

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

CARLA REGINA ANDRIGHETTI FRÖHNER

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, DA
GENOTOXICIDADE E DA POTENCIAL ATIVIDADE
ANTIVIRAL DA VIOLACEÍNA, PRODUZIDA PELA
*Chromobacterium violaceum***

Florianópolis

2003

CARLA REGINA ANDRIGHETTI FRÖHNER

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, DA
GENOTOXICIDADE E DA POTENCIAL ATIVIDADE
ANTIVIRAL DA VIOLACEÍNA, PRODUZIDA PELA
*Chromobacterium violaceum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do grau de Mestre em Farmácia. Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões

Florianópolis

2003

Andrighetti-Fröhner, Carla Regina

Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *Chromobacterium violaceum* / Carla Regina Andrighetti-Fröhner. Florianópolis, 2003. 135 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

1. violaceína; 2. citotoxicidade; 3. genotoxicidade; 4. ensaio do Cometa; 5. antiviral; 6. herpes vírus simples tipo 1; 7. poliovírus; 8. rotavírus; 9. vírus da hepatite A; 10. adenovírus.

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) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC.

Este trabalho recebeu apoio do Programa de Pós-Graduação em Farmácia, do CNPq e, também, da CAPES através da concessão da bolsa de Mestrado.

Dedico este trabalho ao meu Amor, Gilson, pelo carinho, pelos bons momentos na alegria, pela força nos dias difíceis, por acreditar em mim e por estar sempre ao meu lado.

Te amo!

AGRADECIMENTOS

À Deus por orientar os meus caminhos, pelas bênçãos e maravilhas que derrama sobre a minha vida.

À meus pais e irmãos pelo amor, pelo carinho, pela compreensão e pelas palavras de incentivo.

À família Fröhner pelo apoio, pela compreensão e incentivo.

À professora Cláudia Maria Oliveira Simões pela valiosa orientação, pelo aprendizado, pela amizade e pelo incentivo na busca de um novo caminho.

À professora Célia Regina Monte Barardi (MIP, CCB) pela orientação, atenção e amizade.

Às amigas Thaís e Caroline pela dedicação, pela parceria constante na execução desta dissertação e, principalmente, pela amizade sincera.

Aos amigos do Laboratório de Virologia Aplicada pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos Cecília, Márcia e Rodrigo pela amizade e pelo auxílio na realização desta dissertação.

Às professoras Tânia Beatriz Creczynski-Pasa (CIF, CCS) e Regina Vasconcelos Antonio (BQA, CCB), por terem gentilmente cedido a violaceína.

Aos professores Mário Steindel (MIP, CCB) e Edmundo Grisard (MIP, CCB) pelo apoio.

Ao professor Maurício Sedrez dos Reis (FIT, CCA) pelo auxílio nas análises estatísticas.

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

Aos professores, colegas e amigos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização desta dissertação.

Carla Regina

RESUMO

Os produtos naturais constituem uma fonte inesgotável de compostos com atividades farmacológicas promissoras, incluindo ação antiviral. A *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria Gram (-) encontrada em amostras de solo e água de regiões tropicais e subtropicais de diversos continentes. No Brasil, esta bactéria é amplamente distribuída no Rio Negro e no solo de bancos dos rios da região da Amazônia. A violaceína, o pigmento majoritário produzido por esta bactéria, apresenta várias atividades biológicas, tais como antibiótica, antitumoral, tripanossomicida e antifúngica. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a citotoxicidade, a genotoxicidade e a potencial atividade antiviral da violaceína. A citotoxicidade da violaceína, frente às células VERO, MA104, HEp-2 e FRhK-4, foi avaliada por três metodologias e as concentrações citotóxicas a 50% (CC₅₀) obtidas foram diferentes de acordo com o método empregado: (I) avaliação microscópica das alterações morfológicas celulares: 2,29 ± 0,23 µM (VERO); 2,69 ± 0,12 µM (MA104); 2,42 ± 0,22 µM (FRhK-4) e 2,78 ± 0,13 µM (HEp-2); (II) viabilidade celular - método de exclusão do corante azul de Trypan: 2,23 ± 0,06 µM (VERO); 2,54 ± 0,10 µM (MA104); 2,07 ± 0,05 µM (FRhK-4) e 2,70 ± 0,12 µM (HEp-2). e (III) viabilidade celular - ensaio colorimétrico do MTT: 2,96 ± 0,12 µM (VERO); 3,55 ± 0,22 µM (MA104); 3,14 ± 0,32 µM (FRhK-4) e 3,42 ± 0,05 µM (HEp-2). A violaceína não causou danos significativos ao DNA das células HEp-2 e MA104, nas concentrações testadas (0,19 – 1,5 µM), através do Ensaio do Cometa, quando comparados ao controle negativo (teste *t*-Student $p > 0,05$); entretanto, apresentou ação genotóxica para as células VERO e FRhK-4, na concentração de 1,5 µM, quando comparada com o controle negativo (teste *t*-Student $p < 0,05$). As demais concentrações (0,75; 0,37 e 0,19 µM) não causaram danos ao DNA celular e são estatisticamente semelhantes entre si (teste SNK $p > 0,05$) e ao controle negativo (teste *t*-Student $p > 0,05$). A potencial atividade antiviral da violaceína foi avaliada pelo método de inibição do efeito citopático viral e pelo ensaio do MTT. A violaceína não inibiu o efeito citopático do herpes vírus simplex humano tipo 1 (HSV-1): cepas 29-R, KOS e ATCC/VR-733, do poliovírus humano tipo 2 (PV-2), do rotavírus símio SA11 (RV), do vírus da hepatite A (HAV) cepas: HM-175 e HAF-203, e do adenovírus tipo 5 (AdV-5). As porcentagens de inibição da replicação dos diferentes vírus pela violaceína, obtidas através do ensaio do MTT, foram: 1,42 ± 0,68%; 14,48 ± 5,06% e 21,47 ± 3,74% para o HSV-1 cepa KOS; 5,96 ± 2,51%; 8,75 ± 3,08% e 17,75 ± 5,19%, para o HSV-1 cepa ATCC/VR-733; 5,13 ± 2,38%; 8,18 ± 1,11% e 8,51 ± 1,94% para o PV-2 e 8,30 ± 4,24%; 13,33 ± 4,66% e 24,27 ± 2,18% para o RV, nas concentrações de 0,312; 0,625 e 1,250 µM, respectivamente. A violaceína não demonstrou ação inibitória da replicação do HSV-1 cepa 29-R, do HAV cepas HM-175 e HAF-203 e do AdV-5, através do ensaio do MTT.

Palavras-chave: violaceína; citotoxicidade; genotoxicidade; ensaio do Cometa; atividade antiviral; herpes vírus simplex tipo 1; poliovírus; rotavírus; vírus da hepatite A; adenovírus.

ABSTRACT

Natural products are an inexhaustible source of compounds with promising pharmacological activities, including antiviral action. *Chromobacterium violaceum* is a Gram(-) bacteria found in water samples and soils from tropical and subtropical regions of the world. In Brazil this bacteria is widely distributed in the Rio Negro in the soil of river banks in Amazon region. Violacein, the major pigment produced by this bacteria, showed to have antibiotic, antitumoral and antichagasic activities. In the present work, cytotoxicity and genotoxicity as well the potential antiviral action of violacein were investigated. The toxicity of violacein to VERO, MA104, HEp-2 and FRhK-4 cells was investigated by three methods and the cytotoxic concentration values which cause destruction in 50% of the monolayer cells (CC_{50}) were different depending on the method used: (I) cell morphology evaluation by inverted light microscopy: $2,29 \pm 0,23 \mu\text{M}$ (VERO); $2,69 \pm 0,12 \mu\text{M}$ (MA104); $2,42 \pm 0,22 \mu\text{M}$ (FRhK-4) and $2,78 \pm 0,13 \mu\text{M}$ (HEp-2). (II) cell viability test by Trypan blue dye exclusion method: $2,23 \pm 0,06 \mu\text{M}$ (VERO); $2,54 \pm 0,10 \mu\text{M}$ (MA104); $2,07 \pm 0,05 \mu\text{M}$ (FRhK-4) and $2,70 \pm 0,12 \mu\text{M}$ (HEp-2). (III) cell viability test by MTT assay: $2,96 \pm 0,12 \mu\text{M}$ (VERO); $3,55 \pm 0,22 \mu\text{M}$ (MA104); $3,14 \pm 0,32 \mu\text{M}$ (FRhK-4) and $3,42 \pm 0,05 \mu\text{M}$ (HEp-2). Violacein caused no significant damage to the DNA of HEp-2 and MA104 cells, at different tested concentrations (0,19 – 1,5 μM), as measured by Comet assay, when compared to negative controls (*t*-Student test $p > 0,05$). However violacein showed a genotoxic action for VERO and FRhK-4 cells, at 1,5 μM when compared to negative controls (*t*-Student test $p < 0,05$); other concentrations (0,75; 0,37 e 0,19 μM) did not show DNA damage when compared to negative controls (*t*-Student test $p > 0,05$). Antiviral activity was studied by cytopathogenicity inhibition test and MTT assay. Violacein showed no cytopathic effect inhibition of the tested viruses: herpes simplex virus type 1 (HSV-1 - strains KOS, ATCC/VR733 and 29-R/acyclovir resistant), poliovirus type 2 (PV-2), rotavirus SA11 (RV), hepatitis A virus (HAV - strains HM175 and HAF-203) and adenovirus type 5 (AdV-5). The percentage of inhibition of viral replication by violacein as measured by MTT assay were: $1,42 \pm 0,68\%$; $14,48 \pm 5,06\%$ and $21,47 \pm 3,74\%$ for HSV-1 (strain KOS); $5,96 \pm 2,51\%$; $8,75 \pm 3,08\%$ and $17,75 \pm 5,19\%$, for HSV-1 (strain ATCC/VR-733); $5,13 \pm 2,38\%$; $8,18 \pm 1,11\%$ and $8,51 \pm 1,94\%$ for PV-2, $8,30 \pm 4,24\%$; $13,33 \pm 4,66\%$ and $24,27 \pm 2,18\%$ for RV, at 0,312; 0,625 and 1,250 μM , respectively. Violacein showed no inhibition of viral replication for the viruses: HSV-1 (strains 29-R/acyclovir resistant), HAV (strains HM175 and HAF-203) and AdV-5 as measured by MTT assay.

Keywords: violacein, cytotoxicity assay; genotoxicity assay; Comet assay; antiviral assay; herpes simplex virus type 1; poliovirus; rotavirus; hepatitis A virus; adenovirus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microfotografia eletrônica da <i>Chromobacterium violaceum</i>	18
Figura 2: Estrutura química da violaceína	20
Figura 3: Esquema do processo de extração da violaceína	26
Figura 4: Exemplo da disposição da placa de microtitulação para avaliação da atividade antiviral das diferentes concentrações de violaceína, em relação ao HSV-1, em células VERO, por inibição do efeito citopático (ECP) viral.....	45
Figura 5: Resultados da determinação da citotoxicidade da violaceína frente às células VERO, MA104 e FRhK-4 e HEp-2, avaliada através de diferentes métodos.....	50
Figura 6: Resultados da avaliação da citotoxicidade da violaceína frente a diferentes linhagens celulares, através de três métodos: microscopia das alterações morfológicas celulares, viabilidade celular por exclusão do azul de Trypan e pelo ensaio colorimétrico do MTT.....	51
Figura 7: Resultados da avaliação da genotoxicidade da violaceína frente às linhagens celulares VERO (A) e FRhK-4 (B), tratadas com diferentes concentrações da violaceína (0,19 – 1,5 µM); CN= controle negativo (meio 199); CP1= 100 µM e CP2= 200 µM de peróxido de hidrogênio (controles positivos)	54
Figura 8: Resultados da avaliação da genotoxicidade da violaceína frente às linhagens celulares MA104 (A) e HEp-2 (B), tratadas com diferentes concentrações da violaceína (0,19 – 1,5 µM); CN= controle negativo (meio 199); CP1= 100 µM e CP2= 200 µM de peróxido de hidrogênio (controles positivos)	55
Figura 9: Efeito genotóxico da violaceína, após uma hora de incubação, avaliado através do Ensaio do Cometa, sobre diferentes linhagens celulares	56
Figura10: Diferentes classes de cometa obtidas pelo tratamento de células VERO com H ₂ O ₂ 100 µM, avaliadas através do Ensaio do Cometa e classificadas segundo Kobayashi et al. (1995), com algumas modificações propostas por Miyamae et al. (1998a).....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Informações gerais sobre o vírus herpético humano tipo 1, o poliovírus tipo 2, o vírus da hepatite A, o adenovírus tipo 5 e o rotavírus símio.....	17
Tabela 2:	Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados.....	48
Tabela 3:	Resultados da determinação da citotoxicidade da violaceína frente a diferentes linhagens celulares, avaliada através de diferentes métodos.....	49
Tabela 4:	Resultados da determinação da viabilidade das diferentes linhagens celulares tratadas com violaceína, através do método do azul de Trypan.....	53
Tabela 5:	Efeito genotóxico do peróxido de hidrogênio, após uma hora de incubação, avaliado através do Ensaio do Cometa, sobre diferentes linhagens celulares.....	56
Tabela 6:	Análise de variância dos resultados obtidos com as células VERO, tratadas com diferentes concentrações da violaceína (0,19 – 1,5 µM), através do Ensaio do Cometa.....	58
Tabela 7:	Análise de variância dos resultados obtidos com as células FRhK-4, tratadas com diferentes concentrações da violaceína (0,19 – 1,5 µM), através do Ensaio do Cometa.....	58
Tabela 8:	Análise de variância dos resultados obtidos com as células MA104, tratadas com diferentes concentrações da violaceína (0,19 – 1,5 µM), através do Ensaio do Cometa.....	59
Tabela 9:	Análise de variância dos resultados obtidos com as células HEp-2, tratadas com diferentes concentrações da violaceína (0,19 – 1,5 µM), através do Ensaio do Cometa.....	59
Tabela 10:	Resultados da aplicação do teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para a separação das médias do escore dos danos causados ao DNA das células VERO, MA104 e FRhK-4, tratadas com diferentes concentrações da violaceína (0,19 – 1,5 µM), através do Ensaio do Cometa.....	60
Tabela 11:	Resultados da determinação da atividade antiviral da violaceína, através do ensaio colorimétrico do MTT.....	61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 A IMPORTÂNCIA DOS MEDICAMENTOS ANTIVIRAIS.....	16
2.2 FÁRMACOS ANTIVIRAIS DE ORIGEM NATURAL.....	20
2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE GENOTOXICIDADE.....	25
2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE VÍRUS	29
2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE A BACTÉRIA <i>Chromobacterium</i> <i>violaceum</i>	30
2.5.1 METABÓLITOS DA <i>Chromobacterium violaceum</i>	33
2.5.2 ESTRUTURA QUÍMICA DA VIOLACEÍNA.....	33
2.5.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA VIOLACEÍNA.....	34
3 OBJETIVOS	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 CULTIVO DA <i>Chromobacterium violaceum</i> E EXTRAÇÃO DA VIOLACEÍNA.....	38
4.2 CULTURAS CELULARES.....	38
4.2.1 CÉLULAS	38
4.2.2 MEIO DE CULTURA E REAGENTES	40
4.3 VÍRUS	41
4.3.1 ORIGEM DAS CEPAS	41
4.3.2 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES-ESTOQUE VIRAIS.....	42
4.3.2.1 HERPES VÍRUS SIMPLEX TIPO 1 E POLIOVÍRUS TIPO 2.....	42
4.3.2.2 ROTAVÍRUS SA-11.....	42

4.3.2.3	VÍRUS DA HEPATITE A.....	43
4.3.2.4	ADENOVÍRUS TIPO 5.....	44
4.3.3	DETERMINAÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO VIRAL.....	44
4.3.3.1	TITULAÇÃO DO ROTAVÍRUS E DO VÍRUS DA HEPATITE A.....	46
4.3.3.2	TITULAÇÃO DO HERPES VÍRUS SIMPLEX TIPO 1 E DO ADENOVÍRUS TIPO 5.....	47
4.3.3.3	TITULAÇÃO DO POLIOVÍRUS TIPO 2.....	48
4.4	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	50
4.4.1	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CELULARES.....	50
4.4.2	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO MÉTODO DE EXCLUSÃO DO CORANTE AZUL DE TRYPAN.....	51
4.4.3	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO COLORIMÉTRICO COM SAL DE TETRAZOLIUM (MTT).....	52
4.5	AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE ATRAVÉS DO ENSAIO DO COMETA.....	53
4.5.1	PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO CELULAR.....	53
4.5.2	PREPARAÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVO.....	54
4.5.3	PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS.....	55
4.5.4	LISE DAS CÉLULAS.....	55
4.5.5	TRATAMENTO ALCALINO E ELETROFORESE.....	56
4.5.6	NEUTRALIZAÇÃO E COLORAÇÃO.....	56
4.5.7	ANÁLISE DOS COMETAS.....	57
4.5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
4.6	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i>	58
4.6.1	INIBIÇÃO DO EFEITO CITOPÁTICO VIRAL.....	58

4.6.2 ENSAIO COLORIMÉTRICO COM SAL DE TETRAZOLIUM (MTT).....	59
4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	61
5 RESULTADOS	63
5.1 DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS VIRAIS	63
5.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	63
5.3 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE ATRAVÉS DO ENSAIO DO COMETA.....	66
5.4 ESTUDOS DA ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i>	75
6 DISCUSSÃO	77
6.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	77
6.2 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE ATRAVÉS DO ENSAIO DO COMETA	82
6.3 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i>	92
7 PERSPECTIVAS	97
8 CONCLUSÕES	100
9 REFERÊNCIAS	103

1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes avanços na área da 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, o desaparecimento quase completo da poliomelite e o controle de várias outras doenças. Todavia, elas propiciam um fraco ou nenhum efeito terapêutico, em indivíduos que já estão infectados, e existe a possibilidade de complicações pós-vacinação, já tendo sido relatados vários casos de distúrbios devido à reativação viral. Além disso, a administração de vacinas em indivíduos imunocomprometidos e gestantes deve ser realizada com precaução. Conseqüentemente, uma segunda arma para a defesa antiviral é o desenvolvimento e o uso de fármacos antivirais capazes de prevenir uma infecção ou de combatê-la, uma vez começada. Entretanto, apesar de quase 50 anos de pesquisa, o arsenal de fármacos antivirais permanece pequeno (FLINT et al., 2000) e apresenta graves restrições de uso, tais como reduzido espectro de atividade, utilidade terapêutica limitada e vários graus de toxicidade (SIMÕES et al., 1999a). Várias pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos antivirais têm sido realizados com base em substâncias sintéticas (CASSADY; WHITLEY, 1997; DAMIAN et al., 2000; KANEKO et al., 2001; MARCELETTI, 2002), mas grandes esforços têm sido feitos para avaliar a potencial atividade antiviral de produtos naturais, a fim de isolar e caracterizar novos compostos, os quais poderiam inibir a replicação viral ou servir como modelo de novas moléculas (VLINETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997; COWAN, 1999; HUDSON; TOWERS, 1999; DE CLERCQ, 2000; BETANCUR-GALVIS et al., 2002b; MA et al., 2002; SUN et al., 2002).

Os produtos naturais são a base de muitos fármacos atualmente disponíveis no mercado para o tratamento de várias doenças humanas. O sucesso é devido, em parte, à rica diversidade química que é encontrada em extratos microbianos e em fontes botânicas. Deles podem ser retiradas substâncias ativas,

cuja produção na forma sintética seria muito dispendiosa, ou ainda, podem ser extraídos compostos básicos que, com modificações estruturais, tornam-se mais eficazes e menos tóxicos, ou então, podem ser utilizados como protótipos para fármacos sintéticos, que possuam atividades farmacológicas semelhantes às originais (MCMAHON, et al., 1995; HOUGHTON, 1996; NIELSEN, 2002).

Uma grande conquista na área da pesquisa de novos fármacos, nos últimos 30 anos, foi a introdução de sistemas biológicos *in vitro* em grande escala, os quais podem testar atividades de várias amostras, em um curto período de tempo, permitindo executar facilmente as repetições dos experimentos e propiciando uma análise estatística dos resultados. Os sistemas de ensaio *in vitro* são, freqüentemente, baseados na utilização de culturas de células, de sistemas enzimáticos ou de receptores clonados. Os grupos de pesquisadores, nas indústrias farmacêuticas ou na academia, podem utilizar estes ensaios rotineiramente para a pesquisa de um grande número de amostras produzidas por química combinatorial, de coleções de organismos da biosfera e do fracionamento de extratos naturais (HOUGHTON, 2000).

De maneira geral, os ensaios de atividade antiviral *in vitro* utilizam culturas de células, as quais são permissíveis aos vírus em estudo e baseiam-se na capacidade desses vírus de se replicarem nessas células (BURLESON; CHAMBERS; WIEDBRAUK, 1992; VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997).

A segurança é um dos parâmetros de grande importância no desenvolvimento de fármacos antivirais. Os testes de toxicidade celular fornecem as primeiras informações sobre a segurança dos compostos em teste. Muitas moléculas promissoras são descartadas logo de início, devido à sua citotoxicidade. Um composto antiviral deve ser mais tóxico para os vírus do que para as células (FLINT et al., 2000). Além disso, nos estágios iniciais de desenvolvimento de novos fármacos tem sido dada grande ênfase aos estudos de genotoxicidade (GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000; TRAORE et al., 2000;

HARTMANN et al., 2001a; WUTZLER; THUST, 2001; POLI, et al., 2002; TOMICIC et al., 2002).

Com o intuito de contribuir com a pesquisa de novos agentes antivirais a partir de produtos naturais e devido ao alto potencial biotecnológico e farmacêutico da bactéria *Chromobacterium violaceum* e do seu metabólito majoritário, a violaceína, optou-se por este último como objeto desta dissertação, avaliando sua citotoxicidade, sua genotoxicidade e sua potencial atividade antiviral, frente a vários vírus.

Para tal, foram escolhidos os seguintes vírus: herpético tipo 1 (HSV-1: duas cepas sensíveis e uma resistente ao aciclovir), rotavírus símio (cepa SA11), vírus da hepatite A (HAV: duas cepas HM175 e HAF203), adenovírus tipo 5 e poliovírus tipo 2. Vale ressaltar que o poliovírus serviu apenas como um modelo de vírus RNA, podendo ser comparado aos outros enterovírus, já que as infecções pelo poliovírus estão sob controle devido ao esquema de vacinação mundial.

Importante também salientar o caráter interdisciplinar deste trabalho, envolvendo não somente o Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, sua infra-estrutura e a experiência da professora orientadora no assunto em questão, mas também o Laboratório de Bioenergética e Comunicação Celular e o Laboratório de Bioquímica, sob a coordenação das professoras Tânia Beatriz Creczynski-Pasa e Regina Vasconcelos Antonio, respectivamente, onde a violaceína vem sendo extraída, purificada e quantificada, além de ser também avaliada com relação a sua potencial atividade antioxidante.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A IMPORTÂNCIA DOS MEDICAMENTOS ANTIVIRAIS

Os compostos antivirais se enquadram em duas categorias:

- ✓ aqueles com ação indireta, como os imunomoduladores (ex. interferonas) e as vacinas, que estimulam o mecanismo de defesa das células hospedeiras;
- ✓ aqueles com ação direta, como os agentes virucidas e os compostos antivirais propriamente ditos, que irão agir sobre uma determinada etapa do processo de replicação viral após infecção da célula hospedeira (CHE, 1991a).

Os fármacos antivirais diretos interferem em um ou mais processos dinâmicos da replicação viral e, conseqüentemente, são candidatos a se tornarem medicamentos antivirais, enquanto que as substâncias virucidas inibem a infectividade viral extracelularmente e podem ser utilizadas como antissépticos (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997).

Em contraste com a enorme quantidade de medicamentos antibacterianos e antifúngicos, encontram-se disponíveis somente alguns poucos medicamentos antivirais efetivos. Uma das principais razões para a falta de sucesso no desenvolvimento desses últimos é, principalmente, a natureza dos vírus, os quais possuem uma estrutura extremamente simples e um sistema enzimático restrito, sendo totalmente dependentes dos processos metabólicos celulares para a sua multiplicação e sobrevivência. Desta forma, os compostos que inibem ou causam a morte viral são, também, tóxicos às células hospedeiras, em diferentes intensidades. O compromisso com a especificidade pelas células infectadas, a eficácia e a baixa toxicidade são indispensáveis e daí advém a escassez de medicamentos antivirais (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991; WHITE; FENNER, 1994; BOON, 1997; VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997).

O aumento do conhecimento a respeito dos eventos moleculares e bioquímicos da replicação viral em muito contribuiu para o surgimento de novos compostos antivirais (WHITE; FENNER, 1994; CHALLAND; YUONG, 1998; SHARPE-SUBAK; DARGAN, 1998). Estas pesquisas conduziram à descoberta de vários compostos ativos, como por exemplo, aqueles que inibem enzimas-chave envolvidas na replicação do DNA dos vírus herpéticos e aqueles que inibem proteinases do vírus HIV (ROBERTS et al., 1990). A obtenção de informações mais detalhadas de como os fármacos antivirais agem em nível molecular faz com que seja possível melhorar sua eficácia e diminuir sua citotoxicidade, e até minimizar os problemas advindos do aparecimento de resistência aos medicamentos antivirais já existentes, em pacientes submetidos a tratamentos de longa duração. A principal ênfase que tem sido dada no desenvolvimento de novos fármacos antivirais é a busca de alvos específicos do processo de replicação viral, tal como a inibição de determinadas enzimas envolvidas na replicação dos ácidos nucléicos virais, ou seja, enzimas do tipo da transcriptase reversa, da DNA polimerase, da timidina quinase, etc (KINCHINGTON et al., 1995). Na realidade, qualquer processo que seja essencial para a replicação do vírus, mas não para a sobrevivência da célula é, teoricamente, suscetível a uma intervenção farmacológica (WHITE; FENNER, 1994).

Devido ao desenvolvimento, cada vez mais crescente, de resistência aos medicamentos antivirais disponíveis, é imperativo que se pesquise novas alternativas terapêuticas efetivas para doenças virais humanas e veterinárias, à base de compostos com potente atividade e baixa toxicidade (SUDO et al., 1994; HASUI; MATSUDA; OKUTANI, 1995; BENENCIA; COURRÉGES, 2000; REBORA, 2002).

Nos vírus, o processo de mutação randômica, combinada com a habilidade de se replicar rapidamente, resulta na seleção de cepas resistentes com alterações dos alvos antivirais. A resistência antiviral ocorre como o resultado das mutações em genes que codificam os sítios alvo da ação antiviral, tais como as mutações

no gene pol que codifica as proteases e a transcriptase reversa no HIV - resistência aos anti-retrovirais, no gene que codifica a proteína M9 nos vírus influenza - resistência a amantadina, ou no gene que codifica as enzimas que ativam os fármacos antivirais, como aquele que codifica a enzima timidina quinase no HSV-1 - resistência ao aciclovir (PILLAY; ZAMBON, 1998; FIELD, 2001; MCKEEGAN, BORGES-WALMSLEY; WALMSLEY, 2002).

Apesar do contínuo desenvolvimento de pesquisas na área dos antivirais, poucos fármacos vêm sendo aprovados pelas autoridades governamentais para uso clínico, e a maioria desses compostos tem aplicações limitadas a poucas doenças (VLIETINCK; VANDEN BERGHE, 1998; DE CLERCQ, 2001b). Portanto, insiste-se de que a descoberta de novos compostos antivirais se faz necessária, principalmente, para o tratamento de doenças virais responsáveis por alta morbidade e/ou mortalidade, tais como aquelas causadas pelos vírus HIV, vírus herpéticos, vírus que causam hepatite, vírus influenza, vírus que causam febres hemorrágicas, etc. (SCHINAZI,1992), assim como de doenças infecciosas emergentes (febre Lassa, síndrome pulmonar causada pelo hantavírus, etc.), para as quais, atualmente, não existem terapias adequadas (CRAGG et al., 1997; SHU, 1998; DOBLHOFF-DIER; COLLINS, 2001).

Há também necessidade de se encontrar novas substâncias com atividade virucida, pois muitos desinfetantes e antissépticos não eliminam todos os vírus patogênicos, mesmo após o tempo de exposição recomendado (CHE,1991a; VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997; VALOT; EDERT; FAOU, 2000).

Alguns trabalhos testaram a incorporações de fármacos antissépticos, como o polivinilpirrolidona, em lipossomas, que são conhecidos por propiciar um aumento da atividade sítio específica, mantendo a liberação do fármaco e uma menor toxicidade do que as formulações convencionais *in vivo* (REIMER et al., 2000; WUTZLER et al., 2002).

A epidemia da AIDS tem acelerado e diversificado as pesquisas de novos medicamentos antivirais. Embora, na terapêutica atual sejam utilizados,

majoritariamente, os análogos sintéticos de nucleosídeos (zidovudina, didanosina, lamivudina e estavudina) (DE CLERCQ, 2001a; ROSENBLUM et al., 2001; VAN PRAAG et al., 2002), muitos produtos naturais, especialmente aqueles derivados de plantas, vêm sendo testados, no mundo todo, e têm demonstrado atividade inibitória da replicação do vírus HIV (KITAMURA et al., 1998; MATSUSE et al., 1999; MATTHEE; WRIGHT; KONING, 1999; PREMANATHAN et al., 1999; DE CLERCQ, 2000; ASRES, et al., 2001; BEDOYA et al., 2001; ROMANOS, et al., 2002; ROWLEY et al., 2002), e alguns deles, tais como calanolídeo A, prostratina, glicirrizina, hipericina e didemmina já estão sendo testados clinicamente, com resultados favoráveis (GULICK et al., 1999; YAMAMOTO et al., 1999; CREAGH et al., 2001; KULKOSKY et al., 2001; YANG et al., 2001, VERA; JOULLIE, 2002).

