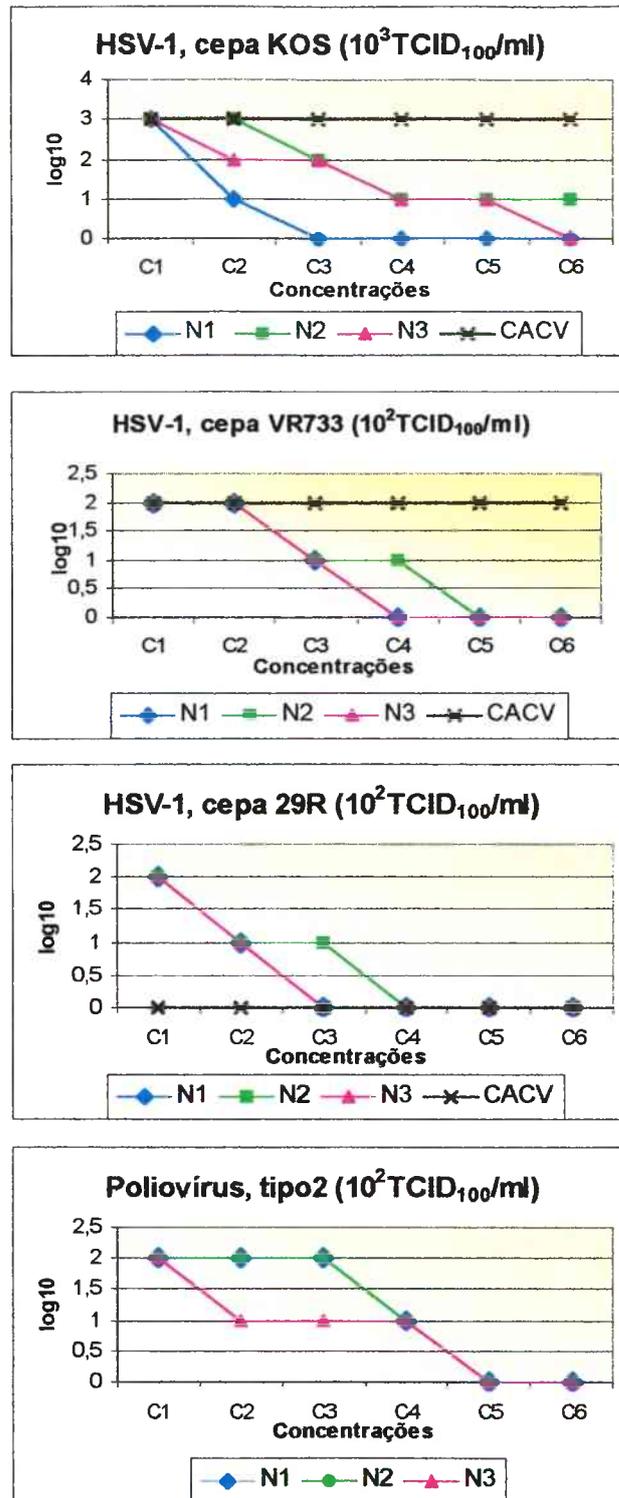


Figura 15. Redução do título infeccioso viral, expressa em \log_{10} , com um ciclo de multiplicação ($MOI=1$) apresentada pelos extratos nebulizados de marcela N₁, N₂ e N₃ nas concentrações ($\mu\text{g/ml}$): C₁= 62,5; C₂= 31,2; C₃= 15,6; C₄= 7,8; C₅=3,9; C₆= 1,9. Controle ACV= controle com aciclovir nas concentrações ($\mu\text{g/ml}$): C₁=10; C₂=5; C₃=2,5; C₄=1,25; C₅=0,62; C₆=0,31.

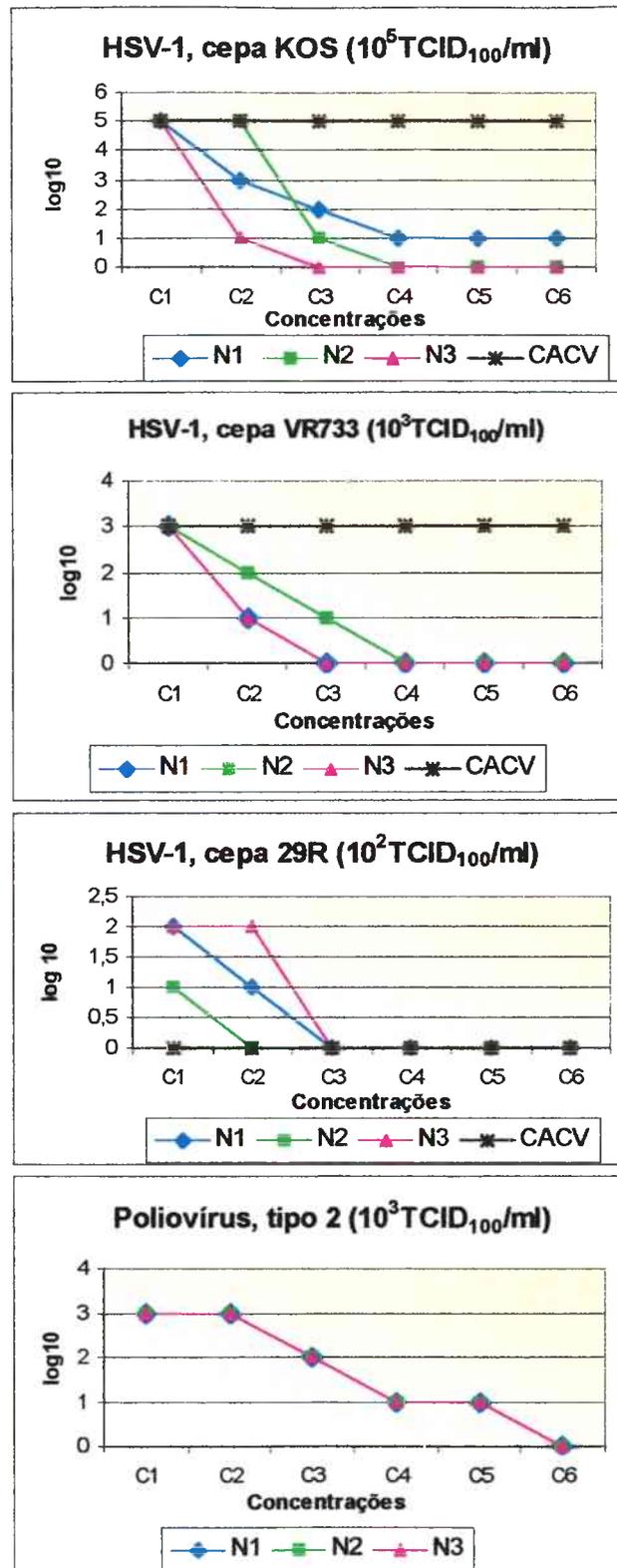


Figura 16. Redução do título infeccioso viral, expressa em \log_{10} , com quatro ciclos de multiplicação ($\text{MOI}=0,2$) apresentada pelos extratos nebulizados de marcela N₁, N₂ e N₃ nas concentrações ($\mu\text{g/ml}$): C₁= 62,5; C₂= 31,2; C₃= 15,6; C₄= 7,8; C₅=3,9; C₆ = 1,9. Controle ACV= controle com aciclovir nas concentrações ($\mu\text{g/ml}$): C₁=10; C₂=5; C₃=2,5; C₄=1,25; C₅=0,62; C₆=0,31.

