

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

**Centro de Ciências da Saúde**

**Programa de Pós-Graduação em Farmácia**

**VANESSA DANIELLE MENJON MÜLLER**

**TRIAGEM ANTIVIRAL DE EXTRATOS VEGETAIS:  
Fracionamento biomonitorado de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.  
Aquifoliaceae (erva-mate).**

**FLORIANÓPOLIS  
2006**

**VANESSA DANIELLE MENJON MÜLLER**

**TRIAGEM ANTIVIRAL DE EXTRATOS VEGETAIS:  
Fracionamento biomonitorado de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.  
Aquifoliaceae (erva-mate).**

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

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões.

**FLORIANÓPOLIS  
2006**

Müller, Vanessa Danielle Menjon  
TRIAGEM ANTIVIRAL DE EXTRATOS VEGETAIS:  
Fracionamento biomonitorado de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.  
Aquifoliaceae (erva-mate)./ Vanessa Danielle Menjon Müller. –  
Florianópolis, 2006.  
90 p.

Orientadora Cláudia Maria Oliveira Simões  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação  
em Farmácia.

1. Antiviral. 2. HSV-1. 3. Fracionamento Biomonitorado. 4. *Ilex  
paraguariensis*. 5. Cromatografia Líquida de alta eficiência. I. Simões,  
Cláudia Maria Oliveira. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

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

Este trabalho recebeu apoio financeiro do CNPq / MCT, através do projeto 47.4880 /2001-0 (coordenado pela orientadora desta dissertação), e a mestranda recebeu uma bolsa da CAPES/MEC, no período de 05/2005 a 02/2006.

**“A vida é construída nos sonhos e concretizada no amor”**

Francisco Cândido Xavier

Aos meus pais José e Elvira e aos meus irmãos Leandro e Eduardo, por tudo que representam para mim.

## AGRADECIMENTOS

A professora Cláudia Maria Oliveira Simões, pelo voto de confiança me aceitando sem me conhecer e pelos ensinamentos que nunca esquecerei, disciplina, organização, prioridades, persistência, seriedade, profissionalismo, confiança.

A professora Célia Regina Monte Barardi, pela presença, carinho e amizade.

Ao professor Carlos Roberto Zanetti, pelos grandes ensinamentos nos poucos momentos de convívio. Ao professor Mário Stendel, pelo exemplo de dedicação e humildade. Aos professores Aguinaldo, Carlos, Edmundo, Marília, Sônia, pela cordialidade e coleguismo.

Aos membros da Banca por avaliarem e melhorarem a qualidade deste trabalho.

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao programa de Pós-Graduação de Farmácia, pela oportunidade e a CAPES pela bolsa.

Aos professores Rivaldo Niero, Dionezine Navarro, Eloir Paulo Schenkel, Flávio Reginatto e seus alunos por cederem as amostras e auxiliarem na elaboração deste trabalho.

A Cláudia e Solange, técnicas dos Laboratório de Farmacognosia e Química Farmacêutica por sempre estarem dispostas a ajudar.

.Ao amigo Roberto que sempre trouxe uma palavra de conforto, e aos amigos Jadel e Rodrigo, pelas contribuições profissionais e pessoais.

As amigas Adriana, Ana Paula e Dayse, nossos encontros nunca serão esquecidos.

Carla e Gilson, por dividirem seus domingos e amenizarem as horas no laboratório aos finais de semana, pelos ensinamentos profissionais e pessoais, pela amizade e carinho.

A mulher que tenho como exemplo de Mãe, Cris; e aos amigos Jonas, Vanessa Moresco, Camila, Carol, Vanessa Valgas, Thais, Cláudia Figueredo, Ramon e Luciane.

Aos colegas Aline, Talize, Ariane, Andressa, Lisiane, Daiane, Silvana, Adriana, Leonilda; Letícia, Juliana, Cristiane, Bibiana, Roberto, Leonardo, João e demais alunos da proto e imuno.

Márcia e Alexandre, grandes responsáveis pelo meu aprendizado.

Ao meu inseparável Thiago, por todo o amor, recíproco.

As queridas Juliana, Débora e Sabrina, por todos nossos minutos, conversas, nossa amizade e cumplicidade, por nunca me deixarem desanimar, por sempre estarem de braços abertos para mim, por me entenderem e me ajudarem a me entender, por todo amor que temos uma pela outra.

A Monika, que foi o grande instrumento de Deus que me fez estar aqui e que, além disso, me ajudou a compreender muitas coisas, entre elas eu. Minha companheira de todos os programas, finais de semana, noites de insônia, filmes, pelas longas conversas sobre a vida, as paixões, a existência, pelo jardim e pelos sonhos que plantamos.

Hellen, pela amizade, companheirismo, conselhos, por tentar me entender e me aceitar mesmo sendo diferente de mim, por sempre me incentivar, me apoiar, me ajudar a melhorar.

Mari, Carlos e Buba por fazerem parte da minha vida e tornarem especiais os momentos ao seu lado.

Minha prima Carla, por dividir comigo a descoberta da vida. Graciele, Gabrielle, Sophia e Maythê, minhas quatro meninas que amo tanto.

Anaelka, Daliana, Fábio, Ítalo, Fabrício, cada um com sua particularidade, me fazendo entender que cada um tem uma forma de amar, por todos os momentos e conversas.

Rosane Campanharo, Viviane, Raquel Stadler, Nilza, Rita e Cácia nunca a distância me fará esquecer vocês.

Paul Manfred, por sempre me apoiar e acreditar em mim, por estar presente em tantos momentos, por me conhecer e respeitar, pela importância que tem para mim.

Diogo, um anjo que aliviou minha angústia quando esta mais me sufocava.

Ao querido Flávio que veio a minha vida não apenas para me ajudar profissionalmente, mas para me fazer crescer como pessoa, que teve a capacidade de me mostrar quem sou, por me fazer sentir capaz, por me mostrar que é possível ser um bom profissional sem perder a humildade.

Ao professor e amigo Paulo Wunder, por me orientar sobre a importância da pós-graduação e por todas as contribuições em minha vida.

As pessoas de Cruz Machado, que tocaram meu coração com sua simplicidade e amor, por me fazerem sentir necessária, por mostrarem que as pessoas precisam de pouco para serem felizes, que as vezes o carinho “cura uma dor de cabeça”, que o desabafo pode amenizar um coração aflito, que os medicamentos não estão só nas prateleiras, por me mostrarem que quando não houver recurso nenhum, se ainda houver boa vontade, respeito e amor pelo menos o “sofrimento de ser um ser humano” pode ser amenizado.

Vladimir Romilson Otto, por tornar os momentos em Cruz Machado tão especiais, pelo amor e pelo preço que paga por amar sua família e sua cidade incondicionalmente.

Vô Lauro e Vó Elisa (*in memoriam*) e Vô Morocinez e Vó Cecília, por me apoiarem e amarem Leandro e Eduardo, por serem desde cedo minha inspiração, por me ensinarem a ver a vida da forma mais linda, por compartilharem comigo momentos tão especiais, pelo orgulho e paixão que despertam em mim, obrigada por serem como são e por serem meus irmãos.

Mãe e pai, por tudo que me ensinaram, pelos valores que me deram, pelo exemplo que são, por todos os sacrifícios que fizeram, por sempre estarem ao meu lado e me incentivarem. Pelo amor incondicional, por me ensinarem a lutar e a buscar, e por tornarem essa luta e essa busca menos sofrida, por sempre me acolherem. Por vocês meu amor transborda.

A todos que acreditaram em mim, mesmo quando eu não acreditava.

Obrigada a “luz” em que acreditei e a quem pedi: Jesus, Deus, Anjos, Santos, Bons Espíritos, porque não sei quem me ajudou, mas sei que “alguém” sempre esteve comigo.

*Vanessa Danielle Menjon Müller*



## RESUMO

O vírus herpético do tipo 1 (HSV-1) infecta grande número de pessoas no mundo todo. O composto de escolha para sua profilaxia e tratamento é o aciclovir; no entanto, a resistência deste vírus a este fármaco fez com que as infecções herpéticas se tornassem um grave problema de saúde pública. A triagem anti-herpética de extratos de plantas tem fornecido resultados promissores, que justificam pesquisas nesta área. O objetivo deste trabalho foi realizar uma triagem da atividade antiviral com oito extratos brutos de plantas e suas frações, e o fracionamento biomonitorado com aquele que apresentou atividade mais promissora. Assim sendo, o extrato bruto, as frações acetato de etila e *n*-butanólica, e o resíduo aquoso de *Ilex paraguariensis* (erva-mate) foram testados contra o HSV-1 (cepas KOS e 29R), através de diferentes estratégias metodológicas, utilizando-se as técnicas do MTT e de redução das placas de lise. Entre as diferentes estratégias metodológicas utilizadas, os resultados mais promissores foram obtidos no pós-tratamento; foram também avaliados os efeitos dos materiais-teste na adsorção viral e em função do seu tempo de adição nas culturas celulares. A fração acetato de etila, apresentou os melhores resultados na técnica de inibição da adsorção viral; no estudo da ação antiviral em função do tempo de adição, foi verificado que os materiais-teste inibiram a replicação viral do tempo zero até 18h, indicando agir provavelmente em todas as etapas da replicação viral, com menor intensidade na montagem e liberação do vírus, e a exocitose. No intuito de identificar o(s) composto(s) responsável(is) pela atividade detectada, foram realizadas análises por CLAE que evidenciaram a presença de quatro ácidos fenólicos, tendo sido possível caracterizar dois deles como sendo os ácidos caféico e clorogênico. A avaliação da ação anti-herpética destes dois compostos mostrou que somente o ácido caféico foi capaz de inibir a replicação do HSV-1 (IS=5,5 para a cepa 29R e IS=26,4 para a cepa KOS). De acordo com todos os resultados obtidos, não foi possível correlacionar a ação anti-herpética somente com a presença desses ácidos fenólicos, e é provável que outras substâncias presentes na erva-mate tais como os flavonóides e as saponinas triterpênicas, também estejam contribuindo, de forma sinérgica, para tal atividade. Maiores estudos deverão ser realizados para comprovar esta hipótese.

**Palavras chave:** Atividade antiviral; HSV-1; triagem; ensaio biomonitorado; *Ilex paraguariensis*; ácido caféico; ácido clorogênico.

## ABSTRACT

The herpetic virus type 1 (HSV-1), infects a large number of people all over the world. The acyclovir is the major compound for HSV-1 prophylaxis and treatment, however, because of increasing resistance to this drug, herpetic infections has become a serious problem of public health. The selection of plants with anti-herpetic activity has results has been promising and justify researches in this area. The aim of this work was to study eight crude extracts of plants and their fractions, and to perform anti-HSV-1 bioassay with those fractions that presented more promising activity. Thus, the crude extract, the acetate of ethyl and n-butanol fractions, from *Ilex paraguariensis* (erva-mate), and the watery residue were tested against the HSV-1 (KOS and 29R strain), by different methodologic strategies, using the techniques of MTT and plaque reduction assay. Among the different methodologic strategies used, the most promising results were obtained in the post-treatment; the comparison between the results of MTT techniques and the plaque reduction assay showed that there are no significant differences between them. Also the effects of the material-test in the viral adsorption and during replication in the cellular cultures were evaluated. With the purpose of identifying the compounds responsible for the antiviral activity, HPLC analyses were performed that indicated the presence of four phenolic acids; two of them were the chlorogenic and caffeic acid. The evaluation of the anti-herpetic action of these two compounds showed that the caffeic acid was the only one capable to inhibit the replication of HSV-1 (IS=5,5 for 29R strain and for IS=26,4 KOS strain). In accordance with all the results obtained, it was not possible to correlate the anti-herpetic action with the presence of these phenolic acid; it is possible that other substances present in "erva mate" such, as the triterpenoid saponins and flavonoids, are also contributing, in the synergic way, for such activity. More studies will have to be carried out to prove this hypothesis.

**Key Words:** Antiviral activity; HSV-1; selection; bioassay; *Ilex paraguariensis*; acid caféico; acid chlorogenic.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Procedimentos de obtenção de compostos bioativos	24
<b>Figura 2</b> – Procedimento de separação dos principais metabólitos secundários vegetais	26
<b>Figura 3</b> – Estruturas químicas dos ácidos fenólicos caféico e clorogênico	32
<b>Figura 4</b> – Análise por cromatografia em camada delgada do extrato bruto e frações de <i>Ilex paraguariensis</i> , ácidos caféico e clorogênico, rutina e quercetina.	75
<b>Figura 5</b> – Cromatograma por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do Extrato Bruto obtido a partir de folhas de <i>Ilex paraguariensis</i> .	79
<b>Figura 6</b> – Cromatograma por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da Fração Acetato de Etila obtido a partir de folhas de <i>Ilex paraguariensis</i> .	80
<b>Figura 7</b> – Cromatograma por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) da Fração <i>n</i> -BuOH obtido a partir de folhas de <i>Ilex paraguariensis</i>	80
<b>Figura 8</b> – Cromatograma por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do Resíduo aquoso obtido a partir de folhas de <i>Ilex paraguariensis</i>	81
<b>Figura 9</b> – Cromatograma por cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) das amostras de referência Ácido Clorogênico e ácido caféico.	81

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados	48
<b>Tabela 2</b> – Resultados da avaliação da citotoxicidade e da potencial atividade anti-herpética dos extratos brutos das plantas testadas	52
<b>Tabela 3</b> – Resultados da avaliação da citotoxicidade e da potencial atividade anti-herpética das frações das plantas testadas.	53
<b>Tabela 4</b> – Citotoxicidade do extrato bruto, frações e substâncias isoladas de <i>Ilex paraguariensis</i> frente às células VERO.	57
<b>Tabela 5</b> – Resultados da avaliação da atividade anti-herpética do extrato bruto, frações e compostos isolados de <i>Ilex paraguariensis</i> pela técnica do MTT, e estratégias de tratamento simultâneo, e dos pré- e pós-tratamentos, expressos em valores de IS.	60
<b>Tabela 6</b> – Resultados da avaliação da atividade anti-HSV-1 (cepas KOS e 29R) do extrato bruto, frações e ácidos fenólicos isolados de <i>Ilex paraguariensis</i> , obtido através das técnicas do MTT e de inibição das placas de lise – tratamento simultâneo.	65
<b>Tabela 7</b> – Resultados do efeito do extrato bruto e frações de <i>Ilex paraguariensis</i> na adsorção do HSV-1 (Cepas KOS e 29R), obtidos através da técnica de inibição das placas de lise.	68
<b>Tabela 8</b> – Concentração (%) das substâncias S2 e S4 (com tempos de retenção semelhantes aos dos ácidos clorogênico e caféico, respectivamente) presentes em <i>Ilex paraguariensis</i> .	82
<b>Tabela 9</b> – Área dos ácidos fenólicos majoritários observados em <i>Ilex paraguariensis</i> e IS pelas técnicas do MTT e inibição das placas de Lise.	85

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Informações sobre os extratos vegetais utilizados	31
<b>Quadro 2</b> – Dados relacionados à origem, identificação e líquido extrator das espécies vegetais utilizadas	35
<b>Quadro 3</b> – Comparação entre as variáveis de dois grupos de trabalho e os diferentes resultados obtidos.	63

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – Resultados da avaliação da potencial atividade anti-herpética (cepas KOS e 29R) do extrato bruto, frações e ácidos fenólicos isolados de <i>Ilex paraguariensis</i> , através do tratamento simultâneo e dos pré- e pós-tratamentos, pelo ensaio colorimétrico do MTT.	59
<b>Gráfico 2</b> – Resultados da avaliação da potencial atividade anti-herpética (cepas KOS e 29R) do extrato bruto, frações e ácidos fenólicos isolados de <i>Ilex paraguariensis</i> , através de diferentes estratégias metodológicas, pelo ensaio colorimétrico do MTT	61
<b>Gráfico 3</b> – Resultados da avaliação da atividade anti-HSV-1 (cepas KOS e 29R) do extrato bruto, frações e ácidos fenólicos isolados de <i>Ilex paraguariensis</i> , através das técnicas do MTT e de redução das placas de Lise	66
<b>Gráfico 4</b> – Resultados da avaliação da atividade anti-HSV-1 (cepas KOS e 29R) do extrato bruto, frações e ácidos fenólicos isolados de <i>Ilex paraguariensis</i> , através das técnicas do MTT e de redução das placas de Lise.	66
<b>Gráfico 5</b> – Resultados do efeito do extrato bruto e frações de <i>Ilex paraguariensis</i> na adsorção do HSV-1 (cepas KOS e 29R), obtidos através da técnica de inibição das placas de lise	68
<b>Gráfico 6</b> – Resultados do efeito do extrato bruto e frações de <i>Ilex paraguariensis</i> na adsorção do HSV-1 (cepas KOS e 29R), obtidos através da técnica de inibição das placas de lise.	69
<b>Gráfico 7</b> – Efeito antiviral em função do tempo de adição do extrato bruto e frações de <i>Ilex paraguariensis</i> (500 µg/mL) frente a cepa KOS do HSV-1.	72
<b>Gráfico 8</b> – Efeito antiviral em função do tempo de adição do extrato bruto e frações de <i>Ilex paraguariensis</i> (500 µg/mL) frente a cepa 29R do HSV-1.	73
<b>Gráfico 9</b> – Curvas padrão dos ácidos caféico e clorogênico.	77
<b>Gráfico 10</b> – Distribuição das substâncias majoritárias analisadas (fenólicos totais) nas amostras teste. Os valores representam a soma da área das substâncias analisadas (ácidos fenólicos) e sua distribuição entre as amostras teste.	83
<b>Gráfico 11</b> – Percentagem de fenólicos totais distribuídos nas amostras teste incluindo os frutos.	111

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>16</b>
2.1	ARSENAL TERAPÊUTICO ANTIVIRAL	16
2.2	HERPES SIMPLEX TIPO 1 (HSV-1)	17
2.3	ANTIVIRAIS DE ORIGEM VEGETAL	19
2.4	METODOLOGIAS PARA ESTUDO DA AÇÃO ANTIVIRAL DE EXTRATOS VEGETAIS	23
2.4.1	Seleção de plantas para triagem antiviral	24
2.4.2	Seleção do solvente	25
2.4.3	Análise e identificação de compostos biologicamente ativos	27
2.4.4	Seleção de testes antivirais <i>in vitro</i>	27
2.5	EXTRATOS VEGETAIS TESTADOS	30
2.5.1	Plantas testadas	30
2.5.2	<i>Ilex paraguariensis</i>	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
4.1	Material vegetal, preparação dos extratos e das soluções-estoques	34
4.2	CULTURAS CELULARES	34
4.2.1	Células	34
4.2.2	Meio de cultura e reagentes	36
4.3	VÍRUS	36
4.3.1	Origem das cepas virais	36
4.3.2	Preparo das suspensões-estoques virais	36
4.3.3	Determinação dos títulos infecciosos virais	37
4.3.3.1	Método das placas de lise	37
4.4	AValiação da citotoxicidade	38