A descoberta do aciclovir, o mais efetivo e menos tóxico agente anti-herpético já desenvolvido até o momento (RICHARDS et al., 1983; O'BRIEN; CAMPOLI-RICHARDS, 1989; FIELD, 2001; WHITLEY; ROIZMAN, 2001) e a produção de interferonas, através da tecnologia do DNA recombinante, podem ser considerados marcos importantes na história da elaboração do arsenal terapêutico anti-herpético (SUDO et al., 1994; WHITE; FENNER, 1994).

A resistência dos vírus herpéticos ao aciclovir não é uma questão recente (FIELD, 1983; POTTAGE; KESSLER, 1995; REUSSER, 1996; CASSADY; WHITLEY, 1997; TYRING; CARLTON; EVANS, 1998), e a disseminação de cepas virais resistentes a partir de pacientes imunocomprometidos (por exemplo, pacientes portadores do vírus HIV ou transplantados) para indivíduos imunocompetentes e vice-versa é um fato preocupante (FIELD; BIRON, 1994; PILLAY; ZAMBON, 1998; SNOECK, 2000; FIELD, 2001; CHENG; LIN; LIN, 2002). Por exemplo, uma terapêutica alternativa ao aciclovir é a administração do foscarneto sódico em pacientes com infecções mucocutâneas provocadas por cepas do vírus HSV-1 resistentes ao aciclovir, em pacientes com AIDS (CHATIS, 1989; ÖBERG, 1989; DE CLERCQ, 2001b), mas este composto tem demonstrado muitos efeitos adversos (SUDO et al., 1994; SNOECK, 2000),

sendo, portanto, de grande interesse o desenvolvimento de novos compostos anti-*HSV* que substituam o aciclovir para tratar pacientes a ele resistentes (PUJOL, 1996; BARQUERO; ALCHE; COTTO, 1997; KUO et al., 2001). Além disso, esforços têm sido direcionados na pesquisa de vacinas anti-herpéticas (BERNSTEIN; STANBERRY, 1999).

2.2 FÁRMACOS ANTIVIRAIS DE ORIGEM NATURAL

Como qualquer tipo de substância, os produtos naturais podem interferir em muitos alvos virais, desde a adsorção do vírus, sua penetração na célula hospedeira, o bloqueio de um ou mais estágios da replicação viral, até sua liberação (HUDSON; TOWERS, 1999), podendo resultar em diferentes mecanismos de ação.

Existem quatro processos básicos que podem ser utilizados na seleção de plantas a serem testadas numa triagem antiviral: a) escolha randômica de plantas; b) seleção baseada em estudos etnobotânicos e/ou etnofarmacológicos; c) escolha através de dados pré-existentes na literatura; d) abordagem quimiotaxonômica (VLIETINCK; VANDEN BERGHE, 1998). A comparação de resultados obtidos com a coleta de plantas ao acaso ou quimiotaxonomicamente orientadas com aqueles obtidos com base no uso em medicina popular tem gerado dados que demonstram que o conhecimento tradicional é um bom indicativo de espécies vegetais que acumulam compostos bioativos (ELISABETSKY, 2001). Ainda, Vlietinck e Vanden Berghe (1998) relataram que a seleção de plantas, baseada no uso tradicional, mostrou uma porcentagem cinco vezes maior de substâncias ativas com atividade antiviral.

De maneira geral, os ensaios preliminares realizados para pesquisar uma potencial atividade antiviral de produtos naturais utilizam culturas de células e podem ser aplicados com sucesso para a determinação dessa atividade ou da ação virucida de qualquer material.

Os métodos comumente utilizados para a avaliação da atividade antiviral *in vitro* são baseados na diferente habilidade dos vírus de se replicarem em células cultivadas. Alguns vírus podem causar efeito citopático ou formar placas de lise, outros são capazes de realizar funções especializadas ou provocar transformações nas células. A replicação dos vírus em cultura de células pode também ser monitorada pela detecção de determinados elementos virais, tais como DNA ou RNA viral ou polipeptídeos, quando os vírus não produzem efeito citopático nas células. Assim sendo, o teste antiviral selecionado pode ser baseado na inibição do efeito citopático viral, na redução ou inibição da formação de placas de lise, na redução do título viral ou de outras funções virais (VLIETINCK; VANDEN BERGHE, 1998).

Dentre a enorme gama de produtos naturais, encontram-se os metabólitos primários e secundários, produzidos por vários organismos, em resposta a estímulos externos, tais como mudanças nutricionais, infecções e competição para sobrevivência. Muitos desses metabólitos, produzidos por plantas, fungos, bactérias, protozoários, insetos e outros animais, já foram isolados, identificados e caracterizados biológica e/ou farmacologicamente (COWAN, 1999; STROHL, 2000). Recentemente, organismos marinhos também passaram a constituir uma importante fonte para a obtenção de novas substâncias ativas, incluindo antivirais (SARIN et al., 1987; CHE, 1991b; BOURGOUGNON et al., 1994; RINEHART, 1992; WITOROUW et al., 1994; HASUI; MATSUDA; OKUTANI, 1995; PUJOL et al., 1996; WRIGHT; KÖNIG, 1996; EL SAYED et al., 1997; FENICAL, 1997; PAN et al., 2000; BLUNDEN, 2001; FIORI, 2001; BETANCUR-GALVIS et al., 2002a).

A busca de novos compostos farmacologicamente ativos, através da triagem de produtos naturais, tais como aqueles obtidos por fermentação microbiana ou isolados de plantas, conduziu à descoberta de muitos fármacos úteis clinicamente, que desempenham uma importante função no tratamento de doenças humanas (SHU, 1998; NIELSEN, 2002), como por exemplo, o antitumoral paclitaxel (Taxol[®]) (HARVEY, 1999; RASKIN, 2002), isolado das

cascas dos troncos e das folhas de *Taxus brevifolia* Nutt. (EISENHAUER; VERMORKEN, 1998).

Uma revisão recente apontou que 39% dos 520 novos medicamentos aprovados pelo FDA, entre 1983 e 1994, eram produtos naturais ou derivados desses, e que cerca de 60-80% dos medicamentos antitumorais e anti-infecciosos, disponíveis comercialmente ou que se encontravam nos últimos estágios de avaliação clínica, eram de origem natural (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997) e que das 35 alternativas terapêuticas químicas e biológicas, lançadas em 2000, conforme relatado no *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, um terço delas é originário de produtos naturais (NIELSEN, 2002).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a fitoterapia em seus programas de saúde e sugere, também, alguns procedimentos básicos para a validação de fármacos de origem vegetal, em países em desenvolvimento (RATES, 2001). Além disso, dos 252 fármacos considerados como básicos e essenciais pela OMS, 11% são exclusivamente de origem de plantas e sabe-se, ainda, que um número significativo de fármacos sintéticos foram obtidos a partir de precursores naturais (RATES, 2001; RASKIN et al., 2002).

Ao longo dos últimos quinze anos, o *Natural Cancer Institute* (NCI), EUA, através do seu Programa de Produtos Naturais, tem coletado, catalogado, extraído e testado plantas terrestres e marinhas, invertebrados e amostras microbiológicas como fonte potencial de substâncias anti-HIV e antitumorais (YANG et al., 2001). Apesar desse extensivo programa, os recursos naturais pesquisados até o momento representam somente uma pequena parcela da imensa biodiversidade global disponível para a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos (RATES, 2001; YANG et al., 2001), sendo que, em muitos casos, somente foram realizados estudos preliminares. Entre os anos de 1957 e 1981, o NCI avaliou a atividade antitumoral de aproximadamente 20.000 espécies de plantas da América do Sul e da Ásia, mas, até o momento, não foram pesquisadas outras atividades farmacológicas dessas plantas (RATES, 2001).

Os microrganismos também podem ser considerados uma fonte muito rica de compostos potencialmente ativos (HARVEY, 2000), incluindo fármacos imunossupressores ou imunoestimulantes (NISBET; MOORE, 1997; SHU, 1998), antibióticos e hipocolesterolemiantes (SHU, 1998; SCHENKEL et al., 2001). Entretanto, eles são produzidos somente a partir de um pequeno número de microrganismos, tendo em vista a enorme biodiversidade existente no planeta (PEARCE, 1997; HANDELSMAN et al., 1998). Na realidade, muito vem sendo feito neste âmbito e um sentimento de urgência tem acompanhado pesquisadores de várias partes do mundo, pois é sabido que muitas espécies correm risco de extinção (COWAN, 1999) e que somente uma pequena fração da biodiversidade global já foi estudada (VERPOORTE, 1998; HARVEY, 2000).

Aproximadamente 60% das populações existentes utilizam a medicina tradicional para o atendimento de suas necessidades primárias de saúde (FARNSWORTH, 1993; HOUGHTON, 1995). Em particular, várias plantas empregadas na medicina tradicional de vários países já foram estudadas e demonstraram algum tipo de atividade antiviral *in vitro* (HUDSON, 1990; ARUOMA et al., 1996; LOCHER et al., 1996; ABAD et al., 1999; BETANCUR-GALVIS et al., 1999; SIMÕES et al., 1999b; BARRIO; PARRA, 2000; DE LOGU et al., 2000; BEDOYA et al., 2001; KUO et al., 2001; BETANCUR-GALVIS et al., 2002b; CHIANG et al., 2002; FORTIN et al., 2002). Muitos desses estudos apresentaram resultados promissores, e foram ou estão sendo aprofundados com o objetivo de fornecer alguma alternativa de tratamento às infecções virais (HOUGHTON, 1996; HAYASHI, et al, 2001; ZEMBOWER, et al., 1998; KANG et al., 1999; NAWAWI et al, 1999; ABAD et al., 2000; HUSSEIN et al., 2000; SEONG-KUG et al., 2000; KWON et al., 2000; CRAIG; BENENCIA; COULOMBIÉ, 2001; KIM et al., 2001; BERMEJO et al., 2002; BINNS et al., 2002; LI et al., 2002).

Como sabido, os produtos naturais apresentam uma grande diversidade estrutural, muito maior do que a fornecida pela maioria dos compostos obtidos por técnicas de química combinatória e que a evolução natural tem selecionado e

aperfeiçoado diversas moléculas bioativas que não poderiam ser ignoradas pelas indústrias farmacêuticas (RASKIN, 2002). Esses compostos naturais são relativamente pequenos (>1000 Da) e ocorrem, em geral, como membros de uma família de compostos relacionados, possibilitando o isolamento de inúmeros homólogos e a obtenção de informações sobre relações de estrutura-atividade, apresentando ainda a capacidade de serem absorvidos e metabolizados (HARVEY, 1999 e 2000). Importante lembrar que, na categoria de produtos naturais, incluem-se aqueles isolados diretamente de organismos da biodiversidade, os derivados semi-sintéticos dessas substâncias e também os compostos sintetizados com base em modelos de substâncias naturais (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997).

Atualmente, ocorreu um aumento na aplicação dos conhecimentos sobre produtos naturais na química combinatória e vice-versa. As estruturas dos produtos naturais servem como inspiração para novas sínteses, como modelo estrutural para análogos bioativos ou moléculas híbridas e como base para a preparação de bibliotecas combinatoriais, aumentando a chance de se encontrar potentes atividades biológicas (BREINBAUER et al., 2002; NIELSEN, 2002).

Muitos estudos realizados com extratos de plantas mostraram algum tipo de atividade antiviral e, hoje em dia, se conhece vários grupos de metabólitos que seriam os responsáveis pelas atividades detectadas (VANDEN BERGHE et al., 1986; DE LOGU et al., 2000). A título ilustrativo, pode-se citar: substâncias flavonoídicas (KAUL et al., 1985; SIMÕES et al., 1990; AMOROS; SIMÕES; GIRRE, 1992; HAYASHI et al., 1992 e 1997, BURKE et al., 1995; ROBIN, 1998; SHAHAT et al., 1998; LIN et al., 1999; LI et al., 2002); quinonas e derivados (MERUELO et al., 1992; ANDERSEN et al., 1991; SYDISKIS et al., 1991); lecitinas (BALZARINI et al., 1991); polissacarídeos (MARCHETTI et al., 1996; HUDSON et al., 1999; HUDSON; TOWERS, 1999; CARLUCCI et al., 1999; HUHEIHEL et al., 2002); triterpenos (SINDAMBIWE et al., 1998; VLIETINCK; DE BRUYNE; PIETERS, 1998; COWAN, 1999; SIMÕES; AMOROS; GIRRE, 1999a; MUCSI et al., 2001); floroglucínóis (ARISAWA et

al., 1990); derivados da catequina (FERREA et al., 1993); alcalóides (VANDEN BERGHE; VLIETINCK; VAN HOOFF, 1986; YAMAMOTO et al., 1989; MCMAHON et al., 1995; MONTANHA et al., 1995); cumarinas (HUDSON et al., 1993; HOUGHTON, 1996; CREAGH et al., 2001); outros compostos fenólicos (VANDEN BERGHE; VLIETINCK; VAN HOOFF, 1986; CHE, 1991a; HAYASHI, 1997; CHENG; LIN; LIN, 2002; CHIANG et al., 2002); saponinas (SIMÕES et al., 1990; SIMÕES; AMOROS; GIRRE, 1999a); proteínas (ARNOLD, et al., 2002; BERMEJO et al., 2002); lignanas (MACRAE, 1981; CHARLTON, 1998), etc.

Assim sendo, muitos produtos naturais, que mostraram atividade antiviral *in vitro* e *in vivo*, são potenciais candidatos a uso em terapia sistêmica e/ou profilaxia de infecções virais, sendo que alguns podem ser úteis como agentes tópicos ou em associação com outros fármacos antivirais (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997).

2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE GENOTOXICIDADE

Os estudos de genotoxicidade representam um papel importante no desenvolvimento de novos fármacos (GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000; HARTMANN et al., 2001a; KISKINIS; SUTER; HARTMANN, 2002), devendo ser realizados nos estágios iniciais desse desenvolvimento a fim de prognosticar uma potencial atividade genotóxica e/ou carcinogênica e para auxiliar na obtenção de novas estruturas químicas menos tóxicas (GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000; SNYDER; GREEN, 2001).

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).

Os ensaios de genotoxicidade *in vitro* são ferramentas sensíveis para a detecção da genotoxicidade e da potencial carcinogenicidade de agentes químicos

ou físicos (MCGREGOR; CASCIANO; MÜLLER, 2000; TICE et al., 2000; EISENBRAND et al., 2002), podendo ser avaliada pelos seguintes ensaios: teste de Ames (TRAORE et al., 2000; GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000; FERRER et al., 2002), teste de micronúcleos (MCGREGOR; CASCIANO; MÜLLER, 2000; SILVA et al., 2002) e o ensaio do Cometa (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999; SNYDER; GREEN, 2001; KISKINIS; SUTER; HARTMANN, 2002), entre outros.

O Ensaio do Cometa ou *Single Cell Gel (SCG) Assay* é um método de eletroforese em microgel, utilizado para a detecção e quantificação de quebras das fitas do DNA, em células individuais, usando microscopia (SINGH, et al., 1988; FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995; OLIVE, 2002; SLAMENOVA et al., 2002).

Rydeberg e Johanson (1978) foram os primeiros a quantificar diretamente o dano no DNA de células individuais. Após, Östling e Johanson (1984) melhoraram a sensibilidade da detecção de danos no DNA, desenvolvendo 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 das fitas duplas do DNA celular (McKELVEY-MARTIN, 1993; ANDERSON; YU; MCGREGOR, 1998). Singh et al. (1988) modificaram a técnica de Östling e Johanson, utilizando uma eletroforese alcalina ($\text{pH} > 13$) capaz de detectar quebras das fitas simples do DNA e em sítios álcali-lábeis (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995; ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999). Partindo-se do princípio de que a maioria dos agentes genotóxicos induz mais quebras em fitas simples do que em fitas duplas do DNA, a versão alcalina da técnica apresenta maior sensibilidade para a detecção da indução de danos ao DNA (SPEIT et al., 1999; SPEIT; HARTMANN, 1999; TICE et al., 2000). Adicionalmente, Olive et al. (1990) desenvolveram um processo de lise celular, também em condições alcalinas, seguido de eletroforese em $\text{pH} \sim 12,3$. Os métodos de Singh e de Olive são idênticos no princípio e similares na prática, mas o protocolo que utiliza $\text{pH} > 13$ mostrou ser mais sensível (COLLINS et al.,

1997; ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999), por possibilitar a expressão máxima dos danos em fitas simples e em sítios álcali-lábeis, sendo o método de escolha para a identificação de agentes genotóxicos, segundo o *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* (TICE et al., 2000).

A técnica básica foi modificada para a detecção complementar de classes específicas de adutos de DNA (por exemplo, pirimidinas oxidadas e dímeros de timidina) (ALBERTINI et al., 2000), através da utilização de anticorpos específicos aos danos do DNA (GODARD; GAUDUCHON; DEBOUT, 2002) ou de enzimas específicas de reparo do DNA (COLLINS; AI-GUO; DUTHIE, 1995; COLLINS et al., 1997).

O Ensaio do Cometa é um teste de genotoxicidade que se desenvolveu, rapidamente, nos últimos anos, representando um papel importante em muitas áreas (WATERS; STACK; JACKSON, 1999; COLLINS, 2002; KAMER; RINKEVICH, 2002). O número de pesquisadores que utilizam esse teste e o alcance de suas aplicações estão aumentando exponencialmente, podendo ser aplicado na avaliação dos efeitos genotóxicos de vários agentes sobre células somáticas e germinativas *in vitro* e *in vivo* (HARTMANN; SPEIT 1997.; CHAUVEL-LEBRET et al., 2001; SNYDER; GREEN, 2001; POLI, et al., 2002; TOMICIC et al., 2002), estudos de reparo do DNA (RISO et al, 2002; LAFFON, et al., 2002), aplicações clínicas (SARDAS, 1998; KASSIE; PARZEFALL; KNASMÜLLER, 2000), biomonitoramento humano (COLLINS et al., 1997; FRENZILLI; BOSCO; BARALE, 2000; KAN et al., 2002) e biomonitoramento ambiental (STEINERT et al., 1998; BICKHAM et al., 2000; KASSIE et al., 2001; MONARCA, 2001; GIRI, 2002).

As vantagens dessa técnica incluem: 1) sensibilidade para a detecção de baixos níveis de dano ao DNA; 2) simplicidade e baixo custo; 3) uso de pequeno número de células por amostra; 4) coleta de dados de células individuais, permitindo análises estatísticas mais robustas; 5) virtualmente, qualquer população de células eucarióticas pode vir a ser analisada; 6) uso de pequenas quantidades do material teste, fácil aplicação e curto período de tempo para

concluir o experimento; 7) capacidade para avaliar o dano ao DNA de células não proliferativas e, sendo um ensaio de células individuais, pode-se detectar respostas não uniformes numa população mista de células; 8) capacidade para avaliar a genotoxicidade em ensaios *in vivo* e *in vitro* (COLLINS et al., 1997; ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999; TICE et al., 2000). A população de células mais adequada dependerá das características da exposição, da amostra, do acesso e do objetivo do estudo (ALBERTINI et al., 2000).

Segundo Tice et al. (1991), as únicas desvantagens são a necessidade de suspensões de células individuais, e o fato de que pequenas amostras celulares podem não ser representativas da população celular total.

Devido a grande diversidade de aplicações desta técnica, surgiu a necessidade da validação internacional dos seus procedimentos, a fim de que diferentes laboratórios pudessem intercomparar seus resultados (GREIM, 2001; OLIVE, 2002). Algumas padronizações já estão disponíveis: o *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* (TICE et al., 2000) e o *International Programme on Chemical Safety* (ALBERTINI et al., 2000) recomendam alguns procedimentos para que o Ensaio do Cometa possa ser utilizado nos estudos de genotoxicidade.

Já foram realizados estudos para avaliar a genotoxicidade de alguns fármacos antivirais, disponíveis no mercado, principalmente os análogos sintéticos de nucleosídeos. Embora muitas investigações tenham sido conduzidas nesta área, o mecanismo de ação antiviral e a citotoxicidade de muitos desses análogos dos nucleosídeos ainda não são totalmente conhecidos. Isto também é aplicado aos danos induzidos por esses fármacos ao DNA celular. Embora muitos fármacos antivirais do tipo nucleosídeos sejam licenciados para uso clínico, e tenham passado por pesquisas de rotina para avaliar sua genotoxicidade a fim de serem aprovados, para uso clínico humano, somente dados limitados sobre tais estudos já foram publicados (TOMICIC et al., 2002). Muitos antivirais análogos de nucleosídeos induzem aberrações cromossomais, mas mostraram-se inativos nos ensaios de mutação de genes. Os dados sobre carcinogenicidade em

ratos e em camundongos são variáveis, mas claramente positivos para zidovudina (AZT) e zalcitabina (ddC). Aciclovir, ganciclovir e penciclovir mostraram ser fortes indutores de apoptose, concentração e tempo dependentes, e induziram quebras nas fitas simples e duplas do DNA; resultados esses obtidos pelo Ensaio do Cometa (WUTZLER; THUST, 2001; TOMICIC et al., 2002). Os possíveis mecanismos pelos quais esses agentes podem causar danos à informação genética ainda são hipotéticos, e os achados experimentais não permitem extrapolações para humanos. Também não há evidências conclusivas que esses fármacos tenham causado tumores em humanos; desta forma, o uso dos análogos de nucleosídeos na terapia antiviral permanece uma alternativa terapêutica eficaz e segura, justificada pela avaliação risco/benefício (WUTZLER; THUST, 2001).

2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE VÍRUS

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

Os vírus são capazes de reconhecer e de penetrar em células-alvo, principalmente, pela especificidade dos receptores na superfície dessas células hospedeiras e dos próprios vírus. O conjunto de eventos que vão desde a

penetração do genoma viral na célula até a liberação dos vírions é chamado de ciclo de multiplicação viral. A maneira como o vírus se multiplica é determinada pela estrutura do genoma: se DNA ou RNA; se RNA positivo (+) ou negativo (-) e da estrutura do próprio vírion a ser replicado. As principais etapas da multiplicação viral podem ser resumidas numa fase inicial, com fixação do vírus à célula hospedeira, penetração e desnudamento (decapsidação) da partícula viral, e numa fase tardia, que vai desde a síntese macromolecular até a montagem e liberação dos vírions (WHITE; FENNER, 1994).

O vírus herpético humano tipo 1 (HSV-1), o poliovírus tipo 2 (PV-2), o vírus da hepatite A (HAV), o adenovírus tipo 5 (Ad-5) e o rotavírus símio (RV) foram utilizados para a realização deste trabalho. A Tabela 1 mostra algumas informações sobre os mesmos.

2.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE A BACTÉRIA *Chromobacterium violaceum*

A *Chromobacterium violaceum* (Figura 1) é uma bactéria quimiorganotrófica, Gram(-), anaeróbia facultativa, com formato de bastonete, e dimensões de aproximadamente 0,5 a 1 μm por 2 a 3 μm , locomovendo-se por meio de um flagelo polar e de um a quatro flagelos laterais (HOLT; KRIEG, 1984). Em 1882, Boisbaudran descreveu a formação de uma coloração violeta sobre um preparado à base de farinha. O pequeno organismo e o pigmento aos quais ele se referia eram, provavelmente, a *Chromobacterium violaceum* e a violaceína, respectivamente, por causa do espectro de absorção no visível registrado pelo próprio Boisbaudran (DURAN; MENCK, 2001).

Em 1976, dois tipos diferentes de colônias bacterianas (branca e violeta) foram isoladas da estação de tratamento de água da cidade de Manaus (Amazonas). As colônias violetas foram identificadas pelo Prof. Wilson Chagas de Araújo, do Instituto de Microbiologia da UFRJ, como sendo a *Chromobacterium violaceum* (RETTORI, 1996).

Tabela 1: Informações gerais sobre o vírus herpético humano tipo 1, o poliovírus tipo 2, o vírus da hepatite A, o adenovírus tipo 5 e o rotavírus símio.

Família	Vírus		Genoma	Envoltório	Manifestações clínicas
	Gênero	Espécie			
Picornaviridae	Enterovírus	Poliovírus	RNA simples fita	(-)	Paralisia, meningite
	Hepatovírus	Vírus da hepatite A	RNA simples fita	(-)	Hepatite infecciosa
Reoviridae	Rotavírus	Rotavírus símio	RNA dupla fita	(-)	Gastroenterites
Herpesviridae	Herpes simplex vírus	Herpes simplex vírus tipo 1	DNA dupla fita	(+)	Infecções cutâneo-mucosas, queratoconjuntivites, encefalites, etc.
Adenoviridae	Mastadenovírus	Adenovírus tipo 5	DNA dupla fita	(-)	Infecções respiratórias

Fonte: BEARD; LEMON, 1999; DA SILVA, 2000; MINOR, 1999 e WHITLEY; ROIZMAN, 2001.

Atualmente, a descrição do gênero *Chromobacterium*, feita por Sneath, é a que se encontra no “Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey’s” (HOLT; KRIEG, 1984).

Devido ao seu potencial biotecnológico, a cepa brasileira de *C. violaceum* (CCT3496/JMC 3496) foi escolhida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) como modelo para ser o primeiro microrganismo a ter seu genoma completamente seqüenciado pelo Projeto Genoma – Rede Nacional de Seqüenciamento de DNA (DURAN; MENCK, 2001). Tal proposição foi feita por duas professoras da UFSC: Tânia Beatriz Creczynski-Pasa e Regina Vasconcelos Antonio.



Figura 1: Microfotografia eletrônica da *Chromobacterium violaceum*

Fonte: disponível em <http://www.unb.br/acs/acsweb/imagens/bactéria1.jpg>.

Acesso em: 17 de janeiro de 2003.

A *Chromobacterium violaceum* é considerada uma bactéria saprófita não patogênica, que se encontra em amostras de solo e água de regiões tropicais e subtropicais (RICHARDS, 1993; DURAN; MENCK, 2001). No Brasil, esta bactéria é amplamente distribuída no Rio Negro e no solo de bancos dos rios da região amazônica (DURÁN; MENCK, 2001). Ocasionalmente, ela pode atuar como um patógeno oportunista em animais e homens, causando desde lesões na pele até abscessos no fígado e pulmão e septicemia fatal (RICHARDS, 1993; MIDANI; RATHORE, 1998; DURAN; MENCK, 2001). O potencial patogênico deste organismo foi descrito, pela primeira vez, por Woolley, em 1905, ao identificar a *C. violaceum* como a responsável pela morte de búfalos da água por septicemia, nas Filipinas (PONTE; JENKINS, 1992; RETTORI, 2000; DURAN; MENCK, 2001). O primeiro caso relatado de infecções em humanos ocorreu na Malásia, em 1927 e, desde então, ocorreram aproximadamente 30 óbitos, no mundo todo (DESJARDINS; FENLON; MADISON, 1999). Assim, alguns casos de infecções sérias e mesmos fatais, em humanos, foram relatados em Cuba (MACHIN-VILLAFRANCA, 1986), Argentina, Vietnã, Nigéria (BALLOWS et al., 1992), Estados Unidos (PONTE; JENKINS, 1992; DESJARDINS; FENLON; MADISON, 1999; MOORE et al., 2001, HODGE, 2002), Tailândia

(ROBERTS et al., 1997), Austrália (HUFFAM; NOWOTNY; CURRIE, 1998; CURRIE; CARAPETIS, 2000), Japão (HIRAOKA et al., 1999), Brasil (MARTINEZ et al., 2000), Taiwan (CHOU et al., 2000; SHAO et al., 2002), Índia (CHATTOPADHYAY et al., 2002) e Senegal (DROMIGNY et al., 2002).

2.5.1 METABÓLITOS DA *Chromobacterium violaceum*

A característica mais notável da *C. violaceum* é a produção de um pigmento intracelular chamado **violaceína**. Pesquisas recentes confirmam a importância de vários outros metabólitos, alguns deles de grande interesse biológico, como os potenciadores de antibióticos beta-lactâmicos glicopeptídeos: o SQ28-504 e o SQ28-546; antibióticos, como a aerocianidina (PARKER et al., 1988) e a aerocavina (LIU et al., 1988), o 3,6-di-hidróxi-indoxazeno e um depsipeptídeo antitumoral, o FR-901228, o qual está na fase I dos testes clínicos (LI et al., 1996; MARSHALL et al., 2002).

Os homopolímeros produzidos por esta bactéria podem ser utilizados na formulação de polímeros biodegradáveis (DURAN; MENCK, 2001; MARTINELLI; BACHOFEN; BRANDL, 2002). Também foram isoladas e caracterizadas algumas enzimas: fenilalanina hidroxilase, triptofano hidroxilase e quitinase (RETTORI, 1996).

2.5.2 ESTRUTURA QUÍMICA DA VIOLACEÍNA

Reilly e Pyne foram os primeiros a estudar detalhadamente a estrutura química da violaceína, em 1927. Ballantine e colaboradores deduziram, em 1958, através de estudos de degradação e síntese, a estrutura correta da mesma (Figura 2) (RETTORI, 1996; DURAN; MENCK, 2001). Estes pesquisadores também propuseram corretamente a estrutura do pigmento produzido em menor proporção: a deoxiviolaceína. A única diferença entre essa última e a violaceína é que a deoxiviolaceína não possui o grupo hidroxila. Os dados obtidos por

Ballantine e seus colaboradores foram confirmados, posteriormente, por espectroscopia por Laatsch e Thomson, em 1984.