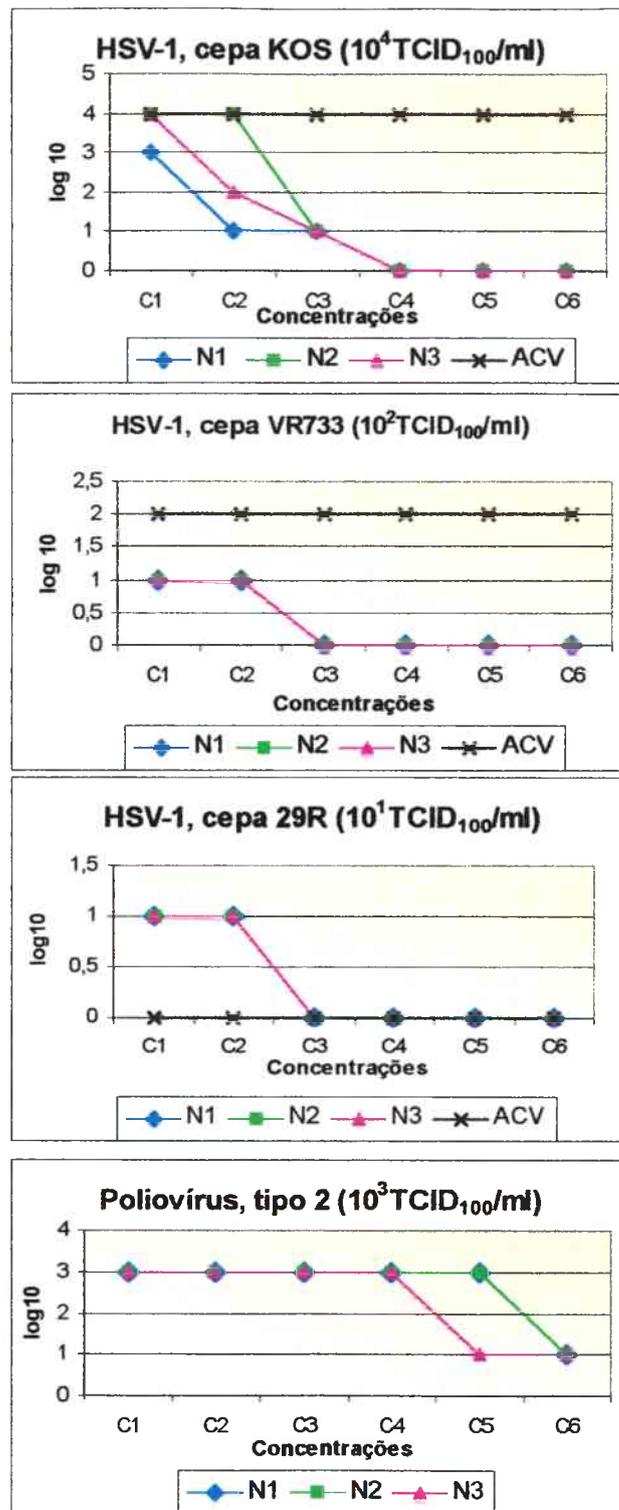


Figura 17. Redução do título infeccioso viral, expressa em log₁₀, com quatro ciclos de multiplicação (MOI=0,01) apresentada pelos extratos nebulizados de marcela N₁, N₂ e N₃ nas concentrações (μg/ml): C₁= 62,5; C₂= 31,2; C₃= 15,6; C₄= 7,8; C₅=3,9; C₆= 1,9. Controle ACV= controle com aciclovir nas concentrações (μg/ml): C₁=10; C₂=5; C₃=2,5; C₄=1,25; C₅=0,62, C₆=0,31.

A diminuição do título infeccioso do poliovírus foi observada até com as menores concentrações testadas dos extratos (C₅ e C₆) e apresentou-se mais homogênea em relação aos três extratos, embora esta redução tenha sido sensivelmente mais acentuada para o extrato N₂ (Figuras 15, 16 e 17).

A pronunciada atividade antipoliiovírus observada para os extratos de marcela deve-se à presença dos seus constituintes majoritários, os flavonóides, mais especificamente as 3-O-metil-flavonas (VAN HOOFF et al., 1984; VLIETINCK et al., 1986; CASTRILLO, VANDEN BERGHE, CARRASCO, 1986; VRIJSEN et al., 1987). Os primeiros estudos da atividade antiviral destes compostos iniciaram-se com o isolamento de derivados da 3-metil-quercetina (3MQ) e do 3-metil-canferol de plantas medicinais chinesas e africanas (ISHITSUDA et al., 1982; VAN HOOFF et al., 1984). VAN HOOFF et al. (1984) relataram que, na concentração de 0,01µg/ml, a 3MQ mostrou um efeito inibitório de 90% do ECP do poliovírus e sua CC₅₀, após 4 dias, foi de 40µg/ml, ou seja, apresentando um IS=4000. Estudos correlacionando a estrutura e a atividade antipoliiovírus indicaram que o grupamento metila na posição C-3 é essencial para a atividade, uma vez que rutina, apigenina e quercetina, possuindo, respectivamente, um grupamento osídico, uma hidroxila e uma função hidrogênio na posição C-3, não exibiram efeito antipoliiovírus (VAN HOOFF et al., 1984).

O mecanismo de ação antipoliiovírus da 3MQ já foi descrito e seus análogos apresentaram o mesmo comportamento. Adicionando-a, 1 a 2h após a infecção viral, ocorre uma diminuição drástica da síntese do RNA e das proteínas virais, por inibição seletiva das etapas precoces da replicação do poliovírus, diferentes da adsorção e da decapsidação, provavelmente a translação. Além disso, a adição de 3MQ às células infectadas, independente da etapa da multiplicação viral, inibiu quase totalmente a incorporação de precursores radioativos ao RNA viral (VLIETINCK et al., 1986; VRIJSEN et al., 1987). O efeito inibitório da 3MQ é reversível, pois as células tratadas recomeçam a sintetizar RNA e proteínas virais quando o composto é removido das culturas (CASTRILLO et al., 1986).

Na presença de 3MQ, a fita simples do RNA viral de polaridade negativa não é transcrita para gerar mais cópias de polaridade positiva, pois o processo requer a participação de proteínas adicionais; acredita-se que essas proteínas sejam o alvo da 3MQ (CASTRILLO & CARRASCO, 1987). Interessante salientar que o bloqueio (=shut-off) da síntese protéica celular persiste mesmo quando a concentração da 3MQ é suficiente para inibir completamente a síntese do RNA e das proteínas virais. Isto sugere que o fator viral que provoca o bloqueio não é, então, uma proteína sintetizada *de novo* pelo vírus (CASTRILLO et al., 1986; VRIJSEN et al., 1987).

Este grupo de substâncias, é, portanto, muito útil para a obtenção de informações complementares sobre o mecanismo molecular de inibição da replicação do poliovírus.

Embora os resultados antipoliovírus apresentados pelos extratos nebulizados de marcela sejam bastante promissores, os estudos dessa atividade não foram levados adiante, uma vez que o mecanismo de ação dos derivados da 3MQ, presentes nos extratos, está bem estabelecido, conforme explicado acima.

IV.4.3. Elucidação do mecanismo da atividade anti-herpética

IV.4.3.1. Ação virucida

O efeito virucida é a inativação extracelular de um vírus. Um determinado produto pode inativar um vírus ligando-se a ele fora das células, o que impediria sua fixação sobre os receptores e conseqüente penetração nas células, ou ainda, destruindo o genoma e matando o vírus.

O estudo da ação virucida foi realizado conforme técnica descrita em Materiais e Métodos. Os extratos nebulizados de marcela N₁, N₂ e N₃ não provocaram redução do título infeccioso das três cepas em estudo do HSV-1, em relação aos controles virais, não exercendo assim qualquer ação virucida (dados não mostrados).

IV.4.3.2. Ação sobre os receptores celulares

Um vírus, para entrar e se multiplicar numa célula hospedeira, precisa primeiro se fixar aos receptores localizados na superfície extracelular. Se as células forem pré-incubadas com algum produto antiviral, esse pode recobrir ou degradar os receptores celulares impedindo a penetração do vírus no meio intracelular, e uma diminuição do título infeccioso viral poderá ser detectada, já que não ocorrerá multiplicação.

Neste experimento, as células foram incubadas, anteriormente à infecção viral, com diferentes concentrações dos extratos N₁, N₂ e N₃, durante 3 e 24h, a 37°C.

As reduções dos títulos infecciosos virais foram baixas (menores do que 1 log₁₀), com relação aos controles virais, em ambos os tempos de pré-incubação (3 e 24h), indicando que os extratos em estudo não atuam degradando ou bloqueando os receptores celulares (dados não mostrados).