4.4.1	Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com MTT	38
4.5	AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL	39
4.5.1	Ensaio colorimétrico com Sal de Tetrazolium (MTT)	39
4.5.1.1	Adição simultânea dos materiais-teste e dos vírus	39
4.5.1.2	Pré-tratamento das células com os materiais-teste, antes da adição dos vírus	40
4.5.1.3	Pós-tratamento das células infectadas com os materiais-teste	41
4.5.2	Ensaio de redução das placas de lise	41
4.5.2.1	Tratamento simultâneo	42
4.5.2.2	Efeito dos materiais-teste na adsorção viral	43
4.5.2.3	Efeito antiviral em função do tempo de adição dos materiais-teste	43
4.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
4.7	AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE <i>Ilex paraguariensis</i> POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	44
4.7.1	Amostras testadas	44
4.7.2	Condições cromatográficas	44
4.8	ANÁLISES QUALI E QUANTITATIVAS DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM <i>Ilex paraguariensis</i> POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	45
4.8.1	Equipamento utilizado	45
4.8.2	Preparação das amostras	45
4.8.3	Determinação das curvas padrões dos ácidos caféico e clorogênico	46
4.8.4	Análise dos ácidos fenólicos	46
4.8.5	Validação de métodos analíticos	46
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
5.1	DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS VIRAIS	48
5.2	TRIAGEM ANTI-HERPÉTICA	48
5.2.1	Citotoxicidade	48
5.2.2	Atividade Antiviral	49
5.3	FRACIONAMENTO BIOMONITORADO DE <i>Ilex paraguariensis</i>	55
5.4	ATIVIDADE ANTI-HERPÉTICA DE <i>Ilex paraguariensis</i>	56
5.4.1	Citotoxicidade	56



5.4.2	Atividade antiviral do extrato bruto, frações e ácidos fenólicos isolados de <i>Ilex paraguariensis</i> pela técnica do MTT _____	57
5.4.3	Confirmação da atividade antiviral do extrato bruto, frações e ácidos fenólicos isolados de <i>Ilex paraguariensis</i> pela técnica de redução das placas de lise – tratamento simultâneo _____	64
5.5	EFEITO DOS MATERIAIS-TESTE NA ADSORÇÃO VIRAL _____	67
5.6	EFEITO ANTIV EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ADIÇÃO DOS MATERIAIS-TESTE_	70
5.7	RESULTADOS DAS ANÁLISES QUALITATIVAS E QUANTITATIVAS DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM <i>Ilex paraguariensis</i> _____	74
5.7.1	Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) _____	74
5.7.2	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) _____	76
5.7.2.1	Seleção das condições cromatográficas _____	76
5.7.2.2	Curvas padrões dos ácidos caféico e clorogênico _____	76
5.7.2.3	Validação da técnica _____	78
5.7.3	Quantificação dos ácidos caféico e clorogênico nos materiais- teste _____	79
5.8	ESTABELECIMENTO DA CORRELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE ANTI-HERPÉTICA E OS TEORES DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM <i>Ilex paraguariensis</i> _____	83
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> _____	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> _____	<b>90</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> _____	<b>91</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas virais são um importante problema de saúde no mundo. Embora a busca por novos fármacos antivirais seja intensa, os avanços são poucos, já que a maioria destes compostos possui aplicações limitadas, fazendo com que um baixo número deles seja aprovado pelas autoridades governamentais para uso clínico (VLIETINCK; VANDEN BERGHE, 1998).

O crescimento do número de pacientes imunocomprometidos e da sobrevivência dos mesmos tem aumentado o desenvolvimento de infecções virais nesses pacientes. Além disso, o intenso uso de medicamentos antivirais conduziu ao desenvolvimento de cepas resistentes, as quais são agora comumente disseminadas (SNOECK, 2000), o que faz o problema agravar-se ainda mais.

Dentre os inúmeros vírus de importância clínica, destaca-se a família dos vírus herpéticos; nela encontram-se os Herpes Simplex vírus tipos 1 e 2 (HSV-1 e 2), que infectam grande número de pessoas no mundo todo. Os sintomas da doença não são sempre aparentes, mesmo durante a infecção primária, e podem variar desde lesões cutâneas e de mucosas até encefalites ou doenças sistêmicas envolvendo múltiplos órgãos. A transmissão da infecção de pessoa a pessoa ocorre, geralmente, pelo contato íntimo e compartilhamento de fluídos contendo os vírus. Por exemplo, o HSV-2 causa, principalmente, o herpes genital, que é uma das doenças sexualmente transmissíveis de maior prevalência no mundo. O HSV-1, apesar de também poder causar infecções genitais, provoca mais comumente o herpes labial; e estima-se que 60-95% das pessoas adultas, no mundo, sejam portadoras destes vírus (ROIZMAN; KNIPE, 2001; SPEAR et al., 2006).

O composto de escolha para profilaxia e tratamento das infecções causadas pelos HSV é o aciclovir, que inibe seletivamente a replicação do DNA viral, com baixa toxicidade às células hospedeiras. Contudo, a resistência dos vírus herpéticos à este fármaco, a disseminação das cepas resistentes em pacientes, principalmente os imunocomprometidos, e a decorrente progressão da doença fizeram com que as infecções herpéticas se tornassem um grave problema de saúde pública (CASSADY; WHITLEY, 1997; BRADY; BERNSTEIN, 2004), fatos que estimulam pesquisas para que novas terapias antivirais sejam encontradas (NIELSEN, 2002).

Os produtos naturais possuem uma extensa diversidade química, sendo uma fonte inesgotável de compostos com promissoras atividades biológicas, não apenas pelo grande número de espécies com propriedades medicinais inexploradas, mas

principalmente pela variedade estrutural dos metabólitos sintetizados. Além disso, grande parte das substâncias ativas pode ser isolada e modificada estruturalmente, alcançando maior eficácia e menor citotoxicidade (HUDSON, 1990; CHE, 1991; HOUGHTON, 1998; NIELSEN, 2002).

Fármacos antivirais derivados de produtos naturais podem atuar nas diversas etapas da replicação viral, desde a adsorção do vírus na célula hospedeira até sua liberação, o que pode resultar em mecanismos de ação complementares àqueles dos fármacos atualmente disponíveis (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997; HUDSON; TOWERS, 1999). Além disso, a triagem antiviral de extratos de plantas tem fornecido resultados promissores, que justificam a pesquisa de novas substâncias com potencial atividade antiviral a partir desta fonte (KHAN et al., 2005)

O Brasil possui uma medicina popular rica e original, na qual o uso de plantas ocupa lugar de destaque. Isto se deve ao fato do país ser detentor da maior biodiversidade do planeta, com aproximadamente 20-22% de todas as plantas e microorganismos existentes, além da assimilação dos conhecimentos indígenas, integrado às contribuições trazidas pelos escravos e imigrantes (SIMÕES et al., 1999; GUERRA et al., 1998). Esta ampla biodiversidade, combinada com a introdução de modelos biológicos *in vitro* em grande escala, propiciaram avanços significativos no estudo de novos fármacos (HOUGHTON, 2000; NIELSEN, 2002).

Além disso, devido ao importante aumento da 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 (HASUI; MATSUDA; OKUTANI, 1995; BENENCIA; COURRÉGES, 1999; REBORA, 2002).

Com o intuito de contribuir para o avanço do conhecimento nesta área, o Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) vem desenvolvendo, de forma cooperativa com pesquisadores desta e de outras instituições, trabalhos com produtos naturais de diversas origens e, também, com substâncias sintéticas (BETTEGA, 2000; FREITAS, 2001; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, 2003; SAVI, 2004; SILVA, 2005; CARRIEL, 2005; CHAVEZ, 2005).

Unindo a necessidade do estudo de novos fármacos com atividade antiviral à grande diversidade de extratos disponíveis produzidos por outros pesquisadores, este trabalho teve como objetivo a realização da triagem anti-herpética de extratos

de plantas e frações, seguida do estudo biomonitorado do extrato vegetal, cujos resultados preliminares foram promissores e que apresentaram disponibilidade de matéria-prima para a realização dos estudos subseqüentes.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ARSENAL TERAPÊUTICO ANTIVIRAL

Há pouco mais de uma década, apenas cinco fármacos antivirais tinham sido licenciados para o tratamento de infecções virais. Desde então, os avanços na virologia, particularmente pela necessidade de combate ao HIV (vírus da imunodeficiência humana), resultaram na descoberta e validação de vários alvos para intervenção terapêutica (DE CLERCQ, 2002).

O atual arsenal quimioterápico para infecções virais consiste em 40 fármacos antivirais licenciados pelas autoridades governamentais. A maioria foi aprovada nos últimos cinco anos, sendo que 20 deles são utilizados para o tratamento da infecção pelo HIV. Os demais antivirais são utilizados contra os vírus das hepatites B e C, vírus influenza, vírus respiratório sincicial, vírus herpéticos, incluindo neste último grupo o vírus da varicela zoster, o citomegalovírus e os vírus herpes simplex (DE CLERCQ, 2005).

A necessidade da busca por fármacos antivirais é fortemente embasada pela falta de vacinas eficazes contra uma ampla variedade de patógenos virais, como a maioria dos vírus respiratórios (adenovírus, rinovírus, vírus parainfluenza e vírus sincicial respiratório), o papilomavírus humano, os herpesvírus humanos, além dos vírus que causam febres hemorrágicas (DE CLERCQ, 2002). Além disso, os fármacos antivirais atualmente disponíveis apresentam muitas restrições de uso, pelo baixo espectro de ação e alta toxicidade (RICE; BADER, 1995).

Uma das principais razões das dificuldades no desenvolvimento de fármacos antivirais é a natureza intrínseca dos vírus, os quais possuem uma estrutura aparentemente simples e um sistema enzimático restrito, sendo totalmente dependentes dos processos metabólicos celulares para sua replicação. Dessa maneira, agentes que inibem ou provocam a inativação viral, normalmente causam também toxicidade às células hospedeiras. O compromisso com a especificidade pelas células infectadas, a eficácia e um baixo nível de toxicidade são, portanto, indispensáveis para a seleção de novos agentes antivirais (WHITE; FENNER, 1994).

Outro problema da quimioterapia antiviral relaciona-se à mutação dos genomas virais, pois cada célula infectada pode produzir milhares de cópias em poucas horas, e a maioria dessas cópias poderá sofrer mutação (STRAUSS; STRAUSS; LEVINE,

1996). Mesmo que o genoma, teoricamente, tenha acesso aos mecanismos de leitura e reparo, ele também pode acumular mutações, com um resultado inevitável, que traduz-se na rápida aquisição de resistência aos fármacos utilizados (LUCIW, 1996). No caso dos HSV, a resistência aos antivirais normalmente utilizados e a latência, que caracteriza a infecção por tais vírus, têm limitado a eficácia dos mesmos. Conseqüentemente, a pesquisa de novos agentes contra os vírus do herpes é de extrema necessidade (WHITE; FENNER, 1994).

## 2.2 HERPES SIMPLEX TIPO 1 (HSV-1)

Os vírus herpéticos fazem parte da família Herpesviridae e são divididos em três subfamílias:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -Herpesvirinae. Atualmente, existem cerca de 100 herpesvírus parcialmente caracterizados, sendo oito humanos, além do herpes vírus símio de macacos (Vírus herpético B), que pode também infectar o homem causando encefalite mortal (ROIZMAN, 1996; SANTOS; SILVA; PEREIRA JR, 2000; DA SILVA, 2000).

Ao contrário das outras famílias de vírus, os vírus herpéticos podem causar infecções líticas, latentes e transformadas. A infecção latente com subsequente doença recorrente é uma de suas características e durante o período de recorrência herpética, os vírus são inacessíveis ao sistema imune e aos medicamentos atualmente disponíveis (ROIZMAN, 1996).

Geralmente, o HSV-1 está associado a infecções orais, enquanto que o HSV-2 a infecções genitais. Contudo, ambos os vírus podem causar infecções clinicamente indistinguíveis em vários locais e podem permanecer latentes nos gânglios sensoriais, podendo ser reativado em infecções recorrentes sintomáticas ou assintomáticas (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

O Herpes Simplex Vírus tipo-1 (HSV-1), pertencente à sub-família  $\alpha$ -Herpesvirinae, é o principal agente etiológico do herpes simplex extragenital, uma dermatovirose infecto-contagiosa crônica e recorrente. Apresenta propriedades biológicas de crescimento rápido, lise das células infectadas e estabelecimento de infecções latentes em gânglios nervosos sensoriais. O fato de o vírus herpético codificar as principais enzimas necessárias à replicação do DNA viral, mantendo um grau de virulência suficiente para não ser subjugado pelos mecanismos de defesa do hospedeiro, faz com que sua sobrevivência em células neurais (permanentes),

que não replicam DNA e não se dividem, constitui um fato bastante provável de ocorrer (WHITE; FENNER, 1994; LUPI; PEREIRA JR, 2000).

O HSV-1 é constituído por uma estrutura helicoidal de DNA em dupla hélice, envolvida por um capsídeo icosaédrico de 100 nm de diâmetro composto por 162 capsômeros (150 hexâmeros e 12 pentâmeros) envolto por uma proteína de preenchimento denominada tegumento e envelopado por uma membrana lipídica, com aproximadamente 150 nm de diâmetro. Apresenta um dos maiores genomas virais de herpesvírus humanos, codificando cerca de 70 a 200 proteínas (WHITE; FENNER, 1994; ROIZMAN, 1996; DA SILVA, 2000; SANTOS, 2000).

Na infecção primária pelos vírus herpético ou primo-infecção, o vírus penetra no corpo por invasão das mucosas ou soluções de continuidade da pele. O vírus sofre, então, replicação nas células situadas na base do sítio de entrada, podendo ou não produzir lesões vesiculares e após, dissemina-se para células nervosas adjacentes. Nos neurônios, o nucleocapsídeo é encaminhado para o núcleo, iniciando a infecção latente, fase na qual o genoma viral está reprimido e integrado ao DNA da célula. O vírus pode então ser ativado por vários estímulos, como estresse, febre, trauma, mudanças hormonais, radiação ultra-violeta, etc, e depois passar retrogradamente pelo nervo, causando lesões características em sítios específicos da pele e mucosas (CLEMENTS; TIMBURY; GRIFFITHS, 1990; LUPI; PEREIRA JR, 2000).

As manifestações clínicas primárias e recorrentes podem variar desde gengivomastites, faringotonsillites e herpes labial, até querato-conjuntivites, encefalites e doença disseminada. Após a recuperação da infecção primária, o indivíduo retém o DNA herpético no gânglio trigêmeo por toda a vida, com no mínimo 50% de chances de sofrer ataques recorrentes, várias vezes no decorrer da sua existência. Em pacientes imunocomprometidos, como os submetidos à transplantes, quimioterapia e portadores do HIV, as infecções latentes são frequentemente reativadas (WHITE; FENNER, 1994).

O ciclo de multiplicação dos vírus herpéticos (18h) ocorre da seguinte maneira: primeiramente ocorre a ADSORÇÃO, que consiste na ligação específica dos receptores superficiais das células hospedeiras com as glicoproteínas do envelope viral; em seguida, ocorre a PENETRAÇÃO E DESNUDAMENTO (3 min), onde a principal via de penetração do HSV é por fusão na membrana da superfície celular, mas também pode ocorrer por endocitose. Neste último caso, o capsídeo é digerido

por enzimas lisossomais celulares, enquanto que no primeiro caso, a fusão do envelope com a membrana celular permitirá que o material genético seja liberado, iniciando a REPLICAÇÃO viral. A TRANSCRIÇÃO (4h pós-infecção - PI) e a SÍNTESE PROTÉICA prosseguem de forma coordenada, reguladas em três fases: imediata ( $\alpha$  – 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> h PI), precoce ( $\beta$  – 5<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> h PI), e tardia ( $\gamma$  até 12<sup>a</sup> h PI). Os produtos imediatos e precoces são algumas enzimas, que promovem a replicação do DNA viral e enzimas destruidoras, que iniciam a degradação do RNAm celular. Após a replicação (que vai até a 15<sup>a</sup> h PI), os genes tardios são transcritos e codificam proteínas estruturais do capsídeo e outras proteínas que formarão o vírion; após, inicia-se a última fase, de MONTAGEM e LIBERAÇÃO DOS VÍRIONS (até 18h PI), quando as proteínas do capsídeo são transportadas para o núcleo e reunidas em pró-capsídeos vazios ou preenchidos com DNA. Os nucleocapsídeos brotam de porções modificadas da membrana nuclear com glicoproteínas virais, e sofrem exocitose (COLBERE, 1975; ROIZMAN, 1996).

### **2.3 ANTIVIRAIS DE ORIGEM VEGETAL**

Embora a maioria das pesquisas no desenvolvimento de agentes antivirais tenha sido direcionada para substâncias sintéticas (RICE; BADER, 1995), esforços vêm sendo realizados no sentido de avaliar a capacidade de produtos de origem natural, tais como plantas medicinais, microorganismos e produtos marinhos, em inibir a replicação viral, tratar infecções virais ou, ainda, servir de modelo para a obtenção de novas moléculas farmacologicamente ativas (HUDSON, 1990; CHE, 1991; CHU; CURTLER, 1992; SENIOR, 1996; VLIETINCK; DE BRUYNE; VADEN BERGUE, 1997).

Uma das estratégias na busca de novos fármacos antivirais derivados de produtos naturais é baseada no estudo de extratos vegetais de plantas medicinais (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997). Ao se estudar uma planta com relação às suas características fitoquímicas, deve-se considerar a existência de dois grupos distintos de metabólitos, que são importantes para o seu desenvolvimento: os metabólitos primários e os secundários. Os metabólitos primários são encontrados em todos os sistemas vivos, essenciais ao crescimento e à vida, como os aminoácidos, monossacarídeos, ácidos carboxílicos, lipídeos, etc. Os metabólitos secundários são produtos de metabolismo específico, relacionados



aos processos adaptativos. São biossintetizados a partir de metabólitos primários, com distribuição restrita a certas plantas e microorganismos, e caracterizados por uma enorme diversidade química (VERPOORTE, 2000).

A título ilustrativo, pode-se citar inúmeros metabólitos secundários, que apresentaram atividade antiviral *in vitro*, tais como flavonóides (AMOROS; SIMÕES, GIRRE, 1992; ROBIN et al., 1998; LIN et al., 1999; SÁNCHEZ, et al., 2000; LI et al., 2000; SHAHAT et al., 2002; DU, et al., 2003), alcalóides (VANDEN BERGUE; VLIETINCK; VAN HOOF, 1986; MONTANHA et al., 1995; MCCORMICK et al., 1996), taninos (YOSHIDA et al., 1996; ELDERMEIER et al., 1996; DE BRUYNE, et al., 1999; LIU et al., 1999; ESQUINAZI et al., 2002), lignanas (ASANO et al., 1996; KERNAN et al., 1997; CHARLTON, 1998; KUO et al., 2001), compostos fenólicos (VANDEN BERGUE; VLIETINCK; VAN HOOF, 1986; CHE, 1991; HAYASHI et al., 2001; ABDEL-KADER, 2001; CHIANG et al., 2002; TOYOKUNI et al., 2003; SAVI et al., 2005; LI; BUT; OOI, 2005), saponinas (AMOROS, FAUCONNIER, GIRRE, 1987; KONOSHIMA, et al., 1995; HAYASHI, et al., 1997; SIMÕES, AMOROS, GIRRE, 1999; SINDAMBIWE, et al., 1998; APERS, et al., 2000; GOSSE, et al., 2002; MENGONI, et al., 2002; IKEDA et al., 2005), quinonas (ANDERSEN et al., 1991), terpenos (BOURNE et al., 2000), glicosídeos esteroidais (IKEDA et al., 2000), tiossulfatos (TASI et al., 1985), proantocianidinas (ERDELMEIER et al., 1996), proteínas (AOKI et al., 1995), entre outros.