A produção da violaceína é induzida por lactonas acetiladas N-homoserinas, que são descritas como reguladores genéticos em várias bactérias Gram (-), em um sistema que se denomina *quorum sensing*. A produção de violaceína é induzida especificamente pela N-hexanoil-homoserinalactona. (CHERNIN et al., 1998; BLOSSER, 2000).

A violaceína é classificada como um metabólito secundário e a sua função fisiológica permanece desconhecida (BROMBERG; DURAN, 2001).

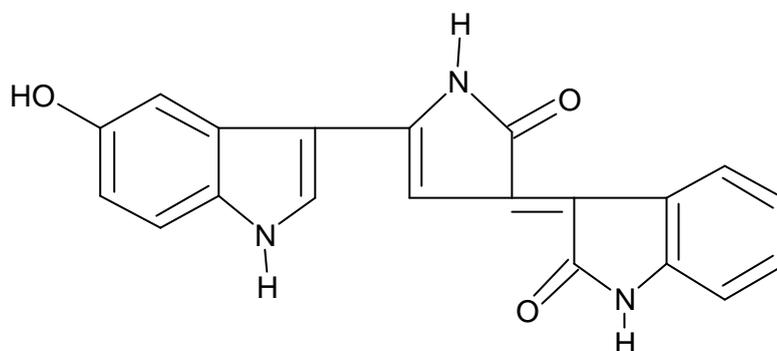


Figura 2: Estrutura química da violaceína

2.5.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA VIOLACEÍNA

Lichstein e Van de Sand, em 1945, foram os primeiros a fazer um estudo abrangente das propriedades antibióticas da violaceína. Até aquela data, haviam sido relatadas mortes por septicemia pela *C. violaceum* e, em todos os casos, havia sido verificada a ausência de microrganismos contaminantes, indicando a possível atividade antibiótica da violaceína. Verificou-se, inicialmente, que a violaceína possuía efeito inibitório acentuado no crescimento de bactérias Gram (+) e efeito leve para as Gram (-). No entanto, estudos posteriores realizados com violaceína purificada, mostraram que ela é igualmente eficiente para os dois

grupos (DURAN; MENCK, 2001). Além disso, também exibe atividade inibitória de fungos fitopatogênicos, tais como *Rosellinia necatrix* (SHIRATA et al., 2000).

A violaceína apresenta atividade antibacteriana *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis*, em concentrações comparáveis àquelas descritas na literatura para a pirazinamida, fármaco utilizado no tratamento da tuberculose (DE SOUZA et al., 1999; DURAN; MENCK, 2001).

Recentemente, verificou-se que a bactéria *Janthinobacterium lividum* produz um pigmento violeta, o qual foi caracterizado como sendo uma mistura de violaceína e deoxiviolaceína, que mostrou atividade antibacteriana contra diversas bactérias putrefativas tais como *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Stafilococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Altas concentrações desse pigmento violeta causaram não somente a inibição do crescimento, mas também a morte de tais bactérias putrefativas (NAKAMURA et al., 2002)

A violaceína apresenta, ainda, propriedades tripanossomicidas (AZEVEDO et al., 2000; DURAN; MENCK, 2001) e atividade antileishmania (LEON et al., 2001).

Estudos de citotoxicidade realizados com a violaceína em linhagens de fibroblastos V79 demonstraram alta atividade citotóxica, sendo que essa processa-se por meio de apoptose e não por necrose. As mudanças morfológicas no núcleo dessas células incluem condensação de cromatina e decréscimo do conteúdo de ácidos nucléicos (MELO et al., 2000). A violaceína apresenta atividade antitumoral, sendo efetiva em culturas de células de algumas leucemias, linfomas, e tumores de pulmão e cólon (MELO et al., 2000) e em linfomas relacionados à AIDS (DURAN; MENCK, 2001).

Foi relatado que a violaceína, contendo 10% de deoxiviolaceína, apresentou atividade antiviral para vírus herpéticos e para poliovírus (MAY; BRUMMER; OTT, 1991).

Como pode ser evidenciado, devido ao alto potencial biotecnológico e farmacêutico, a bactéria *Chromobacterium violaceum* e o seu pigmento

majoritário, a violaceína, têm sido objeto de estudo de vários grupos de pesquisadores.

3 OBJETIVOS

GERAL:

- Avaliar a toxicidade e a potencial atividade antiviral da violaceína, principal pigmento produzido pela bactéria *Chromobacterium violaceum*.

ESPECÍFICOS:

- Avaliar a citotoxicidade da violaceína frente as células VERO, MA104, HEp-2 e FRhK-4, através de diferentes metodologias.
- Avaliar a genotoxicidade da violaceína em células VERO, MA104, HEp-2 e FRhK-4, utilizando o Ensaio do Cometa.
- Avaliar a potencial atividade da violaceína na inibição da replicação de diferentes cepas do vírus herpético humano tipo 1, do vírus da poliomielite tipo 2, do rotavírus símio, do adenovírus tipo 5 e do vírus da hepatite A, através de metodologias diversas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTIVO DA *Chromobacterium violaceum* E EXTRAÇÃO DA VIOLACEÍNA

A *Chromobacterium violaceum* foi cultivada no meio *Terrific Broth* modificado contendo 1% de peptona, 0,5 % de extrato de levedura, 0,5% de cloreto de sódio, fosfato de potássio dibásico 72 mM , fosfato de potássio monobásico 17 mM e 1% de glicose, nas seguintes condições de crescimento: pH 7,2; temperatura ambiente e aeração. Após 24h, a suspensão celular foi centrifugada (350Xg, durante 15 min) e a massa celular obtida foi extraída conforme o esquema da Figura 3.

A solução-mãe da violaceína (contendo 10% de deoxiviolaceína) foi obtida dissolvendo-a em etanol puro + dimetilsulfóxido (DMSO) 0,003%, e foi mantida protegida da luz e sob refrigeração a 4° C, até o momento de uso.

A determinação da concentração em Molaridade da violaceína na solução-mãe foi realizada através de espectrofotometria a 577 nm e calculada com o auxílio da fórmula: A_{577}/ϵ , onde: A_{577} = Absorbância a 577 nm e ϵ = Coeficiente de extinção molar = $1,7 \times 10^4$.

4.2 CULTURAS CELULARES

4.2.1 CÉLULAS

Foram utilizadas células VERO, que são culturas contínuas de fibroblastos de rins do macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*), fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz, SP. Essas células foram escolhidas porque são permissivas ao vírus herpético e ao poliovírus.

A linhagem celular FRhK-4, que são células fetais de rins do macaco *Rhesus* (WIEDBRAUK; SHERYL, 1992) permissivas à infecção *in vitro* pelo vírus da hepatite A, foram fornecidas pela professora Ana Maria Campos da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

A linhagem celular HEp-2, que são células de carcinoma de orofaringe humana permissivas à infecção *in vitro* pelo adenovírus, foram fornecidas pela professora Dolores V. Menhnert do ICB/USP, SP.

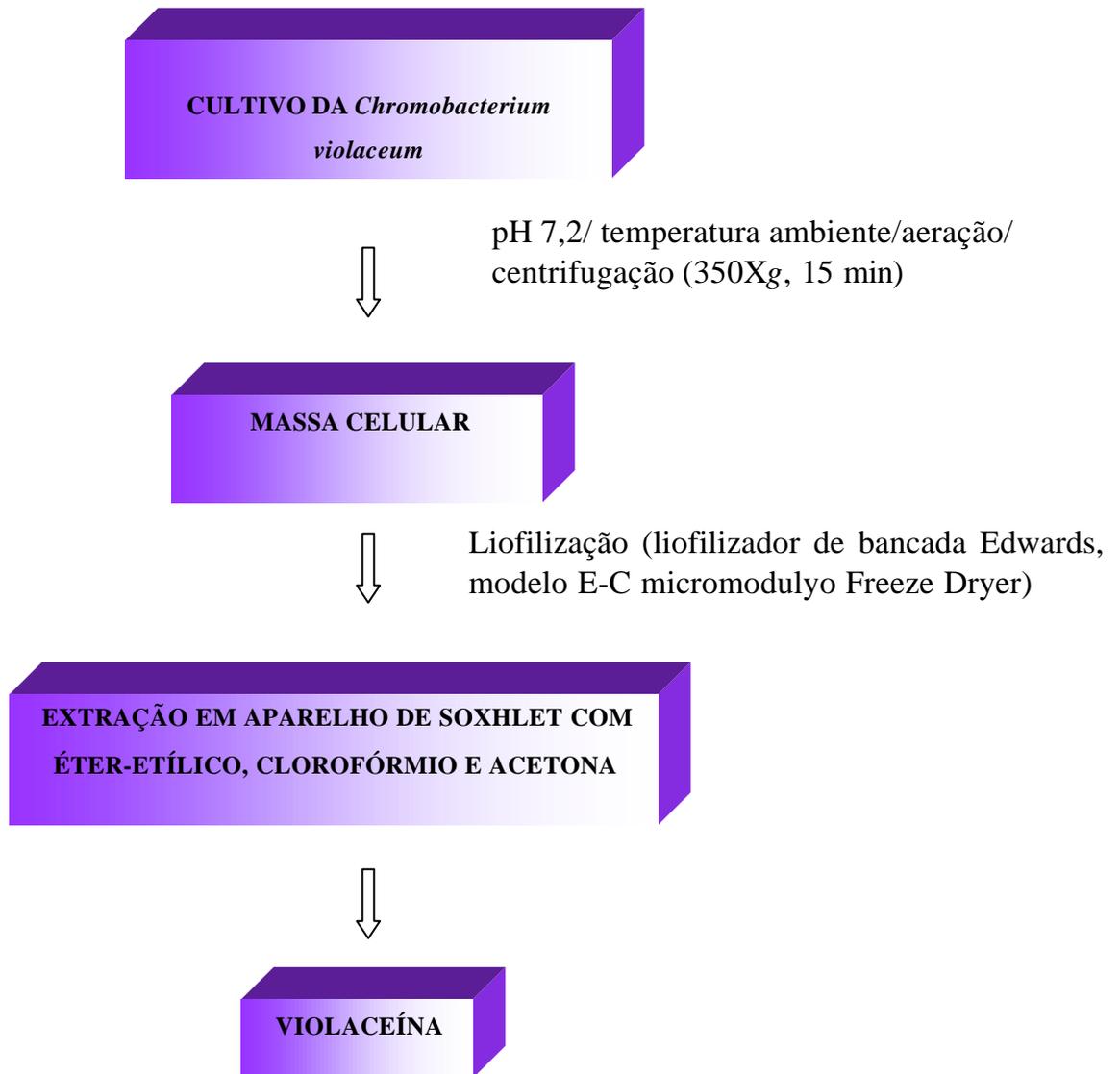


Figura 3: Esquema do processo de extração da violaceína

Também foram utilizadas células MA104, que são culturas contínuas de fibroblastos, obtidos a partir de rins embrionários do macaco *Rhesus*, permissivas à infecção *in vitro* pelo rotavírus e fornecidas pelo ICB/USP, SP.

Estas células foram selecionadas para os quatro vírus escolhidos para este trabalho, porque permitem a multiplicação dos mesmos, apresentando efeitos citopáticos visíveis, reprodutíveis e de fácil observação ao microscópio invertido.

4.2.2 MEIO DE CULTURA E REAGENTES

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

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

Antibióticos e antifúngico: foram adicionados ao meio para evitar a contaminação das culturas por bactérias, fungos e leveduras, na proporção de 1ml de penicilina/estreptomicina/anfotericina B (Gibco BRL: 10.000U penicilina, 10.000 µg estreptomicina, 25 µg anfotericina B) para cada 100ml de meio 199.

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

4.3 VÍRUS

4.3.1 ORIGEM DAS CEPAS

Os experimentos foram realizados com os seguintes vírus:

* Vírus com genoma DNA:

- Herpes vírus simplex humano tipo 1 (HSV-1):
 - HSV-1 cepa KOS (Universidade de Rennes, França)
 - HSV-1 cepa VR733 (ATCC)
 - HSV-1 cepa 29R (resistente ao aciclovir)
(Universidade de Rennes, França).
- Adenovírus tipo 5 (AdV-5) (ICB/USP, SP)

* Vírus com genoma RNA:

- Poliovírus humano tipo 2 (PV-2) cepa vacinal (Instituto Adolfo Lutz, SP).
- Vírus da hepatite A (HAV):
 - HAV cepa HM-175 (Macquarie University, Austrália).

-HAV cepa HAF-203 (ICB/USP, SP)

- Rotavírus (RV) símio SA11 sorotipo G3 (ICB/USP, SP).

4.3.2 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES–ESTOQUE VIRAIS

4.3.2.1 HERPES VÍRUS SIMPLEX TIPO 1 E POLIOVÍRUS TIPO 2

Cada suspensão viral (três cepas de HSV-1 e uma cepa de PV) foi inoculada em um frasco de cultura de 75 cm² de área, contendo uma monocamada de células VERO, cultivadas em 10 mL de meio 199, suplementado com 5% de SFB e antibióticos/antifúngico, tendo sido tripsinizadas 24 h antes da infecção. Primeiramente, o meio de cultura 199 foi aspirado da garrafa e a monocamada celular foi lavada 3X com PBS; após, foi inoculado 1 mL da suspensão viral em questão e incubou-se, durante 1 h, a 37° C, em estufa de CO₂, para permitir a adsorção e penetração viral e, então, o inóculo foi retirado por sucção a vácuo e 10 mL do meio 199 sem SFB foram adicionados. A incubação foi feita nas mesmas condições acima relatadas. O efeito citopático viral (ECP) foi monitorado por microscópio invertido a cada ciclo de replicação: 18 h para HSV-1 e 8 h para PV-2. Quando o tapete celular se mostrou totalmente infectado pelo vírus, o frasco foi congelado a –80° C e descongelado a 37° C por 3X, para o rompimento total das células e liberação das partículas virais. A suspensão foi centrifugada a 350Xg, durante 10 min. O sobrenadante foi aliquoteado em tubos estéreis e armazenados a –80° C até sua utilização.

4.3.2.2 ROTAVÍRUS SA11

A suspensão viral foi inoculada em um frasco de cultura de 75 cm² de área, contendo uma monocamada de células MA104, cultivadas em 10 mL de meio 199, suplementado com 5% de SFB e antibióticos/antifúngico, tendo sido tripsinizadas 24 h antes da infecção. O meio de cultura 199 foi aspirado da garrafa e a monocamada celular foi lavada 3X com PBS. A suspensão viral foi

previamente incubada, durante 30 min, a 37° C, na presença de 5 µg/mL de tripsina, pois o cultivo *in vitro* do rotavírus é dependente do tratamento com tripsina, visto que o produto da clivagem da proteína VP4 em VP5 e VP8 resulta no aumento da infectividade viral (ESTES et al., 1981). Posteriormente, foi inoculado 1 mL desta suspensão viral, e incubou-se durante 1 h, a 37° C, em estufa de CO₂, para permitir a adsorção e penetração viral e, então, o inóculo foi retirado por sucção a vácuo e 10 mL do meio 199 sem SFB e acrescido de 5 µg/mL de tripsina foram adicionados. A incubação foi feita nas mesmas condições acima relatadas. O ECP foi monitorado por microscópio invertido a cada 12 h, ciclo de replicação do rotavírus. Quando o tapete celular se mostrou totalmente infectado pelo vírus, o frasco foi congelado a -80°C e descongelado a 37° C por 3X, para o rompimento total das células e liberação das partículas virais. A suspensão foi centrifugada a 350Xg, durante 10 min. O sobrenadante foi aliquoteado em tubos estéreis e armazenados a -80° C até sua utilização.

4.3.2.3 VÍRUS DA HEPATITE A

Cada suspensão viral (duas cepas de HAV) foi inoculada em um frasco de cultura de 75 cm² de área, contendo uma monocamada de células FRhK-4, cultivadas em 10 mL de meio 199, suplementado com 5% de SFB e antibióticos/antifúngico, tendo sido tripsinizadas 24 h antes da infecção. Primeiramente, o meio de cultura 199 foi aspirado da garrafa e a monocamada celular foi lavada 3X com PBS; após foi inoculado 1 mL da suspensão viral e incubou-se, durante 90 min, a 37°C, em estufa de CO₂, para permitir a adsorção e penetração viral e, então, o inóculo foi retirado por sucção a vácuo e 10 mL de meio 199 suplementado com 2% de SFB foram adicionados. A incubação foi feita nas mesmas condições acima relatadas. O ECP foi monitorado por microscópio invertido a cada 24 h. Quando o tapete celular se mostrou totalmente infectado pelo vírus, o frasco foi congelado a -80° C e descongelado a 37° C por 3X, para o rompimento total das células e liberação das partículas virais. A

suspensão foi centrifugada a 350Xg, durante 10 min. O sobrenadante foi aliquotado em tubos estéreis e armazenados a -80° C até sua utilização.

4.3.2.4 ADENOVÍRUS TIPO 5

A suspensão viral foi inoculada em um frasco de cultura de 75 cm² de área, contendo uma monocamada de células HEp-2, cultivadas em 10 mL de meio 199, suplementado com 5% de SFB e antibióticos/antifúngico, tendo sido tripsinizadas 24 h antes da infecção. Primeiramente, o meio de cultura 199 foi aspirado da garrafa e a monocamada celular foi lavada 3X com PBS; após, foi inoculado 1 mL da suspensão viral e incubou-se, durante 60 min, a 37°C, em estufa de CO₂, para permitir a adsorção e penetração viral e, então, o inóculo foi retirado por sucção a vácuo e 10 mL do meio 199 suplementado com 2% de SFB foram adicionados. A incubação foi feita nas mesmas condições acima relatadas. O ECP foi monitorado por microscópio invertido a cada 24 h. Quando o tapete celular se mostrou totalmente infectado pelo vírus, o frasco foi congelado a -80° C e descongelado a 37° C por 3X, para o rompimento total das células e liberação das partículas virais. A suspensão foi centrifugada a 350Xg, durante 10 min. O sobrenadante foi aliquotado em tubos estéreis e armazenados a -80° C até sua utilização.

OBS.: O procedimento de preparação das suspensões virais foi realizado rotineiramente a fim de se obter estoques virais com alto título infeccioso.

4.3.3 DETERMINAÇÃO DO TÍTULO INFECCIOSO VIRAL

Antes de se iniciar os testes da potencial atividade antiviral da violaceína, foi essencial obter inóculos virais com infectividade conhecida. A infectividade dos vírus pode usualmente ser determinada como dose infectante a 50% do tecido celular (TCID₅₀), como unidades formadoras de placas (pfu) ou como unidades formadoras de focos (ffu), dependendo da metodologia utilizada.

Alguns conceitos básicos devem ser considerados antes de se iniciar a descrição do método propriamente dito. Segundo Burleson, Chambers e Wiedbrauk (1992):

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

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

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

-Efeito citopático (ECP) é o conjunto de todas as lesões provocadas por uma partícula viral nas células onde ela se multiplica. A maioria dos vírus provoca modificações celulares específicas e fáceis de observar ao microscópio. No caso dos vírus herpéticos, o ECP se expressa pelo aparecimento de células arredondadas, brilhantes, freqüentemente ligadas umas às outras por prolongamentos citoplasmáticos, formando os focos. Esses focos têm o aspecto característico de cachos de uva, que se estendem pelo tapete celular, desorganizando-o (GIRARD; HIRTH, 1989). O ECP provocado pelo poliovírus se traduz por células arredondadas ou piriformes, que se destacam do suporte, se vacuolizam e acabam por arrebentar-se ou encolher-se em massas cristalinas; as células tornam-se refringentes com o citoplasma vacuolizado e grânulos (WHITE; FENNER, 1994). O ECP do rotavírus é caracterizado por células arredondadas e granulação. Eventualmente, as células se destacam, desintegrando a monocamada. O ECP do adenovírus é caracterizado pela presença de células arredondadas e agrupadas em focos, as quais, eventualmente, se descolam do frasco de cultura celular (WIEDBRAUK; SHERYL, 1992). O ECP do vírus da hepatite A (cepas HM175 e HAF203) é caracterizado pela presença de células arredondas e pequenas (CROMEANS; SOBSEY; FIELDS, 1987).

4.3.3.1 TITULAÇÃO DO ROTAVÍRUS SA11 E DO VÍRUS DA HEPATITE A

Os títulos infecciosos dos estoques virais produzidos, conforme os itens 5.3.2.2 e 5.3.2.3, foram determinados através do ensaio de imunofluorescência (IFA) indireta, conforme descrito por Barardi et al. (1998).

Técnica: células MA104 e FRhK-4 foram cultivadas na concentração de 5×10^4 células/mL em meio de crescimento durante 24 ou 48 h em placas de 8 cavidades estéreis (Lab Tek, NUNC), especiais para este tipo de ensaio, até a formação de um tapete confluyente.

A suspensão viral foi diluída seriadamente de 10^{-1} a 10^{-7} , em meio 199 (suplementado com 2% SFB para o HVA, e sem SFB acrescido de 5 $\mu\text{g/mL}$ de tripsina para o rotavírus) e distribuída nas placas. Foram realizados também controles negativos contendo somente o meio 199 e a monocamada de células.

Para a infecção viral, as células contidas em cada cavidade foram semeadas com 100 μL de cada diluição viral. As placas foram incubadas, durante 90 min (HAV) e 60 min (rotavírus), a 37°C , em estufa de CO_2 para que ocorresse a adsorção dos vírus às células. Após esse período, o inóculo foi removido e, em seu lugar, foram adicionados 300 μL de meio 199. As células foram, então, incubadas por 2 a 3 dias para o HAV e durante 24 h para o rotavírus, sob as mesmas condições de temperatura e atmosfera acima mencionadas.

Após o período de incubação, o meio foi removido das placas. Em seguida, as células foram fixadas pela adição de 300 μL de metanol a -20°C e mantidas, durante 5 min, a temperatura ambiente. Esta etapa foi repetida para garantir a fixação adequada das células e, posteriormente, as placas foram secas ao ar. As células foram reidratadas com 300 μL de PBS, que foi retirado após 5 min. A próxima incubação foi realizada com 300 μL da solução bloqueadora (PBS, soroalbumina bovina a 1% e Tween 20 a 0,05%), durante 15 min. Posteriormente, em cada cavidade foram adicionados 100 μL do anticorpo monoclonal anti-HAV MAB 8241 (Chemicon International Inc.) , diluído 1:100

em solução bloqueadora para o HAV, ou 100 µL de sobrenadante do hibridoma contendo o anticorpo monoclonal anti-rotavírus M60, diluído 1:1 em solução bloqueadora para o rotavírus; as placas foram incubadas, durante 12 h, a 4° C. Após, as células foram lavadas 3X com solução bloqueadora e, finalmente, incubadas, durante 15 min, a 37°C, com 100 µL do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a fluoresceína (FITC, Sigma), diluído 1:100. As células foram novamente lavadas 3X com solução bloqueadora. Deixou-se secar e adicionou-se 10 µL de meio de montagem [PBS 40%, glicerol 50%, formalina 5%, NaCl 5% e DABCO (1,4-diazabicyclo-2,2,2-octano) 2,5%; pH 8,6]. As placas foram recobertas com lamínulas para a realização da leitura em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40), com um filtro de excitação verde (515-560 nm), 200X.

O título viral foi determinado através da contagem do número de células fluorescentes na maior diluição viral, sendo expresso em unidades formadoras de focos/mL (ffu/mL).

4.3.3.2 TITULAÇÃO DO HERPES VÍRUS SIMPLEX TIPO 1 E DO ADENOVÍRUS TIPO 5

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

Técnica: a partir de uma suspensão-estoque viral foi preparada uma série de diluições na razão de 1:10, em tubos de microtitulação, com meio 199 sem SFB (225 µL de meio 199 + 25 µL de suspensão viral). Após, 200 µl destas

diluições foram adicionados ao tapete celular (densidade celular 2×10^5 células/mL) previamente formado em placas de 96 cavidades, após aspiração do meio de cultura (5% de SBF + antibiótico/antifúngico). A placa foi, então, incubada a 37°C , em estufa de CO_2 , durante 72 h para o HSV-1, (= 4 ciclos de multiplicação do HSV-1) ou por 165 h para o AdV-5 (= 5 ciclos de multiplicação do AdV-5), e foi observada diariamente ao microscópio invertido.

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

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

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

Então, o valor encontrado foi multiplicado pelo volume adicionado a cada cavidade, no caso 200 μL , e obteve-se o valor de $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$.

4.3.3.3 TITULAÇÃO DO POLIOVÍRUS TIPO 2

O título infeccioso do estoque viral do PV-2 foi determinado através do método de contagem das placas de lise, descrita por Burleson, Chambers e Wiedbrauk (1992) e Kingchington et al., (1995).

Técnica: células VERO, em uma densidade aproximada de 2×10^5 células/mL, foram cultivadas em placas de 24 cavidades com meio 199, suplementado com 5% de SFB, até atingirem confluência (aproximadamente 24 h). A suspensão viral foi diluída em forma seriada (razão 1:10) em meio 199 sem SFB e com antibióticos/antifúngico. O meio foi aspirado e 500 μ L das diferentes diluições foram adicionadas em cada cavidade (três réplicas para cada diluição). As placas foram incubadas em estufa de CO₂, durante 60 min e, a cada 15 min, foram suavemente agitadas para uma melhor distribuição da amostra. Após esse tempo, o inóculo foi removido e foi adicionado 1,0 mL da seguinte solução: meio 199 2X + solução aquosa a 1,5% de carboximetilcelulose, na proporção 1:1, previamente esterilizada. As placas foram, então, incubadas a 37°C, durante 24 h, em estufa de CO₂. Após este período, o meio foi retirado e as células fixadas e coradas pela adição de 500 μ L do corante preto de naftaleno (Sigma) preparado da seguinte forma: 0,1g do corante em 100 mL de uma solução aquosa a 5% de ácido acético (v/v), pH 2,3-2,5. Esta mistura foi filtrada através de papel de filtro e estocada a 4°C. As células foram incubadas com o corante durante 30 min a temperatura ambiente. Após este período, o corante foi aspirado e as placas foram deixadas para secar ao ambiente.

Para calcular o título foram escolhidas as diluições que apresentaram um número discreto de focos de infecção, caracterizados por áreas claras de lise celular, chamadas de placas, que foram contadas com ajuda de microscópio estereoscópio.

Segundo Burleson, Chambers e Wiedbrauk (1992), o título infeccioso é expresso através do número de unidades formadoras de placas/mL (pfu/mL) e, portanto, de partículas virais, já que teoricamente cada placa é iniciada pela infecção de uma única partícula viral infectante. O título viral foi calculado através da fórmula: nº de placas formadas X recíproca da diluição X recíproca do volume

4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

4.4.1 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CELULARES

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

Para avaliar a citotoxicidade da violaceína foram usadas quatro linhagens celulares.

Técnica: uma suspensão de células VERO ou MA104 ou FRhK-4 ou HEP-2, contendo aproximadamente 2×10^5 células/mL, foi obtida através da tripsinização de um frasco de cultura celular. Essa suspensão foi distribuída em uma placa de 96 cavidades (100 μ L por cavidade). Após 24 h de incubação, a 37° C, em estufa de CO₂, o tapete celular estava confluyente e foram adicionadas as diferentes concentrações de violaceína, (5,0 – 0,078 μ M), dissolvidas em meio 199 sem SFB (razão de 1:2). O meio da placa foi descartado por aspiração e as diluições foram transferidas para a placa. Nos controles celulares foi adicionado somente meio 199. As placas foram incubadas, a 37° C, em estufa de CO₂, e as alterações morfológicas foram acompanhadas, no microscópio invertido, diariamente, por 72 h.

As alterações morfológicas que, eventualmente, surgiram foram comparadas com os controles celulares. Esta técnica permitiu estimar a concentração que causa citotoxicidade a 50% das células de uma cavidade (CC₅₀). As alterações morfológicas do tapete celular foram classificadas em cinco categorias, de acordo com a porcentagem de alteração celular (SIMÕES; AMOROS; GIRRE, 1999a):

- 1 = de 0 a 20% aproximadamente do tapete celular com alterações;
- 2 = de 21 a 40% aproximadamente do tapete celular com alterações;
- 3 = de 41 a 60% aproximadamente do tapete celular com alterações;

4 = de 61 a 80% aproximadamente do tapete celular com alterações;

5 = de 81 a 100% aproximadamente do tapete celular com alterações.

A CC_{50} da violaceína foi estimada a partir dos valores das categorias (1 a 5), em relação aos controles celulares, por análise de regressão (SOKAL; ROHLF, 1995).

4.4.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO MÉTODO DE EXCLUSÃO DO CORANTE AZUL DE TRYPAN

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).