IV.4.3.3. Ação anti-herpética intracelular

IV.4.3.3.1. Ação intracelular em função do tempo de adição dos extratos N₁, N₂ e N₃

Quando um produto não inativa os vírus extracelularmente (ação virucida) nem age sobre os receptores celulares impedindo a penetração viral nas células, obviamente ele atua dentro da célula (ação intracelular). Neste caso, é importante determinar em qual etapa do ciclo de multiplicação viral estará ocorrendo inibição.

Para ter certeza de estar avaliando somente a ação intracelular e de que outros fenômenos não estão contribuindo para a atividade antiviral, foi necessário trabalhar em condições experimentais de um único ciclo de multiplicação viral (=18h para o HSV-1).

Se um determinado produto apresentar atividade antiviral somente quando adicionado durante as fases precoces do ciclo de multiplicação viral, isto significa que ele pode atuar inibindo a síntese do DNA viral, como é o caso do aciclovir (no caso de alguns vírus herpéticos) (ELION et al., 1977; SCHAEFFER et al., 1978); e do AZT (no caso do HIV) (LANGTRY & CAMPOLI-RICHARDS, 1989). Se um produto for ativo quando adicionado tardiamente, é porque ele inibe as últimas etapas do ciclo de multiplicação viral, preferencialmente, a síntese das proteínas estruturais, que formam o capsídeo (HAYASHI, HAYASHI, MORITA, 1992).

Para verificar essas possibilidades, os extratos N₁, N₂ e N₃ foram adicionados às células em vários tempos de incubação após a infecção viral: 1; 1,5; 3; 6; 9 e 12h. Após um ciclo de multiplicação viral, os títulos infecciosos foram comparados com aqueles dos controles virais. Para a realização deste experimento foi escolhida a cepa KOS do HSV-1, pois essa apresentou melhores resultados nos ensaios anteriores, sendo que a concentração utilizada para cada um dos três extratos foi inferior às respectivas CC₅₀ (31,25µg/ml).

Tendo em vista o tempo reduzido do experimento (18h), o efeito citopático viral produzido é pouco visível, mesmo nos controles virais, pois os vírions neoformados encontram-se ainda nas células infectadas. Em consequência disso, a suspensão viral referente aos controles virais apresentou uma diminuição do seu título infeccioso de 10⁴ para 10² TCID₁₀₀/ml, após a titulação dos experimentos.

A redução do título infeccioso viral em função do tempo de adição pós-infecção (PI) foi idêntica para os extratos N₁, N₂ e N₃ e apresentou-se pouco acentuada com relação aos controles virais (redução de 0,5 log₁₀ em 1 e 12h PI e 1 log₁₀ em 1,5; 3; 6 e 9h PI) (Figura 18). Estes resultados traduzem uma perturbação e/ou inibição em mais de uma etapa da replicação viral, com exceção da adsorção e da penetração, pois os extratos não mostraram atividade sobre os receptores celulares e nem na montagem dos vírions, uma vez que a redução do título

infeccioso, a partir de 12h, foi menos acentuada do que nas demais etapas do ciclo de multiplicação HSV-1.

Conforme mostra a Figura 18, não foi possível estabelecer exatamente em qual etapa intermediária do ciclo de multiplicação viral os extratos nebulizados N₁, N₂ e N₃ exerceram sua ação antiviral, uma vez que a redução do título infeccioso foi mais acentuada numa ampla faixa do tempo de adição (de 1,5 a 9h PI).

Realizou-se, assim, a avaliação da inibição da síntese do DNA viral, através de uma técnica mais específica, com o objetivo de verificar, mais precisamente, se os extratos em estudo agiriam nesta etapa intracelular da multiplicação do HSV-1.

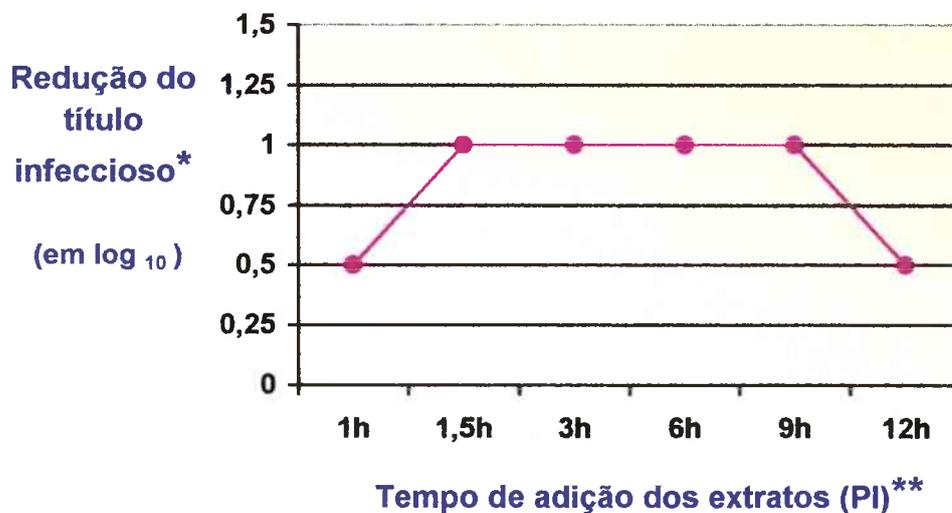


Figura 18. Avaliação da ação anti-herpética intracelular em função do tempo de adição dos extratos nebulizados de marcela N₁, N₂ e N₃ (31,25 µg/ml) (*), com relação ao controle viral: HSV-1 / cepa KOS (10²TCID₁₀₀/ml). (**)
PI=tempos pós-infecção.

IV.3.3.3.2. Ação intracelular por inibição da síntese do DNA do HSV-1

Para a quantificação da inibição da síntese do DNA do HSV-1, cepa KOS, pelo extrato nebulizado de marcela N₂ (escolhido por ser aquele que mostrou melhor atividade nos testes antivirais) foram realizadas reações quantitativas de PCR, conforme protocolo descrito em Materiais e Métodos. Neste ensaio, as culturas foram infectadas (MOI=1) e tratadas com o extrato N₂, numa concentração não citotóxica, além de terem sido preparados controles virais, celulares e com aciclovir. Foram utilizados oligonucleotídeos específicos para a amplificação da região do DNA, comum para o HSV-1 e HSV-2, correspondente ao gene da glicoproteína D do envelope (gD), que juntamente com a gB, são responsáveis pela adsorção do vírus à membrana celular e posterior penetração no citoplasma (LUPI et al., 2000). Optou-se por não extrair o DNA das suspensões virais utilizando fenol-clorofórmio (item III.5.3.3.2) e sim a liberação do mesmo por fervura, uma vez que, num teste prévio obtiveram-se resultados semelhantes utilizando-se as duas técnicas de extração, sendo a liberação do DNA por aquecimento uma técnica muito mais simples (Figura 19).

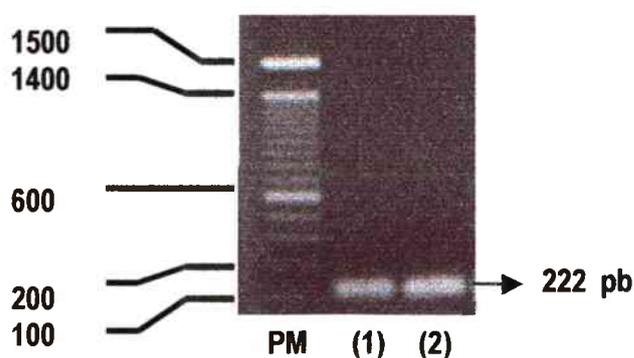


Figura 19. Produtos da reação de PCR obtidos com suspensões do controle viral do HSV-1 (cepa KOS), submetidas à extração do DNA com fenol-clorofórmio (1) e submetidas à fervura para liberação do DNA viral (2). Gel de agarose a 1% corado com solução de brometo de etídeo a 0,5 µg/ml e visualizado por exposição sob luz UV. PM= marcador de peso molecular, pb= pares de bases.

Conforme pode ser observado na Figura 20, o extrato nebulizado de marcela testado - N₂ - , na concentração de 31,25 µg/ml, nas diferentes diluições utilizadas (1/2 até 1/1024), não mostrou ser capaz de inibir a síntese do DNA viral, em comparação com os controles virais. Por sua vez, o aciclovir mostrou sua forte capacidade inibitória, na concentração de 10µg/ml, a partir da diluição 1/4.