Adicionalmente, recorrendo-se à base de dados *pubmed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), pôde-se obter uma retrospectiva dos antivirais de origem vegetal:

- o primeiro relato data de 1953, foi realizado por D. Vincent e intitula-se “Plantas antivirais”;
- em 1954, Fischer e colaboradores relataram o efeito virucida e antiviral de alguns taninos vegetais;
- Albano e Donato, em 1962, avaliaram as propriedades antivirais de alguns extratos de plantas, realizando experimentos *in vitro* contra o vírus da poliomielite e o ecovírus;
- em 1964, Cohen, Kucera e Herrmanni avaliaram a atividade antiviral do extrato de *Melissa officinalis*;

- no ano seguinte (1965), o mesmo grupo de pesquisa publicou sobre a atividade do bálsamo-de-limão; em 1967, sobre plantas da família Labiatae;
- em 1970, Bogdanova e colaboradores relataram a atividade anti-herpética de *Calendula officinalis*;
- em 1973, Badaev relatou a atividade antiviral dos extratos aquosos de algumas plantas;
- em 1974, foi feito o primeiro relato da atividade anti-herpética de um extrato de algas marinhas (DEIG et al., 1974);
- em 1976, um estudo relatou a atividade antiviral de uvas e vinhos (KONOWALCHUK; SPEIRS, 1976);
- em 1977, Calle e Caballero relataram o efeito anti-herpético de *Spilanthes americana*;
- em 1978, May e Willuhn relataram o efeito antiviral dos extratos aquosos de diversas plantas;
- Vacik et al., (1979) avaliaram a atividade antiviral do extrato aquoso do narciso contra o herpesvirus;
- Becker, em 1980, publicou uma revisão sobre agentes antivirais de origem natural;
- Shirobokov e colaboradores, em 1981, relataram a atividade antiviral de representantes da família Crassulaceae;
- Evtushenko (1982) relatou a atividade antiviral de espécies de *Kalanchoe*;
- em 1983, Suganda, Amoros, Girre e Fauconnier relataram o efeito inibitório de alguns extratos brutos e semi-purificados de plantas francesas na replicação do HSV-1 e do poliovírus-2;
- em 1984, Xu e colaboradores avaliaram o efeito antiviral do extrato de *Luffa cylindrica in vivo*;
- em 1985, Andrei e colaboradores relataram a atividade antiviral do extrato bruto de folhas de *Melia azedarach* L.

A partir daí, o número de trabalhos publicados nesta área cresceu e somente no período de 2000-2005, são relacionados no *site pubmed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) 164 artigos (antiviral AND medicinal plants).

Como pode ser visto, há na literatura científica muitos estudos pré-clínicos que avaliaram as propriedades antivirais de uma grande variedade de plantas

medicinais. Contudo, ainda existem poucos estudos em humanos com estas plantas. Nesse sentido, foi publicada recentemente, uma revisão sistemática para avaliação da eficácia e da segurança antiviral de preparações à base de plantas medicinais, que já tinham sido anteriormente testadas em estudos *in vivo* e *in vitro*. Para esta revisão, foram incluídos somente os ensaios clínicos randomizados e comparados, que avaliaram a eficácia e a segurança de monopreparações, em pacientes com infecções virais e sem complicações ou comorbidades. Todos os estudos foram devidamente analisados do ponto de vista metodológico, com vistas à redução dos erros sistemáticos e, obviamente, das inferências realizadas a partir da análise dos estudos individuais. Foram excluídos os ensaios clínicos que testaram preparações à base de *Echinacea spp.*, *Silybum marianum* e *Eleutherococcus senticosus*, pois apesar dessas plantas terem apresentado atividade antiviral, considera-se que os seus efeitos clínicos são, predominantemente, causados por seus efeitos imunomoduladores. Foram localizados 41 ensaios clínicos, que avaliaram a eficácia e a segurança de 11 plantas medicinais no tratamento de infecções virais, que já tinham sido testadas previamente em estudos pré-clínicos, tais como hepatite viral crônica dos tipos B e C, lesões cutâneas provocadas por herpes simplex, gripe provocada pelo influenza B, herpes genital masculina, herpes labial e HIV. Todas as espécies vegetais estudadas apresentaram resultados positivos e melhores do que os grupos tratados com placebo e, em alguns casos, similares ao antiviral de referência. Porém, a maioria dos ensaios clínicos apresentou problemas metodológicos, tais como utilização de extratos não padronizados, amostras reduzidas de pacientes, alocação dos pacientes sem randomização, e problemas de comparação entre os grupos de estudo, reduzindo, assim, a credibilidade dos resultados encontrados. Os autores dessa revisão concluíram que, devido às falhas metodológicas, os resultados encontrados nestes estudos não podem servir de base para a indicação terapêutica de medicamentos fitoterápicos contendo as plantas estudadas. Os resultados positivos encontrados justificam a condução de novos ensaios clínicos mais rigorosos para comprovar a eficácia e a segurança destes produtos (MARTIN; ERNEST, 2003).

Mais recentemente, Khan e colaboradores (2005) publicaram uma revisão sobre a ação anti-herpética de extratos e substâncias extraídas de plantas, e concluíram que, tanto as plantas medicinais podem exercer ação antiviral, quanto também podem servir como fonte para o isolamento de compostos bioativos. Além

disso, os autores também afirmaram que embora a atividade anti-herpética tenha sido demonstrada para um grande número de extratos, somente em poucos casos a natureza química dos compostos bioativos foi caracterizada.

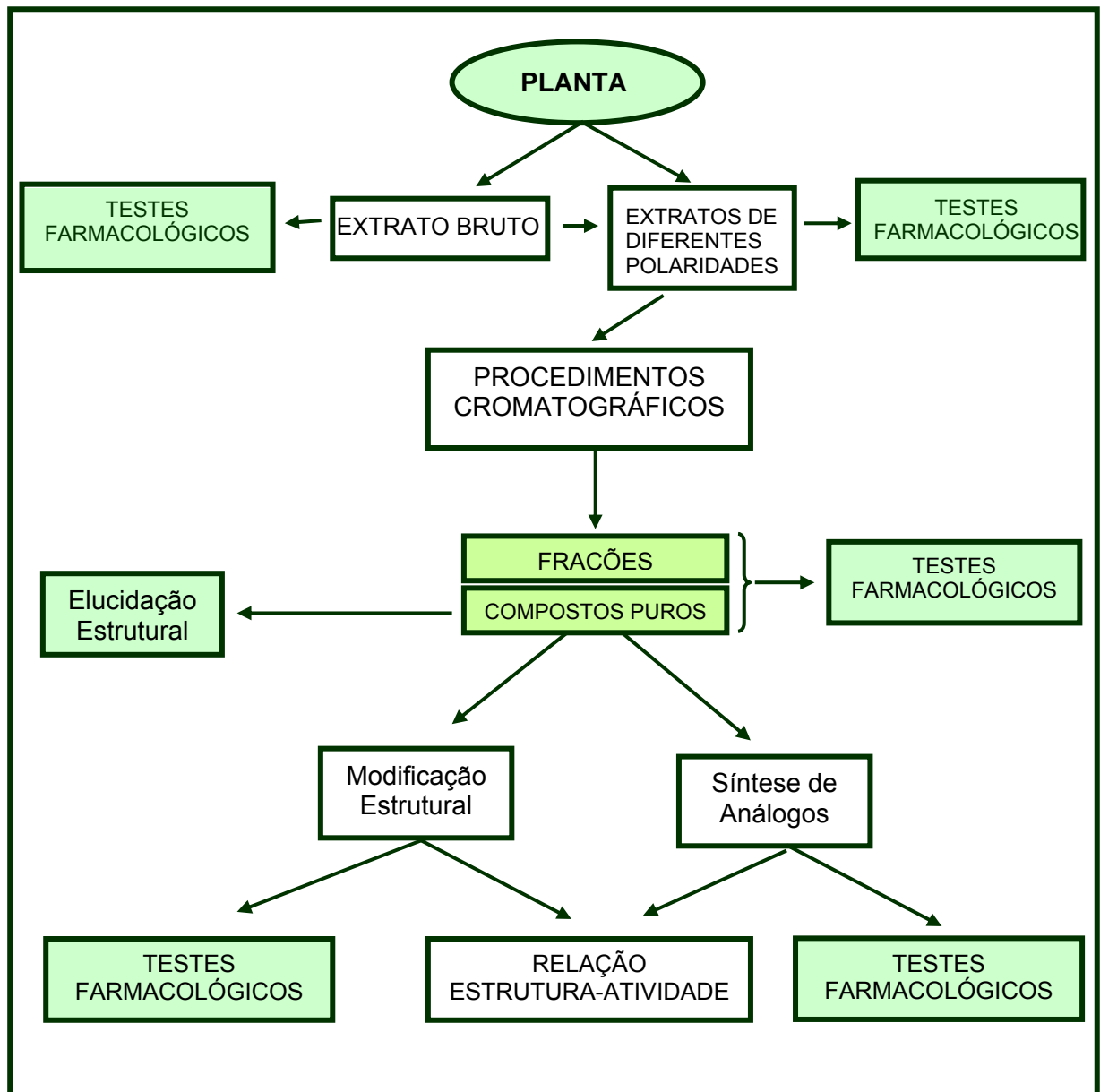
É importante destacar também que, até agora, nenhum composto anti-herpético de origem vegetal apresentou ação antiviral significativa, que permitisse seu uso clínico, embora várias substâncias naturais tenham mostrado resultados promissores para o desenvolvimento de fármacos antivirais ou agentes virucidas contra o HSV (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

#### **2.4 METODOLOGIAS PARA ESTUDO DA AÇÃO ANTIVIRAL DE EXTRATOS VEGETAIS**

Como regra geral, há duas diferentes abordagens para o estudo de novos fármacos: o desenvolvimento racional e a triagem randômica. Esta última permanece sendo a estratégia mais usual e acessível. Não somente compostos sintéticos, mas também produtos naturais de diferentes origens, tais como plantas, microorganismos e produtos marinhos têm demonstrado potencial atividade antiviral (VANDEN BERGHE et al., 1986; HUDSON, 1990; CHE, 1991; VLIETINCK; VANDEN BERGHE, 1991), sendo que muitos desses antivirais são obtidos por fracionamento biomonitorado (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997; VLIETINCK; VANDEN BERGHE, 1998).

O ensaio biomonitorado consiste na purificação, isolamento e identificação dos metabólitos bioativos presentes em extratos e frações semi-purificadas, a fim de isolar os metabólitos bioativos. Para isso, são utilizadas diferentes técnicas cromatográficas, que são selecionadas de acordo com as características dos compostos a serem isolados. Após cada fracionamento, as diferentes frações obtidas são monitoradas através dos mesmos ensaios de atividade farmacológica, com o objetivo de detectar em qual fração localizam-se os compostos bioativos (HOUGHTON, 2000).

A figura 1 ilustra as etapas básicas do processo de obtenção de metabólitos vegetais bioativos.



**Figura 1:** Processo de obtenção de compostos bioativos (Adaptado de CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

#### 2.4.1 Seleção de plantas para triagem antiviral

A escolha da planta e as diferentes estratégias metodológicas a serem estudadas dependem dos objetivos do pesquisador. A estratégia mais comum é a seleção baseada em estudos etnobotânicos e/ou etnofarmacológicos, a qual

fundamenta-se na cuidadosa observação do uso dos recursos naturais na medicina popular em diferentes culturas (ELISABETSKY, 1986; GILANI; RAHMAN, 2005).

Outra forma é a seleção baseada na composição química, uso filogenético ou informações quimiotaxonômicas da planta, principalmente no uso de plantas pertencentes a certos gêneros e famílias com compostos com definida classe química e conhecida atividade farmacológica (GOTTLIEB; KAPLAN, 1993; VLIETINCK; DE BRUYNE; BERGHE, 1997; FABRICANT; FARNSWORTH, 2001).

Como dito anteriormente, outro método para seleção é a escolha randômica de plantas, na qual o pesquisador busca uma atividade farmacológica definida, resultando em espécies ativas, cujos estudos posteriores são realizados. E finalmente, é possível, desejável e inevitável, a combinação de vários critérios. Além da estratégia escolhida, a busca de informações em banco de dados e na literatura científica são cruciais para encontrar compostos bioativos, que já tenham sido identificados e possam também ser usados como critério para escolha da planta, isto é, se o propósito é a busca de uma nova substância (RATES, 2001).

#### **2.4.2 Seleção do solvente**

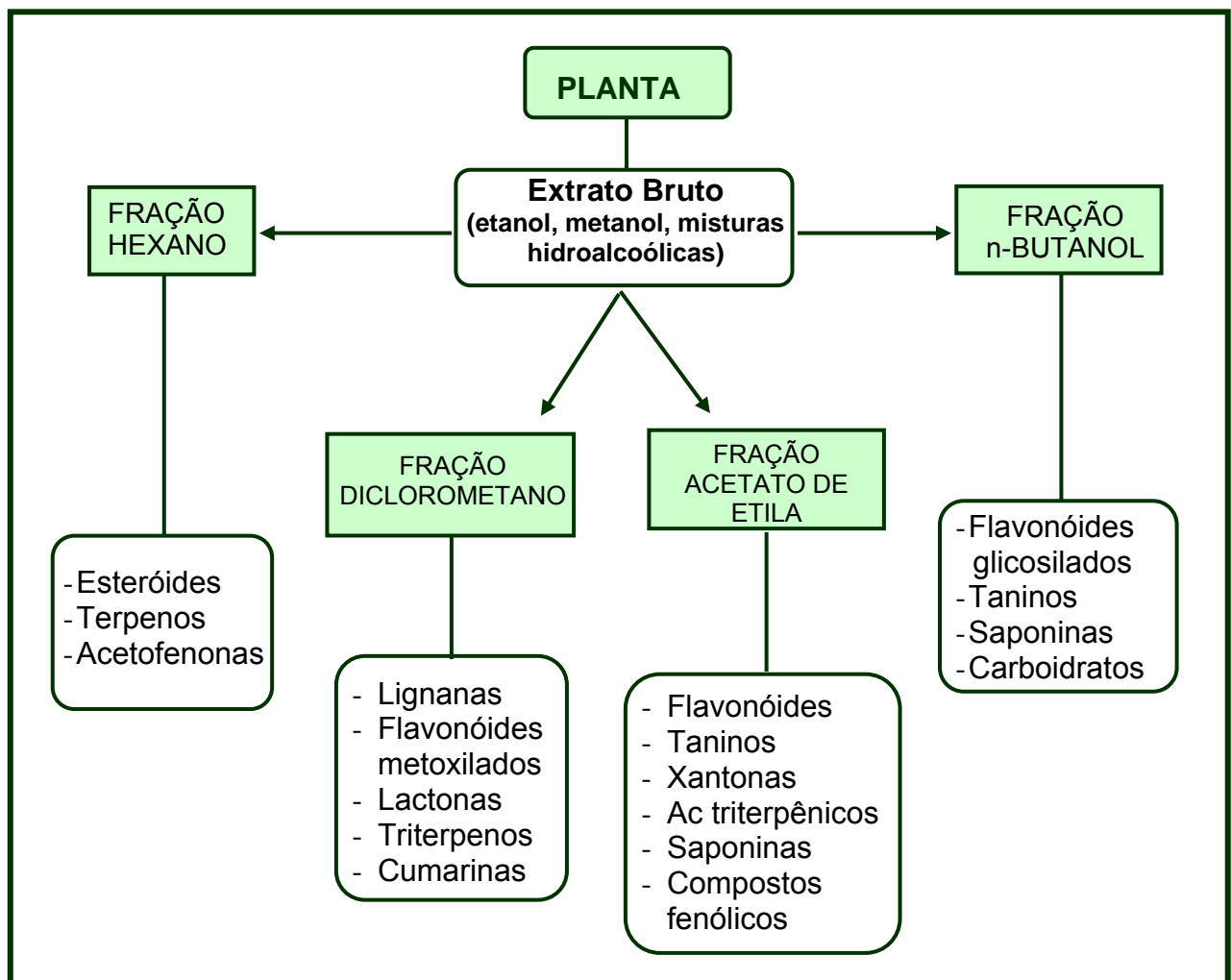
A preparação dos extratos brutos das plantas é o ponto de partida para uma posterior purificação. A escolha do solvente para extração deve ser feita tendo em vista os objetivos do estudo e os resultados da abordagem. Para obter uma extração eficiente é necessário usar solventes puros e condições adequadas, utilizando sempre que possível solventes de baixa reatividade; nunca deve ser descartada a possibilidade de formação de artefatos (GHISALBERTI, 1993).

Embora algumas formas de extração (por exemplo: água quente, água fria, solução salina) pareçam ser mais apropriadas para muitas plantas, o método de extração tradicional varia consideravelmente. Se o objetivo do pesquisador é ter relevância com a técnica tradicional de uso popular, reproduzi-la ao máximo é o mais indicado, e mesmo alguns procedimentos tradicionais podem usar outros solventes (álcool, vinagre) (VANDEN BERGHE; VLIETINCK; VAN HOOFF, 1986; HUDSON; TOWERS, 1999).

Mas se o objetivo for extrair compostos bioativos, os quais possam ser quimicamente caracterizados, uma grande variável de procedimentos pode ser utilizada, representando uma tentativa de extração primária de moléculas polares

(por exemplo, etanol), moléculas apolares (por exemplo, clorofórmio, hexano) ou mesmo uma mistura de moléculas polares e apolares (por exemplo, metanol). Em alguns casos, o investigador pode olhar especificamente para a classe de compostos que objetiva isolar, a qual é ditada pelo tipo de extração usada (HUDSON; TOWERS, 1999).

A figura 2 mostra o esquema dos processos de separação dos principais metabólitos secundários vegetais. Este método é geralmente usado quando não se conhece a natureza dos compostos químicos presentes na planta em estudo; caso contrário podem ser utilizados métodos específicos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).