Técnica: uma suspensão de células VERO ou MA104 ou FRhK-4 ou HEp-2, contendo aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células/mL, foi obtida através da tripsinização de um frasco de cultura celular. Essa suspensão foi distribuída em placas de 12 cavidades, tendo sido adicionados 2 mL dessa suspensão em cada cavidade da placa. Após 24 h de incubação, a 37°C , em estufa de CO_2 , o tapete celular estava confluyente e foram adicionadas as diferentes concentrações de violaceína, (5,0 – 0,078 μM), dissolvidas em meio 199 sem SFB (razão de 1:2). Após incubação, durante 72 h, a 37°C , o tapete celular foi dissociado por tripsinização. A tripsina foi, então, inativada através da adição do meio 199 contendo 5% de SFB e a suspensão celular foi recolhida e centrifugada a $350 \times g$, durante 15 min. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso em meio 199 sem SFB, num volume suficiente para formar uma suspensão celular contendo 2×10^6 células/mL. De cada suspensão celular, uma alíquota de 50 μL foi retirada e acrescentou-se 50 μL do corante azul de Trypan

(solução a 0,4% em PBS). As contagens foram realizadas em câmara de Neubauer, estabelecendo-se os percentuais de células viáveis em relação aos controles celulares.

A CC_{50} da violaceína foi estimada a partir das porcentagens das células viáveis em relação aos controles celulares, por análise de regressão (SOKAL; ROHLF, 1995).

4.4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO ENSAIO COLORIMÉTRICO COM SAL DE TETRAZOLIUM (MTT)

Neste trabalho, foi utilizado o ensaio colorimétrico do MTT, conforme proposto por Takeuchi, Baba e Shigeta (1991), com algumas modificações segundo Sieuwerts et al. (1995).

Técnica: uma suspensão de células VERO ou MA104 ou FRhK-4 ou HEP-2, contendo aproximadamente 2×10^5 células/mL, foi obtida através da tripsinização de um frasco de cultura celular. Essa suspensão foi distribuída em uma placa de 96 cavidades (100 μ L por cavidade). Após 24 h de incubação, a 37° C, em estufa de CO₂, o tapete celular estava confluyente, o meio da placa foi descartado por aspiração e foram adicionadas as diferentes concentrações de violaceína, (5,0 – 0,078 μ M), dissolvidas em meio 199 sem SFB (razão de 1:2). Após, as placas foram incubadas a 37° C, durante quatro dias, em estufa de CO₂ e no quarto dia foi aspirado todo o meio e foram adicionados 50 μ L da solução de MTT (Sigma) (1 mg/mL em meio 199), em todas as cavidades da placa, e essa foi incubada por 4 h. Após o período de incubação, foi retirado o meio + MTT de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células e foram adicionados 100 μ L de DMSO (Nuclear), em todas as cavidades, para solubilizar o formazan. Após, as placas foram agitadas, levemente, a temperatura ambiente, por 5-10 min, para que todo o formazan fosse solubilizado e lidas a 540nm em leitor tipo ELISA (Bio-Tek, EL_x 800).

As porcentagens de viabilidade celular foram calculadas em relação aos controles celulares.

A CC_{50} da violaceína foi calculada a partir das porcentagens de células viáveis em relação aos controles celulares, por análise de regressão (SOKAL; ROHLF, 1995).

4.5 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE ATRAVÉS DO ENSAIO DO COMETA

Neste trabalho, foi utilizada a técnica do Cometa/SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis), proposta por Singh et al. (1988), com algumas modificações na preparação das lâminas propostas por Klaude et al. (1996) e segundo as recomendações do *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* (TICE et al., 2000).

4.5.1 PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO CELULAR

A potencial atividade genotóxica da violaceína foi avaliada *in vitro*, utilizando-se as células VERO, MA104, FRhK-4 e HEp-2.

Técnica: foram preparadas placas de 12 cavidades contendo células suficientes para formar uma monocamada confluenta em 24 h ($2,5 \times 10^5$ células/mL; 2,0 mL/cavidade). Após 24 h, foram adicionadas às células quatro diferentes concentrações da violaceína, (1,5 - 0,19 μ M - razão 1:2) e foram incubadas a 37° C, durante 1 h, em estufa de CO₂. Também foram preparados controles positivos e negativo. Após, o meio 199 foi retirado, as células foram lavadas 3X com PBS gelado e tripsinizadas. Em cada cavidade foram adicionados 300 μ L de tripsina:EDTA (1:250) e a placa foi incubada por, no máximo, 5 min, para a obtenção da suspensão celular, já que o processo de tripsinização pode provocar indução de danos ao DNA, sem que haja comprometimento da viabilidade celular (SINGH et al., 1991). A ação da tripsina foi interrompida com a adição do meio 199 com 5% SFB. Após, as suspensões

celulares foram centrifugadas e ressuspensas em meio 199 sem SFB, de forma a obter uma suspensão celular contendo aproximadamente 1×10^6 células/mL.

Verificou-se a viabilidade celular, pelo método de exclusão do corante azul de Trypan, sendo que somente foram utilizadas nos ensaios, as suspensões que apresentaram viabilidade celular maior do que 70%. Essa suspensão foi, posteriormente, adicionada à agarose (Gibco-BRL) de baixo ponto de fusão para formar a segunda camada sobre as lâminas de microscópio. Foram preparadas duas lâminas para cada tratamento.

As lâminas foram preparadas imediatamente após a exposição, visto que relatos na literatura confirmam que o reparo dos danos do DNA de fibroblastos são completos após um período de 2 h de incubação a 37°C (SINGH et al., 1991).

4.5.2 PREPARAÇÃO DOS CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVO

Os controles positivo 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 ($\bullet\text{OH}$), 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 ($\bullet\text{OH}$) e outras formas, que provocam estresse oxidativo, de 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).

Os controles positivos (H_2O_2) foram preparados nas concentrações de 100 μM (controle positivo 1) e de 200 μM (controle positivo 2), a partir de uma

solução a 30% de H₂O₂ (Nuclear), que foram então incubados com as células, a 37° C, durante 1 h.

Periodicamente, foi realizada a titulação da solução a 30% de H₂O₂ (Nuclear), por permanganometria, para garantir a concentração dos controles positivos.

O controle negativo consiste apenas em células mantidas em meio 199 e foi preparado exatamente da mesma forma que os controles positivos e as células tratadas com violaceína.

4.5.3 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

Pré-cobertura:

Lâminas de microscópio, foscas apenas numa extremidade, limpas com etanol antes do uso, foram mergulhadas numa solução 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 inferior das lâminas foi limpo e as mesmas foram armazenadas a 4° C. As lâminas foram codificadas na extremidade fosca.

Primeira camada:

A suspensão celular (15 µL), previamente preparada, foi dispersa em 90 µL de uma suspensão de agarose com baixo ponto de fusão (Low Melting Agarose= LMA, Gibco-BRL) a 0,5% em PBS livre de Ca²⁺ e Mg²⁺, a 37° C. Imediatamente após a mistura, essa suspensão foi gotejada sobre a lâmina previamente preparada (pré-cobertura) e já codificada e, então, coberta com uma lamínula de 24x60mm. As lâminas foram mantidas a 4° C, durante 15 min, para a solidificação da agarose. A partir deste momento, as lâminas foram protegidas da luz, com papel alumínio, para prevenção de danos adicionais ao DNA.

4.5.4 LISE DAS CÉLULAS

Após, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram mergulhadas na solução de lise recém-preparada e mantida a 4° C, por um período não inferior a 1 h. A solução de lise é composta por NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris-HCl 10

mM, 10% de DMSO, 1% sarcosinato de sódio, 1% de Triton X-100 e NaOH adicionado em q.s.p. para obter pH 10. As lâminas podem ser mantidas na solução de lise por até 30 dias. A solução de lise é uma solução detergente com altas concentrações de sais, que promove a desintegração das membranas celulares.

4.5.5 TRATAMENTO ALCALINO E ELETROFORESE

Após a lise, as lâminas foram acomodadas numa cuba horizontal de eletroforese e cobertas com um filme de tampão alcalino pH 13 (300 mM de NaOH e 1 mM de EDTA), devendo permanecer em tratamento alcalino, durante 30 min, a 4° C, em banho de gelo.

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

A corrida de eletroforese foi realizada em corrente elétrica de 280-300 mA e 25 V, por 30 min.

4.5.6 NEUTRALIZAÇÃO E COLORAÇÃO

Após a corrida eletroforética, as lâminas foram neutralizadas através de lavagem 3X com o tampão de neutralização (Tris-HCl 0,4 M; pH 7,5), por 5 min cada.

Em seguida, as lâminas foram coradas com 50 µL de uma solução de brometo de etídeo 20 µg/mL (um agente intercalante de DNA que emite fluorescência quando exposto à radiação UV) e observadas ao microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40), aumento de 200x, com filtro de excitação de 515-560 nm, com filtro barreira de 590 nm.

4.5.7 ANÁLISE DOS COMETAS

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

No microscópio de epifluorescência foram examinadas ao acaso 50 células, na região central de cada lâmina codificada, para cada concentração da violaceína, assim como para os controle (+) e (-), e os danos foram classificados em função da forma e do comprimento das caudas dos cometas: **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 ou com cabeça pequena.

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 zero (ausência de dano referente ao cometa 1 para núcleos intactos) a quatro (dano máximo referente ao cometa tipo 5). Desta forma, o escore total para 50 células variou de zero (totalmente sem danos) a 200 (totalmente danificadas).

4.5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cada experimento foi realizado em triplicata e para cada tratamento foram confeccionadas duas lâminas. Foram analisadas, ao acaso, 50 células em cada lâmina.

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

O efeito dos tratamentos nas diferentes células em relação à intensidade e frequência da formação de cometas foi analisado utilizando a análise de variância, com nível de significância de 5%. Após, quando necessário, foi

utilizado o teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para a separação de médias (SOKAL; ROHLF, 1995).

4.6 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO*

4.6.1 INIBIÇÃO DO EFEITO CITOPÁTICO VIRAL

O efeito citopático viral foi definido por ENDERS et al. (1949) como sendo o conjunto das lesões provocadas pelos vírus nas células onde eles se replicam. A maioria dos vírus provoca modificações celulares específicas e fáceis de serem detectadas ao microscópio invertido.

Técnica: uma suspensão de células VERO ou FRhK-4 ou MA104 ou HEP-2, contendo aproximadamente 2×10^5 células/mL foi preparada e distribuída em uma placa de 96 cavidades. Após incubação de 24 h, a 37° C, as células atingiram confluência. Após retirar o meio por sucção, foram adicionados simultaneamente 100 µL das diferentes concentrações da violaceína, (2,5 – 0,078 µM), dissolvidas em meio 199 sem SFB (razão de 1:2) e 100 µL da suspensão dos diferentes vírus em estudo: HSV-1, cepas KOS e ATCC/VR-733 – MOI: 0,1, cepa 29R – MOI: 0,5; PV-2 – MOI: 0,3; HAV, cepas HM175 e HAF203 – MOI: 0,02; RV-SA11 – MOI: 0,2; AdV-5 – MOI: 0,03. A suspensão viral do rotavírus foi, previamente, incubada com tripsina (5 µg/mL), a 37° C, por 20 min. Foram realizados controles virais (100 µL da suspensão viral + 100 µL de meio199), controles celulares (200 µL de meio 199) e controles positivos de inibição do ECP: no caso do HSV-1 (100 µL de suspensão viral + 100 µL de solução de aciclovir 2,5; 5,0 e 10 µg/mL); os demais vírus não dispõem de controle (+) de inibição. O controle celular permite verificar as boas condições do tapete celular, confirmando sua integridade na ausência da violaceína e dos vírus, e o controle viral permite verificar se os vírus estão ativos, nas condições testadas. Em todos os experimentos com o HAV, o meio 199 foi suplementado com 2% SFB e naqueles com o rotavírus, o meio foi acrescido de 5 µg/mL de tripsina e sem

SFB. Após a incubação, a 37° C, em estufa de CO₂, durante 24 h para o PV-2, 48 h para o rotavírus, 72 h para o HSV-1 e 144 h para o HAV e o AdV-5, as leituras foram realizadas ao microscópio invertido e a inibição do ECP foi comparada com os controles. O ECP foi estimado de acordo com um escore de 1 a 5, conforme o grau de destruição do tapete celular (SIMÕES; AMOROS; GIRRE, 1999a):

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

A concentração que inibe o ECP em aproximadamente 50% das células (CE₅₀) foi estimada a partir dos valores de cada categoria, por análise de regressão (SOKAL; ROHLF, 1995). De posse dos valores estimados de CC₅₀ e CE₅₀, pode-se calcular o índice de seletividade (IS), que é a relação entre CC₅₀ e CE₅₀. A disposição das diferentes concentrações da violaceína e dos controles na placa de microtitulação estão ilustrados na Figura 4.

4.6.2 ENSAIO COLORIMÉTRICO COM SAL DE TETRAZOLIUM (MTT)

A avaliação da atividade antiviral foi realizada da mesma forma que para a citotoxicidade (item 5.53), porém com a adição das suspensões virais.

Técnica: células VERO ou MA104 ou FRhK-4 ou HEp-2 foram cultivadas em placas de 96 cavidades (2x10⁵ células/mL) até confluência (24 h). Então, o meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100 µL das diferentes concentrações da violaceína, (2,5 – 0,078 µM), dissolvidas em meio 199 sem SFB (razão de 1:2) e 100 µL da suspensão dos diferentes vírus em estudo: HSV-1, cepas KOS e ATCC/VR-733 – MOI: 0,1, cepa 29R – MOI: 0,5; PV-2 – MOI: 0,3; HAV, cepas HM175 e HAF203 – MOI: 0,02; RV-SA11 – MOI: 0,2; AdV-5 – MOI: 0,03. A suspensão viral do rotavírus foi, previamente,

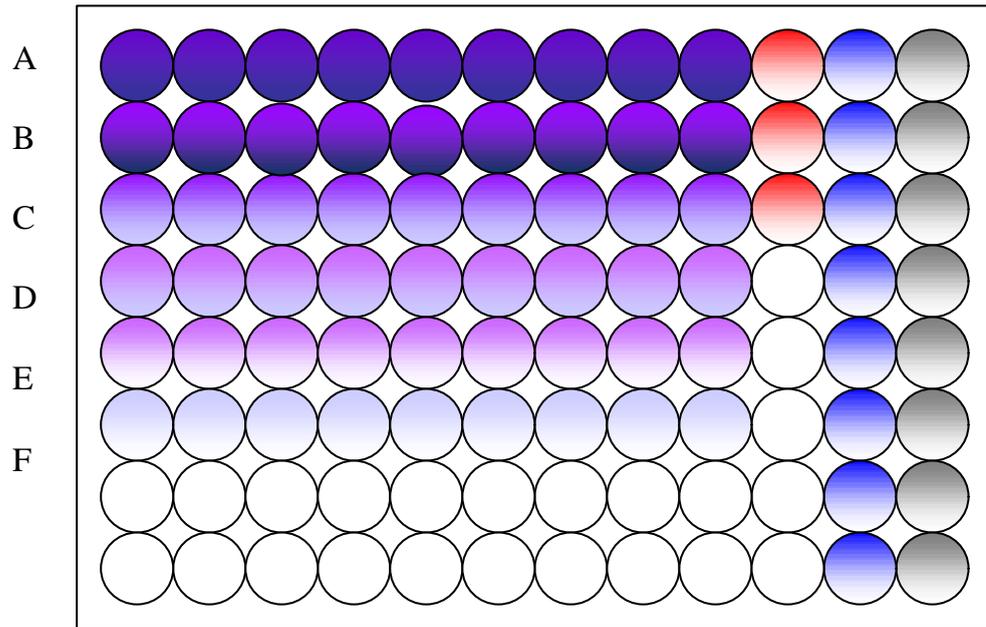
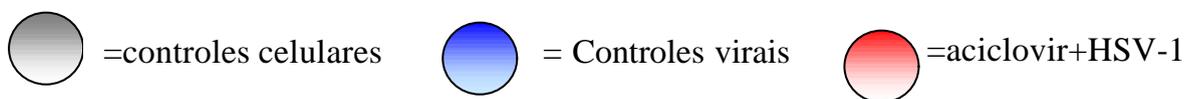


Figura 4: Exemplo da disposição da placa de microtitulação para avaliação da atividade antiviral das diferentes concentrações de violaceína, em relação ao HSV-1, em células VERO, por inibição do efeito citopático (ECP) viral.



A-F= diferentes concentrações da violaceína (2,5 – 0,078 μ M)

incubada com tripsina (5 μ g/mL), a 37° C, por 20 min. Foram realizados controles virais (100 μ L da suspensão viral + 100 μ L de meio 199), controles celulares (200 μ L de meio 199) e controles positivos de inibição do HSV-1 (100 μ L de suspensão viral + 100 μ L de solução de aciclovir 2,5; 5,0 e 10 μ g/mL); os demais vírus não dispõem de controle (+) de inibição. Em todos os experimentos com o HAV, o meio 199 foi suplementado com 2% SFB e naqueles com o rotavírus, o meio foi acrescido de 5 μ g/mL de tripsina e sem SFB. As placas foram incubadas a 37° C, em estufa de CO₂, durante dois dias para o PV-2, três dias para o rotavírus, quatro dias para o HSV-1 e sete dias para o HAV e o AdV-

5. Após o período de incubação, foi aspirado todo o meio e foram adicionados 50 μL da solução do MTT (Sigma) (1 mg/mL em meio 199), em todas as cavidades da placa, e essa foi incubada por 4 h. Após o período de incubação, foi retirado o meio + MTT de cada cavidade, cuidadosamente, sem danificar as células e foram adicionados 100 μL de DMSO (Nuclear), em todas as cavidades, para solubilizar o formazan. Após, as placas foram agitadas, levemente, a temperatura ambiente, por 5-10 min, para que todo o formazan fosse solubilizado e lidas a 540 nm em leitor tipo ELISA (Bio-Tek, EL_x 800

As porcentagens de proteção foram calculadas através da fórmula:

$$\frac{(A)_{\text{EXP}} - (A)_{\text{CV}}}{(A)_{\text{CC}} - (A)_{\text{CV}}} \times 100\%$$

Onde: $(A)_{\text{EXP}}$, $(A)_{\text{CV}}$ e $(A)_{\text{CC}}$ indicam, respectivamente, as absorbâncias das cavidades com (violaceína + vírus), (controle viral) e (controle celular).

A CE_{50} da violaceína foi calculada a partir das porcentagens médias de proteção (triplicatas), por análise de regressão (SOKAL; ROHLF, 1995).

4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Nos experimentos, foi utilizado o delineamento de blocos completamente casualizados (BCC) e um arranjo fatorial dos tratamentos, onde cada cavidade constituiu uma unidade experimental (placas de 96 cavidades e/ ou 12 cavidades) e os tratamentos foram as diferentes concentrações da violaceína, frente a diferentes linhagens celulares, no caso da citotoxicidade ou da genotoxicidade, ou diferentes tipos de vírus, quando da avaliação da atividade antiviral. Os tratamentos e os controles foram distribuídos aleatoriamente entre as cavidades e as repetições (três) ficaram em placas diferentes, garantindo a casualização. Cada placa correspondeu a um bloco, permitindo uma melhor avaliação das possíveis variações entre as repetições.

O estudo de qualquer atividade biológica em cultura celular tem como vantagem, entre muitas outras, a homogeneidade das amostras. Um erro grave que, normalmente, é cometido quando se trata de experimentos realizados em placas de microtitulação, é acreditar que, colocando-se as mesmas concentrações de um material em teste, em duas ou três colunas na placa, se estaria fazendo uma duplicata ou replicata. Estatisticamente, esse procedimento é considerado apenas uma réplica de um mesmo tratamento e não uma repetição, pois a variância devido a fatores externos (erro experimental) não estaria sendo levado em consideração (SOKAL; ROHLF, 1995).

5 RESULTADOS

5.1 DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS VIRAIS

Os títulos infecciosos das soluções-estoques virais foram determinados conforme as metodologias descritas no item 5.3.3. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2: Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados.

Vírus	Títulos
HSV-1 cepa KOS	$5 \times 10^{6,25}$ TCID ₅₀ /mL
HSV-1 cepa VR733	$5 \times 10^{6,25}$ TCID ₅₀ /MI
HSV-1 cepa 29R	$5 \times 10^{5,64}$ TCID ₅₀ /mL
AdV-5	$5 \times 10^{5,00}$ TCID ₅₀ /mL
HAV cepa HM-175	$2,5 \times 10^3$ ffu/mL
HAV cepa HAF-203	$2,5 \times 10^4$ ffu/mL
RV SA-11	$3,4 \times 10^7$ ffu/mL
PV-2	$5,6 \times 10^6$ pfu/mL

5.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A avaliação da citotoxicidade da violaceína frente às células VERO, MA104 FRhK-4 e HEp-2 foi realizada através de diferentes metodologias: avaliação microscópica das alterações morfológicas celulares, viabilidade celular através do método de exclusão do corante azul de Trypan e viabilidade celular através do ensaio do MTT. Os valores de CC₅₀ obtidos estão sumarizados na Tabela 3. A incubação das diferentes linhagens celulares, com concentrações crescentes de violaceína (0,078 µM a 5 µM) conduziram a um aumento da citotoxicidade (Figura 5), ou seja a citotoxicidade da violaceína é concentração-dependente.

Os resultados de citotoxicidade obtidos pela avaliação microscópica das alterações morfológicas celulares e pelo método de exclusão do azul de Trypan foram estatisticamente diferentes daqueles obtidos pelo ensaio do MTT ($p < 0,05$ – teste *t*-Student) (Figura 6).

Tabela 3: Resultados da determinação da citotoxicidade da violaceína frente a diferentes linhagens celulares, avaliada através de diferentes métodos.

Método Utilizado	Linhagem Celular	Citotoxicidade CC ₅₀ (μM)
Avaliação microscópica das alterações morfológica celulares	VERO	2,29 ± 0,23
	MA104	2,69 ± 0,12
	FRhK-4	2,42 ± 0,22
	HEp-2	2,78 ± 0,13
Viabilidade celular por exclusão do azul de Trypan	VERO	2,23 ± 0,06
	MA104	2,54 ± 0,10
	FRhK-4	2,07 ± 0,05
	HEp-2	2,70 ± 0,12
Viabilidade celular por colorimetria (ensaio do MTT)	VERO	2,96 ± 0,12
	MA104	3,55 ± 0,22
	FRhK-4	3,14 ± 0,32
	HEp-2	3,42 ± 0,05

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

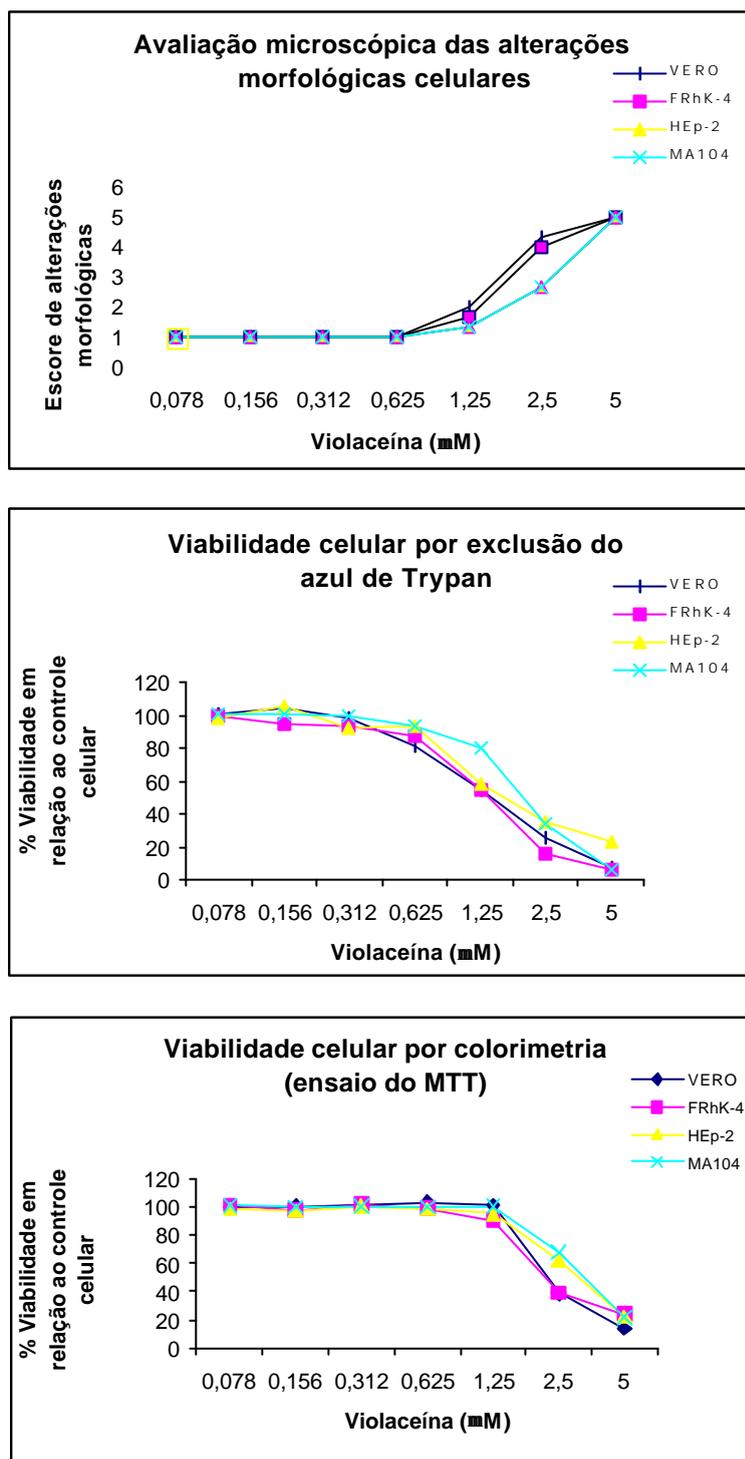


Figura 5: Resultados da determinação da citotoxicidade da violaceína frente às células VERO, MA104 e FRhK-4 e HEp-2, avaliada através de diferentes métodos. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes.

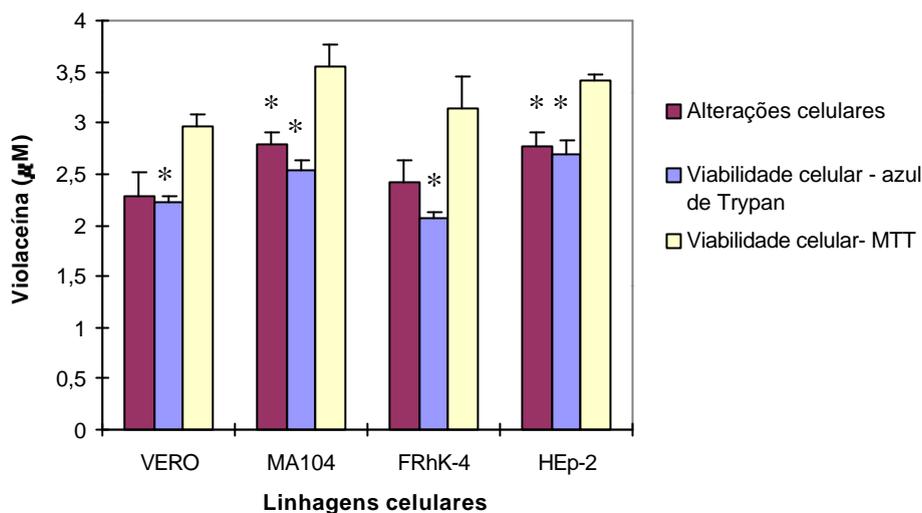


Figura 6: Resultados da avaliação da citotoxicidade da violaceína frente a diferentes linhagens celulares, através de três métodos: microscopia das alterações morfológicas celulares, viabilidade celular por exclusão do azul de Trypan e pelo ensaio colorimétrico do MTT. Cada barra representa a média da $CC_{50} \pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes. * Os valores diferem significativamente daqueles obtidos pelo ensaio do MTT (teste *t*- Student $p < 0,05$).

5.3 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE ATRAVÉS DO ENSAIO DO COMETA

A viabilidade celular das diferentes linhagens celulares foi determinada imediatamente após o tratamento com a violaceína, através do método de exclusão do azul de Trypan (Tabela 4) e, em todas as situações, foi $> 90\%$. As diferentes linhagens celulares apresentaram viabilidade celular $> 80\%$ para os controles positivos tratados com 100 e 200 μM de peróxido de hidrogênio e maior do que 90% para os controles negativos, também através do método de exclusão do azul de Trypan (dados não mostrados).

A avaliação da genotoxicidade da violaceína frente às células VERO, MA104, FRhK-4 e HEp-2 foi realizada através do Ensaio do Cometa. Os efeitos no DNA celular das diferentes linhagens celulares, após o tratamento com

diferentes concentrações da violaceína, duas concentrações do peróxido de hidrogênio (controles positivos) e meio 199 (controle negativo) estão representados nas Figuras 7 e 8.

Através deste ensaio, verificou-se que a violaceína induziu um aumento de quebras do DNA, concentração-dependente, para as linhagens celulares VERO e FRhK-4 (Figura 9).

O peróxido de hidrogênio foi utilizado como controle positivo do experimento em duas concentrações: 100 e 200 μM . (Tabela 5) e conduziu à formação de diferentes classes de cometa (Figura 10).

Os resultados obtidos com cada linhagem celular foram submetidos à análise de variância e ao F-teste, e os resultados estão descritos nas Tabelas 6, 7, 8 e 9.

As linhagens celulares VERO, FRhK-4 e MA104 apresentaram um F teste calculado $>$ F teste tabelado, a um nível de significância de 5%, sendo submetidas ao Teste SNK para a separação das médias (Tabela 10).

Pela análise de variância, verificou-se que as linhagens celulares VERO, FRhK-4 e MA104 apresentam diferenças significativas nas respostas às diferentes concentrações da violaceína, e que pelo teste de separação das médias entre si (teste SNK, $p < 0,05$), a concentração de 1,5 μM foi estatisticamente diferente das demais concentrações testadas, nas três linhagens celulares. No entanto, os resultados obtidos com as células HEp-2, tratadas com diferentes concentrações da violaceína, não foram estatisticamente diferentes ($p > 0,05$).