Estes resultados indicam que a ação anti-herpética intracelular do extrato N₂ não inclui inibição da síntese do DNA viral, influenciando, no entanto, aqueles eventos que ocorrem entre a segunda e a nona hora do ciclo de multiplicação do HSV-1, ou seja, a transcrição e a tradução das proteínas virais (COLBÈRE, 1975).

Isso deve ter ocorrido, provavelmente, por se tratar de um extrato vegetal padronizado e não de uma substância isolada, no qual existe mais de um composto, com diferentes características físico-químicas, interagindo de forma sinérgica e/ou antagônica, em etapas distintas do ciclo de multiplicação viral.

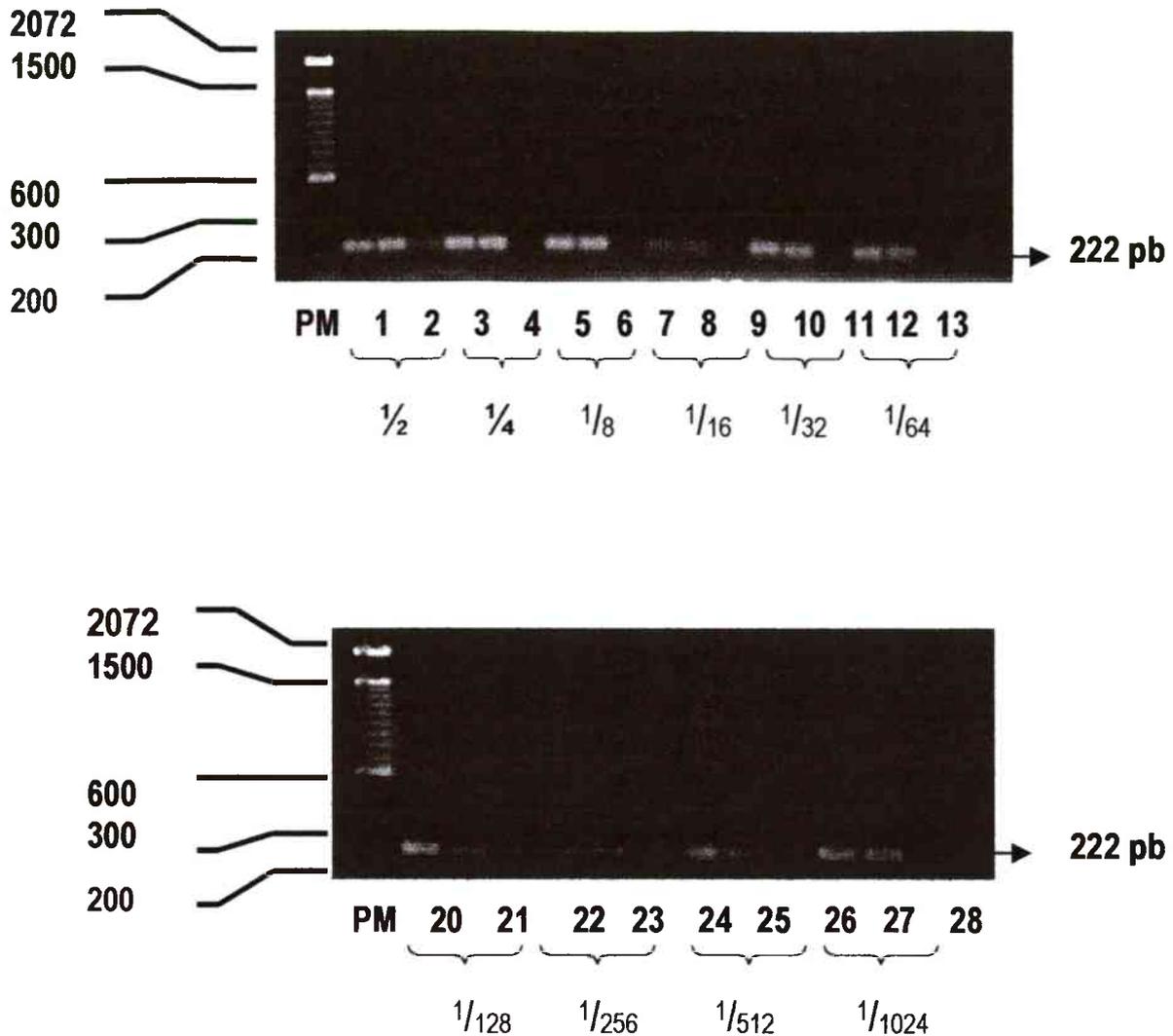


Figura 20: Produtos da reação de PCR obtidos com suspensões do controle viral (HSV-1, cepa KOS) – **linhas 1, 4, 7, 10, 13, 16, 20, 23, 26 e 29**; tratamentos com o extrato nebulizado de marcela N₂ (31,25µg/ml) – **linhas 2, 5, 8, 11, 14, 17, 21, 24, 27 e 30**; e tratamento com aciclovir (10µg/ml) – **linhas 3, 6, 9, 12, 15, 18, 22, 25, 28 e 31**; nas diluições de 1/2 até 1/1024 respectivamente. **Linhas 19 e 32**, controles negativos. Géis de agarose a 1% corados com solução de brometo de etídeo a 0,5 µg/ml e visualizados por exposição sob luz UV. **PM**= marcador de peso molecular.

V. DISCUSSÃO FINAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os extratos nebulizados de marcela avaliados neste trabalho são padronizados, ricos em compostos flavonoídicos, provavelmente, os responsáveis pela atividade antiviral detectada. Há algum tempo, os flavonóides vêm sendo estudados com este objetivo e, apesar da similaridade estrutural básica desses compostos, seu mecanismo e o espectro de ação antiviral dependem do tipo de flavonóide. Desta forma, alguns flavonóides possuem ação virucida (BAKAY et al., 1968), outros têm ação sobre a penetração do vírus nas células-alvo (BERNARD et al., 1993), enquanto outros agem intracelularmente em várias etapas do ciclo de multiplicação viral, ora interferindo nos níveis de AMPc (MUSCI & PRÁGAI, 1985), ora agindo em estágios precoces da replicação do RNA de alguns picornavírus, como é o caso dos derivados das 3-O-metil-flavonas (De MEYER et al., 1991), ou na supressão da síntese protéica do HSV-1, como é o caso da ginkgetina (HAYASHI et al., 1992). Alguns flavonóides podem agir, ao mesmo tempo, em mais de uma etapa do ciclo de multiplicação viral, como por exemplo a quercetina, que possui ação virucida e também intracelular contra os vírus herpéticos (BAKAY et al., 1968).

Com base nos resultados obtidos no estudo do mecanismo da ação anti-herpética dos extratos nebulizados de marcela N₁, N₂ e N₃ pode-se afirmar que, nas condições experimentais deste trabalho, tais extratos não são virucidas e não afetaram a adsorção, a penetração, a decapsidação, a montagem dos vírions, nem inibiram a síntese do DNA viral. Portanto, é provável que eles ajam então nas etapas de transcrição e tradução das proteínas que formarão o capsídeo viral. Experimentos para comprovar tal hipótese deverão ser oportunamente realizados.

O presente trabalho servirá de base para um projeto maior, que é a continuação dos estudos sobre a ação anti-herpética da marcela, que deverão ser realizados, num segundo momento, *in vivo*, a exemplo daquele realizado por AMOROS, FAUCONNIER e GIRRE (1988), que avaliaram o efeito de uma pomada

preparada com uma mistura de duas saponinas, em coelhos portadores de queratite ocular herpética provocada artificialmente; e por AMOUROUX, JEAN, LAMAISSON (1998), que avaliaram o efeito de um creme adicionado de um extrato vegetal seco padronizado em polifenóis totais expressos em catequina, em camundongos pelados (*hairless mice*). Os resultados desta segunda etapa de estudos, aliados a estudos clínicos complementares a serem realizados a exemplo daqueles publicados por WÖLBLING & LEONHARDT (1994) e KOYTCHEV, ALKEN, DUNDAROV (1999), poderão servir de fundamento para a produção de um fitoterápico genuinamente brasileiro, preparado a partir de extratos padronizados de marcela incorporados numa pomada (PETROVICK & KNORST, 1991; De PAULA et al., 1998), cuja atividade anti-herpética tenha sido comprovada, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Além disso, suas comprovadas ações antiinflamatória tópica e antibacteriana (GUTKIND et al., 1981; SIMÕES, 1988; LIMA, 1990) poderão aliviar os sintomas secundários da infecção herpética, a saber inflamação e infecção bacteriana. A utilização terapêutica deste tipo de preparação possui também a vantagem de que um único produto poderá agir em mais de uma etapa do ciclo de multiplicação viral, aumentando assim sua eficácia.