**Figura 2:** Processos de separação dos principais metabólitos secundários vegetais (Adaptado de CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

### 2.4.3 Análise e identificação de compostos biologicamente ativos

Uma vez extraído da planta, o composto bioativo deve ser separado do extrato bruto. O procedimento pode envolver desde uma simples cristalização do composto até separações sucessivas com partições em solventes de polaridades diferentes e uso de técnicas cromatográficas. Neste contexto, a cromatografia tem lugar de merecido destaque no que concerne à separação, identificação e quantificação de compostos (HOUGHTON; RAMAN, 1998).

Uma das técnicas de caracterização e subsequente separação, bem como de controle final da pureza do composto isolado, é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC – High Performance Liquid Chromatography). Dentre as vantagens que esta técnica oferece pode-se citar: a possibilidade de separação e detecção de compostos em baixas concentrações na planta, fases móvel e estacionária com ampla faixa de polaridade (de modo que a seletividade no processo de separação possa ser ajustada), além da minimização de decomposição de compostos instáveis na amostra (HOSTETTMANN; WOLFENDER; RODRIGUEZ, 1997; MARASCHIN; VERPOORTE, 2001).

### 2.4.4 Seleção de testes antivirais *in vitro*

As técnicas usadas para a detecção de uma potencial atividade antiviral diferem significativamente entre si, apesar da maioria delas estar fundamentada na inibição da replicação viral provocada pelo material em estudo (SUBAK-SHARPE, 1990).

A técnica mais comum envolve a avaliação do ECP (efeito citopático) viral por microscopia, que avalia os danos morfológicos celulares causados pelos vírus; esta técnica é subjetiva e permite a estimativa de concentrações dos materiais-teste que inibem a replicação viral, em diferentes graus (MARLES et al., 1992; GALT; DARGAN; SUBAK-SHARPE, 1990).

O efeito citopático viral do HSV-1 é caracterizado pelo aparecimento de células de dimensões variáveis, arredondadas, bastante brilhantes, pouco refringentes, algumas vezes separadas e, mais freqüentemente, ligadas umas às outras por prolongamentos citoplasmáticos formando os chamados “focos” com aspecto característico de “cachos de uva”, que se estendem rapidamente pela superfície do local de infecção. As lesões nucleares se caracterizam por uma marginação da



cromatina que dá lugar, no centro do núcleo, a uma inclusão acidófila característica. As lesões citoplasmáticas aparecem como formações policarióticas (sincícios e células gigantes) devido a fusão dos citoplasmas das células adjacentes infectadas (GIRARD; HIRTH, 1989).

Além da avaliação do ECP viral, pode-se também observar microscopicamente o aparecimento de corpos de inclusão, que são alterações mais sutis na arquitetura intracelular de células individuais e/ou realizar a técnica de hemadsorção, que se refere à medida indireta da síntese de proteínas virais, em células infectadas, detectada pela adsorção de eritrócitos na superfície dessas células (FIELDS, 1998).

Embora a avaliação do efeito citopático viral seja bastante usado, nem todos os vírus causam efeito citopático, e por isso, outras técnicas são também utilizadas como por exemplo, aquelas que avaliam a diminuição do título viral e a redução de unidades formadoras de placas (FIELDS, 1998).

É possível que um composto antiviral possa estar presente em baixas concentrações no extrato e sejam exigidas altas concentrações para este apresentar atividade antiviral, ou então, que este inative apenas parte do inóculo viral, a qual pode ser registrada como parcial atividade antiviral. Por isso, a técnica escolhida para a realização do ensaio antiviral com esse tipo de compostos é de crucial importância (HUDSON; TOWERS, 1999).

É muito importante que, antes de se iniciar a avaliação da potencial ação antiviral propriamente dita, se determine a citotoxicidade, pois a concentração de uma amostra que apresenta atividade antiviral, não pode ser tóxica às células hospedeiras (ELOFF, 1998). Devido a isso, os resultados dos estudos *in vitro* geralmente são expressos como IS (= Índice de Seletividade), valor que expressa a relação entre a concentração da amostra, que é tóxica para 50% do tapete celular e a concentração efetiva, que é a concentração que protege 50% do tapete celular da infecção viral. Contudo, um trabalho realizado por Galt, Dargan e Subak-Sharpe, em 1990, revelou que os índices de seletividade podem variar, dependendo da metodologia, da linhagem celular e dos vírus utilizados.

Diferentes técnicas de coloração (cristal violeta, eosina, vermelho neutro, azul de trypan, etc) são usualmente utilizadas para avaliar a citotoxicidade e/ou atividade antiviral de amostras. O azul de trypan é um corante vital, 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, e o percentual de células não coradas representa o índice de viabilidade celular (WALUM; STENBERG; JESSEN, 1990).

O sal de tetrazolium MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium] é um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em suas mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto formazana de coloração azul-escuro, não solúvel em água, que fica armazenado no citoplasma celular (DENIZOT; LANG, 1986).

O ensaio colorimétrico com MTT é um método sensível e quantitativo, pois mede a quantidade de formazana formada através de espectrofotometria, onde o valor da absorbância obtido é proporcional ao número de células viáveis. A técnica foi descrita por Mosmann (1983), primeiramente, para avaliar compostos com atividade antitumoral, que está intimamente relacionada com a citotoxicidade.

Em 1988, Pauwels e colaboradores modificaram a técnica para avaliar a potencial atividade anti-HIV e a citotoxicidade de vários compostos, o que representou uma inovação na metodologia já existente. Posteriormente, em 1991, Takeuchi, Baba e Shigeta utilizaram esse teste para avaliar a atividade antiviral e a citotoxicidade de compostos conhecidos anti-herpéticos, tais como aciclovir, vidarabina e sulfato de dextrana.

O ensaio do MTT é apropriado para uma variedade de linhagens celulares, que apresentam crescimento exponencial em cultura e alto nível de atividade mitocondrial. Deve-se levar em consideração que alguns compostos podem afetar seletivamente as enzimas responsáveis pela redução do MTT, resultando numa superestimação da toxicidade (BARILE, 1994; SMEE et al., 2002). Outro aspecto importante a ser considerado é que a redução do MTT pode não estar exclusivamente relacionada às desidrogenases mitocondriais, mas também a outras enzimas celulares (LIU et al., 1997; LIU; SCHUBERT, 1997) e quaisquer fatores que afetem os mecanismos desta redução, poderiam fornecer resultados não fidedignos (CARMICHAEL et al., 1987; VISTICA et al., 1991; SIEUWERTS et al., 1995).

Sieuwerts e colaboradores (1995) afirmaram que o ensaio do MTT pode ser uma excelente ferramenta para a medida da atividade metabólica *in vitro*, desde que algumas precauções sejam tomadas, já que a habilidade das células viáveis em produzir formazana pode ser influenciada, significativamente, por algumas condições. O controle dos valores de pH, durante a incubação do MTT nas células e

após a solubilização dos cristais de formazana; a qualidade do agente solubilizante de formazana; e a linhagem celular associada ao requerimento de diferentes períodos de incubação para redução do MTT são os principais fatores que podem interferir no ensaio, afetando desde o espectro de produção da formazana até a quantidade produzida pela célula.

O teste de redução das placas de lise é a técnica “padrão ouro” para a medida quantitativa de infecções virais, e se caracteriza como uma técnica com custo mais elevado e longo tempo para obtenção de resultados, sendo, portanto, pouco indicada quando se objetiva testar vários extratos ou substâncias – triagem preliminar - (HUDSON; TOWERS, 1999).

O teste de redução das placas de lise foi desenvolvido originalmente para o estudo de bacteriófagos por d’Herelle em 1900, tendo sido adaptado para vírus animais por Dubelco e Vogt, em 1953, um avanço que revolucionou a virologia animal. Este teste é baseado na habilidade das partículas infecciosas virais de causar uma área macroscópica de efeito citopático em um tapete celular normal. Especificamente, se uma célula na monocamada é infectada com uma partícula viral, novos vírus resultantes da infecção inicial podem infectar células ao redor desta primeira e assim por diante. Após um determinado período de tempo, que depende do vírus e do MOI (= multiplicidade de infecção) utilizados, a região onde ocorreu a infecção viral forma a chamada placa de lise, e o corante usado para revelação auxilia na visualização e contagem dos focos (FIELDS, 1998).

A partir destas técnicas pode-se projetar diferentes estratégias metodológicas, com objetivos diversos, tais como os desta dissertação, que estão discutidos adiante no item 4.

## **2.5 EXTRATOS VEGETAIS TESTADOS**

### **2.5.1 Plantas testadas**

O quadro 1 e o item 2.5.2 trazem algumas informações a respeito dos extratos vegetais testados neste trabalho.

**Quadro 1:** Informações sobre os extratos vegetais utilizados

Família	Sinonímia Botânica	Nomes populares	Usos tradicionais
Apocynaceae	<i>Allamanda blanchettii</i> A. DC. <i>Allamanda schottii</i> Pohl	Alamanda	Ornamental (Pio Correa, 1979)
Aquifoliaceae	<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.Hil.	Erva-mate, mate	Propriedades diuréticas, antiinflamatórias e estimulante (CRUZ, 1982; MAZZAFERA, 1994) Sintomas de úlceras gástricas, perda de peso, febre, como tônico, e para tratamento de feridas (POTT, POTT, 1994).
Lythraceae	<i>Lafoensia pacari</i> St.Hil.	Mangava-brava	Sedativo (Pio Correa, 1979)
Passifloraceae	<i>Passiflora edulis</i> Deg.	Maracujá-azedo	Para tratar diabetes (ALONSO, et al., 1980)
Rosaceae	<i>Rubus imperialis</i> Chum. Schl.	Amora-branca, Amora-domato	-
Elaeocarpaceae	<i>Sloanea guianensis</i> Aubl. Benth	Sapopema	-
Leguminosae	<i>Glycine max</i> L.	Soja	Alimento (MURPHY et al., 1999)

Após a triagem anti-herpética, o extrato escolhido para dar continuidade aos experimentos foi o de *Ilex paraguariensis*; seguem abaixo algumas informações sobre esta planta.

### 2.5.2 *Ilex paraguariensis*

Historicamente, a erva-mate era usada pelos índios das tribos guaranis, tendo o seu cultivo iniciado no século XV, durante a colonização jesuíta. Desde então, esse cultivo se tornou tradicional e sua importância na agricultura aumentou, resultando em um impacto econômico significativo nos países da América do Sul (SCHENKEL; MONTANHA; GOSMANN, 1996).

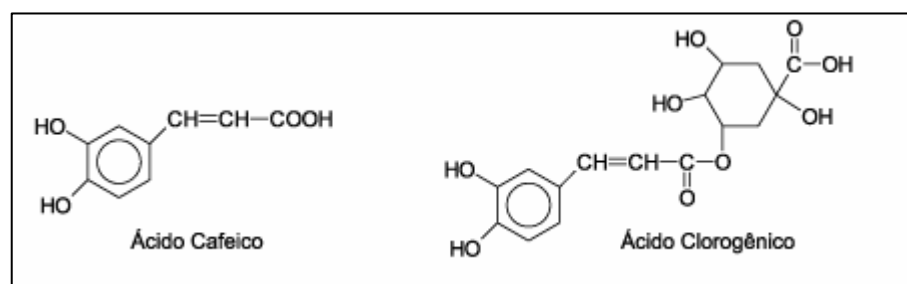
O cultivo da erva-mate tem relevância econômica, cultural e social na região sul do Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai. A importância cultural pode ser ilustrada pela sua incorporação na cesta básica do Rio Grande do Sul, enquanto que

sua importância sócio-econômica é caracterizada pelo fato dela ser uma cultura não-extensiva, realizada predominantemente em pequenas propriedades familiares. Esta espécie é também utilizada na medicina popular e empregada em preparações comerciais de plantas medicinais como estimulante do sistema nervoso central, digestiva, diurética e anti-reumática. (GOSMANN; GUILLAUME, 1995; MARTINET et al., 2001; SCHENKEL et al., 1997).

O efeito colerético, o aumento do trânsito intestinal (GORZALCZANY et al., 2001), a prevenção da indução de metilgloxalinibidor de plasminogênio e de antitrombina III (GUGLIUCCI; MENINI, 2002), o efeito antioxidante (SCHINELLA et al., 2000; BRACESCO; DELL; ROCHA, 2003) e a diminuição da progressão de arterosclerose em coelhos (MOSIMANN; WILHELM FILHO; SILVA, 2005) são algumas atividades farmacológicas descritas na literatura.

Estes efeitos têm sido atribuídos às altas concentrações de flavonóides e de derivados cafeoilquínicos no vegetal (SCARPATI; GUIISO, 1964; CLIFFORD, 1990; FILIP et al., 2001). A literatura relata a presença de metil-xantinas (REGINATTO et al., 1999; COELHO et al., 2001), saponinas triterpênicas (GOSMANN et al., 1989, 1995; MONTANHA, 1990; KRAEMER et al., 1996; TAKETA et al., 2000; GNOATTO, SCHENKEL, BASSANI, 2005), minerais (P, Fe, Ca), e vitaminas C, B1 e B2 (GRAHAM, 1984) em *Ilex paraguariensis*.

Até o momento, no nosso conhecimento, não há relato da detecção da atividade anti-herpética para a erva-mate. Dentre os grupos de metabólitos existentes nas folhas deste vegetal, sabe-se que para algumas saponinas triterpênicas (AMOROS et al., 1987; SIMÕES; AMOROS; GIRRE, 1999; IKEDA et al., 2005) e para alguns ácidos fenólicos (SERKEDJIEVA; IVANCHEVA, 1999; CHIANG et al., 2002; LI et al., 2004) já foi relatada ação antiviral. Por isso, neste trabalho será dada ênfase aos ácidos fenólicos, e serão analisados os ácidos caféico e clorogênico, cujas estruturas são apresentadas na figura 3:



**Figura 3:** Estruturas químicas dos ácidos fenólicos caféico e clorogênico.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar a triagem anti-herpética de oito plantas da flora brasileira, e selecionar a que apresentar os melhores resultados para aprofundar a avaliação da atividade antiviral detectada, correlacionando-a com sua composição química.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade dos extratos brutos e frações obtidos a partir de *Allamanda blanchettii*, *Allamanda schottii*, *Glycine max*, *Lafoensia pacari*, *Passiflora edulis*, *Rubus imperialis*, *Sloanea guianensis* e *Ilex paraguariensis* frente a células VERO, através do ensaio do MTT.
- Avaliar a atividade anti-herpética destes extratos brutos e frações frente ao vírus herpético humano do tipo 1 (HSV-1, cepas KOS e 29 R, respectivamente, sensível e resistente ao aciclovir), através do ensaio do MTT.
- Confirmar a atividade antiviral do extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis* frente ao HSV-1 (cepas KOS e 29 R), pelo ensaio das placas de lise.
- Propor o provável mecanismo de ação do extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis* frente ao HSV-1 (cepas KOS e 29 R), usando diferentes estratégias metodológicas.
- Determinar a composição química qualitativa e quantitativa do extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis*, por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- Correlacionar a atividade anti-herpética detectada e os teores obtidos dos ácidos fenólicos (ácidos caféico e clorogênico) em *Ilex paraguariensis*.
- Avaliar a citotoxicidade dos ácidos caféico e clorogênico frente a células VERO, através do ensaio do MTT.
- Avaliar a atividade antiviral dos ácidos caféico e clorogênico frente ao HSV-1 (cepas KOS e 29 R), através dos ensaios do MTT e das placas de lise.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal, preparação dos extratos e das soluções-estoques

Após a coleta, os órgãos vegetais pós triagem foram colocados para secar a temperatura ambiente. A seguir, cada órgão, separadamente, foi moído e macerado por 7 dias, com diferentes líquidos extratores (quadro 2). O macerado obtido foi filtrado e levado à secura em evaporador rotatório, sob pressão reduzida e temperatura inferior a 45 °C. Os extratos brutos obtidos e que apresentaram atividade anti-herpética, foram submetidos a uma partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, gerando as frações hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol.

Foram preparadas soluções-estoque a 2 mg/mL dos extratos vegetais. Os extratos foram exatamente pesados em balança analítica e dissolvidos em 1 % de DMSO (quando necessário) e, posteriormente, diluídos em meio MEM acrescido de 1 % de PSA (Penicilina G/estreptomicina/anfotericina B) filtrados assepticamente em filtro Millipore® 0,22 µm, aliquotados em tubos tipo eppendorf, e armazenados a -20 °C até a realização dos ensaios.

Os diferentes materiais-teste foram doados por outros grupos de pesquisadores; desta forma, apenas testou-se as amostras recebidas, o que justifica que a escolha dos diferentes líquidos extratores utilizados foi feita por tais pesquisadores.

### 4.2 CULTURAS CELULARES

#### 4.2.1 Células

Foram utilizadas células VERO (ATCC: CCL 81), que são culturas contínuas de fibroblastos de macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*), cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz/SP. As mesmas foram escolhidas por serem permissivas ao HSV-1, possibilitando sua multiplicação e demonstrando efeito citopático bem visível e reprodutível ao microscópio invertido (HU; HSIUNG, 1989).

**Quadro 2:** Dados relacionados à origem, identificação e líquido extrator das espécies vegetais utilizadas.

<b>Espécie</b>	<b>Parte utilizada</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Época de coleta</b>	<b>Identificação</b>	<b>Líquido extrator</b>
<i>Allamanda blanchettii</i>	Folhas e flores	Praia dos Ingleses, Florianópolis, SC	10/2003	Oscar Benigno Isa Herbário Barbosa Rodrigues	Etanol
<i>Allamanda schottii</i>	Folhas e flores	Campus Universitário – UFSC – Florianópolis, SC	02/2004	Oscar Benigno Isa Herbario Barbosa Rodrigues	Etanol
<i>Ilex paraguariensis</i>	Folhas	Erexim, RS	03/2001 a 12/2001	Branca Severo Herbário da Universidade de Passo Fundo	Água
<i>Lafoensia pacari</i>	Folhas	Cuiabá, MT	04/2000	Herbario Central da Universidade Federal do Mato Grosso	Metanol
<i>Passiflora edulis</i>	Folhas e Raízes	Antônio Carlos, SC	07/2003 (folhas) e 10/2003 (raízes)	Daniel Falkenberg Universidade Federal de Santa Catarina	Água
<i>Rubus imperialis</i>	Partes aéreas	Florianópolis, SC	06/1997	Ademir Reis Herbário Barbosa Rodrigues	Metanol
<i>Sloanea guianensis</i>	Folhas e Caules	Morro do Baú, SC	08/ 2001	Ademir Reis Herbário Barbosa Rodrigues	Metanol
<i>Glycine max</i>	Sementes	Medianeira, PR	07/2004	-	Etanol 40%



#### 4.2.2 Meio de cultura e reagentes

O meio utilizado para o crescimento e manutenção das células foi o Meio MEM (“Minimal Essential Medium”) – Sigma® e Cultilab®, adicionado de 0,22% de bicarbonato de sódio para que o pH do meio permaneça entre 7,25 a 7,4. O MEM foi suplementado com Soro Fetal Bovino – SFB (Cultilab®) na proporção de 10 % para promoção do crescimento e 5 % para manutenção da linhagem celular. Como incubadora foi utilizada estufa com atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> e 95 % de O<sub>2</sub>. As culturas celulares infectadas com HSV-1 foram mantidas com meio MEM não suplementado com SFB (FRESHNEY, 1999). Para prevenir a contaminação das culturas de células por bactérias, fungos e leveduras foram adicionados ao meio 1 % de PSA (10.000 U de penicilina, 10.000 µg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B – Gibco BRL). Para a obtenção de subculturas celulares, para a manutenção das células e para a realização dos experimentos, utilizou-se como agente dissociante a tripsina (tripsina de pâncreas de porco preparada em uma solução de EDTA 1: 250, Sigma®), que é uma enzima proteolítica que catalisa reações de quebra de cadeia polipeptídica em determinadas seqüências de aminoácidos.