Tabela 4: Resultados da determinação da viabilidade das diferentes linhagens celulares tratadas com violaceína, através do método de exclusão do azul de Trypan.

Linhagem celular	Violaceína (μM)	Viabilidade celular (%)
VERO	1,50	$94,4 \pm 0,2$
	0,75	$96,0 \pm 0,7$
	0,37	$96,0 \pm 0,6$
	0,19	$95,3 \pm 0,3$
MA104	1,50	$92,0 \pm 1,9$
	0,75	$91,8 \pm 0,4$
	0,37	$93,0 \pm 0,7$
	0,19	$91,6 \pm 0,7$
FRhK-4	1,50	$90,5 \pm 0,5$
	0,75	$92,7 \pm 0,4$
	0,37	$94,6 \pm 1,4$
	0,19	$92,9 \pm 0,7$
HEp-2	1,50	$91,3 \pm 0,2$
	0,75	$92,1 \pm 0,3$
	0,37	$92,6 \pm 0,1$
	0,19	$93,6 \pm 0,5$

Os valores representam a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes.

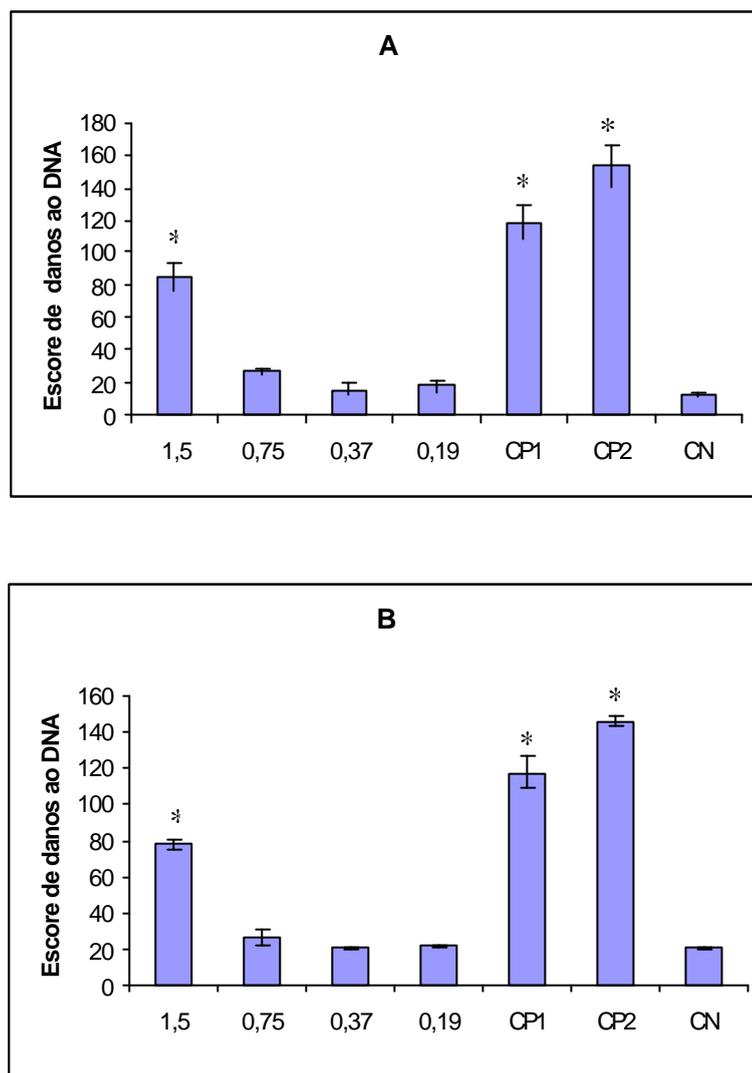


Figura 7: Resultados da avaliação da genotoxicidade da violaceína frente às linhagens celulares VERO (A) e FRhK-4 (B), tratadas com diferentes concentrações da violaceína (0,19 – 1,5 μM); CN= controle negativo (meio 199); CP1= 100 μM e CP2= 200 μM de peróxido de hidrogênio (controles positivos). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. * As diferenças entre o controle negativo e os tratamentos foram estatisticamente significativas pelo teste *t*-Student ($p < 0,05$).

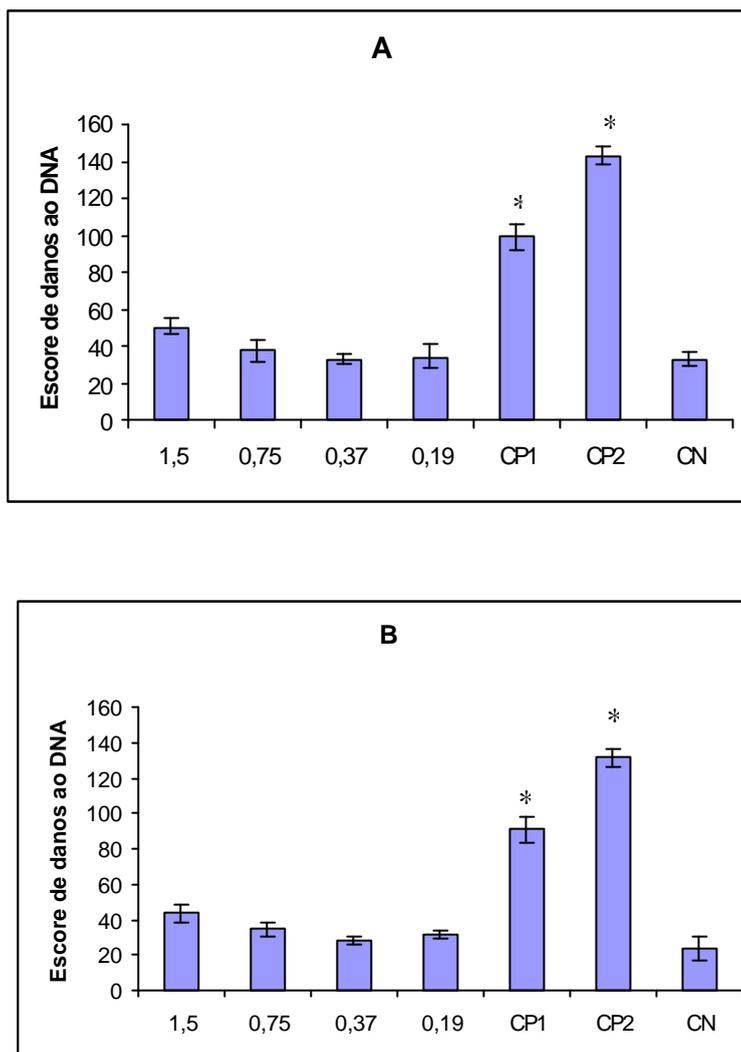


Figura 8 Resultados da avaliação da genotoxicidade da violaceína frente às linhagens celulares MA104 (A) e HEP-2 (B), tratadas com diferentes concentrações da violaceína (0,19 – 1,5 μM); CN= controle negativo (meio 199); CP1= 100 μM e CP2= 200 μM de peróxido de hidrogênio (controles positivos). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. * As diferenças entre o controle negativo e os tratamentos foram estatisticamente significativas pelo teste *t*-Student ($p < 0,05$).

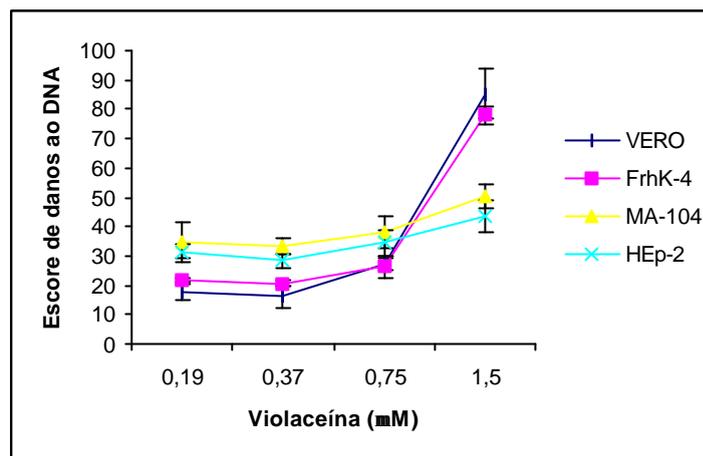


Figura 9: Efeito genotóxico da violaceína, após uma hora de incubação, avaliado através do Ensaio do Cometa, sobre diferentes linhagens celulares. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes.

Tabela 5: Efeito genotóxico do peróxido de hidrogênio, após uma hora de incubação, avaliado através do Ensaio do Cometa, sobre diferentes linhagens celulares.

Linhagem celular	Escore de danos ao DNA			
	VERO	FRhK-4	MA104	HEp-2
Controle negativo	12,67 \pm 1,30	20,50 \pm 0,58	33,33 \pm 3,76	23,67 \pm 6,84
H ₂ O ₂ (100 μ M)	118,67 \pm 10,49*	117,33 \pm 8,97*	99,00 \pm 7,09*	90,83 \pm 7,02*
H ₂ O ₂ (200 μ M)	153,33 \pm 12,81*	145,17 \pm 3,03*	142,83 \pm 5,06*	131,33 \pm 4,63*

Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes.
 * Diferenças estatisticamente significativas entre o controle negativo e os tratamentos com H₂O₂ (teste *t*-Student $p < 0,05$).

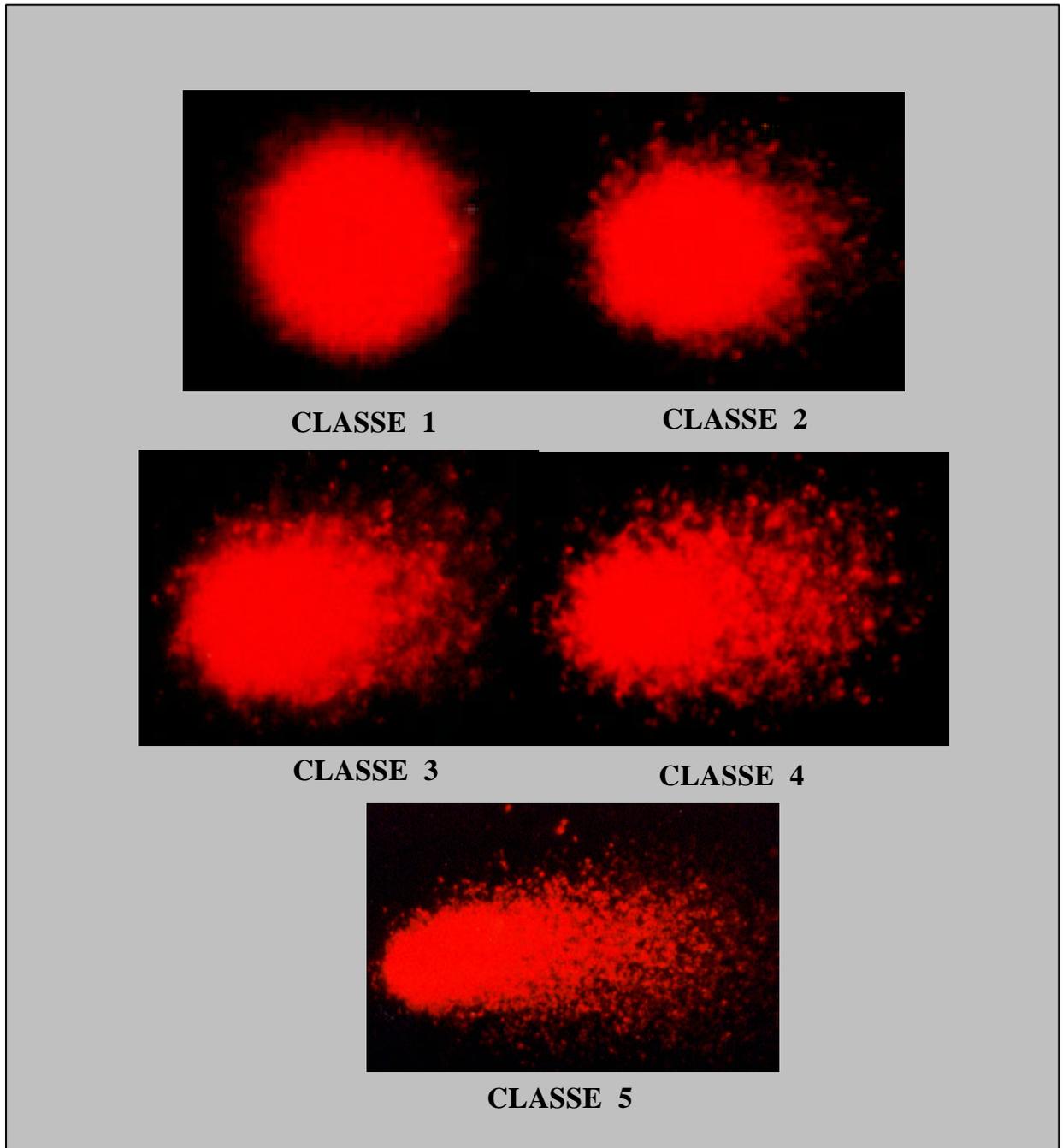


Figura 10: Diferentes classes de cometa obtidas pelo tratamento de células VERO com H_2O_2 100 μM , avaliadas através do Ensaio do Cometa e classificadas segundo Kobayashi et al. (1995), com algumas modificações propostas por Miyamae et al. (1998a). Coloração com brometo de etídeo, 400X. Fonte: Autora

Tabela 6: Análise de variância a dos resultados obtidos com as células VERO, tratadas com diferentes concentrações da violaceína (0,19 – 1,5 μM), através do Ensaio do Cometa.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F teste	CV _{exp} (%)
Blocos	2	0,0010			
Concentrações	3	1,0316	0,3439	19,53	9,18
Erro	6	0,1054	0,0176		
Total	11	1,1381			

GL= graus de liberdade; SQ= soma dos quadrados; QM= quadrados médios; F teste= SQ/QM; CV_{exp}= coeficiente de variação experimental. Valor de F tabelado: F_{0,05 (3,6)}= 4,76. Dados transformados em log.

Tabela 7: Análise de variância dos resultados obtidos com as células FRhK-4, tratadas com diferentes concentrações da violaceína (0,19 – 1,5 μM), através do Ensaio do Cometa.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F teste	CV _{exp} (%)
Blocos	2	0,0050			
Concentrações	3	0,6584	0,2195	62,71	16,30
Erro	6	0,0209	0,0035		
Total	11	0,6843			

GL= graus de liberdade; SQ= soma dos quadrados; QM= quadrados médios; F teste= SQ/QM; CV_{exp}= coeficiente de variação experimental. Valor de F tabelado: F_{0,05 (3,6)}= 4,76. Dados transformados em log.

Tabela 8: Análise de variância dos resultados obtidos com as células MA104, tratadas com diferentes concentrações da violaceína (0,19 – 1,5 μM), através do Ensaio do Cometa.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F teste	CV _{exp} (%)
Blocos	2	376,1667			
Concentrações	3	563,0833	187,6944	5,51	14,92
Erro	6	204,1667	34,0278		
Total	11	1143,4167			

GL= graus de liberdade; SQ= soma dos quadrados; QM= quadrados médios; F teste= SQ/QM; CV_{exp}= coeficiente de variação experimental. Valor de F tabelado: F_{0,05 (3,6)}= 4,76.

Tabela 9: Análise de variância dos resultados obtidos com as células HEp-2, tratadas com diferentes concentrações da violaceína (0,19 – 1,5 μM), através do Ensaio do Cometa.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F teste	CV _{exp} (%)
Blocos	2	113,5417			
Concentrações	3	384,0625	128,0208	3,47	17,62
Erro	6	221,1250	36,8542		
Total	11	718,7292			

GL= graus de liberdade; SQ= soma dos quadrados; QM= quadrados médios; F teste= SQ/QM; CV_{exp}= coeficiente de variação experimental. Valor de F tabelado: F_{0,05 (3,6)}= 4,76

Tabela 10: Resultados da aplicação do teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para a separação das médias do escore dos danos causados ao DNA das células VERO, MA104 e FRhK-4, tratadas com diferentes concentrações da violaceína (0,19 - 1,5 μ M), através do Ensaio do Cometa.

Concentrações da violaceína (μ M)	Média do escore de danos ao DNA		
	VERO ^a	FRhK-4 ^a	MA104
0,19	1,18	1,31	33,00
0,37	1,23	1,34	34,67
0,75	1,43	1,41	38,17
1,50	1,92*	1,89*	50,50*

^a Os resultados das médias do escore de danos ao DNA foram transformados em log antes de serem submetidos à análise de variância. * As diferenças entre as médias foram estatisticamente significativas pelo teste SNK ($p < 0,05$).

5.4 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO*

A atividade antiviral da violaceína foi realizada através de duas metodologias: pela inibição do efeito citopático viral (ECP) monitorada por microscopia e pelo ensaio colorimétrico do MTT.

Após o período de incubação de 24 h para o PV-2, 48 h para o rotavírus e 72 h para o HSV-1 cepa KOS e HSV-1 cepa ATCC/VR-733, não foi possível estimar os valores da CE_{50} a partir da leitura da inibição do ECP ao microscópio invertido, pois a violaceína apresentou baixa atividade inibitória desses vírus, tendo sido necessária a utilização de um método mais sensível para a detecção desta baixa atividade antiviral. Além disso, a violaceína não inibiu o efeito citopático viral dos vírus HSV-1 cepa 29-R, HAV cepas HM-175 e HAF-203 e AdV-5.

A atividade antiviral da violaceína foi, então, avaliada através do ensaio colorimétrico do MTT. As porcentagens de inibição de infecção foram calculadas através da fórmula citada no item 5.7.2 e os resultados obtidos estão descritos na

Tabela 11. As baixas porcentagens de inibição de infecção em estudo não permitiram o cálculo das CE_{50} e dos IS para a violaceína.

Tabela 11: Resultados da determinação da atividade antiviral da violaceína, através do ensaio colorimétrico do MTT.

Vírus	Violaceína (μ M)	% de Inibição	Aciclovir*(μ g/mL)	% de inibição
HSV-1				
Cepa 29-R	0,078 - 2,5	Sem inibição	2,5-10	Sem inibição
Cepa KOS	0,312	1,42 \pm 0,68	2,5	96,50 \pm 0,82
	0,625	14,48 \pm 5,06	5	99,28 \pm 0,72
	1,250	21,47 \pm 3,74	10	99,93 \pm 3,06
Cepa VR-733	0,312	5,96 \pm 2,51	2,5	99,81 \pm 2,19
	0,625	8,75 \pm 3,08	5	101,81 \pm 3,39
	1,250	17,75 \pm 5,19	10	101,60 \pm 2,77
RV-SA11	0,312	8,30 \pm 4,24	-	-
	0,625	13,33 \pm 4,66	-	-
	1,250	24,27 \pm 2,18	-	-
PV-2	0,312	5,13 \pm 2,38	-	-
	0,625	8,18 \pm 1,11	-	-
	1,250	8,51 \pm 1,94	-	-
HAV				
Cepa HM175	0,078 - 2,5	Sem inibição	-	-
Cepa HAF203	0,078 - 2,5	Sem inibição	-	-
AdV-5	0,078 - 2,5	Sem inibição	-	-

Os valores representam a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. * Controle positivo de inibição do HSV-1.

6 DISCUSSÃO

6.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade foi definida por NARDONE (1977) como sendo o conjunto de alterações da homeostase celular, que leva a uma série de modificações, que interferem na capacidade adaptativa das células, bem como na sua sobrevivência, reprodução e realização de suas funções metabólicas.

Os programas de desenvolvimento de fármacos envolvem, além da pesquisa das atividades farmacológicas, o estudo da citotoxicidade dos mesmos. Ambos são importantes para indicar seu potencial terapêutico e sua segurança (WILSON, 2000).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são importantes para verificar a toxicidade de novos compostos nos estágios iniciais de desenvolvimento de fármacos (PUTNAM; BOMBICK; DOOLITTLE, 2002), pois o equilíbrio entre os efeitos farmacológicos e toxicológicos de um composto é um requisito importante, quando se está verificando sua aplicabilidade como agente terapêutico (MELO et al., 2000).

O composto antiviral ideal é aquele que inibe somente a(s) etapa(s) do ciclo de replicação viral, sem interferir na célula hospedeira, possibilitando que essa se recupere da infecção e mantenha sua atividade metabólica (VANDEN BERGHE; VLIETINCK; VAN HOOFF, 1986). Na pesquisa de novos fármacos antivirais deve-se considerar seus efeitos tóxicos sobre as células hospedeiras, pois se os mesmos forem excessivamente tóxicos, a sua utilização se torna inviável, mesmo se esses apresentarem uma ação antiviral significativa, já que algumas substâncias podem exibir tal atividade em virtude dos seus efeitos tóxicos sobre as células (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis e necessários para definir a citotoxicidade basal, ou seja, a habilidade intrínseca de um composto em causar alterações e morte celular, como conseqüência de dano das funções celulares

básicas. Esses testes são necessários para definir o limite de concentração para testes *in vitro* posteriores e mais detalhados, e também para fornecer informações significativas sobre outros parâmetros a serem pesquisados, como a genotoxicidade (EISENBRAND et al., 2002).

Os ensaios mais frequentemente usados para avaliar citotoxicidade baseiam-se na alteração da permeabilidade celular (ex. uso de corantes vitais, tais como azul de Trypan, preto de naftaleno, eosina, etc), nas funções mitocondriais (ex. ensaio do MTT, XTT, etc), e nas alterações da morfologia celular e da proliferação celular (ex. ensaios de proliferação celular, ensaios clonogênicos, etc). Esses ensaios já estão estabelecidos para muitos tipos de células e avaliam diferentes aspectos das funções celulares (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997; WILSON, 2000; EISENBRAND et al., 2002).

O primeiro e o mais fácil efeito observado, após a exposição das células a um composto ou a uma mistura de compostos (ex. extratos de plantas), é a avaliação microscópica das alterações morfológicas ocorridas na monocamada de células, as quais se traduzem pela desorganização do tapete celular e/ou pelo aspecto granuloso, arredondado e vacuolizado das células (STREISSLE et al, 1981; BARILE,1994).

Outra técnica para avaliar a citotoxicidade é a avaliação da viabilidade celular, através do método de exclusão do corante azul de Trypan, o qual permite determinar a integridade das membranas (WILSON, 2000). Esse corante só penetra em células mortas cujas membranas não podem mais excluí-lo. A contagem das células viáveis é comparada com o controle e fornece um índice de toxicidade do composto (WALUM; STRENBORG; JENSSEN, 1990; BARILE,1994).

No ensaio do MTT, o sal de tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium] é um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em suas mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto formazan de coloração

azul-escuro, não solúvel em água, que fica armazenado no citoplasma celular (DENIZOT; LANG, 1986). Após a adição de DMSO (DENIZOT; LANG, 1986; CARMICHAEL et al., 1987; TODRYK, et al., 2001), isopropanol (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991; SUDO et al., 1994) ou outro solvente apropriado, o produto é solubilizado, liberado e quantificado colorimetricamente, através de espectrofotometria tipo ELISA. A habilidade das células em reduzirem o MTT fornece uma indicação da atividade e da integridade mitocondrial, que são interpretadas como medidas da viabilidade celular (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986; BARILE, 1994). A técnica foi descrita por Mosmann (1983), primeiramente, para avaliar compostos com atividade antitumoral, que está intimamente relacionada com citotoxicidade. Em 1988, Pauwels et al. (1988) modificaram a técnica para avaliar a potencial atividade antiviral (anti-HIV) e a citotoxicidade de vários compostos, o que representou uma inovação na metodologia já existente. Em 1991, Takeuchi, Baba e Shigeta utilizaram esse teste para avaliar a atividade antiviral e a citotoxicidade de compostos conhecidamente antiherpéticos, tais como aciclovir, brovavir, vidarabina e sulfato de dextrana.

O ensaio do MTT é apropriado para uma variedade de linhagens celulares, que exibem crescimento exponencial em cultura e alto nível de atividade mitocondrial. Deve-se levar em consideração que alguns compostos afetam seletivamente a mitocôndria, resultando em uma superestimação da toxicidade (BARILE, 1994; SMEE et al., 2002).

Substâncias indicadoras colorimétricas da viabilidade celular, tal como MTT (TAKAHASHI et al., 2001; SMEE et al., 2002) ou vermelho neutro (CHIBA; KAWAKAMI; TOHYAMA, 1998; MELO et al., 2000), são utilizados para uma avaliação menos subjetiva da citotoxicidade (SMEE et al., 2001, 2002).

Em adição à potencial subjetividade, causadora de erros, todos os métodos baseados na inspeção visual consomem tempo e são trabalhosos, e portanto, são inapropriados para pesquisas em grande escala. As análises espectrofotométricas da conversão metabólica de corantes são mais objetivas, rápidas e de menor custo

do que os métodos baseados na avaliação visual (GUTLEB; MORRISON; MURK, 2002).

O método de exclusão de corantes, como o azul de Trypan, exige trabalho intenso principalmente no tempo de leitura; o ensaio do MTT, ao contrário, oferece rapidez, pois testa grande número de substâncias e tem boa reprodutibilidade, particularmente, em linhagens de células aderentes (CARMICHAEL et al., 1987).

Antes de se iniciar os experimentos de avaliação da potencial atividade antiviral da violaceína, foi necessário avaliar a citotoxicidade da mesma frente às células VERO, MA104, FRhK-4 e HEp-2, as quais foram utilizadas, posteriormente, nos ensaios da genotoxicidade e da avaliação da atividade antiviral, cujos resultados foram apresentados na Tabela 3.

Na avaliação da citotoxicidade da violaceína, optou-se por trabalhar com mais de um teste de citotoxicidade, pois estudos preliminares demonstraram que a violaceína apresenta alta citotoxicidade para os fibroblastos V79 ($CC_{50} = 7 \mu\text{M}$ – ensaio do MTT) (MELO et al., 2000). Esta alta toxicidade também foi verificada nas linhagens celulares utilizadas neste trabalho, onde a violaceína apresentou os seguintes valores de CC_{50} , também utilizando o ensaio do MTT: $2,96 \pm 0,20 \mu\text{M}$ (VERO); $3,14 \pm 0,55 \mu\text{M}$ (FRhK-4); $3,42 \pm 0,08 \mu\text{M}$ (HEp-2) e $3,55 \pm 0,39 \mu\text{M}$ (MA104).

As diferenças de sensibilidade à violaceína foram detectáveis pelas três técnicas entre as linhagens celulares, sendo as células VERO ligeiramente mais sensíveis.

A violaceína atua sobre as células de uma maneira concentração-dependente, já que a citotoxicidade aumentou progressivamente com o aumento da concentração da violaceína, conforme verificado pelos três métodos utilizados (Figura 5).

Os resultados da avaliação da citotoxicidade foram diferentes, dependendo da linhagem celular. Os valores de CC_{50} obtidos pela avaliação microscópica das alterações morfológicas celulares e da viabilidade celular pelo método de

exclusão do corante azul de Trypan foram significativamente diferentes dos valores de CC_{50} obtidos pelo ensaio do MTT ($p < 0,05$ – teste t -Student) (Figura 6). Os resultados dos métodos baseados na inspeção visual são questionáveis devido à subjetividade da avaliação e ao método escolhido para avaliar a viabilidade (por ex. contagem de células após coloração) (GUTLEB; MORRISON; MURK, 2002), enquanto que os ensaios colorimétricos, tal como o ensaio do MTT, são mais exatos e precisos, permitem quantificar rapidamente a citotoxicidade dos compostos estudados.

Segundo Smee et al. (2002), o uso de análises colorimétricas é muito importante para avaliar a toxicidade ao invés de somente contar com os resultados visuais, pois as células podem parecer normais, quando observadas microscopicamente, mesmo quando as substâncias-teste estiverem causando toxicidade. Algumas vezes, as células estão alteradas morfológicamente, enquanto que os resultados da avaliação pelo método de exclusão de corantes indicam valores equivalentes aos dos controles celulares.

O ensaio do MTT pode superestimar a toxicidade de certas substâncias, porque esse sal sofre conversão enzimática em células viáveis, mas é possível que certos compostos possam inibir este processo, fazendo que o composto pareça mais tóxico do que ele realmente é. Compostos que são naturalmente coloridos podem interferir em testes colorimétricos. Assim, é importante determinar se os resultados obtidos usando o corante concordam com aqueles obtidos pela avaliação visual; ou mesmo realizar outro método colorimétrico em paralelo (SMEE et al., 2002).

O ensaio de viabilidade celular, através do método de exclusão do azul de Trypan, é mais adequado para culturas em suspensão do que em monocamada, porque a morte das células pode levar ao descolamento da monocamada, cujas células são, então, perdidas (WILSON, 2000). Este fato poderia justificar os menores valores de CC_{50} (Figura 6) obtidos através do método de exclusão do corante azul de Trypan em relação aos outros dois métodos de avaliação da citotoxicidade.

6.2 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE ATRAVÉS DO ENSAIO DO COMETA

A pesquisa da potencial atividade genotóxica é uma etapa importante do desenvolvimento de novos fármacos (HARTMANN et al., 2001a).