Nesta mesma linha de raciocínio, a título ilustrativo, pode-se citar o exemplo do medicamento Lomaherpan[®], desenvolvido, produzido e comercializado na Alemanha, país bem conhecido por sua tradição no uso de fitoterápicos, que é um creme elaborado à base de extrato seco de *Melissa officinalis* (melissa-verdadeira). Esse mesmo produto é também comercializado nos Estados Unidos, sob o nome de Herpilyn[®]. A produção desses medicamentos anti-herpéticos teve como base estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, nas décadas de 60 (COHEN, KUCERA, HERRMANN, 1964; RONALD & KUCERA, 1964; KUCERA, COHEN, HERRMANN, 1965; HERRMANN & KUCERA, 1967; KUCERA & HERRMANN, 1967) e de 80 (VANDEN BERGHE, VLIETINCK, VAN HOOFF, 1986), e que foram retomados recentemente (DIMITROVA et al., 1993; WÖLBLING & LEONHARDT, 1994; KOYTCHEV, ALKEN,

DUNDAROV, 1999) com o intuito de melhor fundamentar tal utilização. Esse exemplo mostra a importância desse tipo de investigação, que fornece subsídios para uma terapia anti-herpética alternativa aos medicamentos já existentes no mercado.

O conjunto dos resultados aqui mostrados também exemplifica o tipo de trabalho que deve ser feito para detectar atividades farmacológicas em extratos de plantas brasileiras, que possam servir de subsídio para estudos multidisciplinares com o objetivo de colaborar com a resolução de problemas de saúde da população.

VI. CONCLUSÕES

- A avaliação da citotoxicidade dos extratos nebulizados de marcela N₁, N₂ e N₃ foi realizada através da observação microscópica das alterações morfológicas celulares e da determinação da viabilidade celular com Azul de Trypan, o que permitiu estimar a concentração citotóxica a 50% (CC₅₀) de 62,5µg/ml para os três extratos em estudo.
- A avaliação da citotoxicidade das misturas de adjuvantes usadas na preparação de cada um dos extratos nebulizados de marcela N₁, N₂ e N₃ foi realizada através da observação microscópica das alterações morfológicas celulares, o que permitiu estimar a concentração citotóxica a 50% (CC₅₀) de 125µg/ml para as três misturas de adjuvantes. Isto significa que a citotoxicidade na concentração de 62,5 µg/ml encontrada para os extratos nebulizados N₁, N₂ e N₃ deve-se exclusivamente à presença do extrato seco de marcela.
- A avaliação da genotoxicidade dos extratos nebulizados de marcela N₁, N₂ e N₃ foi realizada através do Ensaio do Cometa, não tendo sido encontrados, nas concentrações não citotóxicas utilizadas, danos no DNA celular em 24, 48 e 72h de exposição aos extratos.
- A potencial atividade antiviral dos extratos nebulizados de marcela N₁, N₂ e N₃ foi avaliada, preliminarmente, através da inibição do efeito citopático virai, tendo sido estimada a concentração efetiva a 50% (CE₅₀) e calculado o índice de seletividade (IS=CC₅₀/CE₅₀) para cada extrato. Os valores de IS obtidos para o poliovírus foram idênticos para os três extratos (IS~64), podendo ser considerados bastante elevados, o que indica promissora atividade antiviral e segurança do ponto de vista toxicológico. Os valores de IS encontrados para o HSV-1 (cepas KOS,

VR733 e 29R/resistente ao aciclovir) foram similares para os três extratos em estudo, com valores acima de 8 destacando-se, porém, o extrato N₂, para a cepa KOS do HSV-1, que apresentou IS~33.

- Os resultados obtidos na avaliação da inibição do efeito citopático viral foram confirmados e quantificados através da redução do título infeccioso, em um e em quatro ciclos de multiplicação viral. O extrato N₂, numa concentração inferior à sua CC₅₀, mostrou ser o mais ativo reduzindo o título infeccioso do HSV-1, cepa KOS, em aproximadamente 100% (redução de 5log₁₀).
- Os estudos da atividade antipoliiovírus dos extratos nebulizados de marcela N₁, N₂ e N₃ não foram aprofundados, uma vez que essa pronunciada atividade deve-se aos constituintes flavonoidicos derivados da 3-O-metil-quercetina, abundantes em extratos de marcela, cujo mecanismo de ação já foi bem estabelecido e consta na literatura.
- O estudo do mecanismo da ação dos extratos nebulizados de marcela N₁, N₂ e N₃ mostrou que esses não exercem ação virucida nem têm atividade na adsorção e na penetração viral, sendo que a atividade anti-herpética detectada ocorre intracelularmente, mas não no processo de decapsidação nem no de montagem dos vírions.
- O estudo da ação anti-herpética intracelular dos extratos nebulizados de marcela N₁, N₂ e N₃, em função do seu tempo de adição pós-infecção (PI), indicam que os mesmos atuam num amplo intervalo de tempo PI, ou seja, reduzindo a replicação viral em mais de um estágio do ciclo de multiplicação do HSV-1. Isto ocorreu, provavelmente, por tratar-se de extratos e não de substâncias isoladas, já que os

primeiros contêm um grande número de compostos interagindo em diferentes momentos do processo replicatório viral.

- A avaliação da inibição da síntese do DNA viral mostrou que o extrato nebulizado de marcela testado N₂, na concentração de 31,25µg/ml, nas diferentes diluições testadas, não mostrou ser capaz de inibir a síntese em pauta.

VII. Referências Bibliográficas

- ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; SANCHES PALOMINO, S.; CARRASCO, L. - Antiviral activity of medicinal plant extracts. **Phytother.Res.**, 11:198-202, 1997.
- ADAMS, J. & MERLUZZI, V.J., ed. - **The search for antiviral drugs - case histories from concept to clinic.** Boston, Birkhäuser, 1993. 238p.
- AMOROS, M.; FAUCONNIER, B; GIRRE, L. - Effect of saponins from *Anagallis arvensis* on experimental herpes simplex keratitis in rabbits. **Planta Med.**, 54(2):128-131, 1988.
- AMOUROUX, P.; JEAN, P.; LAMAISON, J.L. - Étude de l'influence de la formulation galénique d'une crème dermique à base de procyanidines polymères et de son efficacité sur les lésions cutanées induites par le virus de l'herpes. **J.Pharm.Belg.**, 53(1):24-30, 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. **Mut.Res.**, 307: 261-271, 1994.
- ANDERSON, D.; YU, T.W.; MC GREGOR, D.B. - Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. **Mutagenesis**, 15:8539-555, 1998.
- AURELUIS, E.; JOHANSSON, B.; SKÖLDENBERG, B.; STALAND. A.; FORSGREN, M. - Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. **Lancet**, 337: 189-192, 1991.
- BAKAY, M.; MUSCI, I.; BÉLÁDI, I.; GÁRBOR, M. - Effect of flavonoids and related substances. **Acta Microbiol.**, 15: 223-227, 1968.
- BASSANI, V.L. - **Valorisation de formes galéniques végétales. Desalcoolisation et concentration des solutions extractives sur membrane d'osmose inverse.** Montpellier, 1990. (Tese - Doutorado - Université de Montpellier, França)