### 4.3 VÍRUS

#### 4.3.1 Origem das cepas virais

Os experimentos foram realizados com o vírus herpético humano tipo I (HSV-1), cepas KOS e 29-R (Universidade de Rennes, França), um vírus DNA envelopado.

#### 4.3.2 Preparo das suspensões-estoques virais

Os estoques virais foram preparados conforme metodologia descrita anteriormente por Simões e colaboradores (1999).

As suspensões virais já existentes (HSV-1, cepas KOS e 29R) foram inoculadas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo uma monocamada de células VERO, tripsinizadas 24 h antes da infecção. O meio de cultura foi aspirado da garrafa e a monocamada celular foi lavada 3 X com solução de tampão fosfato (PBS), com o objetivo de retirar células mortas e resquícios de SFB; em seguida, o tapete celular foi inoculado com 1 mL da suspensão viral e o frasco incubado por 1 h a 37 °C, em

estufa de CO<sub>2</sub> para que o vírus fosse adsorvido. O inóculo foi retirado por sucção a vácuo, e adicionou-se meio MEM sem SFB. As condições de incubação foram as mesmas condições descritas acima.

O efeito citopático viral (ECP) foi monitorado por microscópio invertido a cada ciclo de replicação (18 h para o HSV-1). Após total destruição do tapete celular, o frasco foi congelado a -80 °C e descongelado a 37 °C 3 X para o rompimento total das células e liberação das partículas virais. O sobrenadante foi aliquoteado em tubos estéreis e armazenados a -80 °C até sua utilização.

#### 4.3.3 Determinação dos títulos infecciosos virais

As cepas KOS e 29R do HSV-1 foram tituladas pelo método das placas de lise (BURLESON; CHAMBERS; WIEDBRAUK, 1992).

##### 4.3.3.1 Método das placas de lise

Células VERO, em uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/mL, foram cultivadas em placa de 24 cavidades, com meio MEM, suplementado com 5 % de SFB e incubadas a 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub>. Após confluência, essas células foram infectadas com 400 µL da suspensão estoque viral diluídas seriadamente (razão 1:10), em meio MEM sem SFB (três réplicas para cada diluição). As placas foram incubadas durante 1h, tendo sido agitadas cuidadosamente a cada 15 min para uma melhor distribuição da suspensão viral. Após esse tempo, a suspensão viral foi aspirada e foram adicionados a cada cavidade 500 µL de uma solução de CMC (carboximetilcelulose<sup>1</sup>). As placas foram novamente incubadas por 72 h, equivalente a 4 ciclos de multiplicação do HSV. Após este período, o meio foi retirado e as células fixadas e coradas pela adição de 200 µL do corante preto de naftaleno<sup>2</sup> por 40 min, a temperatura ambiente, em agitador mecânico. Após este tempo, o corante foi aspirado e as placas colocadas para secar a temperatura ambiente, sendo

---

<sup>1</sup> Preparação da solução de carboximetilcelulose: Meio MEM 2X + solução aquosa a 0,8% de carboximetilcelulose (Sigma®), na proporção 1:1, ambos previamente esterilizados e acrescidos de 1% de PSA.

<sup>2</sup> Preparação da solução de preto de naftaleno: 100mg do corante preto de naftaleno (Sigma®), foram dissolvidos em 100 mL de uma solução aquosa a 5% de ácido acético (v/v) (Nuclear®), sendo o pH ajustado, se necessário, para 2,3-2,5. Esta mistura foi filtrada através de papel filtro e estocada a 4 °C, sendo aquecida em banho-maria a 37°C, antes de seu uso.

quantificadas através da visualização em microscópio estereoscópio. Para calcular o título, contou-se os focos de infecção na última diluição, que se caracterizam por áreas claras de lise celular, chamadas de placas. O título infeccioso é expresso através do número de unidades formadoras de placas/mL (UFP/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:

$$\text{Número de placas formadas na última diluição} \times \text{Recíproca da diluição} \times \text{Recíproca do volume (mL)}$$

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

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

Foi utilizado o ensaio colorimétrico do MTT, conforme proposto por Takeuchi, Baba e Shigeta (1991), com modificações propostas por Sieuwerts et al. (1995).

Uma suspensão de células VERO, contendo aproximadamente  $2,0 \times 10^5$  células/mL, obtida por tripsinização de um frasco de cultura celular, foi distribuída em uma placa de 96 cavidades (100  $\mu$ L/cavidade). A placa foi incubada por 24 h, a 37 °C, em estufa de CO<sub>2</sub>. Após 24 h, com o tapete celular confluyente, o meio MEM foi substituído pelos diversos materiais-teste, em diferentes concentrações. A placa foi incubada por 72 h, o meio substituído por 50  $\mu$ L de MTT<sup>3</sup>, e a placa foi novamente incubada por 4 h. O meio com MTT foi então removido e substituído por 100  $\mu$ L de DMSO/cavidade (Nuclear®), a placa foi agitada por 10 min e realizada a leitura em espectrofotômetro (Bio-Tek, Elx 800) a 540 nm.

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

$$x\% = \frac{\text{DO}_{\text{material teste}}}{\text{DO}_{\text{controle celular}}} \times 100$$

onde DO = Densidade Óptica

<sup>3</sup> Preparação da solução estoque de MTT (Sigma®) a 5 mg/mL em PBS (p/v) – para uso, diluição subsequente em meio MEM (1mg/mL).

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

## 4.5 AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL

### 4.5.1 Ensaio colorimétrico com Sal de Tetrazolium (MTT)

A avaliação da atividade antiviral foi realizada da mesma forma que para a citotoxicidade (item 4.4.1), porém com a adição das suspensões virais, usando três estratégias metodológicas diferentes.

#### 4.5.1.1 Adição simultânea dos materiais-teste e dos vírus

Células VERO foram cultivadas em placas de 96 cavidades ( $2,0 \times 10^5$  células/mL, 100  $\mu$ L/cavidade) até confluência (24 h) utilizando meio MEM suplementado com 5 % de SFB, incubadas a 37 °C com 5 % de  $CO_2$ . Após 24 h, o meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 100  $\mu$ L das diferentes concentrações dos materiais-teste (razão 1:2 a partir do valor de  $CC_{50}$  de cada amostra obtido anteriormente) + 100  $\mu$ L da suspensão viral/cavidade (MOI 0,5). Na mesma placa, foram realizados controle celular (200  $\mu$ L meio/cavidade), controle viral (100  $\mu$ L suspensão viral + 100  $\mu$ L meio/cavidade = MOI=0,5), controle positivo [100  $\mu$ L suspensão viral + 100  $\mu$ L aciclovir (10  $\mu$ g/mL)/cavidade]. Após, as placas foram incubadas por 96 h, nas mesmas condições citadas anteriormente. Passado esse período, o meio foi aspirado e o experimento foi realizado como descrito no item 4.4.1.

Os valores de absorbância medidos para cada concentração de cada material-teste foram transformados em porcentagem (x %) em relação aos controles celular e viral, através da seguinte fórmula:

$$x\% = \frac{(DO_{\text{material teste}} - DO_{\text{controle viral}})}{(DO_{\text{controle celular}} - DO_{\text{controle viral}})} \times 100$$

Em seguida, os percentuais calculados, referentes às diferentes concentrações das amostras, foram inseridos em um gráfico, e através da análise de regressão, foi possível calcular os valores de  $CE_{50}$ , ou seja, a concentração de cada amostra que manteve 50% das células viáveis na presença da infecção viral. Os valores de  $CE_{50}$  calculados representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão da média.

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

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

Onde:  $CC_{50}$ = Concentração de material-teste que reduz a viabilidade de 50% do tapete celular.

$CE_{50}$ = Concentração de material-teste que protege 50% do tapete celular.

#### 4.5.1.2 Pré-tratamento das células com os materiais-teste, antes da adição dos vírus

Células VERO foram cultivadas em placas de 96 cavidades ( $2,0 \times 10^5$  células/mL, 100  $\mu$ L/cavidade) até confluência (24 h) usando meio MEM suplementado com 5 % de SFB, e incubados a 37 °C com 5 % de  $CO_2$ . Após 24 h, o meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 200  $\mu$ L das diferentes concentrações dos materiais-teste (razão 1:2 a partir do valor de  $CC_{50}$  de cada amostra obtido anteriormente), que ficaram em contato com o tapete celular por 3 h a 37 °C com 5 % de  $CO_2$ . Decorrido este período, os materiais-teste e frações foram cuidadosamente aspirados e foram adicionados 200  $\mu$ L da suspensão viral (MOI=0,5). Na mesma placa, foram realizados controle celular (200  $\mu$ L meio/cavidade), controle viral (200  $\mu$ L suspensão viral/cavidade, MOI=0,5) e controle positivo [100  $\mu$ L suspensão viral + 100  $\mu$ L aciclovir (10  $\mu$ g/mL)/cavidade]. As placas foram incubadas por 96 h nas mesmas condições citadas anteriormente. Passado esse período, o meio foi aspirado e o experimento foi realizado da mesma forma que no item 4.5.1.1; foram calculados os valores de IS ( $CC_{50}/CE_{50}$ ) para cada material-teste.

#### 4.5.1.3 Pós-tratamento das células infectadas com os materiais-teste

Células VERO foram cultivadas em placas de 96 cavidades conforme descrito acima. Após 24 h, o meio foi retirado por aspiração e foram adicionados 200 µL de suspensão viral (MOI = 0,5). A seguir, a placa foi incubada a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub> por 2 h; após esse período, a suspensão viral foi cuidadosamente aspirada e, então, foram adicionados 200 µL dos materiais-teste diluídos. Na mesma placa, foram realizados controle celular (200 µL meio/cavidade), controle viral (200 µL MEM - previamente incubado com suspensão viral por 2 h) e controle positivo [pré-incubação de 200 µL suspensão viral com posterior adição de 200 µL aciclovir (10 µg/mL)/cavidade]. Após incubação por 96 h nas mesmas condições citadas anteriormente, o meio foi aspirado e o experimento foi realizado da mesma forma que no item 4.5.1.1; foram calculados os valores de IS (CC<sub>50</sub>/CE<sub>50</sub>) para cada material-teste.

#### 4.5.2 Ensaio de redução das placas de lise

Este ensaio foi realizado conforme metodologia proposta por Burleson, Chambers e Wiedbrauk (1992), com algumas modificações, com o objetivo de confirmar alguns dos resultados obtidos com a técnica do MTT e propor o provável mecanismo de ação dos materiais-teste, que apresentaram os melhores resultados.

Os ensaios foram realizados da mesma forma que para a determinação dos títulos infecciosos virais (item 4.3.3.1), porém, com a adição das suspensões virais usando três estratégias metodológicas diferentes

Células VERO [2,0x10<sup>5</sup> células/mL (1 mL/cavidade)] foram cultivadas em placas de 24 cavidades e incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> até confluência (24 h). O meio foi aspirado preservando-se a integridade do tapete celular, e três estratégias metodológicas foram realizadas: (1) **tratamento simultâneo** (4.5.2.1); (2) **efeito dos materiais-teste na adsorção viral** (4.5.2.2); (3) **efeito antiviral em função do tempo de adição dos materiais-teste** (4.5.2.3).

Após os diferentes tratamentos, as placas foram incubadas por 72 h. O meio contendo o material-teste foi aspirado e 200 µL do corante preto de naftaleno (preparado conforme descrito no item 4.3.3.1) foram adicionados. Após 40 min, a temperatura ambiente e em agitador mecânico, o corante foi aspirado e as placas analisadas através da visualização por microscópio estereoscópio. Contou-se o

número de focos de infecção em cada concentração, que se caracterizam por áreas claras de lise celular, chamadas de placas.

A percentagem de inibição da replicação viral foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \left[ 1 - \frac{(\text{Número de Placas})_{\text{Materiais-teste}}}{(\text{Número de Placas})_{\text{Controle Viral}}} \right] \times 100\%$$

Em seguida, os percentuais calculados foram inseridos em um gráfico, e através da análise de regressão, foi possível calcular os valores de  $CE_{50}$ , ou seja, a concentração de cada amostra que manteve 50 % das células viáveis na presença da infecção viral. Os valores de  $CE_{50}$  representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão da média.

Com posse dos valores de  $CC_{50}$  e  $CE_{50}$  foi possível calcular o índice de seletividade (IS) de cada amostra em relação a cada cepa viral utilizada conforme descrito no item 4.5.1.1. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Em todos os experimentos foram realizados controles celular (CC) e viral (CV), para a cepa KOS utilizou-se o aciclovir como controle positivo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.5.2.1 Tratamento simultâneo

No tratamento simultâneo, foram adicionados ao tapete celular confluyente 400  $\mu$ L da suspensão viral (100 UFP/mL). A placa foi incubada em estufa por 1h, sendo a mesma agitada a cada 15 min, para garantir a homogeneidade e distribuição da suspensão viral. Essa suspensão foi aspirada e foram cuidadosamente adicionados 500  $\mu$ L dos materiais-teste, em diferentes concentrações, diluídos em CMC (preparado conforme descrito no item 4.3.3.1). A placa foi incubada por 72 h, e posteriormente, o experimento foi realizado conforme descrito no item 4.5.2 (CARLUCCI et al., 1999).

#### 4.5.2.2 Efeito dos materiais-teste na adsorção viral

A placa com tapete celular confluyente foi levada a temperatura de 4°C, por 30 min. Após aspirar o meio, foram adicionados ao tapete celular 200 µL dos materiais-teste (nas concentrações de 500 a 15,6 µg/mL, razão 1:2) e 200 µL da suspensão viral (100 UFP/mL). Após a homogeneização da placa, a mesma foi novamente colocada a 4 °C por 1 h. Os materiais-teste e a suspensão viral foram, então, aspirados e 500 µL de CMC (preparado conforme descrito no item 4.3.3.1) foram adicionados ao tapete celular. A placa foi incubada por 72 h a 37 °C e após este tempo realizou-se o procedimento conforme descrito no item 4.5.2.

#### 4.5.2.3 Efeito antiviral em função do tempo de adição dos materiais-teste

A técnica utilizada foi a mesma descrita para o tratamento simultâneo, mas variando-se o tempo de adição de cada substância (CARLUCCI et al., 1999).

Os materiais-teste na concentração de 500 µg/mL foram adicionados ao tapete celular confluyente em diferentes tempos: junto com a suspensão viral (tempo 0 - zero); e 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 e 24 h após a adição da suspensão viral. As placas foram incubadas por 72 h. Após incubação, realizou-se o experimento conforme descrito no item 4.5.2.

## 4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tanto na avaliação da citotoxicidade como na avaliação da potencial atividade antiviral foi utilizada a metodologia de blocos completamente casualizados (BCC) e um arranjo multifatorial dos tratamentos (SOKAL; ROHLF, 1995), onde cada cavidade da placa constitui uma unidade experimental e os tratamentos foram realizados com os diferentes materiais-teste *versus* as diferentes concentrações testadas.

Os tratamentos foram distribuídos aleatoriamente entre as cavidades da placa, tendo sido feitas três repetições, em placas diferentes e em dias diferentes. O sorteio dos tratamentos com relação às unidades experimentais aumenta a probabilidade de que possíveis fatores interferentes desconhecidos fiquem igualmente distribuídos nos blocos e faz com que a estimativa dos valores e médias dos tratamentos e do



erro experimental não sejam tendenciosas. Cada bloco (placa) agrupa uma repetição de todos os tratamentos.

Realizou-se uma análise de regressão linear para calcular os valores de  $CC_{50}$  e de  $CE_{50}$ , a partir de curvas de concentração *versus* efeito.

A análise estatística dos dados obtidos foi feita através da análise de variância (ANOVA) de cada material-teste e/ou metodologia diferente, no nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ), avaliando os diferentes materiais-teste *versus* diferentes concentrações *versus* as destruições celulares causadas pelos vírus. Quando foi necessário, a separação de médias foi feita pelo teste de Tukey, e o programa estatístico utilizado foi o Statgraphics®.

O estudo de qualquer atividade farmacológica 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-teste, em duas ou três colunas na placa, se estaria fazendo uma duplicata ou triplicata. 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 levada em consideração (SOKAL; ROHLF, 1995). Por isso, foram realizados três experimentos independentes, em dias subseqüentes, o que caracteriza uma triplicata.

## **4.7 AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE *Ilex paraguariensis* POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)**

### **4.7.1 Amostras testadas**

Para análise por CCD foram utilizados como substâncias de referência os ácidos caféico e clorogênico, todas de procedência Sigma®.

Os materiais-teste utilizados foram os mesmos usados nos ensaios de detecção da ação anti-herpética (Extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis*).

### **4.7.2 Condições cromatográficas**

O extrato e frações de *Ilex paraguariensis* utilizados no presente estudo foram analisados utilizando-se cromatofolhas de alumínio, tendo como fase fixa sílica-gel  $F_{254nm}$  (Merck®), e como fase móvel acetato de etila: ácido fórmico:ácido acético

glacial:água (100:11:11:26 v/v). Para a análise foram aplicados na placa cromatográfica, a partir de soluções com concentração de 30 mg/mL, 15 µL dos materiais testes, com auxílio de capilar graduado. Após migração, as placas foram reveladas com reagente natural A<sup>4</sup> e analisadas sob luz ultravioleta em 254/366 nm (WAGNER; BLADT, 1996).

#### **4.8 ANÁLISES QUALITATIVAS E QUANTITATIVAS DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM *Ilex paraguariensis* POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**

##### **4.8.1 Equipamento utilizado**

Para a realização das análises por CLAE foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu 10AV, composto por bomba Shimadzu LC-10AD, detector UV a 323 nm (0,05 AUFS) injetor manual Rheodyne 7725 com alça dosadora de 20 µL e módulo de tratamento de dados Shimadzu CLASS-VP. Como fase estacionária foi utilizada coluna LUNA® de fase reversa C18 (150 x 4,60 mm.d i.) e 5 µm de diâmetro de partícula.

Como fase móvel foi empregado metanol (A) e uma mistura de metanol:ácido acético 1 % (5:95, v/v – B), ambas preparadas, filtradas através de membrana 0,22 µm (Millipore®) e deaeradas diariamente em banho de ultra-som sob vácuo. A fase móvel utilizada operou com 90% do componente B, com fluxo de 0,8 mL/min e sob forma isocrática. de 0,8 mL/min. Todos os reagentes utilizados foram grau HPLC (Nuclear®).