O Ensaio do Cometa versão alcalina foi, primeiramente, introduzido por Singh e colaboradores (1988) e é, cada vez mais, usado para detectar genotoxicidade, demonstrando suas várias aplicações (HARTMANN et al., 2001b). Sua alta sensibilidade e especificidade, combinadas com sua fácil execução, possibilitam sua apropriada utilização como um teste para pesquisa de genotoxicidade, em nível industrial. O Ensaio do Cometa *in vitro* foi, recentemente, introduzido como um sistema de rotina (usando células mamárias) nos ensaios de genotoxicidade, juntamente com outros testes, para o desenvolvimento de novos fármacos (HARTMANN et al., 2001a; KISKINIS; SUTER; HARTMANN, 2002; COLLINS, 2002).

O Ensaio do Cometa é uma técnica eletroforética, na qual um pequeno número de células suspensas em um microgel de agarose são acomodadas em uma lâmina 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 superesperilizada do DNA, seguido de eletroforese em condições alcalinas e coradas com um corante fluorescente que se liga ao DNA (DUTHIE; JONSON; DOBSON, 1997; ALBERTINI et al., 2000; OLIVE, 2002). O nome pelo qual o ensaio tornou-se conhecido na literatura científica deve-se ao fato de que as células com dano aumentado no DNA demonstraram uma migração aumentada do DNA cromossômico do núcleo celular em direção ao ânodo, o que resulta no formato de um cometa, onde a quantidade de migração do DNA, a intensidade da fluorescência e o comprimento da cauda do cometa indicam a quantidade de dano provocado ao DNA celular, pelo agente testado. Células sem dano aparecem como núcleos intactos (cabeça dos cometas) sem

caudas (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990; MCKELVEY-MARTIN et al., 1993; ANDERSON; YU; MCGREGOR, 1998).

Todos os passos metodológicos desse ensaio são importantes para a obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis. Para a seleção das concentrações a serem testadas (pelo menos três concentrações), é útil determinar a citotoxicidade em ensaios preliminares (TICE et al., 2000), através de métodos, tais como o ensaio colorimétrico do MTT (HARTAMANN et al., 2001a), a medida dos níveis de ATP (TICE et al., 2000; KISKINIS; SUTER; HARTMANN, 2002) ou o teste de exclusão do corante azul de Trypan (HARTAMANN et al., 2001b; SLAMENOVA, 2002). É importante realizar os testes com concentrações não citotóxicas do material em teste, 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, devido a citotoxicidade (ANDERSON; YU; MCGREGOR, 1998; HENDERSON et al., 1998; KISKINIS; SUTER; HARTMANN, 2002)

Também é enfaticamente recomendado que se realize a avaliação da citotoxicidade, após o período de exposição ao material em teste (SPEIT; HARTMANN, 1999; TICE et al., 2000; PARK; JIN; HYUN, 2002). O método mais freqüentemente utilizado é o teste de exclusão do corante azul de Trypan (SINGH et al., 1991; KOBAYASHI et al., 1995; DUTHIE; DOBSON, 1999; TICE et al., 2000; KASSIE et al., 2001; OLIVE, 2002), sendo recomendado para o ensaio do cometa, segundo o *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures*, uma viabilidade celular sempre > 70% nas diferentes concentrações testadas (TICE et al., 2000).

A morte celular pode influenciar na estimativa dos danos provocados, porque a migração do DNA de células mortas também é detectado pelo Ensaio do Cometa (células apópticas) (MIYAMAE et al., 1998b; ALBERTINI et al., 2000) e é difícil a distinção entre células em apoptose e células danificadas por algum agente químico ou físico através desta técnica (HENDERSON et al., 1998), embora certos pesquisadores afirmem que isto seja possível

(ANDERSON et al., 1998; HARTMANN et al., 2001b). Células mortas podem ser identificadas por sua morfologia distinta, quando comparadas com células que exibem dano no DNA (HARTMANN; SPEIT, 1997). A morfologia resulta da extensiva fragmentação da cromatina, de modo que nenhum núcleo ou cabeça do cometa aparece claramente definido e somente a cauda é visível, sendo denominada de “nuvens” ou núcleo de células não detectáveis. Para a avaliação dos efeitos genotóxicos é recomendado que estas células sejam registradas separadamente, mas descartadas da avaliação, partindo-se do princípio de que representam células mortas (SPEIT; HARTMANN, 1999; KISKINIS; SUTER; HARTMANN, 2002). A avaliação destas estruturas pode fornecer um parâmetro independente de toxicidade do material em teste, sendo que as concentrações que provocarem mais do que 15% destas “nuvens” serão consideradas excessivamente tóxicas e deverão ser descartadas (HARTMANN et al., 2001a; HARTMANN et al., 2001b; KISKINIS; SUTER; HARTMANN, 2002).

Após coleta, as células devem ser imediatamente processadas, pois o aumento do tempo entre a coleta e o processamento da amostra pode ser acompanhado por uma diminuição no dano do DNA, que ocorre através do processo de reparo do mesmo (especialmente os sítios álcali-lábeis) ou pela perda de células com maior dano, através da apoptose ou necrose (ALBERTINI et al., 2000).

O Ensaio do Cometa deve ser realizado em condições de temperatura controladas e reprodutíveis (ALBERTINI et al., 2000). Speit et al. (1999) demonstraram que os testes realizados a temperatura ambiente foram mais sensíveis do que os experimentos realizados a 4° C, mas também parece ser a causa de maior variabilidade entre os experimentos. Conseqüentemente, esse ensaio somente pode ser realizado sob temperatura ambiente se as condições de temperatura puderem ser mantidas constantes e reprodutíveis, o que pode ser facilmente obtido pelo uso do tampão de eletroforese gelado e do banho de gelo, durante o tratamento alcalino e a eletroforese. Em comparação com o uso de temperatura ambiente, este procedimento levará a uma menor sensibilidade, que

pode, em princípio, ser aumentada pelo aumento da duração do tratamento alcalino e da eletroforese, pois também foi demonstrado que a maior duração de ambos (tratamento alcalino e eletroforese) aumentou a migração do DNA. Desta maneira, o Ensaio do Cometa a 4° C pode ser considerado como um teste sensível de genotoxicidade e apropriado para testes *in vitro* e *in vivo* (SPEIT et al., 1999).

O uso de amostras codificadas são críticas para eliminar uma potencial sugestividade na avaliação dos danos ao DNA. Para assegurar a qualidade, deve-se incluir, entre as amostras, células não tratadas (controle negativo) e células tratadas com um agente que, conhecidamente, induza danos ao DNA (controle positivo); desta forma, se garante a reprodutibilidade experimental e a habilidade do avaliador em detectar apropriadamente os danos ao DNA (LOVELL; THOMAS; DOBOW, 1999; ALBERTINI et al., 2000; OLIVE, 2002).

A falta de uniformidade no preparo dos reagentes/soluções e das lâminas com agarose, além de irregularidades no estabelecimento das condições de lise, desespiralização alcalina e eletroforese, podem aumentar a variabilidade da técnica. A avaliação dos cometas também é uma fonte potencial de variabilidade, que pode ser minimizada se um único e bem treinado avaliador for responsável pelos experimentos (ALBERTINI et al., 2000).

A migração do DNA pode ser avaliada por uma variedade de métodos, incluindo análise visual (usando um micrômetro para estimar o comprimento da cauda do cometa em microns, ou uma régua para medir a imagem das células em fotografias, ou a classificação arbitrária dos cometas em cinco categorias em função da forma e do comprimento das caudas dos cometas) ou um programa computadorizado analisador de imagens, o qual avalia o comprimento da cauda, a porcentagem do DNA que migrou e o momento da cauda (comprimento da cauda versus porcentagem do DNA na cauda) (ALBERTINI et al., 2000; TICE et al., 2000).

A avaliação paralela dos danos causados ao DNA, realizada através da análise visual e do programa computadorizado analisador de imagens, mostrou

uma evidente e estreita correlação entre os escores visuais e os computadorizados, comprovando que, embora o programa analisador de imagens seja uma ferramenta interessante, o escore visual também fornece informações confiáveis e úteis para a análise estatística dos experimentos (COLLINS; AIGUO; DUTHIE, 1995; COLLINS et al., 1997; COLLINS, 2002).

Kobayashi e colaboradores (1995) também compararam o desempenho e a sensibilidade da análise microscópica manual e a análise de imagens computadorizadas, e concluíram que, além dos escores obtidos através da análise visual e da classificação dos cometas em cinco categorias terem apresentado uma boa correlação com os dados obtidos pela análise computadorizada, a primeira avaliação foi tão ou até mais sensível do que a outra, nas condições testadas, além de apresentar a vantagem da maior rapidez, simplicidade e não necessitar de equipamento especial.

A análise estatística do Ensaio do Cometa deve ser realizada levando-se em consideração a importância biológica dos dados obtidos, identificando-se a intensidade do efeito, que poderá ser considerado biologicamente importante, e relacionando-o com o poder estatístico do estudo (LOVELL; THOMAS; DOBOW, 1999).

No presente estudo, a avaliação da genotoxicidade da violaceína foi realizada através do Ensaio do Cometa, versão alcalina proposta por Singh e colaboradores (1988), com algumas modificações na preparação das lâminas propostas por Klaude e colaboradores (1996) e segundo as recomendações do *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* (TICE et al., 2000) (Figura 7 e 8).

A seleção das quatro concentrações de violaceína (1,5; 0,75; 0,37 e 0,19 μM) foi baseada nos ensaios de citotoxicidade previamente realizados (Tabela 3). Os testes foram realizados com as concentrações não citotóxicas da violaceína abaixo da CC_{50} , pois, no intervalo de concentrações da violaceína testados (5 - 0,078 μM - razão 1:2), a concentração de 2,5 μM apresentou uma viabilidade celular igual ou menor do que 70% (dados não mostrados) e, como anteriormente

citado, a literatura indica que a concentração máxima a ser testada deve produzir uma viabilidade celular maior do que 70%, a fim de se evitar resultados falso-positivos, devido a citotoxicidade (Tabela 4).

A avaliação da viabilidade celular foi confirmada pelo teste de exclusão do corante azul de Trypan, após a exposição das células as quatro diferentes concentrações da violaceína, as duas concentrações de peróxido de hidrogênio (controle positivo) e ao meio de cultura (controle negativo), a fim de se evitar testar concentrações que resultem em citotoxicidade excessiva. A migração do DNA de células mortas também é detectado pelo Ensaio do Cometa podendo influenciar na estimativa dos danos provocados (TICE et al., 2000) e também porque os efeitos genotóxicos são mais expressivos se ocorrerem em células capazes de sobreviver ao tratamento (HARTAMANN et al., 2001a). A viabilidade celular (Tabela 4) foi medida imediatamente após o tratamento com violaceína e foi sempre > 70%, nas diferentes concentrações testadas (0,19- 1,50 μ M), conforme recomendado pelo *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* (TICE et al., 2000). Os controles positivos tratados com 100 e 200 μ M de peróxido de hidrogênio e os controles negativos também apresentaram viabilidade celular > 70% através do método de exclusão do azul de Trypan (dados não mostrados).

Segundo o *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* (TICE et al., 2000), pelo menos duas culturas de células independentes devem ser sucessivamente testadas para cada concentração, incluindo os controles positivos e negativo. Neste trabalho foram realizadas três culturas independentes e foram confeccionadas duas lâminas para cada tratamento. Todas as lâminas, incluindo aquelas dos controles positivos e negativos, foram independentemente codificadas, quando do preparo das mesmas e avaliadas, posteriormente, sem o conhecimento dos códigos.

As condições de temperatura foram mantidas constantes pelo uso do tampão de eletroforese gelado e banho de gelo e foram utilizados os tempos de 30 min para o tratamento alcalino e 30 min para a eletroforese, previamente

determinados (BETTEGA, 2000), ao invés dos 20 min utilizados na técnica original (SINGH et al., 1988), a fim de assegurar a sensibilidade da técnica. A duração do tratamento alcalino e da eletroforese varia consideravelmente entre os estudos e entre os investigadores (TICE et al., 2000), sendo os tempos de 20, 30 e 40 min os mais freqüentemente utilizados (SPEIT et al., 1999).

Após neutralização, as lâminas foram coradas e lidas no período de 24 h, a fim de se evitar a difusão do DNA no gel, tendo sido armazenadas em uma cuba úmida até o momento da leitura. A seleção do aumento mais apropriado para a leitura depende do tipo de célula a ser avaliada, da variação da resposta de migração a ser medida e da restrição do microscópio utilizado. Geralmente, varia de 160X a 600X, sendo os de 200X e 400X os mais comumente utilizados (TICE et al., 2000). Neste trabalho, as lâminas codificadas foram avaliadas com um microscópio de epifluorescência (Olympus BX 40), no aumento de 200X, a 515-560 nm, com filtro de barreira de 590 nm.

Cinquenta células foram analisadas, ao acaso, na região central de cada lâmina e classificadas, visualmente, em cinco classes, segundo Kobayashi et al. (1995), modificado por Miyamae et al. (1998a) (Figura 10). 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 50 células variou de zero (núcleos intactos) a 200 (núcleos totalmente danificados), conforme Figuras 7 e 8. Os cometas próximos ao fim do gel não foram considerados e a ocorrência de “núcleo de células não detectáveis” não foi considerada nas avaliações das lâminas.

A influência das diferentes concentrações da violaceína e dos controles positivos, nas diferentes linhagens celulares, em relação ao controle negativo, foi analisada estatisticamente utilizando-se o teste *t*-Student, com um nível de 5% de significância. Para a comparação do efeito das diferentes concentrações da violaceína, em cada linhagem celular, com relação à intensidade e freqüência da formação de cometas, foi utilizado a análise de variância, com um nível de 5% de

significância. Após, quando necessário, para a separação das médias de escore dos danos causados ao DNA entre si, em uma mesma linhagem celular, foi empregado o teste SNK, num nível de significância de 5%.

Os danos causados às células VERO e FRhK-4, por 1,5 μM de violaceína, foram significativamente maiores do que os danos causados às células do controle negativo ($p < 0,05$) (Figura 7), enquanto que os resultados obtidos com as células MA104 e HEp-2, nas concentrações testadas (0,19 – 1,5 μM), foram muito similares (Figura 9). Além disso, tais concentrações não causaram danos significativos ao DNA, quando comparados ao controle negativo ($p > 0,05$) (Figura 8).

O tratamento com a violaceína, durante uma hora, induziu aumento dos danos ao DNA concentração-dependente para as linhagens celulares VERO e FRhK-4 (Figura 9), não estando associado à citotoxicidade (Tabela 4), nas concentrações testadas (0,19 a 1,5 μM), já que tais concentrações não são citotóxicas, conforme demonstrado (Tabela 3).

O peróxido de hidrogênio foi utilizado como controle positivo do experimento em duas concentrações: 100 e 200 μM . O dano provocado aos DNAs das diferentes linhagens celulares, tratadas com peróxido de hidrogênio, foi significativamente maior do que o dano causado ao DNA das células do controle negativo ($p < 0,05$) (Tabela 5). O peróxido de hidrogênio induz aumento dos danos ao DNA concentração-dependente (SINGH et al., 1991; ANDERSON et al., 1994; FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEIL, 1995; MCCARTHY et al., 1997; HENDERSON et al., 1998; DUTHIE et al., 1997) e uma resposta celular heterogênea, ou seja, conduzindo à formação de diferentes classes de cometa (SINGH et al., 1991; TICE et al., 1991) (Figura 10).

Duas hipóteses são sugeridas para explicar o dano induzido pelo H_2O_2 . A primeira é a formação de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$), 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 ($\bullet\text{OH}$) e outras formas, que provocam estresse oxidativo, de 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).

O teste do $F_{\text{máximo}}$ foi utilizado para analisar a homogeneidade das variâncias de cada linhagem celular (SOKAL; ROHLF, 1995). Na análise de variância, os resultados obtidos com as células VERO e FRhK-4 foram transformados em logaritmo a fim de normalizar os dados, para que o teste paramétrico pudesse ser realizado (ANDERSON et al., 1996; LOVELL; THOMAS; DUBOW, 1999).

Segundo a análise de variância, para a linhagem celular HEp-2, os efeitos provocados pelas diferentes concentrações da violaceína (0,19 – 1,5 μM) foram estatisticamente semelhantes, no nível de significância de 5%, e essas concentrações não provocaram danos ao DNA, quando comparadas com o controle negativo (teste *t*-Student $p > 0,05$), nas condições testadas.

As linhagens celulares VERO, MA104 e FRhK-4 apresentaram um $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$; portanto, pela análise de variância verificou-se que existem diferenças significativas entre as diferentes concentrações da violaceína (0,19 – 1,5 μM), no nível de significância de 5%. O teste de separação de médias (SNK) indicou, para essas três linhagens celulares, que os resultados obtidos com 1,5 μM da violaceína foram estatisticamente diferentes daqueles obtidos com as outras três concentrações (0,19; 0,37 e 0,75 μM), que são, por sua vez, estatisticamente semelhantes (Tabela 10).

Através do Ensaio do Cometa, verificou-se que a violaceína apresenta uma ação genotóxica sobre as células VERO e FRhK-4, na concentração de 1,5 μM , quando comparada com o controle negativo (teste *t*-Student $p < 0,05$), nas condições testadas. As demais concentrações não causaram danos ao DNA celular e são estatisticamente semelhantes entre si (teste SNK $p > 0,05$) e ao controle negativo (teste *t*-Student $p > 0,05$).

A violaceína não causou danos significativos ao DNA das células MA104, quando comparados ao controle negativo (teste *t*-Student $p > 0,05$), mas a concentração de 1,5 μM mostrou ser estatisticamente diferente das demais concentrações testadas (teste SNK $p < 0,05$) (Tabela 10), indicando que essa concentração conduziu à formação de diferentes classes de cometa, representado pelo maior escore, mas que não foi significativamente diferente do controle negativo, portanto não sendo genotóxico nessa concentração.

A precisão de um experimento é avaliada pela magnitude do erro experimental, definido por Steel e Torrie (1960) como a variação devida ao efeito dos fatores não controlados ou que ocorrem ao acaso, de forma aleatória. O coeficiente de variação experimental ($CV_{\text{exp}}\%$) foi utilizado para comparar a precisão experimental dos diferentes experimentos, realizados através do Ensaio do Cometa, sendo fornecido pela expressão, $CV_{\text{exp}}\% = \sqrt{QME/Y}$, onde QME é o quadrado médio do erro experimental e Y é a média geral do experimento. Dessa forma, quanto menor for o erro experimental, menor será a estimativa do coeficiente de variação experimental e, em consequência, maior a precisão do experimento. Segundo Gomes (1990) se o coeficiente de variação for inferior a 10%, diz que o CV é baixo, ou seja, o experimento tem alta precisão; de 10 a 20%, são considerados médios e de boa precisão; 20 a 30%, alto, com baixa precisão, e acima de 30%, muito alto.

Pela análise de variância dos resultados obtidos com as diferentes linhagens celulares tratadas com as diferentes concentrações da violaceína, através do Ensaio do Cometa, pode-se determinar o coeficiente de variação experimental, que variou entre 9,18 a 17,62 %, demonstrando uma boa precisão experimental.

A sensibilidade do Ensaio do Cometa permite utilizá-lo como uma potente ferramenta para o estudo da genotoxicidade, já que aproximadamente 85% dos estudos realizados nessa área encontraram resultados positivos, apesar de que mais estudos são necessários para a investigação da persistência e do reparo dos danos observados, sua possível correlação com aberrações cromossômicas,

mutações ou indução da formação de micronúcleos, e mais importante, para a determinação do significado biológico dos danos ao DNA pelos materiais em teste (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

Através do Ensaio do cometa, constatou-se que a violaceína causou efeitos genotóxicos para determinadas linhagens celulares (VERO e FRhK-4), na concentração de 1,5 μM e, em vista do seu potencial farmacêutico (atividades antibacteriana, antileishmania, tripanocida e antitumoral) são necessários mais estudos, pois atualmente, um único método de análise não fornece todas as informações necessárias para limitar ou não sua aplicação terapêutica. Para substâncias de interesse farmacêutico, tais estudos são usualmente realizados antes da primeira exposição humana (fase clínica I), sendo recomendado submetê-las a uma bateria padrão de ensaios: ensaios de aberrações cromossômicas e de mutações de genes em células de mamíferos, e ensaios citogenéticos *in vivo* em células de medula óssea de roedores (GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000; EISENBRAND, et al., 2002).

6.3 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO*

Vários métodos são utilizados para a rápida avaliação da atividade antiviral de compostos, em cultura de células, os quais incluem a quantificação visual da atividade antiviral baseada na inibição do efeito citopático induzido pelo vírus (SIMÕES; AMOROS; GIRRE, 1999a; SEMPLE et al., 2001; HUHEIHEL et al., 2002; MA, et al., 2002), ou por medidas menos subjetivas, tais como o ensaio colorimétrico do MTT (KODAMA et al., 1996; BEDOYA et al., 2001; BETANCUR-GALVIS et al., 2002b; FORTIN et al., 2002) ou avaliações fluorimétricas (SMEE et al., 2002).

O efeito citopático viral (ECP) é definido como o conjunto de alterações provocadas por um vírus nas células onde ele se multiplica. Tal efeito pode ser manifestado como alterações na forma e no tamanho da célula, na destruição total da célula, ou no descolamento da monocamada (SIDWELL, 1986). O ECP

pode ser observado, microscopicamente, em preparações de células coradas ou não coradas (BURLESON; CHAMBERS; WIEDBRAUK, 1992).

Para os vírus que causam efeitos citopáticos virais perceptíveis microscopicamente em células, o escore de inibição do ECP é, frequentemente, realizado porque é rápido e permite avaliar um bom número de compostos, em placas de 96 cavidades (SMEE et al., 2002); entretanto, é uma análise que envolve uma certa subjetividade (SCHMIDTKE et al., 2001).

O ensaio do MTT vem sendo rotineiramente utilizado para a detecção de citotoxicidade e atividade antiviral de compostos sintéticos e de origem natural (SUDO et al., 1994; BEDARD et al., 1999; SERKEDJIEVA; IVANCHEVA, 1999; BARRIO; PARRA, 2000; KANEKO et al., 2001; TAKAHASHI, et al., 2001; BETANCUR-GALVIS et al., 2001; BETANCUR-GALVIS et al., 2002b). Vírus que causam infecções líticas, tais como HSV-1, poliovírus, adenovírus e rotavírus, causam destruição das células, as quais se descolam da placa de cultura. Assim, o ensaio colorimétrico do MTT pode ser potencialmente utilizado para a quantificação desta destruição celular ou a ausência da mesma, devido a presença do agente antiviral (SMEE et al., 2002). Esta técnica apresenta as seguintes vantagens: (1) grande número de compostos podem ser testados rapidamente e o ensaio pode ser automatizado; (2) facilidade para realizar o experimento, com uma avaliação mais objetiva do que a avaliação da inibição do efeito citopático viral; (3) avaliação simultânea da citotoxicidade e da atividade antiviral, sendo o método tão sensível quanto o método de redução das placas de lise (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991; SUDO et al., 1994; SMEE et al., 2002).

Outros métodos para a determinação da atividade antiviral podem ser mais trabalhosos, requerendo maior número de placas, maior quantidade do material em teste, e/ou maior período de tempo do que os métodos acima citados. Estes incluem ensaio de redução das placas de lise (DE LOGU et al., 2000; GLATTHAAR-SAALMÜLLER; SACHER; ESPERESTER, 2001), ensaio de redução do título viral (SEMPLE et al. 2001; BOULWARE et al., 2001) e

determinação do efeito antiviral através da contagem do número de células infectadas, marcadas por um anticorpo fluorescente (SMEE et al., 2002). Outros procedimentos para a determinação da atividade antiviral, até mesmo mais sofisticados, incluem o estudo dos efeitos sobre o antígeno viral por métodos de *immunoblotting* (BOULWARE et al., 2001), por eletroforese em gel de poli-acrilamida (HAYASHI et al., 2001) ou por quantificação do DNA ou RNA viral através de métodos, que incluem o uso de marcadores radioativos ou da reação da polimerase em cadeia - PCR (MORREY et al., 1999; UNWALLA; BANERJEA, 2001). Muitos desses métodos são reservados para uma melhor avaliação de compostos ativos, que foram previamente detectados pelo método de inibição do ECP viral e/ou pelos ensaios colorimétricos, e para a avaliação da atividade antiviral nos casos em que os vírus não causam mudanças nas células perceptíveis microscopicamente (SMEE et al., 2002).

O uso de um controle positivo, nos ensaios de detecção da atividade antiviral, permite demonstrar se esses foram realizados adequadamente e num nível correto de sensibilidade, sendo considerado, ainda, um padrão com o qual a atividade do material em teste pode ser comparada. Idealmente, o fármaco controle positivo deve ser aquele usado clinicamente em um ou mais países (SIDWELL, 1986).

A avaliação da atividade antiviral da violaceína (0,078 – 2,5 μ M) frente aos vírus HSV-1 (cepas KOS, ATCC/VR-733 e 29-R), PV-2, rotavírus, HAV (cepas HM-175 e HAF-203) e AdV-5 foi realizada através duas metodologias: avaliação do efeito citopático viral através de microscopia e através do ensaio colorimétrico do MTT.

A violaceína não inibiu o efeito citopático viral dos vírus HSV-1 cepa 29-R, HAV cepas HM-175 e HAF-203 e AdV-5, nem demonstrou atividade antiviral através do ensaio colorimétrico do MTT. No entanto, a violaceína apresentou uma fraca ação inibitória da replicação dos vírus HSV-1 cepas KOS e ATCC/VR-733, PV-2 e rotavírus, através do ensaio do MTT (Tabela 11), o qual apresenta maior sensibilidade e objetividade do que a avaliação da inibição do

efeito citopático viral. As porcentagens de inibição obtidas foram menores do que 50%; desta forma, não foi possível calcular a CE_{50} (concentração que inibe 50% da replicação viral), valor necessário para o cálculo do índice de seletividade ($IS = CC_{50}/CE_{50}$), o qual permite a avaliação da eficácia relativa de um potencial agente terapêutico.

Ao utilizar o ensaio do MTT para avaliar a atividade antiviral é importante obter um valor igual ou inferior a 0,2 na razão $(A)_{CV} / (A)_{CC}$. Isto significa que a garantia da sensibilidade do ensaio se deve à diferença entre os valores de absorvância (A) (entenda-se viabilidade celular) dos controles viral e celular. O ideal é que, ao final do tempo de incubação da placa, o controle celular esteja viável enquanto o controle viral totalmente destruído. Qualquer porcentagem de viabilidade celular detectada nos testes será conferida à ação antiviral do material em teste e o grau desta proteção poderá ser calculada para cada concentração do material testado (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991).

Em todos os experimentos utilizando o ensaio colorimétrico do MTT, obteve-se valores menores ou iguais a 0,2 na relação $(A)_{CV} / (A)_{CC}$ (dados não mostrados), indicando que as células do controle viral foram totalmente infectadas e mortas pelo vírus; portanto, as porcentagens de viabilidade celular detectadas, para cada concentração, correspondem às porcentagens de inibição da replicação dos diferentes vírus causada pela violaceína.

Segundo a patente registrada por May, Brummer e Ott (1991), a solução da violaceína, contendo 10% de deoxiviolaceína, apresenta atividade antiviral para vírus herpéticos e para poliovírus. Duran (1998) registrou, também, a patente de uma formulação de ciclodextrina/violaceína para uso como antibacteriano, antitumoral, antiviral e tripanocida. Duran e Menck (2001) citam a patente registrada por May, Brummer e Ott (1991) e afirmam que 0,728 μM da solução da violaceína inibiram 62% do HSV e 0,183 μM inibiram 56% do poliovírus em células HeLa. Estas informações foram obtidas dos documentos patentários aos quais tivemos acesso, e eles não informam as metodologias, os

tipos e as cepas virais, nem as condições experimentais nas quais estes resultados foram obtidos.

Os resultados obtidos nesta dissertação diferem das informações acima citadas, pois verificou-se que, diferentes concentrações da violaceína (0,312 a 1,25 μM) apresentam fraca ação inibitória do vírus HSV-1 e do PV-2: 1,42 a 21,47% para o vírus HSV-1 cepa KOS; 5,96 a 17,75 % para o vírus HSV-1 cepa ATCC/VR-733, e 5,13 a 8,51% para o PV-2, através do ensaio colorimétrico do MTT.

O aciclovir é o fármaco de escolha para o tratamento de várias infecções herpéticas e, por isso, foi utilizado como controle positivo para os testes com o HSV-1 (2,5 – 10 $\mu\text{g/ml}$), em todos os experimentos, obtendo-se porcentagens de inibição entre 96,50 e 101,81% (Tabela 11), comprovando que esses foram realizados corretamente. As porcentagens de inibição verificadas servem também como parâmetro para avaliar a confiabilidade do experimento.

Os estudos da atividade antiviral da violaceína não foram aprofundados, pois as baixas porcentagens de inibição verificadas, não são consideradas promissoras na pesquisa de novos fármacos antivirais.

Entretanto, cabe aqui ressaltar a importância dos resultados obtidos em relação à citotoxicidade e à genotoxicidade da violaceína, os quais são importantes parâmetros na avaliação inicial da segurança de fármacos em desenvolvimento, considerando-se que outras atividades biológicas são atribuídas à violaceína, tais como antibacteriano, antitumoral, tripanocida e antileishmania (DURAN; MENCK, 2001; LEON et al., 2001).