- BERNARD, D.L.; SMEE, D.F.; HUFFMAN, J.H.; MEYERSON, L.R.; SIDWELL, R.W. – Antiherpesevirus activity and mode of action of SP-303, a novel plant flavonoid. **Chemotherapy**, 39:203-211, 1993.
- BEUSCHER, N.; BONIDET, C.; NEUMANN-HAEFELIN, D.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. – Antiviral activity of African medicinal plants. **J.Ethnopharmacol.**, 42:101-109, 1994.
- BOURNE, K.Z.; BOURNE, N.; REISING, S.F.; STANBERRY, L.R. - Plant products as topical microbicide candidates: assessment of *in vitro* and *in vivo* activity against herpes simplex virus type 2. **Antiviral Res.**, 42:219-226, 1999.
- BROUSSALIS, A.M.; FERRARO, G.E.; GURNI, A.; COUSSIO, J.D. – Phenolic constituents of four *Achyrocline* species. **Biochem.Syst.Ecol.**, 16(4):401-402, 1988.
- BROWN, J.P. - A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. **Mut.Res.**, 75: 243-277, 1980.
- CASTRILLO, J.L. & CARRASCO, L. - Action of 3-methylquercetin on poliovirus RNA replication. **J.Virol.**, 61(10): 3319-3321, 1987.
- CASTRILLO, J.L.; VANDEN BERGHE, D.; CARRASCO; L. - 3-methylquercetin is a potent and selective inhibitor of poliovirus RNA synthesis. **Virology**, 152: 219-227, 1986.
- CHE, C.T. - Plants as a source of potential antiviral agents. In: WAGNER, H.; FARNSWORTH, N. R., ed. - **Economic and medicinal plants research**. London, Academic, 1991, v. 5. p.167-251.
- CHU, C. K.& CUTLER, H. G. ed. - **Natural products as antiviral agents**. New York, Plenum, 1992. 279p.
- CLEMENTS, J.B.; TIMBURY, M.C.; GRIFFITHS, P.D. - Herpesviridae. In: COLLIER, L.H.; TIMBURY, M.C., ed.- **Principles of bacteriology, virology and immunity**. 8.ed. London, Edward Arnold, v. 4, 1990. p. 415-429.

- COHEN, R.A.; KUCERA, L.S.; HERRMANN, E.C. – Antiviral activity of *Melissa officinalis* (lemon balm) extract. **Proc.Soc.Exp.Biol.**, 117:431-434, 1964.
- COLBÈRE, F. – L'herpèsvirus simplex: structure, réplication et biologie. **Bull.Inst.Pasteur**, 73:203-254, 1975.
- COLLINS, A.; DISINSKÁ, 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, **Env.Mol.Mut.**, 30: 139-146, 1997.
- COMBES, R.D. - Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chem.Indust.**, 24: 950-954, 1992.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. - Natural products in drug discovery and development. **J.Nat.Prod.**, 60:52-60, 1997.
- De CLERCQ, E. - Antivirals for the treatment of herpesvirus infections. **J.Antimicrob. Chemotherapy**, 32 (suppl. A): 121-132, 1993.
- De MEYER, N.; HAEMERS, A.; MISHRA, L., PANDEY, H.K.; PIETERS, L.A.C.; VANDEN BERGHE; D.A.; VLIETINCK, A.J. - 4'-hydroxi-3-methoxyflavones with potent antipicornavirus activity. **J.Med.Chem.**, 34: 736-746, 1991.
- De PAULA, I.C.; ORTEGA, G.G.; BASSANI, V.L.; PETROVICK, P.R. – Development of ointment formulations prepared with *Achyrocline satureioides* spray-dried extracts. **Drug Dev.Ind.Pharm.**, 24:235-241, 1998.
- DIMITROVA, Z.; DIMOV, B.; MANOLOVA, N.; PANCHEVA, S.; ILIEVA, D.; SHIRSHKOV, S. – Antiherpes effect of *Melissa officinalis* L. extracts. **Acta Microbiol.Bulg.**, 29:65-72, 1993.
- DREHER, D. & JUNOD, A.F. - Role of oxygen free radicals in cancer development. **Eur.J.Cancer**, 32 A: 30-38, 1996.
- DUTHIE, S. J.; JOHNSON, W.; DOBSON, V.L. - The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells. **Mut.Res.**, 390:141-151, 1997a.

- 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 oxidised pyrimidines) in human lymphocytes. **Mut.Res.**, 393: 223-231, 1997b.
- ELION, G.B.; FURMAN, P.A.; FYFE, J.A.; DE MIRANDA, P.; BEAUCHAMP, L.; SCAEFFER, H.J. - Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxymethyl) guanosine. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, 74(12):5716-5720, 1977.
- ELLIGER, C.A.; HENIKA, P.R.; MAC GREGOR, J.T. - Mutagenicity of flavones, chromone and acetophenones in *Salmonella typhimurium*. **Mut.Res.**, 135:77-86, 1984.
- ENDERS, J.F.; WELLER, T.H.; ROBBINS, F.C. - Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in the culture of various embryonic tissues. **Science**, 109:85-87, 1949.
- FARNSWORTH, N.R. & KAAS, C.J. - An approach utilizing information from traditional medicine to identify tumor inhibiting plants. **J.Ethnopharmacol.**, 3: 85-100, 1981.
- FAULDS, D. & HEEL, R.C. - Ganciclovir: a review of this antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections. **Drugs**, 39(4):597-638, 1990.
- FERRARO, G.E.; NORBEDO, C.; COUSSIO, J.D. - Polyphenols from *Achyrocline satureioides*. **Phytochemistry**, 20(8): 2053-2054, 1981.
- FLINT, S.J.; ENQUIST, L.W.; KRUG, R.M.; RACANIELLO, V.R.; SKALKA, A.M. - **Principles of Virology: molecular, biology, pathogenesis and control**. Washington, ASM, 2000. p. 662-714.
- GIRARD, M. & HIRTH, L. - **Virologie moléculaire**. 2.ed. Paris, Doin, 1989. 617p.
- GREEN, M.H.; LOWE, J.E.; DELANEY, C.A.; GREEN, I.C. - Comet assay to detect nitric oxide dependent DNA damage in mammalian cells. **Methods Enzimol.**, 269:243-266, 1996.

- GUTKIND, G.O.; MARTINO, V. GRAÑA, N.; COUSSIO, J.D.; TORRES, R.A. – Screening of South American plants for biological activity: antibacterial and antifungal activity. **Fitoterapia**. 52:213-218, 1981.
- HALLIWELL, B. & ARUOMA, O.I. - DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement in mammalian systems. **FEBS Lett.**, 281: 9-19, 1991.
- HÄNSEL, R. & OHLENDORF, D. - Eins neues im Ring B Unsubstituiertes Flavon aus *Achyroclines satureioides*. **Archiv.Pharm.**, 304(12): 893-896, 1971.
- HARVEY, A.L. – Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? **Trends Pharmacol.Sci.**, 20:196-198, 1999.
- HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; MORITA, N. - Mechanism of action of the antiherpesvirus biflavone ginkgetin. **Antimicrob.Agents Chemother.**, 36(9):1890-1893, 1992.
- HELBIG, R. & SPEIT, G. - DNA effects in repair-deficient V79 Chinese hamster cells studies with the comet assay. **Mut.Res.**, 377:279-286, 1997.
- HERRMANN, E.C. & KUCERA, L.S. – Antiviral substances in plant of the mint family (Labiatae). II Nontannin polyphenol of *Melissa officinalis*. **Proc.Soc.Exp.Biol.**, 214: 869-874, 1967.
- HIRSCHMANN, G.S. The constituents of *Achyrocline satureioides* (Lam.)DC. **Rev.Latinoam.Quim.**, 15(3):134-135, 1984.
- HOUGHTON, P.J. Medicinal plants and the control of parasites: Compounds with anti-HIV activity from plants. **T.Roy.Soc.Trop.Med.H.**, 90:601-604, 1996.
- HU, J.M. & HSIUNG, G.D. - Evaluation of new antiviral agents: *In vitro* perspectives. **Antiviral Res.**, 11: 217-232, 1989.
- HUDSON, J.B. - **Antiviral compounds from plants**. Florida, CRC, 1990. 200p.
- ISHITSUDA, H.; OHSAWA, C.; OHIWA, T.; UMEDA, I.; SUHARA, Y. - **Antimicrob.Agents Chemother.**, 22: 611, 1982.
- KALOGA, M.; HÄNSEL, R.; CYBULSKI, E.M. - Isolierung eines Kawapyrons aus *Achyrocline satureioides*. **Planta Med.**, 48: 103-104, 1983.