##### **4.8.2 Preparação das amostras**

Cada um dos materiais-teste foi exatamente pesado, transferido para um balão volumétrico e diluído na fase móvel até obter concentrações finais de 2.000; 1.000; 500; 250; 125 e 62,5 µg/mL. As amostras foram previamente filtradas em membrana Millipore® (0,22 µm) e injetadas no cromatógrafo. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

---

<sup>4</sup> A placa foi vaporizada com 10 mL de uma solução metanólica a 1% do ácido-β-etilamino éster difenilbórico (=difenilboryloxiethylamina, NP), e depois com 8 mL de uma solução metanólica a 5% de PEG 4000.

#### 4.8.3 Determinação das curvas padrão dos ácidos caféico e clorogênico

Para a realização das curvas padrão, os ácidos clorogênico e caféico foram dissolvidos em metanol e diluídos na fase móvel, a fim de obter concentrações de 0,675; 1,25; 2,5; 5; 10; 16; 20 e 32 µg/mL. As soluções foram filtradas em membrana Millipore® (0,22µm), injetadas no cromatógrafo e as áreas dos picos correspondentes aos ácidos clorogênico e caféico foram relacionadas com suas respectivas concentrações, calculando-se as equações das retas obtidas por regressão linear. Os resultados foram expressos através da média das três injeções de cada amostra.

#### 4.8.4 Análise dos ácidos fenólicos

As amostras foram preparadas conforme item 4.8.2.

A fase móvel utilizada foi a mesma da preparação das curvas dos ácidos caféico e clorogênico, assim como as condições de análise cromatográfica (item 4.8.3).

#### 4.8.5 Validação do método analítico

Para validação da técnica foram avaliados os parâmetros de especificidade, exatidão, linearidade e precisão, conforme preconizado pela ICH (1997), USP (2002) Swartz e Krull (1997) e com a resolução nº 899, de 29/05/2003 da ANVISA.

Para verificar a exatidão da técnica, foram adicionadas quantidades conhecidas das substâncias de referência (ácido caféico e/ou ácido clorogênico) ao extrato bruto e/ou frações em três concentrações diferentes (80%, 100% e 120%). As análises foram realizadas em triplicata. A exatidão foi calculada de acordo com Cass e Degani (2001), através da fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração obtida} \times 100}{\text{Concentração Teórica}}$$

Para avaliação da linearidade, foram utilizadas cinco concentrações diferentes das amostras (2.000; 1.000; 500; 250 e 125 µg/mL) e oito concentrações diferentes das substâncias padrão (20; 15; 10; 5; 2; 1; 0,5 e 0,25 µg/mL - ácido caféico e 32, 20, 16, 10, 5, .2,5, 1,25 e 0,625 µg/mL - ácido clorogênico). A avaliação estatística dos resultados foi realizada através da análise de regressão linear, onde utilizou-se

o método dos mínimos quadrados e verificou-se o quanto a reta descreve os pontos, por intermédio de seu coeficiente de correlação ( $r$ ). As análises foram realizadas em triplicata.

Para avaliação da precisão da técnica, os padrões foram injetados 9X no cromatógrafo, sob as mesmas condições, e os valores dos desvios-padrão e do coeficiente de variação foram calculados. Estas análises foram realizadas intra e inter dia. As medidas estatísticas de tendência central (média) e de variabilidade (desvio padrão e coeficiente de variação) foram calculadas através de planilha estatística do programa Excel da Microsoft

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS VIRAIS

Os títulos infecciosos das soluções-estoques virais foram determinados conforme as metodologias descritas no item 4.3.3. No decorrer do trabalho, foram utilizadas duas soluções-estoques para cada cepa, preparadas de acordo com o descrito no item 4.3.2. Os resultados obtidos estão demonstrados na Tabela 1.

**Tabela 1-** Títulos infecciosos dos estoques virais utilizados.

Vírus	Solução estoque viral	Títulos
HSV-1 cepa KOS	1	$5,33 \times 10^7$ UFP/mL
	2	$9,70 \times 10^7$ UFP/mL
HSV-1 cepa 29R	1	$8,83 \times 10^6$ UFP/mL
	2	$3,70 \times 10^6$ UFP/mL

### 5.2 TRIAGEM ANTI-HERPÉTICA

#### 5.2.1 Citotoxicidade

Para a avaliação da potencial ação antiviral de uma amostra qualquer, é indispensável a avaliação prévia de sua possível toxicidade em relação às células permissivas ao vírus em estudo, em decorrência do fato de que um agente antiviral ideal deve inibir o ciclo de replicação viral, interferindo o mínimo na estrutura e metabolismo das células hospedeiras (VANDEN BERGHE; VLIETINCK; VAN HOOFF, 1986).

A citotoxicidade foi definida por Nardone (1977) como sendo o conjunto de alterações da homeostase celular, que provoca uma série de modificações, que interferem na capacidade adaptativa das células, bem como na sua sobrevivência, multiplicação e realização de suas funções metabólicas. Desta forma, o comportamento das células frente a uma amostra qualquer pode ser evidenciado pela desorganização da monocamada celular, acompanhada do aspecto granuloso e arredondado das células (STREISSLE; SCHWOBEL; HEWLETT, 1981).

A intensidade da lesão celular depende de vários fatores, tais como a concentração do material testado, o tempo de exposição, linhagem celular, a capacidade da amostra em penetrar na célula, entre outras (HU; HSIUNG, 1989).

Além disso, a citotoxicidade pode ser também evidenciada por alterações em suas funções, tais como síntese de proteínas, atividade lisossomal, atividade mitocondrial, entre outras (KORZENIEWSKI; CALLEWAERT, 1983).

O estudo do efeito citotóxico dos extratos e frações frente a células VERO foi realizado utilizando-se o ensaio colorimétrico do MTT e para cada material testado, os valores de  $CC_{50}$  após 96 h de incubação, foram calculados. Este ensaio tem várias vantagens: (1) grande número de amostras pode ser testado rapidamente; (2) o ensaio pode ser automatizado; (3) o experimento é fácil de realizar e sua avaliação é bastante objetiva; (4) a avaliação da citotoxicidade pode ser obtida em paralelo com a avaliação da atividade antiviral; (5) é uma avaliação mais acurada do que o método de inibição do efeito citopático viral (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991; ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2005; PALOMINO et al., 2005).

Os resultados obtidos no ensaio de avaliação da citotoxicidade dos materiais-teste estão expressos na tabela 2.

### 5.2.2 Atividade Antiviral

Vários métodos podem ser utilizados para a avaliação da atividade antiviral de qualquer material-teste. Um destes métodos é o ensaio colorimétrico do MTT, que vem sendo rotineiramente utilizado para a determinação não só da citotoxicidade, mas também para a detecção da atividade antiviral de compostos sintéticos e de origem natural (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991; SUDO et al., 1994; KODAMA et al., 1996; KANEKO et al., 2001; BETANCUR-GALVIS et al., 2001 e 2002; ANDRIGHETTI-FRÖHNER, 2003; SAVI et al., 2005).

O ensaio colorimétrico do MTT com a adição simultânea dos vírus e das diferentes diluições dos materiais-teste às células foi escolhido para realizar a triagem deste trabalho, por apresentar como vantagens a possibilidade de testar um maior número de compostos simultaneamente e utilizar menores quantidades de materiais-teste (YASIN et al., 2000).

Vírus que causam infecções líticas, tais como o HSV-1, 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 à presença do agente antiviral (SMEE et al., 2002). Esta técnica apresenta vantagens como o grande número de compostos que podem

ser testados, a facilidade no emprego da técnica, o fato de ser uma avaliação objetiva e a possibilidade da 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).

Deve-se salientar que alguns fatores podem contribuir para a elevação dos valores de  $CC_{50}$  e  $CE_{50}$ , fornecendo, por exemplo, parâmetros de citotoxicidade menores que os reais. De acordo com Habtemariam (1995), compostos que possuem hidroxilas podem interagir com ferro e outros metais de transição, presentes no meio de cultura suplementado com soro, induzindo a redução do MTT. Da mesma forma, substâncias que, em meio de cultura, apresentam forte coloração podem interferir na leitura das absorbâncias, fornecendo valores mais elevados (SMEE et al., 2002).

Ao utilizar o ensaio do MTT para avaliar a atividade antiviral é importante obter um valor igual ou inferior a 0,2 na razão CV/CC (CC=controle celular; CV= controle viral). Isto significa que a garantia da sensibilidade do ensaio se deve à diferença entre os valores de absorbância (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. Assim, a viabilidade celular detectada nos testes será conferida à ação antiviral do material em teste e o grau desta proteção poderá ser calculado para cada concentração do material testado (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991).

A triagem da atividade anti-herpética foi avaliada pelo ensaio do MTT em células VERO, inoculadas com HSV-1, cepas KOS (sensível ao aciclovir) e 29R (resistente ao aciclovir),  $MOI=0,5$ .

Após o período de incubação de 96 h para o HSV-1/ KOS, foi possível observar, na maioria dos casos, a inibição do efeito citopático viral (ECP), através do monitoramento por microscopia ótica invertida comparando com os resultados obtidos pelo ensaio do MTT.

O efeito citopático viral do HSV-1 é caracterizado pelo aparecimento de células de dimensões variáveis, arredondadas, bastante brilhantes, pouco refringentes, algumas vezes separadas e, mais freqüentemente, ligadas umas às outras por prolongamentos citoplasmáticos formando os chamados “focos” com aspecto característico de “cachos de uva” que se estendem rapidamente pela superfície do local de infecção. As lesões nucleares se caracterizam por uma marginação da

cromatina que dá lugar, no centro do núcleo, a uma inclusão acidófila característica. As lesões citoplasmáticas aparecem como formações policarióticas (sincícios e células gigantes) devido a fusão dos citoplasmas das células adjacentes infectadas (MAURIN, 1985; MAMMETTE, 1986; AZAY, 1989; GIRARD; HIRTH, 1989).

O uso de um controle positivo nos ensaios de detecção da atividade antiviral permite demonstrar se esses foram realizados em um 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).

Paralelamente aos experimentos conduzidos com o vírus HSV-1/KOS, foram realizados controles positivos com o aciclovir, na concentração de 10 µg/mL, pois o aciclovir é o fármaco de escolha para o tratamento de várias infecções herpéticas. A proteção obtida foi acima de 99 %, de acordo com o que é referenciado na literatura e atestando a eficiência da metodologia empregada (DE JALON et al., 2003).

A relação entre os efeitos farmacológicos e tóxicos de um composto é um importante requisito na previsão de sua aplicabilidade como agente terapêutico (MELO et al., 2000), e tal informação provém do cálculo do seu índice de seletividade ( $IS = CC_{50}/CE_{50}$ ), quando da realização dos estudos pré-clínicos *in vitro*.

Oito extratos de plantas e suas frações foram investigados com relação à sua potencial atividade antiviral contra o Herpes Simplex Virus tipo 1 (HSV-1, cepas KOS e 29-R). Embora não existam evidências que estas plantas sejam usadas popularmente para tratar distúrbios que possam indicar uma provável ação anti-herpética, várias outras plantas medicinais, pertencentes às mesmas famílias das espécies aqui avaliadas têm sido utilizadas na medicina popular com aplicações diversas (PIO CORREA, 1979; DERMARDEROSIAN; BEUTLER, 2002).

Os resultados da avaliação da citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) e da potencial atividade anti-herpética ( $CE_{50}$ ; IS) dos extratos testados encontram-se na tabela 2.



**Tabela 2:** Resultados da avaliação da citotoxicidade e da potencial atividade anti-herpética dos extratos brutos das plantas testadas.

Planta testada	Parte da planta	Líquido Extrator	CC <sub>50</sub> (µg/ml) Células VERO	HSV-1 (KOS) Sensível ao aciclovir		HSV-1 (29R) Resistente ao aciclovir	
				CE <sub>50</sub> (µg/ml)	IS	CE <sub>50</sub> (µg/ml)	IS
<i>Alamanda blanchetti</i>	Raízes	EtOH	1.900±10	SA	-	SA	-
<i>Alamanda schottii</i>	Folhas	MeOH	1.190±33	719,7±75	1,6	SA	-
	Flores	MeOH	1.220±100	487,7±64	2,4	SA	-
<i>Glycine max</i>	Sementes	EtOH 40%	3.000±263	SA	-	SA	-
<i>Lafoensia pacari</i>	Folhas	MeOH	1.140±206	60±10,5	<b>19,0</b>	170,1±21	6,7
<i>Passiflora edulis</i>	Raízes	EtOH 40%	1.230±102	SA	-	SA	-
	Raízes	Água	1.600±128	290,9 ±10	5,5	89,9±5,4	<b>17,8</b>
<i>Rubus imperialis</i>	Folhas	MeOH	1.390±125	70±5,6	<b>19,8</b>	90±23	<b>15,4</b>
<i>Sloanea guianensis</i>	Folhas	MeOH	1.400±143	318,2±48	4,4	140±8	<b>10,0</b>
	Caule	MeOH	610±159	381,2±12	1,6	160,5±20	3,8
<i>Ilex paraguariensis</i>	Folhas	Água	1.691±309	117,5±24	<b>14,4</b>	144,9±42	<b>11,7</b>
	Frutos	Água	1.525±161	457,4±73	3,3	468,6±90	3,3

(SA) Sem Atividade; IS = CC<sub>50</sub> / CE<sub>50</sub>; MeOH = metanol; EtOH = etanol. Os valores representam a média de três experimentos independentes ± erro padrão da média.

A partir dos resultados obtidos com os extratos brutos, optou-se por testar as frações das quatro plantas, que apresentaram valores de IS > 10,0 com relação a, no mínimo, uma das cepas empregadas, e cujos materiais vegetais testados foram folhas. Os resultados desta avaliação encontram-se na tabela 3.

**Tabela 3:** Resultados da avaliação da citotoxicidade e da potencial atividade anti-herpética das frações das plantas testadas.

Planta	Fração	CC <sub>50</sub> (µg/ml) Células VERO	HSV-1 (KOS) Sensível ao Aciclovir		HSV-1 (29R) Resistente ao Aciclovir	
			CE <sub>50</sub> (µg/ml)	IS	CE <sub>50</sub> (µg/ml)	IS
<i>Lafoensia pacari</i>	HX	1.050 ±205	SA	-	-	-
	CH	600±54	500±18	1,2	500±7	1,2
	AE	1.030±179	490,5±25	2,1	100±6	<b>10,3</b>
<i>Sloanea guianensis</i>	HX	380±29	290,1±13	1,3	SA	-
	CH	640±35	SA	-	SA	-
	AE	500±22	63,9±6	<b>7,8</b>	SA	-
<i>Rubus imperialis</i>	BuOH	1.390±60	300±20	4,6	53±3	<b>26,2</b>
<i>Ilex paraguariensis</i>	AE	1.593,6±344	156,3±60	<b>10,2</b>	136,8±10	<b>11,7</b>
	BuOH	1.619,2±381	95,2±14	<b>17,0</b>	86,6±19	<b>18,7</b>
	Res Aq	1.595,3±405	114,9±19	<b>13,9</b>	108,8±22	<b>14,7</b>

SA= Sem Atividade; IS = CC<sub>50</sub>/CE<sub>50</sub>; HX; CH; AE; BuOH (Hexano, Clorofórmio, Acetato de Etila, Butanol ). Os valores representam a média de três experimentos independentes ± erro padrão da média.

A atividade anti-herpética do extrato metanólico de folhas de *Lafoensia pacari* (tabela 4 - IS=19 e IS=6,7, respectivamente, para as cepas KOS e 29R) e da fração acetato de etila (tabela 5 - IS=10,3 para a cepa 29R) poderia estar relacionada com a presença de taninos, esteróides, saponinas ou flavonóides, visto que existem relatos na literatura da presença desses metabólitos secundários nesta espécie vegetal (SANTOS; SALATINO; SALATINO, 2000; SOLON et al., 2000) e da atividade anti-herpética dos mesmos – taninos - (YOSHIDA et al., 1996; ELDERMEIER et al., 1996; DE BRUYNE, et al., 1999; LIU et al., 1999; ESQUENAZI et al., 2002); - saponinas - (AMOROS, FAUCONNIER, GIRRE, 1987; DE TOMASI, et al., 1991; KONOSHIMA, et al., 1995; HAYASHI, et al., 1997; SIMÕES, AMOROS, GIRRE, 1999; SINDAMBIWE, et al., 1998; APERS, et al., 2000; GOSSE, et al., 2002; MENGONI, et al., 2002); - flavonóides - (AMOROS; SIMÕES, GIRRE, 1992; ROBIN et al., 1998; LIN et al., 1999; SÁNCHEZ, et al., 2000; LI et al., 2000; SHAHAT et al., 2002; DU, et al., 2003), entre outros.

Embora não seja conhecida qualquer utilização popular de *Sloanea guianensis*, do ponto de vista químico, Schmitt e colaboradores (2003) relataram o isolamento e identificação do esqualeno e do sitosterol glicosilado a partir da fração hexano e acetato de etila, respectivamente, das folhas de *Sloanea guianensis*. A atividade antiviral encontrada para o extrato metanólico de *Sloanea guianensis* (tabela 2 - IS=4,4 e IS=10 para as cepas KOS e 29R, respectivamente), e para a fração acetato de etila (tabela 3 - IS=7,8 para a cepa KOS) poderia estar relacionada com a presença do triterpeno esqualeno, visto que vários estudos relataram atividade anti-herpética para triterpenos (KUROKAWA, 1999; ALCHE et al., 2002; MADUREIRA et al., 2003) e esteróides (MICHELINI, et al., 2004)

O extrato metanólico das folhas de *Rubus imperialis* foi o que apresentou maior atividade inibitória da replicação do HSV-1 (tabela 2 - IS= 19,8 e 15,4, respectivamente, para as cepas KOS e 29R); a fração n-butanólica também mostrou elevado IS (tabela 3 - IS=26,2 para a cepa 29R). Para este gênero, foi relatada a ocorrência de taninos e flavonóides (GUDEJ; TOMYCZYSK, 2004), o que poderia sugerir que a atividade anti-herpética detectada possa estar relacionada à presença desses compostos, visto que há vários relatos na literatura que descrevem atividade antiviral para estes dois grupos de metabólitos (HUDSON; TOWERS, 1999; DE BRUYNE et al., 1999; FUKUCHI et al., 1989; CHENG et al., 2004).

Considerando os resultados obtidos, pôde-se verificar que estes três extratos citados acima mais *Ilex paraguariensis*, que será discutida posteriormente, apresentam promissores resultados de proteção contra a infecção viral do HSV-1, mas o mecanismo desta ação e a atividade das substâncias isoladas não foi ainda identificado. Mais estudos são necessários para verificar quais compostos podem ser responsáveis por esta atividade e como eles exercem sua ação antiviral.