7 PERSPECTIVAS

Torna-se cada vez mais evidente que o desenvolvimento de novos fármacos, muitas vezes, não é suficiente para o estabelecimento de novas terapias. Importantes dados experimentais obtidos *in vitro*, freqüentemente, podem ser seguidos de insucessos, quando da realização de testes *in vivo*. As principais razões para esse insucesso incluem: concentração insuficiente do fármaco devido à sua não absorção, metabolização e eliminação rápidas demais; distribuição do fármaco para outros tecidos; alta toxicidade; fraca solubilidade e flutuação nos seus níveis plasmáticos (MEHNERT; MÄDER, 2001).

Uma estratégia promissora para contornar estes problemas compreende o desenvolvimento de sistemas adequados carreadores de fármacos, os quais incluem lipossomas, nanoemulsões, nanosuspensões, entre outros (MEHNERT; MÄDER, 2001).

Os lipossomas são vesículas esféricas e concêntricas, compostas de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas separadas por fases aquosas e englobando um compartimento aquoso central. Várias moléculas com características anfifílicas, incluindo desde fosfolipídeos naturais até grande variedade de compostos totalmente sintéticos, podem ser utilizados como elementos estruturais dos lipossomas (GULATI et al., 1998; MEHNERT; MÄDER, 2001).

Devido ao seu alto grau de biocompatibilidade, os lipossomas são utilizados como sistemas de liberação de um grande número de fármacos, oferecendo uma melhora substancial nos índices terapêuticos dos mesmos e, devido seu caráter bifásico podem atuar como carreadores de fármacos lipofílicos, os quais são incorporados na região da bicamada, assim como de fármacos hidrofílicos, os quais são solubilizados no espaço central aquoso (GULATI et al., 1998)

Os lipossomas são conhecidos por fornecerem um aumento da atividade sítio-específica, proporcionando seletividade do fármaco com diminuição da toxicidade, além de atravessarem biomembranas e facilitarem o transporte de

substâncias através de barreiras normalmente impermeáveis, em particular, facilitando a penetração dos fármacos encapsulados (WUTZLER et al., 2002).

A aplicação dos lipossomas na área farmacêutica encontra-se em constante evolução, em razão dos significativos avanços na tecnologia de produção, que quase sempre implicam em modificações nas propriedades físico-químicas, objetivando sempre a otimização dos efeitos desejados. Vários estudos, *in vitro* e *in vivo*, têm demonstrado a aplicação das formulações lipossomais, na terapêutica e no diagnóstico, incluindo a incorporação de antibióticos, antifúngicos, imunoadjuvantes, agentes de contraste, anticancerígenos e antivirais (PEREZ-SOLER et al., 1990; TILCOCK et al., 1992; ALLEN, 1994; SHAKIBA et al., 1995; GULATI, et al., 1998; LAW; HUANG; CHIANG, 2000).

Alguns estudos com fármacos antivirais, incorporados em lipossomas, foram desenvolvidos com o intuito de melhorar sua eficácia *in vivo*, através da diminuição da toxicidade e do prolongamento da ação antiviral (HOSTETLER et al., 1994, 1996; SHAKIBA et al., 1995; LAW; HUNG, 1998), tais como aqueles que avaliaram a ação do aciclovir, incorporado em lipossomas, no tratamento de infecções oculares virais, cujos resultados indicaram um aumento da absorção do aciclovir (FRESTA et al., 1999; LAW; HUANG; CHIANG, 2000) e, mostraram que determinados lipossomas podem se ligar intimamente à superfície da córnea, levando a um aumento do tempo de permanência do fármaco no sítio de ação (LAW; HUANG; CHIANG, 2000).

Dando continuidade ao estudo aqui desenvolvido, optou-se por trabalhar com a violaceína incorporada em lipossomas (fosfatidilcolina), fornecida pela professora Tânia Beatriz Creczynski-Pasa, do Laboratório de Bioenergética e Comunicação Celular (CIF, CCS), a fim de buscar um aumento da atividade antiviral, detectada preliminarmente. Os ensaios estão sendo desenvolvidos e os resultados não são ainda conclusivos e merecem ser melhor investigados.

Outro aspecto a ser considerado é a avaliação da potencial atividade virucida da violaceína. Muitos antissépticos e desinfetantes eliminam bactérias e fungos, mas algumas dessas preparações falham na eliminação de vírus

patogênicos, mesmo após o tempo de exposição recomendado, surgindo assim, a necessidade de buscar alternativas mais efetivas (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997). Apesar da fraca ação inibitória da violaceína frente aos vírus testados, não se pode excluir sua potencial atividade como virucida, o que seria de grande valia, considerando-se que já foi demonstrado sua atividade antibacteriana, sendo efetiva contra bactérias Gram (+) e (-) (DURAN;MENCK, 2001); tal estudo necessita ser realizado.

8 CONCLUSÕES

- As concentrações citotóxicas a 50% (CC_{50}) da violaceína, obtidas através da avaliação microscópica das alterações morfológicas celulares, para as diferentes linhagens celulares, foram estimadas por análise de regressão: $2,29 \pm 0,23 \mu\text{M}$ (células VERO); $2,69 \pm 0,12 \mu\text{M}$ (células MA104); $2,42 \pm 0,22 \mu\text{M}$ (células FRhK-4) e $2,78 \pm 0,13 \mu\text{M}$ (células HEp-2).
- As concentrações citotóxicas a 50% (CC_{50}) da violaceína, obtidas pela avaliação da viabilidade celular, através do método de exclusão do corante azul de Trypan, para as diferentes linhagens celulares, foram estimadas por análise de regressão: $2,23 \pm 0,06 \mu\text{M}$ (células VERO); $2,54 \pm 0,10 \mu\text{M}$ (células MA104); $2,07 \pm 0,05 \mu\text{M}$ (células FRhK-4) e $2,70 \pm 0,12 \mu\text{M}$ (células HEp-2).
- As concentrações citotóxicas a 50% (CC_{50}) da violaceína, obtidas pela avaliação da viabilidade celular, através do ensaio do MTT, para as diferentes linhagens celulares, foram calculadas por análise de regressão: $2,96 \pm 0,12 \mu\text{M}$ (células VERO); $3,55 \pm 0,22 \mu\text{M}$ (células MA104); $3,14 \pm 0,32 \mu\text{M}$ (células FRhK-4) e $3,42 \pm 0,05 \mu\text{M}$ (células HEp-2).
- Os valores acima descritos demonstram que a violaceína foi citotóxica em concentrações maiores ou iguais a $2,07 \mu\text{M}$ (células FRhK-4); $2,23 \mu\text{M}$ (células VERO); $2,54 \mu\text{M}$ (células MA104) e $2,70 \mu\text{M}$ (células HEp-2), nas condições testadas.
- A violaceína apresentou ação genotóxica, avaliada através do Ensaio do Cometa, para as células VERO e FRhK-4, na concentração de $1,5 \mu\text{M}$, quando comparada com o controle negativo (teste *t*-Student $p < 0,05$), nas

condições testadas. As demais concentrações não causaram danos ao DNA celular e são estatisticamente semelhantes entre si (teste SNK $p > 0,05$) e ao controle negativo (teste t -Student $p > 0,05$).

- A violaceína não causou danos significativos ao DNA das células HEp-2, nas concentrações testadas (0,19 – 1,5 μM), quando comparados ao controle negativo (teste t -Student $p > 0,05$), nas condições testadas.
- A violaceína não causou danos significativos ao DNA das células MA104, nas concentrações testadas (0,19 – 1,5 μM), quando comparados ao controle negativo (teste t -Student $p > 0,05$), nas condições testadas; entretanto, a concentração de 1,5 μM mostrou-se estatisticamente diferente das demais concentrações testadas (teste SNK $p < 0,05$).
- A violaceína não inibiu o efeito citopático do herpes vírus simplex humano tipo 1 cepas 29-R, KOS e ATCC/VR-733, do poliovírus humano tipo 2, do rotavírus símio SA11, do vírus da hepatite A, cepas HM-175 e HAF-203, e do adenovírus tipo 5.
- A violaceína não demonstrou ação inibitória da replicação do herpes vírus simplex humano tipo 1 cepa 29-R, do vírus da hepatite A, cepas HM-175 e HAF-203, e do adenovírus tipo 5, através do ensaio do MTT.
- A violaceína apresentou uma fraca ação inibitória da replicação do herpes vírus simplex humano tipo 1, cepas KOS e ATCC/VR-733, do poliovírus humano tipo 2 e do rotavírus símio SA11, através do ensaio do MTT. As porcentagens de inibição obtidas foram menores do que 50%; desta forma, não foi possível calcular os valores de CE_{50} (concentração que inibe 50% da replicação viral), nem os índices de seletividade ($\text{IS} = \text{CC}_{50} / \text{CE}_{50}$).

- As porcentagens de inibição da replicação do herpes vírus simplex humano tipo 1 (cepa KOS) pela violaceína, obtidas através do ensaio do MTT, foram $1,42 \pm 0,68\%$; $14,48 \pm 5,06\%$ e $21,47 \pm 3,74\%$, nas concentrações de 0,312; 0,625 e 1,250 μM , respectivamente.

- As porcentagens de inibição da replicação do herpes vírus simplex humano tipo 1 (cepa ATCC/VR-733) pela violaceína, obtidas através do ensaio do MTT, foram $5,96 \pm 2,51\%$; $8,75 \pm 3,08\%$ e $17,75 \pm 5,19\%$, nas concentrações de 0,312; 0,625 e 1,250 μM , respectivamente.

- As porcentagens de inibição da replicação do poliovírus humano tipo 2 pela violaceína, obtidas através do ensaio do MTT, foram $5,13 \pm 2,38\%$; $8,18 \pm 1,11\%$ e $8,51 \pm 1,94\%$, nas concentrações de 0,312; 0,625 e 1,250 μM , respectivamente.

- As porcentagens de inibição da replicação do rotavírus símio SA11 pela violaceína, obtidas através do ensaio do MTT, foram $8,30 \pm 4,24\%$; $13,33 \pm 4,66\%$ e $24,27 \pm 2,18\%$, nas concentrações de 0,312; 0,625 e 1,250 μM , respectivamente.

9 REFERÊNCIAS

ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; PALOMINO, S.S.; CHIRIBOGA, X.; CARRASCO, L. Antiviral activity of some South American medicinal plants. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 142-146, 1999.

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

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

ALLEN, T.M. Long-circulation (sterically stabilized) liposomes for targeted drug discovery. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 15, p. 215-220, 1994.

AMOROS, M.; SIMÕES, C.M.O.; GIRRE, L. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture: comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 1732-1740, 1992.

ANDERSEN, D.O.; WEBER, N.D.; WOOD, S.G.; HUGHES, B.G. MURRAY, B.K.; NORTH, J.A. *In vitro* virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives. **Antiviral Research**, v. 16, p. 185-196, 1991.

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

_____. DHAWAN, A.; YU, T.W.; PLEWA, M.J. An investigation of bone marrow and testicular cells *in vivo* using the Comet assay. **Mutation Research**, v. 370, p. 159-174, 1996.

_____. YU, T.W.; MCGREGOR, D.B. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. **Mutagenesis**, v. 15, p. 539-555, 1998.

ARISAWA, M.; FUJITA, A.; HAYASHI, T. K.; HAYASHI, K.; OCHIAI, H.; MORITA, N. Cytotoxic and antiherpetic activity of phloroglucinol derivatives from *Mallotus japonicus* (Euphorbiaceae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, p.1624-1626, 1990.

ARNOLD, D.; DI BIASE, A.M.; MARCHETTI, M.; PIETRANTONI, A.; VALENTI, P.; SEGANTI, L. SUPERTI, F. Antiadenovirus activity of milk proteins: lactoferrin prevents viral infection. **Antiviral Research**, v. 53, p. 153-158, 2002.

ARUOMA, O.I.; SPENCER, J.P.E.; ROSSI, R. An evaluation of the antioxidant and antiviral actions of extracts of rosemary and provençal herbs. **Food and Chemical Toxicology**, v. 34, p. 449-456, 1996.

ASRES, K.; BUCAR, F.; KARTNIG, T.; WITVROUW, M.; PANNECOUQUE, C. DE CLERCQ, E. Antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and type 2 (HIV-2) of ethnobotanically selected Ethiopian medicinal plants. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 62-69, 2001.

AZEVEDO, M.B.M.; ALDERETE, J.; RODRIGUEZ, J.A.; SOUZA, A.O.; RETTORI, D.; TORSONI, M.A.; FALJONI-ALARIO, A.; HAUN, M.; DURAN, N. Biological activities of violacein, a new antitumoral indole derivative, in an inclusion complex with α -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 37, p. 93-101, 2000.

BALLOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H. **The Prokaryots**. 2nd. ed. New York: Springer-Verlag, 1992. p. 2591-2600.

BALZARINI, J.; SCHOLS, D.; NEYTS, J.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; DE CLERQ, E. α -(1,3)- and α -(1,6)-D-mannose-specific plant lectins are markedly inhibitory to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus infections *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 410-416, 1991.

BARARDI, C.R.M.; EMSLIE, K.R.; VESEY, G.; WILLIAMS, K.L. Development of a rapid and sensitive quantitative assay for rotavirus based on flow cytometry. **Journal of Virological Methods**, v. 74, p. 31-37, 1998.

BARILE, F. A. ***In vitro* cytotoxicology: mechanisms and methods**. Florida: CRC, 1994. 222 p.

BARQUERO, A.A.; ALCHE, L.E.; COTTO, C.E. Antiviral activity of meliacine on the replication of a thymidine kinase-deficient mutant of herpes simplex virus type 1 alone and in combination with acyclovir. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 9, p. 49-55, 1997.

BARRIO, G.; PARRA, F. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 317-322, 2000.

BEARD, M.R.; LEMON, S.M. Hepatitis A virus. In: GRANOFF, A.; WEBSTER, R.G., (Ed.). **Encyclopedia of Virology**. 2nd. ed. San Diego: Academic, 1999. p. 631-639.

BEDARD, J.; MAY, S.; BARBEAU, D.; YUEN, L.; RANDO, R.F.; BOWLIN, T.L. A high throughput colorimetric cell proliferation assay for the identification of human cytomegalovirus inhibitors. **Antiviral Research**, v. 41, p. 35-43, 1999.

BEDOYA, L.M.; PALOMINO-SANCHEZ, S.; ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; ALCAMI, J. Anti-HIV activity of medicinal plant extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 113-116, 2001.

BENENCIA, F.; COURRÉGES, M.C. *In vitro* and *in vivo* activity of eugenol on human herpesvirus. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 495-500, 2000.

BERMEJO, P.; ABAD, M.J.; DIAZ, A.M.; SANTOS, J.; SANCHEZ, S.; VILLAESCUSA, L.; CRRASCO, L; IRUZUN, Antiviral activity of seven iridoids, three saikosaponins and one phenylpropanoid glycoside extracted from *Bupleurum rigidum* and *Scrophularia scorodonia*. **Planta Medica**, v. 68, p. 106-110, 2002.

BERNSTEIN, D.I.; STANBERRY, L.R. Herpes simplex virus vaccines. **Vaccine**, v. 17, p. 1681-1689, 1999.

BETANCUR-GALVIS, L.; SAEZ, J.; GRANADOS, H.; SALAZAR, A.; OSSA, J.E. Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. **Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 4, p. 531-535, 1999.

_____. ZULUAGA, C.; ARNÓ, M.; GONZÁLEZ, M.A.; ZARAGOZA, R.J. Structure-activity relationship of *in vitro* antiviral and cytotoxic activity of semi-

synthetic analogues of scopadulane diterpenes. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1318-1321, 2001.

_____. ZULUAGA, C.; ARNÓ, M.; GONZÁLEZ, M.A.; ZARAGOZA, R.J. Cytotoxic effect (on tumor cells) and *in vitro* antiviral activity against Herpes Simplex Virus of synthetic spongiane diterpenes. **Journal of Natural Products**, v. 65, 189-192, 2002a.

_____. MORALES, G.E.; FORERO, J.E.; ROLDAN, J. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 541-546, 2002b.

BETTEGA, J. M.P.R. **Avaliação da atividade antiviral de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Asteraceae – Marcela.** 2000. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

BICKHAM, J.; SANDHU, S.; HEBERT, P.D.N.; CHIKHI, L.; ATHWAL, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research**, v. 463, p. 33-51, 2000.

BINNS, S.E.; HUDSON, J.; MERALLI, S.; AMASON, J.T. Antiviral activity of characterized extracts from *Echinacea* spp. (Heliantheae: Asteraceae) against Herpes Simplex virus (HSV-1). **Planta Medica**, v. 68, p. 780-783, 2002.

BLOSSER, R. S.; GRAY, K.M. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 47-55, 2000.

BLUNDEN, G. Biologically active compounds from marine organisms. **Phytotherapy Research**, v.15, p. 89-94, 2001.

BOON, R. Antiviral treatment: from concept to reality. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v. 8, p. 5-10, 1997.

BOULWARE, S.L.; BRONSTEIN, J.C.; NORDBY, E.C.; WEBER, P.C. Identification and characterization of a benzothiophene inhibitor of herpes virus type 1 replication which acts at the immediate early stage of infection. **Antiviral Research**, v. 51, p. 111-125, 2001.

BOURGOUGNON, N.; LAHAYE, M.; CHERMANN, J.C; KORNPORST, J.M. Composition and antiviral activities of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. **Biochemical Pharmacology**, v. 47, p.2187-2192, 1994.

BREINBAUER, R.; MANGER, M.; SCHECK, M.; WALDMANN, H. Natural product guided compound library development. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 2129-2145, 2002.

BROMBERG, N.; DURAN, N. Violacein transformation by peroxidases and oxidases: implications on its biological properties. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 463-467, 2001.

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

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

CARLUCCI, M.J.; CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.C.; CERESO, A.S.; DAMONTE, E.B. Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. **Antiviral Research**, v. 43, p. 93-102, 1999.

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W.G.; GAZDAR, A.F.; MINNA, J.D.; MITCHELL, J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Research**, v. 47, p. 936-942, 1987.

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

CHALLAND, R.; YOUNG, R.J. **Antiviral Chemotherapy**. New York: University, 1998. 128 p.

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

CHATIS, P.A.; MILLER, C.H.; SCRAGER, L.E.; CRUMPACKER, C.S. Successful treatment with foscarnet of an acyclovir-resistant mucocutaneous infection with herpes simplex virus in a patient with acquired immunocompromised syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 320, p. 297-300, 1989.

CHATTOPADHYAY, A.; KUMAR, V.; BHAT, N.; RAO, P. *Chromobacterium violaceum* infection: a rare but frequently fatal disease. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 37, p. 108-110, 2002.

CHAUVEL-LEBRET, D.J.; AUROY, P.; TRICOT-DOLEUX, S.; BONNAURE-MALLET, M. Evaluation of the capacity of the SCGE assay to assess the genotoxicity of biomaterials. **Biomaterials**, v. 22, p. 1795-1801, 2001

CHE, C.T. Plants as a source of potencial antiviral agents. In: WAGNER, H.; FARNSWORTH, N. R. (Eds.). **Economic and medicinal plants research**, Londres: Academic, 1991a. p.167-251.

CHE, C.T. Marine products as a source of antiviral drug leads. **Current Trends Review**, v. 23, p. 201-218, 1991b.

CHENG, H.Y.; LIN, C.C.; LIN, T.C. Antiherpes simplex virus type 2 activity of casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* Linn. **Antiviral Research**, v. 55, p. 447-455, 2002.

CHERNIN, L.S.; WINSON, M.K.; THOMPSON, J.M.; HARAN, S.; BYCROFT, B.W.; CHET, I.; WILLIAMS, P.; STWEART, G.S. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 4435-4441, 1998.

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

CHIBA, K.; KAWAKAMI, K.; TOHYAMA, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. **Toxicology in vitro**, v. 12, p. 251-258, 1998.

CHOU, Y.L.; YANG, P.V.; HUANG, C.C.; LEU, C.C; TSAO, T.C. Fatal and non-fatal chromobacterial septicemia: report of two cases. **Chang Gung Medical Journal**, v. 23, p. 492-497, 2000.

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

_____. DUSINSKA, M.; FRANKLIN, M.; SOMOROVSKA, M.; PETROVSKA, H. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 30 p. 139-146, 1997.

_____. The Comet assay: principles, applications and limitations. In: DIDENKO, V.V. (Ed.). **Methods in Molecular Biology**. Totawa: Humana, v. 203, p. 163-177, 2002.

COMBES, R.D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chemistry & Industry**, v. 24, p. 950-954, 1992.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p. 564-582, 1999.

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

CRAIG, M.I.; BENENCIA, F.; COULOMBIÉ, F.C. Antiviral activity of an acidic polysaccharides fraction extracted from *Cedrela tubiflora* leaves. **Fitoterapia**, v. 72, p. 113-119, 2001.

CREAGH, T.; RUCKLE, J.L.; TOLBERT, D.T.; GILTNER, J.; EIZNHAMER, D.A.; DUTTA, B.; FLAVIN, M.T.; XU, Z.Q. Safety and pharmacokinetics of single doses of (+)-calanolide A, a novel, naturally occurring nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor, in healthy, human immunodeficiency virus-negative human subjects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1379-1386, 2001.

CROMEANS, T.; SOBSEY, M.D.; FIELDS, H.A. Development of a plaque assay for a cytopathic, rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. **Journal of Medical Virology**, v.22, p.45-56, 1987.

CURRIE, B.J.; CARAPETIS, J.R. Skin infections and infestations in Aboriginal communities in northern Australia. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 41, p. 139-143, 2000.

DA SILVA, A.G. Propriedades gerais dos herpesvírus. In: LUPI, O.; DA SILVA, A.G.; PEREIRA JR, A.C. (Org.). **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. 278 p. 1-14.

DAMIAN, F.; BLATON, N. ;NAESENS, L.; BALZARINI, J.; KINGET, R.; AUGUSTIJNS, P.; VAN DEN MOOTER, G. Physicochemical characterization of solid dispersions of the antiviral agent UC-781 with polyethylene glycol 6000 and gelucire 44/14. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, p. 311-322, 2000.

DE CLERCQ, E. Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. **Medicinal Research Reviews**, v. 20, n. 5, p. 323-349, 2000.

_____. New developments in anti-HIV chemotherapy. **Farmaco**, v. 56, p. 3-12, 2001a.

_____. Antiviral drugs: current state of the art. **Journal of Clinical Virology**, v. 22, p. 73-89, 2001b.

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

DE SOUZA, A. O.; AILY, D.C.G.; SATO, D.N.; DURAN,N. Atividade da violaceína *in vitro* sobre o *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, p. 59-62, 1999.

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

DESJARDINS, M.; FENLON, C.; MADISON, D. Non-chromogenic *Chromobacterium violaceum* bacteremia. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 21, p.14-16, 1999.

DOBLHOFF-DIER, O.; COLLINS, C.H. Biosafety: future priorities for research in health care. **Journal of Biotechnology**, v. 85, p.227-239, 2001.

DREHER, O.; JUNOD, A.F. Role of oxygen free radicals in cancer development. **European Journal of Cancer**, v. 32A, p. 30-38, 1996.

DROMIGNY, J.A.; FALL, A.L.; DIOUF, S.; PERRIER-GROS-CLAUDE, J.D. *Chromobacterium violaceum*: a case of diarrhea in Senegal. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 21, p. 573-574, 2002.

DURAN, N. **Formulation of cyclodextrin/violacein based medicine – comprises enhancement of violacein solubility, with increase in versatility.** BR n. PI 9801307-A, 4 mar. 1998.

_____. MENCK, C.F.M. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspective. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 27, p. 201-222, 2001.

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

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

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

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

EISENHAUER, E.A.; VERMORKEN, J.B. The taxoids: comparative clinical pharmacology and therapeutic potential. **Drugs**, v. 55, p. 5-30, 1998.

EL SAYED, K.A.; DUNBAR, D.C.; PERRY, T.L.; WILKINS, S.P.; HAMANN, M.T. Marine natural products as prototype insecticidal agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2735-2739, 1997.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.(Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade; Florianópolis: Editora da UFSC, 2001. p. 87-100.

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**, v. 109, p. 85-87, 1949.

ESTES, M.K.; GRAHAM, D.Y.; MASON, B.B. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity molecular mechanism. **Journal of Virology**, v. 39, p. 879-888, 1981.

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

FARNSWORTH, N. R. Ethnopharmacology and future drug development: the North American experience. **Journal Ethnopharmacology**, v. 38, p. 145-152, 1993

FENICAL, W. New pharmaceuticals from marine organisms. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 339-341, 1997.

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

FERRER, M.; SANCHEZ-LAMAR, A.; FUENTES, J.L.; BARBE, J.; LLAGOSTERA, M. Antimutagenic mechanisms of *Phyllanthus orbicularis* when hydrogen peroxide is tested using *Salmonella* assay. **Mutation Research**, v. 517, p. 251-254, 2002.

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

FIELD, H.J. A perspective on resistance to acyclovir in herpes simplex virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 12, p. 129-135, 1983.

_____. Herpes simplex virus antiviral drug resistance: current trends and future prospects. **Journal of Clinical Virology**, v. 21, p. 261-269, 2001.

FIORI, A.M. Remédios do mar. **Pesquisa Fapesp**, p.38-41, 2001.

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.

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

FRENZILLI, G.; BOSCO, E.; BARALE, R. Validation of single gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds. **Mutation Research**, v. 468, p. 93-108, 2000.

FRESTA, M.; PANICO, A.M.; BUCOLO, C. GIANNAVOLA, C. PUGLISI, G. Characterization and *in vivo* ocular absorption of liposome-encapsulated acyclovir. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 565-576, 1999.

GIRAD, M.; HIRTH, L. **Virologie Moléculaire**. 2ème. ed. Paris: Doin, 1989. 617 p.

GIRI, S.; PRASAD, S.B.; GIRI, A.; SHARMA, G.D. Genotoxic effects of malathion: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays *in vivo*. **Mutation Research**, v. 514, p. 223-231, 2002.

GLATTHAAR-SAALMÜLLER, B.; SACHER, F.; ESPERESTER, A. Antiviral activity of an extract derived from roots of *Eleutherococcus senticosus*. **Antiviral Research**, v. 50, p. 223-228, 2001.

GODARD, T.; GAUDUCHON, P.; DEBOUT, C. A first step in visual identification of different cell populations by a modified alkaline Comet assay. **Mutation Research**, v. 520, p. 207-211, 2002.

GOLLAPUDI, B.B.; KRISHNA, G. Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. **Mutation Research**, v. 455, p. 21-28, 2000.

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. Piracicaba: Nobel, 1990. p. 468.

GREIM, H. Endpoints and surrogates for use in population studies in toxicology. **Toxicology Letters**, v. 120, p. 395-403, 2001.

GULATI, M.; GROVER, M.; SINGH, S.; SINGH, M. Lipophilic drug derivatives in liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 165, 129-168, 1998.

GULICK, R.M.; MCAULIFFE, V.; HOLDEN-WILTSE, J.; CRUMPACKER, C.; LIEBES, L.; STEIN, D.S.; MEEHAN, P.; HUSSEY, S.; FORCHT, J.; VALENTINE, F.T. Phase I studies of hypericin, the active compound in St. John's Wort, as an antiretroviral agent in HIV-infected adults. AIDS Clinical Trials Group-Protocols 150 and 258. **Annals of Internal Medicine**, v. 130, p. 510-514, 1999.

GUTLEB, A.C.; MORRISON, E.; MURK, A.J. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.11, p. 309-320, 2002.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O.I. DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement in mammalian systems. **FEBS Letters**, v. 281, p. 9-19, 1991.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v.5, p. R245-R249, 1998.

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

_____. ELHAJOUJI, A.; KISKINIS, E.; POETTER, R.; MARTUS, H.J.; FJALLMAN, A.; FRIEAUFF, W.; SUTER, W. Use of the alkaline Comet assay

for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 843-858, 2001a.

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

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

_____. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 294-300, 2000.

HASUI, M.; MATSUDA, M.; OKUTANI, K. *In vitro* antiviral activities of sulfated polysaccharides from a marine microalga (*Cochlodinium polykrikoides*) against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 17, p. 293-297, 1995.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; MORITA, N. Mechanism of action of the antiherpesvirus biflavone ginkgetin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 1890-1893, 1992.

_____. HAYASHI, T.; OTSULA, H.; TAKEDA, Y. Antiviral activity of 5,6,7-trimethoxyflavone and its potentiation of the antiherpes activity of acyclovir. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p.821-824. 1997.

_____. KAWAUCHI, M.; NAKAI, C.; SANKAWA, U.; SETO, H.; HAYASHI, T. Characterization of inhibitory action of concanamycins against herpes simplex virus. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v. 12, p.51-59, 2001.

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

HIRAOKA, N.; YOSHIOKA, K.; INOUE, K.; KAWAHITO, Y.; KASAMATSU, Y. *Chromobacterium violaceum* sepsis accompanied by bacteria-associated hemophagocytic syndrome in a Japanese man. **Archives of Internal Medicine**, v. 159, p. 1623-1624, 1999.

HODGE, R.A. Non-chromogenic *Chromobacterium violaceum* in a urinary tract infection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 24, p.15, 2002.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v.1, p. 580-582.

HOSTELLER, K.Y.; KORBA, B.E.; SRIDHAR, C.N.; GARDNER, M.F. Antiviral activity of phosphatidyl-dideoxycytidine in hepatitis B infected-cells and enhanced hepatic uptake in mice. **Antiviral Research**, v. 24, p. 59-67, 1994.

_____. KINI, G.D.; BEADLE, J.R.; ALDERN, K.A.; GARDNER, M.F. Lipid prodrugs of phosphonoacids: greatly enhanced antiviral activity of 1-O-octadecyl-sn-glycero-3-phosphonofosphate in HIV-1 and HCMV-infected cells. **Antiviral Research**, v. 31, 59-67, 1996.