- KOBAYASHI, H., SUGIYMAMA, C., MORIKAWA, Y., HAYASHI, M., SOFUNI, T. - A comparison between microscopic analysis and computerised image analysis in the single cell electrophoresis assay, **MMS Commun.**, 3: 103-115, 1995.
- KOYTCHEV, R.; ALKEN, R.G.; DUNDAROV, S. – Balm mint extract (Lo-701) for topical treatment of recurring herpes labialis. **Phytomedicine**, 6(4):225-230, 1999.
- KUCERA, L.S.; COHEN, L.C.; HERRMENN, E.C. - Antiviral activities of the lemon balm plant. **Ann.N.Y.Acad.Sci.**, 130:474-482, 1965.
- KUCERA, L.S. & HERRMANN, E.C. – Antiviral substances in plant of the mint family (Labiatae). I. Tanin of *Melissa officinalis*. **Proc,Soc.Exp.Biol.**, 124:865-869, 1967.
- LANGELOH, A. & SCHENKEL, E.F. - Atividade antiespasmódica em extrato hidroalcoólico de marcela (*Achyrocline satureioides*, DC, Compositae). **Oreades**, 8: 454-458, 1982.
- LANGTRY, H.D. & CAMPOLI-RICHARDS, D.M. – Zidovudine – a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, 37:408-450, 1989.
- LARZUL, D. - La PCR: principes et applications. **Immunoanal.Biol.Spec.**, 16:19-28, 1989.
- LIMA, C.S.A. - **Estudo químico e biológico de *Achyrocline satureioides* DC.** Recife, 1990. (Tese - Mestrado Universidade Federal de Pernambuco).
- 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. **Teratogen.Carcin.Mut.**, 19:109-119, 1999.
- LUPI. O.; SILVA, A.G.; PEREIRA Jr, A.P. - **Herpes- Clínica, diagnóstico e tratamento.** São Paulo, Médica Científica, 2000. 278p.
- MAC GREGOR, J.T.; WEHR, C.M.; MANNERS, G.D.; JURD, L. - *In vivo* exposure to plant flavonols: Influence on frequencies of micronuclei in mouse erythrocytes and sister-chromatid exchange in rabbit lymphocytes. **Mut.Res.**, 124: 255-270, 1983.

- MADIGADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. - **Biology of microorganisms**. 8.ed. New Jersey, Simon & Schuster, 1997. p. 248-303.
- MAMMETTE, A. - **Virologie médicale à l'usage des étudiants et des praticiens**. 12.ed. La Madeleine, C. et R., 1992. 469p.
- MASTERS, K. - **Spray-drying**. 2.ed. New York, John Wiley, 1976. 684 p.
- MENTZ, L.A. & SCHENKEL, E.P. - Plantas medicinais: a coerência e a confiabilidade das indicações terapêuticas. **Cad.Farm.**, 5:93-119, 1989.
- MESQUITA, A.L.; CORREA, D.B.; PADUA, A.P.; GUEDES, M.L.O.; GOTTLIEB, O.R. - Flavonoids from four Compositae species. **Phytochemistry**, 25(5):1255-1256, 1986.
- MIYAMAE, Y.; YAMAMOTO, M.; SASAKI, Y.F.; KOBAYASHI, H.; IGARASHI-SOGA, M.; SHIMOI, K.; HAYASHI, M. - Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the *in vivo* single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. **Mut.Res.**, 418:131-140, 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. **Mut.Res.**, 415: 229-235, 1998b.
- MUSCI, I & PRÁGAI, B.M. - Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids. **Experientia**, 41:930-931, 1985.
- MUSCI, I. - Combined antiviral effects of flavonoids and 5-ethyl-2'-deoxyuridine on the multiplication of herpesviruses. **Acta virol.**, 28:395-400, 1984.
- NAGAO, M., MORITA, M, N.; YAHAGI, T.; SHIMIZU, M.; KUROYANAGI, M.; FUKUOKA, M.; YOSHIGIRA, K.; NATORI, S.; FUJINO, T.; SUGIMURA, T. - Mutagenicities of 61 flavonoids and 11 related compounds. **Environ.Mutagen.**, 3: 401-419, 1981.
- NARDONE, R.M. - Toxicity testing in vitro. In: Rotblat, G.H.; Cristofalo, V.J. ed. - **Growth, nutrition and metabolism of cells in culture**. New York, Academic, 1977. v. 3. p. 471-495.

- NOWOTNY, A.; MENDEL, R.; WEGNER, U.; MUNDT, S.; LINDEQUIST, U. - Antiviral activity of an aqueous extract of the Cyanobacterium *Micricystis aeruginosa*. **Phytother.Res.**, 11: 93-96, 1997.
- OLIVE, P.L.; BANATH, J.P.; DURAND, P.E. - Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual chinese hamster cells. **J.Natl.Cancer Inst.**, 82:779-783, 1990.
- ÖSTLING, O. & JOHANSON, K.J. - Microelectrophoretic study of radiation DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem.Bioph.Res.Co.**, 123: 291-298, 1984.
- PATEL, R. - Valaciclovir: development, clinical utility and potencial. **Exp.Opin.Invest.Drugs**, 6(2): 173-188, 1997.
- PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. - **Microbiology: concepts and applications**. 2. ed. São Paulo, Marcon Books, 1997. 1027p.
- PETROVICK, P.R. & KNORST, M.T. - Characterization of a concentrated extract of *Achyrocline satureioides* as an intermediary product in the preparation of an oinment. **Phytoh.Res.**, 5(5): 237-238, 1991.
- PETROVICK, P.R.; SONAGLIO, D.; MELLO, J.C.P.; FRANCO, S.L.; CARDOSO, M.L. - Eficácia terapêutica e padronização de fitoterápicos, In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 10, São Paulo 1988. **Anais**. São Paulo, 1988. p.18.
- POPP, R. & SCHIMMER, O. - Induction of sister chromatid exchanges (SCE), polyploidy and micronuclei by plant flavonoids in human lymphocyte cultures. A comparative study of 19 flavonoids. **Mut.Res.**, 246:205-213, 1991.
- PUECH, M.L. - **Elaboration d'un extrait sec nebulisé de vigne rouge. Place des substances auxiliaires**. Montpellier, 1991. (Tese - Mestrado - Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier, França).
- PUHLMANN, J. - **Immulogisch aktive Polysaccharide aus den Herbaldrogen von *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. und *Arnica montana* L. sowie aus**

- Arnica montana* L Zellkulturen.** Munich, 1989. (Tese - Doutorado -. School of Chemistry and Pharmacy, Ludwig-Maximilian University, Alemanha)
- REED, L.J. & MUENCH, H. - A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **Am.J.Hyg.**, 27(3): 493-497, 1938.
- RICCI, S.; FRANCISCI, D.; LONGO, V. DEL FAVERO, A. - Central nervous system side effects of antiviral drugs. **Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.Toxicol.**, 26(8): 400-408, 1988.
- ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. - **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology.** Baltimore, Williams & Wilkins, 1996.
- RONALD, L. & KUCERA, L.S. - Antiviral activity of *Melissa officinalis* (lemon balm) extract. **Proc.Soc.Exp.Biol.**, 117:1-3, 1964.
- ROIZMAN, B. - Herpesviridae. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. ed. - **Virology**. 3.ed. New York, Lippincott-Raven, v.2, 1996. p. 2221-2341.
- ROJAS, E.; LOPEZ, M.C.; VALVERDE, M. - Single cell gel electrophoresis: methodology and applications. **J.Chromatogr.B**, 722: 225-254, 1999.
- ROMING, T.L.; WEBER, N.D.; MURRAY, B.K.; NORTH, J.A.; WOOD, S.G.; HUGHES, B.G.; CATES, R.G. - Antiviral activity of Panamanian plant extracts. **Phytother.Res.**, 6: 38-43, 1992.
- RUEFF, J.; LAIRES, A.; BORBA, J.; CHAVECA, T.; GOMES, M.I.; HALPERN, M. - Genetic toxicology of flavonoids: the role of metabolic conditions in the induction of reverse mutation. SOS functions and sister chromatid exchanges. **Mutagenesis**, 1:213-221, 1986.
- RYDBERG, B. & JOHANSON, K.J. - Estimation of single strand breaks in single mammalian cells. In: HANAWALT, P.C.; FRIEDBERG, E.C.; FOX, C.F., ed, **DNA Repair Mechanisms.** New York, Academic, 1978, p. 465-468.