Embora o extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis* não tenham sido os mais promissores entre os testados (tabelas 2 e 3), optou-se por dar continuidade ao ensaio biomonitorado com este material, devido ao fato dele estar disponível em maior quantidade, já que para a realização subsequente dos ensaios antivirais e das análises cromatográficas uma grande quantidade de amostra se fazia necessária. Além disso, também havia disponibilidade de substâncias de referência existentes neste extrato e frações, o que permitiria análises qualitativas e quantitativas destes compostos nas amostras testadas.

### 5.3 FRACIONAMENTO BIOMONITORADO DE *Ilex paraguariensis*

Os processos de fracionamento de extratos vegetais com vista ao isolamento de substâncias ativas podem ser monitorados por ensaios direcionados para a avaliação da atividade biológica (DEY; HARBORNE, 1991). Pode-se iniciar o fracionamento de um extrato vegetal através da partição por solventes orgânicos de polaridade crescente, visto que a concentração de cada um dos componentes em cada fase estará relacionada com o coeficiente de partição ou distribuição apresentado por cada substância (GALAGOVSKY KURMAN, 1995).

Conforme dados da literatura já citados anteriormente, em *Ilex paraguariensis* foi relatada a presença de diversas substâncias, tais como flavonóides, derivados cafeoilquínicos (entre eles derivados do ácido caféico) (SCARPATI; GUIZO, 1964; CLIFFORD, 1990; FILIP et al., 2001), metil-xantinas (REGINATTO et al., 1999; COELHO et al., 2001), saponinas triterpênicas (GOSMANN et al., 1989, 1995; MONTANHA, 1990; KRAEMER et al., 1996; TAKETA et al., 2000; GNOATTO, SCHENKEL, BASSANI, 2005); Rutina, quercetina e canferol foram também considerados como sendo os flavonóides majoritários (FILIP, 2001).

Várias propriedades farmacológicas dos compostos fenólicos já foram descritas, tais como antialérgica, antiviral, antiinflamatória, vasodilatadora, antioxidante, entre outras (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; PIETTA, 2000; ZENEBE; PECHANOVA, 2002).

A ação antiviral de compostos fenólicos sintéticos e também extraídos de vegetais foi extensamente estudada e existem vários relatos, especialmente, da ação antiinfluenza (GREEN, 1949; TURAN; NAGATA; KURU, 1996; KERNAN et al., 1997; SERKEDJIEVA; HAY, 1998; SERKEDJIEVA, 2000; LI; BUT; OOI, 2005; SOKMEN, et al., 2005), antiadenovírus (CHIANG, et al., 2002), contra o vírus sincicial respiratório (CHIANG, et al., 2002; LI; BUT; OOI, 2005; OJWANG, et al., 2005) e anti-herpética (KANE et al., 1988; BENENCIA; COURREGES; 1999; SERKEDJIEVA; IVANCHEVA, 1999; DE LOGU; 2000; CHIANG, et al., 2002; SAVI, 2004; LI; BUT; OOI, 2005; SAVI et al., 2005).

Acredita-se que os compostos polifenólicos, em geral, atuam através da associação com proteínas das partículas virais e/ou da superfície das células hospedeiras, resultando na redução e, até mesmo, na inibição da adsorção viral (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGUE, 1997).

Klöcking e colaboradores (2002) detectaram uma significativa atividade anti-HSV-1 para compostos fenólicos polimerizados, derivados do ácido húmico. A análise da relação estrutura-atividade revelou que o aumento do número de grupamentos carboxila e hidroxila contribuem para o aumento da atividade antiviral dos compostos testados.

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

Compostos fenólicos extraídos de *Millettia erythrocalyx* e *Artocarpus lakoocha* exibiram moderada ação anti-HSV-1, anti-HSV-2, e também frente a uma cepa do HIV-1, sendo o oxiresveratrol, a miletocalixina A, o metil éter de pongol e a ovalifolina, os compostos com ação antiviral mais pronunciada (LIKHITWITAYAWUID et al., 2005).

Embora vários compostos estejam presentes em *Ilex paraguariensis*, os que nos despertaram especial interesse foram os ácidos fenólicos e as saponinas triterpênicas, visto que estes compostos ocorrem em grande quantidade na matéria-prima vegetal estudada e existem vários estudos de atividade antiviral relacionados a esses metabólitos, conforme descrito acima. No entanto, devido à disponibilidade somente dos ácidos fenólicos (ácidos caféico e clorogênico), nesta avaliação foram incluídos somente estes compostos.

## 5.4 ATIVIDADE ANTI-HERPÉTICA DE *Ilex paraguariensis*

### 5.4.1 Citotoxicidade

O extrato bruto e as frações de *Ilex paraguariensis* apresentaram baixa citotoxicidade, com valores de  $CC_{50}$  entre 1.525,5 e 1.691,4  $\mu\text{g/mL}$ ; já os ácidos caféico e clorogênico, apresentaram uma maior citotoxicidade se comparados com estes, com valores de  $CC_{50}$  de 155,9 e 139,1  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. No entanto, não é indicado correlacionar os valores de extratos e/ou frações com compostos isolados.

Chiang et al. (2002) avaliaram a potencial atividade antiviral do extrato aquoso de *Plantago major*. Desta planta foram isolados compostos fenólicos, tais como os

ácidos caféico, clorogênico, ferúlico e p-cumárico. Os dois primeiros ácidos citados apresentaram baixa citotoxicidade, com valores de  $CC_{50}=3.995 \mu\text{g/mL}$  para o ácido clorogênico e  $CC_{50}=10.293 \mu\text{g/mL}$  para o ácido caféico. Apesar das metodologias usadas terem sido similares, os resultados obtidos pelos autores foram significativamente diferentes dos encontrados nesta dissertação; este fato poderia ser justificado pelas diferentes linhagens celulares utilizadas (VERO nesta dissertação e BCC-1/KMC – células de carcinoma de pele humano - no trabalho).

Em outro estudo, realizado por Li et al. (2005), a atividade antiviral de ácidos cafeoilquínicos, isolados de *Schefflera heptaphylla*, foi avaliada, e entre os diversos vírus estudados encontra-se também o HSV-1, em células VERO. No entanto, os autores não mencionaram o valor obtido da  $CC_{50}$ , não permitindo assim, comparar os resultados por eles obtidos aos encontrados nesta dissertação.

A tabela 4 mostra a citotoxicidade do extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis*, e dos ácidos caféico e clorogênico.

**Tabela 4** Citotoxicidade do extrato bruto, frações e substâncias isoladas de *Ilex paraguariensis* frente às células VERO.

Material teste	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Extrato Bruto</b>	1.691,4 $\pm$ 534,5 a
<b>Fração acetato de etila</b>	1.593,6 $\pm$ 595,2 a
<b>Fração butanólica</b>	1.619,2 $\pm$ 659,6 a
<b>Fração resíduo aquoso</b>	1.595,3 $\pm$ 701,0 a
<b>Ácido Caféico</b>	155,9 $\pm$ 15,9 b
<b>Ácido Clorogênico</b>	139,1 $\pm$ 36,7 b

Os valores representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão da média. Utilizou-se os testes de ANOVA e Tukey; valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias.

#### 5.4.2 Atividade antiviral do extrato bruto, frações e ácidos fenólicos isolados de *Ilex paraguariensis* pela técnica do MTT

O método do MTT permite que com os mesmos materiais, equipamentos e reagentes seja possível, apenas variando o momento da infecção viral, iniciar a

elucidação do mecanismo de ação dos materiais testados, comparando-se os índices de seletividade obtidos (YASIN et al., 2000).

O ensaio de pré-tratamento foi realizado com o objetivo de identificar possíveis materiais que atuam no bloqueio da adsorção viral e na penetração do vírus à célula. Dessa forma, as amostras que demonstram resultados promissores no ensaio de pré-tratamento podem ser capazes de bloquear a interação entre determinados receptores virais e os receptores situados nas membranas celulares.

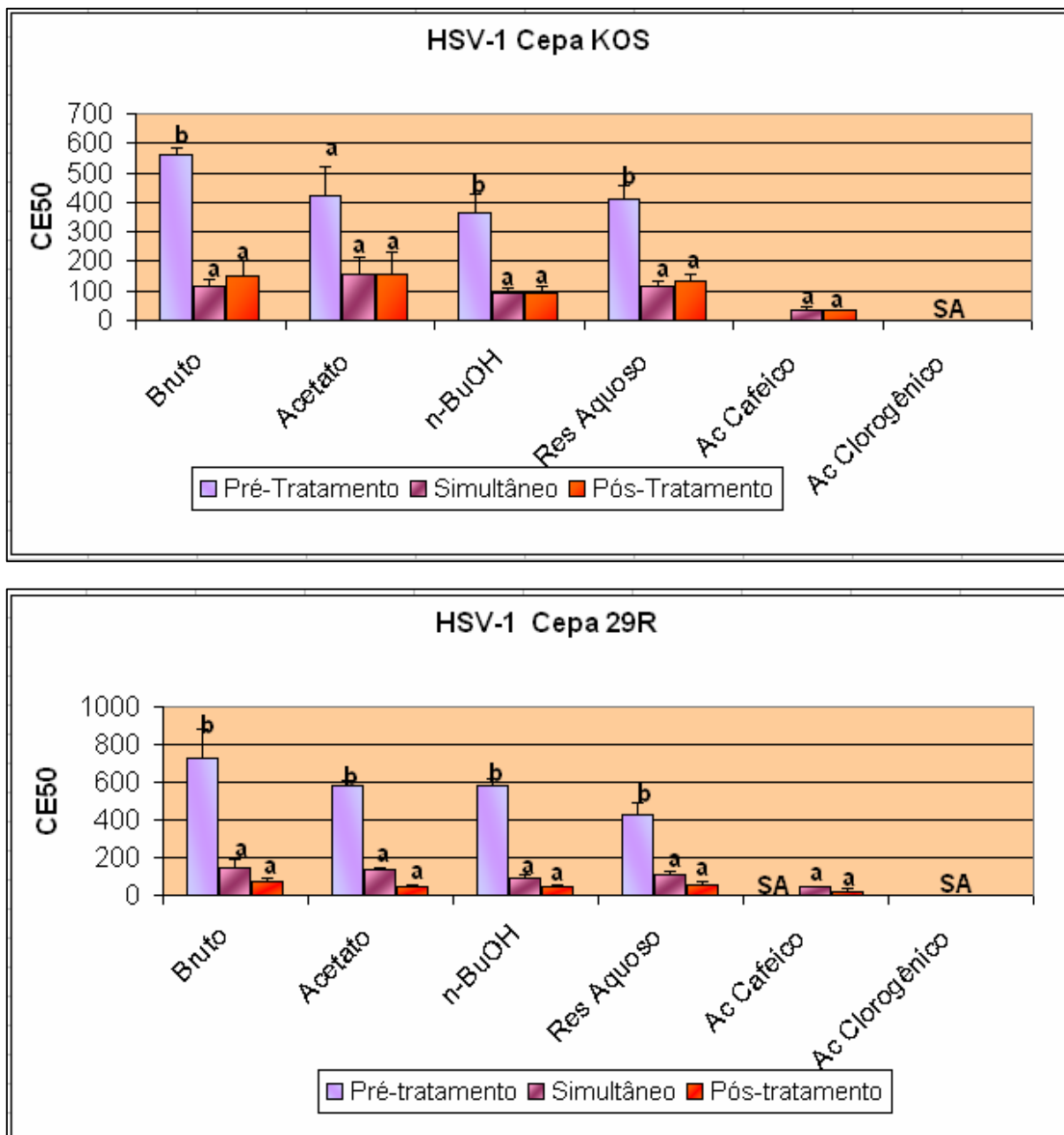
O ensaio do pós-tratamento foi realizado com o objetivo de detectar em quais fases da replicação viral os materiais-teste poderiam agir, já que se conhece perfeitamente em qual momento cada etapa ocorre.

A avaliação da potencial atividade antiviral dos diferentes extratos e frações foi realizada através do ensaio colorimétrico do MTT, em concentrações iguais e inferiores às suas concentrações citotóxicas ( $CC_{50}$ ).

Quando possível, foram calculados os valores de  $CE_{50}$  e os respectivos índices de seletividade ( $IS = CC_{50}/CE_{50}$ ).

Os valores obtidos de  $CE_{50}$  podem ser visualizados no gráfico 1, que mostra a comparação dos resultados obtidos nas três estratégias metodológicas testadas.

Os valores de IS obtidos nas estratégias de tratamento simultâneo, pré- e pós-tratamentos estão apresentados na tabela 5 e no gráfico 2 (melhor visualização).



SA: Sem atividade

**Gráfico 1:** Resultados da avaliação da potencial atividade anti-herpética (cepas KOS e 29R) do extrato bruto, frações e ácidos fenólicos isolados de *Ilex paraguariensis*, através do tratamento simultâneo e dos pré- e pós-tratamentos, pelo ensaio colorimétrico do MTT, expressos em valores de  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os valores representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão da média. Considerando-se cada extrato individualmente frente as três estratégias diferentes, utilizou-se os testes de ANOVA e Tukey, valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias dos diferentes tratamentos.



**Tabela 5:** Resultados da avaliação da atividade anti-herpética do extrato bruto, frações e compostos isolados de *Ilex paraguariensis* pela técnica do MTT, e estratégias de tratamento simultâneo, e dos pré- e pós-tratamentos, expressos em valores de IS.

Material Teste	Pré-tratamento		Tratamento simultâneo		Pós-tratamento	
	IS KOS	IS 29R	IS KOS	IS 29R	IS KOS	IS 29R
<b>Extrato Bruto</b>	3,0	2,3	14,4	11,7	11,2	23,6
<b>Fração acetato de etila</b>	3,8	2,7	10,2	11,7	10,1	35,8
<b>Fração butanólica</b>	4,5	2,8	17,0	18,7	17,7	33,7
<b>Fração resíduo aquoso</b>	3,9	3,7	13,9	14,7	12,0	27,8
<b>Ácido Caféico</b>	SA	SA	4,4	3,7	4,8	7,1
<b>Ácido Clorogênico</b>	SA	SA	SA	SA	SA	SA

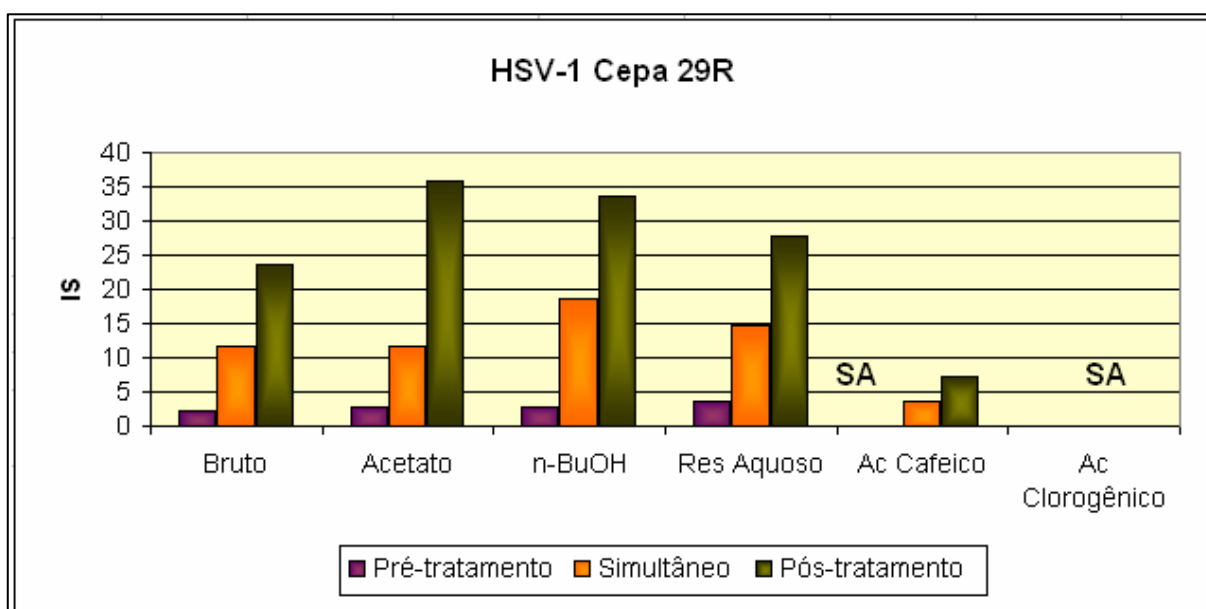
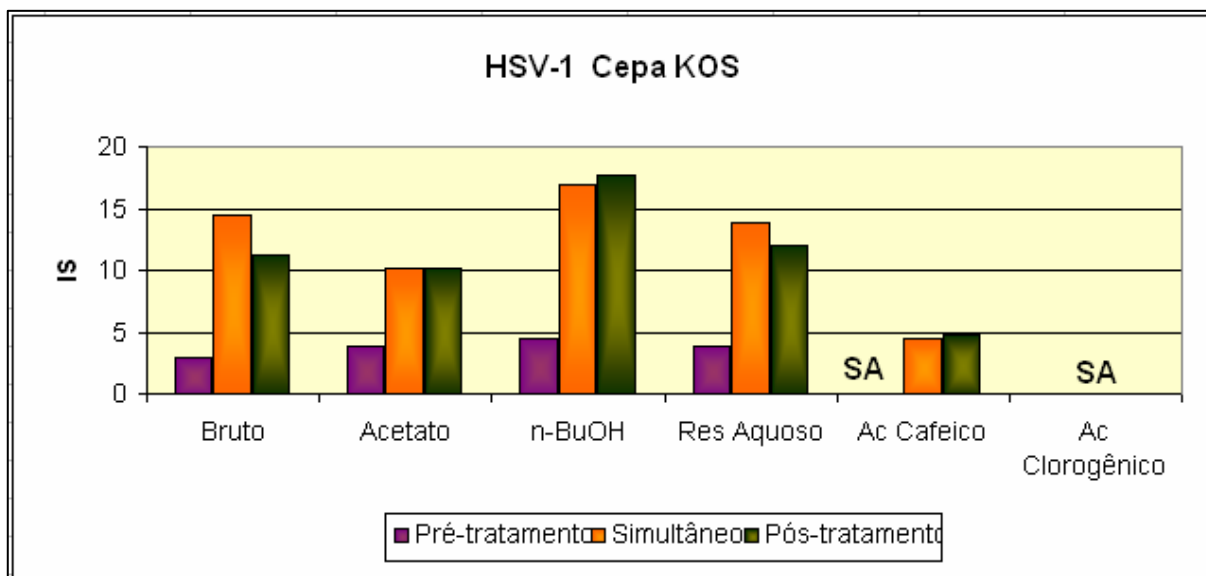
(SA): Sem Atividade; IS=CC<sub>50</sub>/CE<sub>50</sub>. Os valores representam a média de três experimentos independentes.

Os valores obtidos nestas três estratégias metodológicas permitiram verificar que o extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis* apresentam promissora atividade antiviral.