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

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

_____. The role of plants in traditional medicine and current therapy. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 1, p. 131-143, 1995.

HUDSON, J.B. **Antiviral compounds from plants**. Florida: CRC, 1990. 200 p.

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

_____. KIM, J.H.; LEE, M.K.; DEWREEDE, R.E.; HONG, Y.K. Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: evidence for multiple activities. **Journal of Applied Phycology**, v. 10, p. 427-434, 1999.

HUDSON, J.; TOWERS, G.H.N. Phytomedicines as antivirals, **Drugs of the Future**, v. 24, p. 295-320, 1999.

HUFFAM, S.E.; NOWOTNY, M.J.; CURRIE, B.J. *Chromobacterium violaceum* in tropical northern Australia. **Medical Journal of Australia**, v. 168, p. 335-337, 1998.

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

HUSSEIN, G.; MIYASHIRO, H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KAKIUCHI, N.; SHIMOTOHNO, K. Inhibitory effects of Sudanese medicinal plant extracts on Hepatitis C Virus (HCV) protease. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 510-516, 2000.

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

KAN, E.; UNDERGER, U.; BALI, M.; BASARAN, N. Assessment of DNA strand breakage by the alkaline Comet assay in dialysis patients and the role of vitamin E supplementation. **Mutation Research**, v. 520, p. 151-159, 2002.

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

KANG, K.H.; HUH, H.; KIM, B.K.; LEE, C.K. An antiviral furanoquinone from *Paulownia tomentosa* Steud. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 624-626, 1999.

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

_____. PARZEFALL, W.; KNASMÜLLER, S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v. 463, p. 13-31, 2000.

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

KIM, T.G.; KANG, S.Y.; JUNG, K.K.; KANG, J.H.; LEE, E.; HAN, H.M.; KIM, S.H. Antiviral activities of extracts isolated from *Terminalis chebula* retz. *Sanguisorba officinalis* L., *Rubus coreanus* miq. and *Rheum plamatum* L. against hepatitis B virus. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 718-720, 2001.

KINCHINGTON, D.; KANGRO, H.; JEFFRIES, D. J. Design and testing of antiviral compounds. In: DESSELBERGER, U. (Ed.). **Medical Virology: a practical approach**. Oxford: University, 1995. p.147-171.

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

KITAMURA, K.; HONDA, M.; YOSHIZAKI, H.; YAMAMOTO, S.; NAKANE, S.; FUKUSHIMA, M.; ONO, K.; TOKUNAGA, T. Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production *in vitro*. **Antiviral Research**, v. 37, p. 131-140, 1998.

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

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

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

KULKOSKY, J.; CULNAN, D.M.; ROMAN, J. DORNADULA, G.; SCHENLL, M.; BOYD, M.R.; POMERANTZ, R.J. Prostratin: activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART. **Blood**, v. 98, p. 3006-3015, 2001.

KUO, Y.C.; CHEN, C.C.; TSAI, W.J.; HO, Y.H. Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by *Psychotria serpens*: relationship to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. **Antiviral Research**, v. 51, p. 95-109, 2001.

KWON, H.C.; JUNG, C.M.; SHIN, C.G.; LEE, J.K.; CHOI, S.U. KIM,S.Y. LEE,K.R. A new caffeoyl quinic acid from aster scaber and its inhibitory activity against human immunodeficiency virus-1 (HIV) integrase. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, p. 1796-1798, 2000.

LAFFON, B.; PÁSARO, E.; MÉNDEZ, J. DNA damage and repair in human leukocytes exposed to styrene-7,8-oxide measured by the Comet assay. **Toxicology Letters**, v. 126, p. 61-68, 2002.

LAW, S.L.; HUANG, K.J. Properties of acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 161, p. 253-259, 1998.

_____. HUANG, K.J.; CHIANG, C.H. Acyclovir-containing liposomes for potencial ocular delivery corneal penetration and absorption. **Journal of Controlled Release**, v. 63, p. 135-140, 2000.

LEON, L.L.; MIRANDA, C.C.; DE SOUZA, A.O.; DURAN, N. Antileishmanial activity of the violacein extracted form *Chromobacterium violaceum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 449-450, 2001.

LI, K.W. WU,J.; XING, W.N.;SIMON, J.A. Total synthesis of the antitumor depsipeptide FR-901, 228, **Journal of American Chemical Society**, v. 118, p. 7237-7238, 1996.

_____. MA, S.C.; YANG, Y.T.; YE, S.M. BUT, P.P. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinesis* Bunge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 365-368, 2002.

LIN, Y.M.; FLAVIN, M.T.; SCHURE, R.; CHEN, R.C.; SIDWELL, R.; BARNARD, D.L.; HUFFMAN, J.H.; KERN, E.R. Antiviral activities of biflavonoids. **Planta Medica**, v. 65, p. 120-125, 1999.

LIU, W.C.; SINGH, P.D.;GOUGOUTAS, J.Z.; MALLEY, M.F.; PORUBCAN, M.A.; TREJO,W.H.; WELL, J.S.; SYKES, R.B. Aerocavin, a new antibiotic produced by *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Antibiotics**, v. 41, p. 446-453, 1988.

LOCHER, C. P.; WITVROW, M. DE BETHUNE, M. P. Antiviral activity of Hawaiian medicinal plants against human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). **Phytomedicine**, v. 2, p. 259-264, 1996.

LOVELL, D.P.; THOMAS, G.; DUBOW, R. Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* an *in vitro* Comet studies. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 19 p. 109-119, 1999.

MA, S.C.; DU, J.; BUT, P.P.H.; DENG,X.L.; ZHANG, Y.W.; OOI, V.E.C.; XU, X.X; LEE, S.H.S.; LEE, S.F. Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 205-211, 2002.

MACHIN-VILLAFRANCA, C.; LEY, M.; TORRES HERNANDEZ, L. *Chromobacterium violaceum* infection. Presentation of a case with fatal outcome. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 38, p. 353-357, 1986.

MACRAE, W.D.; HUDSON, J.B.; TOWER, G.H.N. Studies on the pharmacological activity of Amazonian euphorbiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 143-150, 1981.

MARCELETTI, J.R. Synergistic inhibition of herpesvirus replication by docosanol and antiviral nucleoside analogs. **Antiviral Research**, v. 56, p. 153-166, 2002.

MARCHETTI, M.; PISANI,S.; PIETROPAOLO, V.; SEGANTI, L.; NICOLETTI, R. Antiviral effect of a polysaccharide from *Sclerotium glaucanicum* towards herpes simplex virus type 1 infection. **Planta Medica**, v. 62, p. 303-307, 1996.

MARSHALL, J.L.; RIZVI, N.; KAUH, J.; DAHUT, W.; FIGUERA, M.; KANG, M.F.; FIGG, W.D.; WAINER, I.; CHAISSANG, C.; LI, M.Z.; HAWKINS, M.J. A phase I trial of depsipeptide (FR901228) in patients with advanced cancer. **Journal of Experimental Therapeutics and Oncology**, v. 2, n.6, p. 325-332, 2002

MARTINELLI, D.; BACHOFEN,R; BRANDL, H. Effect of medium composition, flow rate, and signaling compounds on the formation of soluble extracellular materials by biofilms of *Chromobacterium violaceum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p. 278-283, 2002.

MARTINEZ, M.A.S.; VELLUDO, L.; SANTOS, V.R.; DINAMARCO, P.V. *Chromobacterium violaceum* infection in Brazil. A case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, p. 111-113, 2000.

MATSUSE, I.T.; LIM, Y.A.; HATTORI, M.; CORREA, M.; GUPTA, M. A search for antiviral properties in Panamanian medicinal plants. The effects on HIV and its essential enzymes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 15-22, 1999.

MATTHEE, G.; WRIGHT, A.D.; KONIG, G.M. HIV reverse transcriptase inhibitors of natural origin. **Planta Medica**, v. 65, p. 493-506, 1999.

MAY, G.; BRUMMER, B.; OTT, H. **Treatment of prophylaxis of polio and herpes virus infections – comprises admin. of 3-(di:hydro-5-(hydroxy-1H-indolyl-2oxo-3H-pyrrolidene)-di:hydro-2H-indole**. Ger. Offen. DE 3935066, 25 abr. 1991.

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

MCGREGOR, J.T.; CASCIANO, D.; MÜLLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutation Research**, v. 455, p. 3-20, 2000.

MCKEEGAN, K.S.; BORGES-WALMSLEY, M.I.; WALMSLEY, A.R. Microbial and viral drug resistance mechanisms. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 8-14, 2002.

MCKELVEY-MARTIN, V.J.; GREEN, M.H.L.; SCHMEZE, P.; POLL-ZOBEL, B.B.; DE MEO, M.P.; COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): an European review. **Mutation Research**, v. 288, p. 47-63, 1993.

MCMAHON, J.B.; CURENS, M.J.; GULAKOWSKI, R.J.; BUCKHEIT, R.W.J.; LACKMAN-SMITH, C.; HALLOCK, Y.F.; BOYD, M.R. Michellamine B, a novel plant alkaloid, inhibits human immunodeficiency virus—induced cell killing by at least two distinct mechanisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 484-488, 1995.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nonoparticles production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 165-196, 2001.

MELO, P.S.; MARIA, S.S.; VIDAL, B.C.; HAUN, M.; DURAN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In vitro Cellular & Developmental Biology: Animal**, v. 36, p. 639-543, 2000.

MERUELO, D.; DEGAR, S.; AMARI, N.; MAZUR, Y.; LAVIE, D.; LEVIN, B.; LAVIE, G. Mode of action of hypericin as an antiretroviral agent and other relevant findings. In: CHU, C. K; CUTLER, H. G. (Ed.). **Natural products as antiviral agents**. New York: Plenum, 1992. p. 91-119.

MIDANI, S.; RATHORE, M. *Chromobacterium violaceum* infection. **Southern Medical Journal**, v. 91, p. 464-466, 1998.

MINOR, P.D. Polioviruses. In: GRANOFF, A.; WEBSTER, R.G., (Ed.). **Encyclopedia of Virology**. 2nd. ed. San Diego: Academic, 1999. p.1326-1330.

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

_____. 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. **Mutation Research**, v. 415, p. 229-235, 1998b.

MONARCA, S.; FERETTI, D.; ZANARDINI, A.; MORETTI, M.; VILLARINI, M.; LEBBOLO, E. Monitoring airborne genotoxicants in the rubber industry using genotoxicity tests and chemical analyses. **Mutation Research**, v. 490, p. 159-169, 2001.

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

MOORE, C.C.; LANE, J.E.; STEPHENS, J.L. Successful treatment of an infant with *Chromobacterium violaceum* sepsis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 2107-110, 2001.

MORREY, J.D.; BAILEY, K.W.; KORBA, B.E.; SIDWELL, R.W. Utilization of transgenic mice replicating high levels of hepatitis B virus for antiviral evaluation of lamivudine. **Antiviral Research**, v. 42, p. 97-108, 1999.

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

MUCSI, I.; MOLNÁR, J. HOHMANN, J. REDEI, D. Cytotoxicity an anti-Herpes Simplex Virus activities of diterpenes isolated from *Euphorbia* species. **Planta Medica**, v. 67, p. 672-674, 2001.

NAKAMURA, Y.; SAWADA, R.; MORITA, Y.; TAMIYA, E. Isolation of a psychrotrophic bacterium from the organic residue of a water tank keeping rainbow trout and antibacterial effect of violet pigment produced from the strain. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 79-86, 2002.

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

NAWAWI, A.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KUROKAWA, M.; SHIRAKI, K. Inhibitory Effects of Indonesian medicinal plants on the infection of Herpes Simples Virus type 1. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 37-41, 1999.

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

NISBET, L.J.; MOORE, M. Will natural products remain an important source of drug research for the nature? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 708-712, 1997.

O' BRIEN, J.J.; CAMPOLI-RICHARDS, D.M. Acyclovir. An updated review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 37, p. 233-309, 1989.

ÖBERG, B. Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium). **Pharmacology & Therapeutics**, v. 40, p. 213-285, 1989.

OLIVE, P.L.; BANÁTH, J.P.; DURAND, R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "Comet" assay. **Radiation Research**, v. 122, p. 86-94, 1990.

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

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

PAN, J.; KUROSKY, A.; XU, B.; CHOPRA, A.K.; COPPENHAVER, S.H.; SING., I.P.; BARON, S. Broad antiviral activity in tissues of crustaceans. **Antiviral Research**, v. 48, p. 39-47, 2000.

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

PARKER, W.L.; RATNUM, M.L.; JOHNSON, J.H.; WELLS, J.S.; PRINCIPE, P.A.; SYKES, R.B. Aerocynidin, a new antibiotic produced by *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Antibiotics**, v. 41, p. 454-460, 1988.

PAUWELS, R.; BALZARINI, J.; BABA, M.; SNOECK, R.; SCHOLS, D. HERDEWIJN, P.; DESMYTER, J.; DE CLERQ, E. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. **Journal of Virological Methods**, v. 20, p. 309-321, 1988.

PEARCE, C. Biologically active fungal metabolites. **Advances in Applied Microbiology**, v. 44, p. 1-80, 1997.

PEREZ-SOLER, R.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; LAUTERSZTAIN, J.; AL-BAKER, S. Phase I clinical and pharmacological study of liposome entrapped *cis*-bis-neodecanoato-*trans*-R,R-1,2-diaminocyclohexane platinum (II). **Cancer Research**, v. 50, p. 4254-4259, 1990.

PILLAY, D. ZAMBON, M. Antiviral drug resistance. **British Medical Journal**, v. 317, p.660-662, 1998.

POLI, P.; MELLO, M.A.; BUSCHINI, A.; MORTARA, R.A.; ZUCHI, D. Cytotoxic and genotoxic effects of megaloz, an anti-Chagas' disease drug, assessed by different short-term tests, **Biochemical Pharmacology**, v. 64, p. 1617-1627, 2002.

PONTE, R.; JENKINS, S.G. Fatal *Chromobacterium violaceum* infections associated with exposure to stagnant water. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 11, p. 583-586, 1992.

POTTAGE, J.C.; KESSLER, H.A. Herpes simplex virus resistance to acyclovir: clinical relevance. **Infectious Agents and Disease**, v. 4, p. 115-124, 1995.

PREMANATHAN, M.; ARAKAKI, R.; IZUMI, H.; KATHIRESAN, K.; NAKANO, M.; YAMAMOTO, N.; NAKASHIMA, H. Antiviral properties of a mangrove plant, *Rhizophora apiculata* Blume, against human immunodeficiency virus. **Antiviral Research**, v. 44, p. 113-122, 1999.

PUJOL, C.A.; ERREA, M.I.; MATULEWICZ M.C.; DAMONTE, E.B. Antiherpetic activity of S1, an algal derived sulphated galactan. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 410-413. 1996.

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

RASKIN, I.; RIBNICKY, D.M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D.A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J.M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p. 603-613, 2001.

REBORA, A. Antiviral drugs: unapproved uses, dosages, or indications. **Clinics in Dermatology**, v. 20, p. 474-480, 2002.

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

REIMER, K.; VOGT, P.M.; BROEGMANN, B.; HAUSER, J.; ROSSBACH, O.; KRAMER, A.; RUDOLPH, P.; BOSSE, B.; SCHREIER, H.; FLEISCHER, W. An innovative topical drug formulation for wound healing and infection treatment: *in vitro* and *in vivo* investigation of a povidone-iodine liposome hydrogel. **Dermatology**, v. 201, p. 235-241, 2000.

RETTORI, D. **Produção, extração e purificação da violaceína: um antibiótico produzido pela *Chromobacterium violaceum***. 1996. 44 f. Dissertação (Mestrado do Instituto de Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

RETTORI, D. **Estudos físico-químicos e biológicos da violaceína: um pigmento produzido pela *Chromobacterium violaceum***. 2000. 139 f. Tese (Doutorado do Instituto de Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

REUSSER, P. Herpesvirus resistance to antiviral drugs: a review of the mechanisms, clinical importance and therapeutic options. **Journal of Hospital Infection**, v. 33, p. 235-248, 1996.

RICHARDS, C. *Chromobacterium violaceum*, opportunist pathogenic bacteria in tropical and subtropical regions. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 86, p. 169-173, 1993.

RICHARDS, D.M.; CARMINE, A.A.; BROGDEN, R.N.; HEEL, R.C.; SPEIGHT, T.M.; AVERY, G.S. Acyclovir: a review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 26, p. 378-438, 1983.

RINEHART, K.L. Antiviral agents from marine and terrestrial sources. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 312, p. 41-60, 1992.

RISO, P.; ERBA, D.; CRISCUOLI, F.; TESTOLIN, G. Effect of green tea extract on DNA repair an oxidative damage due to H₂O₂ in Jurkat T cells. **Nutrition Research**, v. 22, p. 1143-1150, 2002.

ROBERTS, N.A.; MARTIN, J A.; KINCHINGTON, D.; BROADHURST, A.V.; DUNCAN, I. B.; GALPIN, S.A. Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. **Science**, v. 248, p. 358-361, 1990.

ROBERTS, S.A.; MORRIS, A.J.; MCIVOR, N. ELLIS-PEGLER, R. *Chromobacterium violaceum* infection of the deep neck tissues in a traveler to Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, p. 334-335, 1997.

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

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

ROMANOS, M.; ANDRADA-SERPA, M.J.; RIBEIRO, A.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; COSTA, S.S.; WIGG, M.D. Inhibitory effect of extracts of Brazilian marine algae on human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-induced syncytium formation *in vitro*. **Cancer Investigation**, v. 20, p. 46-54, 2002.

ROSENBLUM, L.L.; PATTON, G.; GRIGG, A.R.; FRATER, A.J.; CAIN, D.; ERLWEIN, O.; HILL, C.L.; CLARKE, J.R.; McCLURE, M.O. Differential susceptibility of retrovirus to nucleoside analogues. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v. 12, p. 91-97, 2001.

ROWLEY, D.C.; HANSEN, M.S.; RHODES, D.; SOTRIFFER, C.A.; NI, H.; MCCAMMON, J.A.; BUSHMAN, F.D.; FENICAL, W. Thalassiolins A-C: new marine-derived inhibitors of HIV cDNA integrase. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 11, p. 3619-3625, 2002

RYDERG, 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.

SARDAS, S.; KARABIYIK, L; AYGÜN, N; KARAKAYA, A.E. DNA damage evaluated by the alkaline Comet assay in lymphocytes of humans anaesthetized with isofluorane. **Mutation Research**, v. 418, p. 1-6, 1998.

SARIN, P.S.; SUN D.; THORNTON, A.; MÜLLER W. Inhibition of replication of the etiologic agent of acquired immune deficiency syndrome (human T-lymphotropic retrovirus/lymphadenopathy-associated virus) by avarol and avarone. **Journal of National Cancer Institute**, v. 78, p. 663-666, 1987.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade; Florianópolis: Editora da UFSC, 2001. p. 291-320.

SCHINAZI, R.F. Progress in the development of natural products for human immunodeficiency viruses infections. In: CHU, C K.; CUTLER, H.G. (Ed.). **Natural products as antiviral agents**. New York: Plenum, 1992. p.1-29.

SCHMIDTKE, M.; SCHNITTLER, U; JAHN, B.; DAHSE, H.M.; STELZNER, A. A rapid assay for evaluation of antiviral activity against coxsackie virus B3, influenza virus A and herpes simplex virus type 1. **Journal of Virological Methods**, v. 95, p. 133-143, 2001.

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

SEONG-KUG, E.; YOUNG-SO, K. CHONG-KIL, L. SEONG-SUN. H. Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidium* on herpes simplex viruses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 475-481, 2000.

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

SHAHAT, A.A.; ISMAIL, S.I.; HAMMOUDA, F.M.; AZZAM, S.A.; LEMIÉRE, G.; DE BRUYBE, T.; DESWAEF, S.; PIETERS, L.; VLIETINCK,

A. Anti-HIV activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. **Phytomedicine**, v. 5, p. 133-136, 1998.

SHAKIBA, S.; FREEMAN, W.R.; FLORES-AGUILAR, M.; MUNGUIA, D.; HOSTETLER, K.Y. Antiviral effect in human cytomegalovirus-infected cells, pharmacokinetics and intravitreal toxicology in rabbits of acyclovir diphosphate dimyristoylglycerol. **Antimicrobial Agents and Chemoteraphy**, v. 39, p. 1383-1385, 1995.

SHAO, P.L.; HSUEH, P.R.; CHANG, Y.C.; LU, C.Y.; LEE, P.Y.; HUANG, L.M. *Chromobacterium violaceum* infection in children: a case of fatal septicemia with nasopharyngeal abscess and literature review. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v.21, n.7, p. 707-709, 2002.

SHARPE-SUBAK, J.H.; DARGAN, D.J. HSV molecular biology: general aspects of Herpes Simplex Virus molecular biology. **Virus Genes**, v. 16 n. 3, p. 239-251, 1998.

SHIRATA, A.; TSUKAMOTO, T.; YASUI, H.; HATA, T.; HAYASAKA, S.; KOJIMA, A.; KATO, H. Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing, **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 34, p. 131-140, 2000.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

SIDWELL, R.W. Determination of antiviral activity. **Drugs Pharmaceutical Science**, v. 27, p. 433-80, 1986.

SIEUWERTS, A.; KLIJN, J.G.M.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC₅₀ – values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 813-823, 1995.

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

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

_____. AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 317-325, 1999a.

_____. FALKENBERG, M.; AULER MENTZ, L.; SCHENKEL, E.P.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Antiviral activity of South Brazilian medicinal plant extracts. **Phytomedicine**, v. 6, p. 205-214, 1999b.

SINDAMBIWE, J.B.; CALOMME, M.; GEERTS, S.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D.A. Evaluation of biological activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 585-590, 1998.

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

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

SLAMENOVA, D.; KUBOSKOVA, K.; HORVATHOVA, E.; ROBICHOVA, S. Rosemary stimulated reduction of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in mammalian cells treated with H₂O₂ or visible light-excited methylene blue. **Cancer Letters**, v. 177, p. 145-153, 2002.

SMEE, D.F.; SIDWELL, R.W.; MORRISON, A.C.; BAILEY, K.W.; BAUM, E.Z.; LY, L.; WAGAMAN, P.C. Characterization of an influenza A (H3N2) virus resistant to the cyclopentane neuraminidase inhibitor RWJ-270201. **Antiviral Research**, v. 52, p. 251-259, 2001.

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

SNOECK, R. Antiviral therapy of herpes simplex. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 157-159, 2000.

SNYDER, R.D.; GREEN, J.W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**, v. 488, p. 151-169, 2001.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry**. 3rd. ed. New York: W. H. Freeman, 1995, 850 p.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet assay (single-cell gel test). In: HENDERSON, D.S. (Ed.) **Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana, 1999. p. 203-211.

_____. TRENZ, K.; SCHÜTZ, P.; ROTHFUB, A.; MERK, O. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the Comet assay. **Toxicology Letters**, v. 110, p. 7-78, 1999.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics**. New York: McGraw-Hill, 1960. 197 p.

STEINERT, S. A.; STEIB-MONTEE, R.; LEATHER, J.M.; CHADWICH, D.B. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. **Mutation Research**, v. 399, p. 65-85, 1998.

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

STROHL, W.R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 39-41, 2000.

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

SUN, I.C.; CHEN, C.H.; KASHIWADA, Y.; WU, J.H.; WANG, H.K.; LEE, K.H. Anti-AIDS agents 49. Synthesis, anti-HIV, and anti-fusion activities of IC9564 analogues based on betulinic acid. **Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 4271-4275, 2002.

SYDISKIS, R.J.; OWEN, D.G.; LOHR, J.L.; ROSLER, K.H.; BLOMSTER, R.N. Inactivation of enveloped viruses by antraquinones extracted from plants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, p. 2463-2466, 1991.

TAKAHASHI, K.; MATSUDA, M.; OHASHI, K.; TANIGUCHI, K.; NAKAGOMI, O.; ABE, Y.; MORI, S.; SATO, N.; OKUTANI, K. SHIGETA, S. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. **Antiviral Research**, v. 49, p. 15-24, 2001.

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

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

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

TILCOCK, C.; AHKONG, Q.F; KOENIG, S.H.; BROWN, R.D.; DAVIS, M.; KABALKA, G. The design of liposomal paramagnetic MR agents: effect of vesicle size upon the relaxivity of surface-incorporated lipophilic chelates. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 27, p. 44-51, 1992.

TODRYK, S.; MELCHER, A.; BOTTLEY, G.; GOUGH, M.; VILE, R. Cell death associated with genetic prodrug activation therapy of colorectal cancer. **Cancer Letters**, v. 174, p. 25-33, 2001.

TOMICIC, M.; BEY, E.; WUTZLER, P.; THUST, R.; KAINA, B. Comparative analysis of DNA breakage, chromosomal aberrations and apoptosis induced by the anti-herpes nucleoside analogues aciclovir, ganciclovir and penciclovir. **Mutation Research**, v. 505, p. 1-11, 2002.

TRAORE, F.; GASQUET, M.; LAGET, M.; GUIRAUD, H.; GIORGIO, C.D.; AZAS, N.; DOUMBO, O.; TIMON-DAVID, P. Toxicity and genotoxicity of

antimalarial alkaloid rich extracts derived from *Mitragyna inermis* O. Kuntze and *Nauclea latifolia*. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 608-611, 2000.

TYRING, S.K.; CARLTON, S.S.; EVANS, T. Herpes. Atypical clinical manifestations. **Dermatologic Clinics**, v. 16, p. 783-788, 1998.

UNWALLA, H.; BANERJEA, A.C. Novel mono- and di-DNA-enzymes targeted to cleave TAT or TAT-VER RNA inhibit HIV-1 gene expression. **Antiviral Research**, v. 51, p. 127-139, 2001.

VALOT, S.; EDERT, D.; FAOU, A.L. A simple method for the *in vitro* study of the virucidal activity of disinfectants. **Journal of Virological Methods**, v. 86, p. 21-24, 2000.

VAN PRAAG, R.M.; VAN WEERT, E.C.; VAN HEESWIJK, R.P.; ZHOU, X.J.; SOMMADOSSI, J.P. JURRIAANS, S.; LANGE, J.M.; HOETELMANS, R.M.; PRINS, J.M. Stable concentrations of zidovudine, stavudine, lamivudine, abacavir and nevirapine in serum and cerebrospinal fluid during 2 years of therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 896-899, 2002.

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

_____. VLIETINCK, A.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.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, v. 3, p. 232-238, 1998.

VERA, M.D.; JOULLIE, M.M. Natural products as probes of cell biology: 20 years of didemnin research. **Medicinal Research Reviews**, v. 22, p. 102-145, 2002.

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

_____. DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.A. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. **Planta Medica**, v. 64, p. 97-109, 1998.

_____. VANDEN BERGHE, D.A. Leads for antivirals from traditional medicines. In: PREBDERGASTM, H.D.V.; ETKIN, N.L.; HARRIS, D.R.; HOUGHTON, P.J. (Ed.). **Plants for Food and Medicine**. London: Royal Botanic Gardens, 1998. p.333-344.

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

WALUM, E.; STRENBORG, K.; JENSSEN, D. **Understanding cell toxicology: principles and practice**. New York: Ellis Howood, 1990. p. 97-111.

WATERS, M.D.; STACK, H.F; JACKSON, M.A. Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. **Mutation Research**, v. 437, p. 21-49, 1999.

WHITE, D.O.; FENNER, F.J. **Medical Virology**. 4th. ed. San Diego: Academic, 1994. 603 p.

WHITLEY, R.J.; ROIZMAN, B. Herpes Simplex Virus infections. **The Lancet**, v. 357, p.1513-1518, 2001.

WIEDBRAUK, D. L.; SHERYL, L.G.J. **Manual of clinical virology**. New York: Rave, 1992. 275 p.

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

WITOROUW, M.; ESTE, J. A.; MATEU, M. Q. Activity of a sulphated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v. 5, p. 297-303, 1994.

WRIGHT, A.D.; KÖNIG, G.M. Antimalarial activity: the search for marine-derived natural products with selective antimalarial activity. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 710-716, 1996.

WUTZLER, P. THUST, R. Genetic risks of antiviral nucleoside analogues – a survey. **Antiviral Research**, v. 49, p. 55-74, 2001.

_____. SAUERBREI, A.; KLÖCKING, R.; BRÖGMANN, B.; REIMER, K. Virucidal activity and cytotoxicity of the liposomal formulation of povidone-iodine. **Antiviral Research**, v. 54, p. 89-97, 2002.

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

YAMAMOTO, Y.; YASUOKA, A.; TACHIKAWA, N.; TERUYA, K.; GENKA, I; YAMAGUCHI, M.; YASUOKA, C.; KIKUCHI, Y.; AOKI, M.; OKA, S. Mitigation of hepato-cellular injury caused by HAART with glycyrrhizin compound in patients co-infected with HIV and HCV. **Journal of Infectious Diseases**, v. 52, p. 248-249, 1999.

YANG, S.; CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; BADER, J.P. Natural product-based anti-HIV drug discovery and development facilitated by the NCI Developmental Therapeutics Program. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 265-277, 2001.

ZEMBOWER, D. E.; LIN, Y.M.; FLAVIN, M.T.; CHEN, F.C.; KORBA, B.E. Robustaflavone, a potential non-nucleoside anti-hepatitis B agent. **Antiviral Research**, v. 39, p. 81-88, 1998.