- SAMBROOK, J.; FRITCH, E.F.; MANIATS, T. - Gel electrophoresis of DNA. In: _____ **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v.
- SANTOS, A.L.G. - **Estudo tecnológico e biológico de soluções extrativas aquosas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Asteraceae (marcela)**. Porto Alegre, 1996. (Tese - Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul).
- SCHAEFER, H.J.; BEAUCHAMP, L.; DE MIRANDA, P.; ELION, G.B.; BAUER, D.J.; COLLINS, P. - 9-(2-hydroxymetoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. **Nature**, 272:583-585, 1978.
- SHU, Y, Z. - Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **J.Nat.Prod.**, 61: 1053-1071, 1998.
- SIDWELL, R.W. - Determination of antiviral activity. **Drugs Pharm.Sci.**, 27: 433-480, 1986.
- SIMAZAKI, D. Protocols of Comet Assay. Disponível na Internet. <http://env.tu-tokvo.a.c.ip/~shimazak/comet2-e.html>. 22 fevereiro 1999.
- SIMÕES, C.M.O. & BAUER, L. - Investigação químico-farmacológica de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae. In: SECOND NATIONAL SYMPOSIUM ON PHARMACOLOGY AND CHEMISTRY OF NATURAL PRODUCTS, João Pessoa, Pb, Brasil, 1983. **Anais**. João Pessoa, 1983. p. 415-419.
- SIMÕES, C.M.O. - **Investigação químico-farmacológica de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (marcela)**. Porto Alegre, 1984. (Tese - Mestrado - Universidade do Rio Grande do Sul).
- SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. - **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, Editora da Universidade – UFRGS, 1986a. p.108-109.

- SIMÕES, C.M.O.; RECH, N. LAPA, A.J. - Investigação farmacológica do extrato aquoso de folhas/caule de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae (marcela). **Cad.Farm.**, 2: 37-54, 1986b.
- SIMÕES, C.M.O. - Antiinflammatory action of *Achyrocline satureioides* extracts applied topically. **Fitoterapia**, 59(5):419-421, 1988.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. - Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae. **J.Ethnopharmacol.**, 22:281-293, 1988.
- SIMÕES, C.M.O. - **Étude de l'activité et des relations structure-activité de substances d'origine naturelle: plantes utilisées en médecine traditionnelle au Sud du Brésil. Sapogénines et saponosides triterpéniques.** Rennes, 1992. (Tese - Doutorado – Université de Rennes, França).
- SIMÕES, C.M.O.; AMOROS, M.; GIRRE, L. - Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. **Phytother.Res.**, 13:323-328, 1999a.
- SIMÕES, C.M.O.; BETTEGA, J.R.; SINCERO, T.; MOREIRA, L.; TENCONI, D.; HESS, R.; BARBOSA, R.; SIMAS, M.; FARIAS, M.; BARARDI, C. - Antiviral activity of South Brazilian plant extracts. In: XIth International Congress of Virology. Sydney, Australia, 1999b. **Anais.** Sydney, Australia, 1999b. p. 307.
- SIMÕES, C.M.O.; FALKENBERG, M.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; AMOROS, M.; GIRRE, L. - Antiviral activity of South Brazilian medicinal plant extracts. **Phytomedicine**, 6(3): 205-214, 1999c.
- SINDAMBIWE, J.B; CALOMME, M.; COS, P.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, D.; VANDEN BERGHE, D. – Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. **J.Ethnopharmacol.**, 65: 71-77, 1999.
- SINGH, N.P; McCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. - A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp.Cell Res.**, 175(184): 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. **Mut.Res.**, 252:289-296, 1991.
- SONAGLIO, D. - **Padronização de extrato hidroalcoólico de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (marcela)**. Porto Alegre, 1987. (Tese - Mestrado - Universidade do Rio Grande do Sul).
- SPRUANCE, S.L.; TYRING, S.K.; DE GREGORIO, B.; MILLER, C.; BEUTNER, K. - A large-scale, placebo-controlled, dose-ranging trial of peroral valaciclovir for episodic treatment of recurrent herpes genitalis. **Arch.intern.Med.**, 156:1729-1735, 1996.
- STREISSLE, G.; SCHWOBEL, W.; HEWLETT, G. - Evaluation of antiviral compounds in cell cultures with acute or persistent virus infections. **Adv.Cell Cult.**, 1: 67-90, 1981.
- TAYLOR, R.S.L.; MANANDHAR, N.P.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H.N. - Antiviral activities of Nepalese medicinal plants. **J.Ethnopharmacol.**, 52:157-163, 1996.
- TEIXEIRA, H.F. - **Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae - marcela**. Porto Alegre, 1996. (Tese - Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul).
- TICE, R.R.; & STRAUSS, G.H. - The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. **Stem Cells**, 13: 207-214, 1995.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. - **Microbiology**. 6.ed. California, Addison Wesley Longman, 1998. 832p.
- TSUCHIYA, Y.; SHIMIZU, M.; HIYAMA, Y.; ITOH, K.; HASHIMOTO, Y.; NAKAYAMA, M.; HORIE, T.; MORITA, N. - Antiviral activity of natural occurring flavonoids *in vitro*. **Chem.Pharm.Bull.**, 33(9): 3881-3886, 1985.

- VAN HOOF, L.; VANDEN BERGHE, D.A.; HATFIELD, G.M.; VLIETINCK, A.J. - Plant antiviral agents; 3-metoxiflavones as potent inhibitors of viral-induced block of cell synthesis. **Planta Med.**, 50(6); 513-517, 1984.
- VANDEN BERGHE, D.A. & VLIETINCK, A.J.; VAN HOOF, L. - Plant products as potencial antiviral agents. **Bull.Inst.Pasteur**, 84:101-147, 1986.
- VANDEN BERGHE, D.A. & VLIETINCK, J. - Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M. & HARBORNE, J.B., ed. - **Methods in plant biochemistry**. London, Academic, 1991. v.6. p.47-69.
- VARGAS, V.M.F.; MOTTA, V.E.P.; LEITÃO, A.C.; HENRIQUES, J.A.P. - Mutagenic and genotoxic effect of aqueous extract of *Achyrocline satureioides* in prokariotic organisms. **Mut,Res.**, 240:13-18, 1990.
- VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D.A.; VAN HOOF, L.M.; VRIJSEN, R.; BOEYÉ, A. - Antiviral activity of 3-methoxiflavones. **Prog.Clin.Biol.Res.**, 213: 537-540, 1986 .
- VRIJSEN, R.; EVERAERT, L.; VAN HOOF, L.M.; VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D.A.; BOEYÉ, A. - The poliovirus induced shutt-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3-metylquercetin, a flavonoid which blocks viral protein and RNA synthesis. **Antiviral Res.**, 7: 35-42, 1987.
- WAGNER, H.; MAURER, G.; FARKAS, L.; HANSEL, R.; OHLENDORF, D. - Zur Structur und Synthese von gnaphaliin, methyl-gnaphaliin aus *Gnaphalium obtusifolium* L. und *Achyrocline satureioides*. **Chem.Ber.**, 104:2381-2388, 1971.
- WAGNER, H. & HORHAMMER, L. - **Pharmacognosy and phytochemistry**. Berlin, Springer, 1971. p. 274.
- WAGNER, H.; PROKSCH, A.; RIESS-MAURER, I.; VOLLMAR, A.; ODENTHAL, S.; STUPPNER, H.; JURCIC, K.; TURDU, M.L.; FANG, J.N. - Immunstimulierend polysaccharide (heteroglycane) aus höheren pflanzen. **Arzneim.Forsch.**, 35(2):1069-1075, 1985.

WALUM, E.; STENBERG, K.; JENSSEN, D. - **Understanding cell toxicology.**

Principles and practice. New York, Ellis Horwood, 1990, p. 101-117.

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

603p.

WÖLBLING, R.H. & LEONHARDT, K. – Local therapy of herpes simplex with dried extract from *Melissa officinalis*. **Phytomedicine**, 1:25-31, 1994.