A estratégia na qual o desempenho dos materiais testados demonstrou ser menos significativo foi o pré-tratamento. Nas estratégias de tratamento simultâneo e pós-tratamento, os valores de IS encontrados foram mais promissores.

O gráfico 1 mostra que para a cepa KOS e para a cepa 29R, todos os materiais-teste apresentaram diferenças significativas quando comparou-se o pré-tratamento com as outras duas estratégias metodológicas. A única exceção foi a fração acetato de etila para a Cepa KOS. Isso mostra que as amostras testadas não são indicadas para a utilização na profilaxia do HSV-1.

Como já foi dito, as estratégias que mostraram maior inibição da replicação do HSV foram as técnicas de tratamento simultâneo e pós-tratamento, mas os valores obtidos não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si, para todos os materiais testados (gráfico 1).



**SA:** Sem atividade

**Gráfico 2:** Resultados da avaliação da potencial atividade anti-herpética (cepas KOS e 29R) do extrato bruto, frações e ácidos fenólicos isolados de *Ilex paraguariensis*, através de diferentes estratégias metodológicas, pelo ensaio colorimétrico do MTT, expressos em valores de IS ( $IS = CC_{50}/CE_{50}$ ). Os valores representam a média de três experimentos independentes.

De acordo com o gráfico 2, no tratamento simultâneo, a fração que apresentou maior IS foi a fração butanólica ( $IS=17,0$  e  $18,7$  para as cepas KOS e 29R, respectivamente). Tais valores não diferem estatisticamente entre si (entre cepas – dados não mostrados) e nem dos valores do extrato bruto ( $IS=14,4$  e  $11,7$  para as cepas KOS e 29R respectivamente) e das frações acetato ( $IS=10,2$  e  $11,7$  para as cepas KOS e 29R respectivamente), e resíduo aquoso ( $IS=13,9$  e  $14,7$  para as cepas KOS e 29R respectivamente) (dados não mostrados).

Atenção especial deve ser dada aos resultados do pós-tratamento com a cepa 29R e as frações acetato de etila e butanólica, que forneceram valores de IS = 35,8 e 33,7, respectivamente.

Outro fato que despertou especial interesse foram os valores obtidos com os ácidos clorogênico e caféico, que além de apresentarem elevada citotoxicidade, como descrito anteriormente, também divergiram com relação a atividade antiviral detectada nos estudos realizados por Chiang e colaboradores (2002).

Nesta dissertação, o ácido cafeico apresentou baixa atividade anti-herpética (IS=4,4 e 3,7 para as cepas KOS e 29R respectivamente), e o ácido clorogênico não mostrou inibição da replicação viral do HSV-1. Estes resultados podem ser justificados pelo caráter ácido dos compostos (fato que já sugere alta citotoxicidade e prevê baixo valor IS); pelo fato dos ácidos caféico e clorogênico apresentarem hidroxilas, visto que, de acordo com Habtemariam (1995), compostos que possuem hidroxilas podem interagir com ferro e outros metais de transição, presentes no meio de cultura suplementado com soro, induzindo a redução do MTT. Essa característica pode justificar também o fato de os valores obtidos para a viabilidade do ácido caféico serem superiores aos obtidos para o ácido clorogênico (o ácido caféico apresenta três hidroxilas e o ácido clorogênico seis). É importante lembrar também que substâncias que em meio de cultura apresentam forte coloração, podem interferir na leitura das absorbâncias, fornecendo valores mais elevados (SMEE et al., 2002), e foi observado para ambos os ácidos, uma oxidação e intensificação da coloração dos mesmos quando não armazenados nas condições estabelecidas (4°C), inviabilizando a utilização dos mesmos.

Chiang e colaboradores (2002) avaliaram a atividade anti-herpética de *Plantago major* e de cinco classes de compostos bioativos dele isolados: (1) compostos benzóicos (ácido vanílico), (2) flavonóides (baicaleína, baicalina, luteolina), (3) glicosídeo de iridoide (aucubina), (4) compostos fenólicos (ácidos caféico, clorogênico, ferúlico e p-cumárico) e (5) triterpenos (ácidos oleanólico e ácido ursólico). O extrato bruto aquoso de *Plantago major* apresentou atividade apenas contra o HSV-2, não mostrando atividade contra HSV-1, ADV-3, ADV-8 e ADV-11. No entanto, entre os compostos puros testados, os ácidos clorogênico e caféico mostraram importante atividade antiviral: o ácido clorogênico foi ativo contra o HSV-1 (CC<sub>50</sub>=3.995 µg/mL, CE<sub>50</sub>=47,6 µg/mL, IS= 83,9), HSV-2 e ADV-3; e o ácido cafeico foi ativo contra o HSV-1 (CC<sub>50</sub>=10.293 µg/mL, CE<sub>50</sub>= 15,3 µg/mL, IS= 671), HSV-2 e

ADV-3. Os autores não relataram a forma de armazenamento das soluções estoques.

As diferenças entre os resultados obtidos nesta dissertação e os obtidos por estes autores devem-se a vários fatores, que podem ser evidenciados no quadro 3.

**Quadro 3:** Comparação entre as variáveis de dois grupos de trabalho e os diferentes resultados obtidos.

<b>Variáveis</b>	<b>Chiang et al. (2002)</b>	<b>Presente trabalho</b>
<b>Linhagem celular</b>	BCC-1/KMC	VERO
<b>Densidade celular</b>	1x10 <sup>5</sup> cel/mL	2 x10 <sup>5</sup> cel/mL
<b>Vírus</b>	HSV-1 – Cepa KOS	HSV-1 – Cepa KOS
<b>Tempo de formação do tapete</b>	6h	24h
<b>Suspensão viral</b>	MOI=0,002 ou 0,025	MOI= 0,5
<b>Tempo contato da suspensão viral com o tapete celular</b>	2h (não retirou o vírus)	2h (retirou o vírus)
<b>Tempo de incubação da placa</b>	72h	96h
<b>Metodologia usada para avaliação antiviral</b>	XTT	MTT
<b>Resultados</b>	<b>ácido clorogênico:</b> CC <sub>50</sub> = 3.995 µg/mL CE <sub>50</sub> =47,6 µg/mL IS= 83,9	<b>ácido clorogênico:</b> CC <sub>50</sub> = 139,1µg/mL CE <sub>50</sub> = SA
	<b>ácido caféico:</b> CC <sub>50</sub> =10.293 µg/mL CE <sub>50</sub> = 15,3 µg/mL IS= 671	<b>ácido caféico:</b> CC <sub>50</sub> =155,9 µg/mL CE <sub>50</sub> = 22,0 µg/mL IS= 7,1

O fato de que as diferenças metodológicas possam ter interferido nos resultados obtidos é reforçado ao se analisar os resultados obtidos por Li e colaboradores (2005), que avaliaram a atividade antiviral de ácidos cafeoilquínicos derivados de *Schefflera heptaphylla*, e entre os vírus estudados, utilizou-se o HSV-1, cepa 15577. Os autores citaram que os ácidos 3,4-di-O-cafeoilquínico e o 3,5-di-O-cafeoilquínico apresentaram uma discreta atividade anti-HSV, com valores de CE<sub>50</sub>

de 81,3 e 62,5 µg/ml, respectivamente, sem citar, no entanto, os valores de CC<sub>50</sub> nem os de IS. Outro ácido isolado foi o 3-O -cafeoilquínico, denominado de ácido clorogênico; entretanto, este artigo não relatou resultado algum de ação anti-HSV-1 deste ácido, provavelmente por ele não ter apresentado resultados promissores.

#### **5.4.3 Confirmação da atividade antiviral do extrato bruto, frações e ácidos fenólicos isolados de *Ilex paraguariensis* pela técnica de redução das placas de lise – tratamento simultâneo**

O teste de redução das placas de lise usa um número constante de partículas virais e varia a concentração de substâncias teste, assim como na técnica do MTT. O diferencial da técnica das placas de lise é que a adição de um meio semi-sólido (CMC) evita a formação de placas secundárias, impedindo a difusão dos vírus do lugar de origem para novos lugares, assegurando que cada placa formada no teste seja originalmente de uma partícula viral infecciosa do inóculo inicial (FIELDS, 1998). Além disso, a atividade antiviral é expressa como uma redução no tamanho ou número de placas na monocamada celular. Por isso, ela é uma técnica mais precisa, cujos resultados são extremamente objetivos, e foi aqui usada para confirmar os resultados obtidos anteriormente com a técnica do MTT.

Na tabela 6, pode-se comparar os valores obtidos para as duas cepas testadas do HSV-1 (KOS e 29R), através de duas diferentes técnicas (MTT e Placa de Lise). Estes mesmos resultados podem ser melhor visualizados nos gráficos 3 e 4.

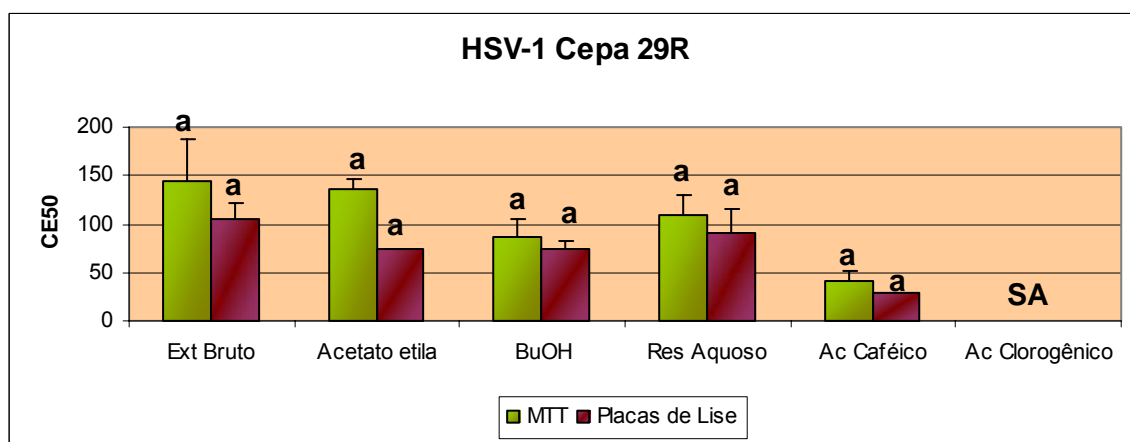
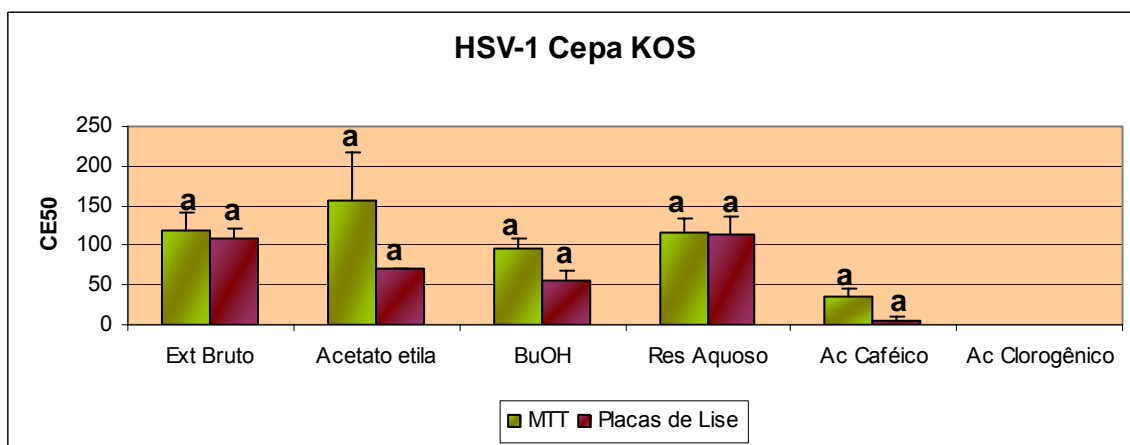
**Tabela 6:** Resultados da avaliação da atividade anti-HSV-1 (cepas KOS e 29R) do extrato bruto, frações e ácidos fenólicos isolados de *Ilex paraguariensis*, através das técnicas do MTT e de inibição das placas de lise – tratamento simultâneo.

Material Teste	MTT				Placas de lise			
	KOS CE <sub>50</sub> *	KOS IS**	29R CE <sub>50</sub> *	29R IS**	KOS CE <sub>50</sub> *	KOS IS**	29R CE <sub>50</sub> *	29R IS**
Extrato bruto	117,5±24	14,4	144,9±42	11,7	107,8±14	15,7	104,9±6	16,1
Fração acetato de etila	156,3±60	10,2	136,8±10	11,7	70,3±1	22,7	73,3±1	21,7
Fração butanólica	95,2±14	17,0	86,6±19	18,7	56,4±11	28,7	75,1±7	21,6
Resíduo aquoso	114,9±19	13,9	108,8±22	14,7	114,6±21	13,9	91,5±23	17,4
Acido Caféico	35,2±12	4,4	42,1±7	3,7	5,87±5	26,4	28,4±3	5,5
Ácido Clorogênico	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA

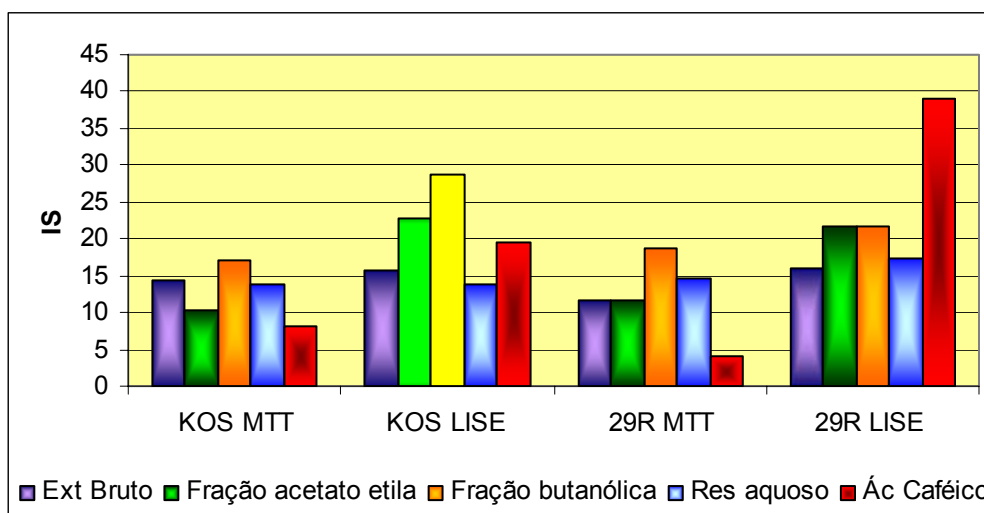
(SA): Sem Atividade; \*Os valores representam a média (CE<sub>50</sub> = µg/mL) de três experimentos independentes ± erro padrão da média; \*\*IS= CC<sub>50</sub>/CE<sub>50</sub> .

Os valores de CE<sub>50</sub> obtidos com as técnicas do MTT e das placas de lise (tabela 6) não apresentaram diferenças significativas entre eles (gráfico 3), mas os valores de IS obtidos para a técnica de inibição das placas de lise foram visivelmente superiores (gráfico 4), evidenciando uma maior sensibilidade e precisão desta técnica. Além disso, as duas técnicas apresentam valores de erro padrão diferentes (tabela 6 e gráfico 3), os quais, com exceção do resíduo aquoso, foram maiores quando utilizada a técnica do MTT, sugerindo que a técnica de inibição das placas de lise apresenta maior reprodutibilidade que a técnica do MTT.

Resumindo, as análises estatísticas mostraram não haver diferenças significativas entre as duas técnicas (MTT x Placa de Lise), entre as cepas virais (KOS e 29R) e entre os extratos e frações (dados não mostrados), confirmando a ação anti-herpética destes materiais e a similaridade entre os resultados obtidos.



**Gráfico 3:** Resultados da avaliação da atividade anti-HSV-1 (cepas KOS e 29R) do extrato bruto, frações e ácidos fenólicos isolados de *Ilex paraguariensis*, através das técnicas do MTT e de redução das placas de lise, expressos em valores de CE<sub>50</sub> (µg/mL). Os resultados representam a média de três experimentos independentes ± erro padrão da média. Utilizou-se os testes de ANOVA e Tukey; valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias de cada amostra teste, comparando-se as duas técnicas empregadas.



**Gráfico 4:** Resultados da avaliação da atividade anti-HSV-1 (cepas KOS e 29R) do extrato bruto, frações e ácidos fenólicos isolados de *Ilex paraguariensis*, através das técnicas do MTT e de redução das placas de lise, expressos em valores de IS (= CC<sub>50</sub>/CE<sub>50</sub>). Os resultados representam a média de três experimentos independentes.

## 5.5 EFEITO DOS MATERIAIS-TESTE NA ADSORÇÃO VIRAL

A replicação requer que o vírus adsorva na membrana celular e, subseqüentemente, penetre na célula. Isto envolve uma interação inicialmente reversível do vírus com um receptor da membrana celular hospedeira, a qual, rapidamente, sofre modificações tais que o vírus possa ser depois dissociado da célula por processos específicos. A natureza da conversão da ligação reversível para irreversível não é clara, mas pode envolver um aumento da fluidez da membrana celular, a qual permite outro lugar de ligação do vírion para reagir com moléculas receptoras celulares adicionais. O sítio de ligação pode ser uma glicoproteína, um glicolípido ou conter um grupo sulfidril funcional. Aparentemente, a interação inicial é eletrostática e serve para orientar a associação vírus-célula para uma subseqüente penetração ou transporte através da membrana celular para dentro do citoplasma (DALES, 1973; DIMMOCK, 1982).

Alguns vírus têm demonstrado sítios de ligação específicos, o que provavelmente envolva o reconhecimento de uma proteína viral por uma macromolécula da membrana da célula do hospedeiro (CHOPPIN, 1986; VILCEK; SREEVALSAN, 1984).

A entrada do vírus na célula hospedeira é dividida em dois eventos: (1) ligação do vírus aos receptores da superfície celular (adsorção) e (2) penetração na membrana plasmática ou entrada propriamente dita (FIELDS, 1998). A penetração do vírus na célula tem sido esquematicamente separada da adsorção porque evidências experimentais indicam processos distintos com diferente energia iônica requerida. Além disso, alguns antivirais agem claramente em um nível e não em outro. Este processo pode envolver a fusão de membranas (para os vírus que possuem envelope), ou alguma forma de "citose" ativa ou englobamento pela célula (HUDSON, 1990).

A inibição da adsorção viral tem sido o alvo menos efetivo pelo ataque de agentes antivirais, ainda sem substâncias conhecidas suficientemente ativas para a realização de testes clínicos. Um polissacarídeo sulfatado tem sido relatado por interagir com partículas virais, causando um decréscimo na velocidade de ataque às células *in vitro* (TAKEMOTO; LIEBHABER, 1961).

A adsorção ocorre a baixas temperaturas e é muito mais eficaz para partículas virais envelopadas que para as não envelopadas. A penetração do vírus, que depende da temperatura de incubação das células, é realizada em três minutos por



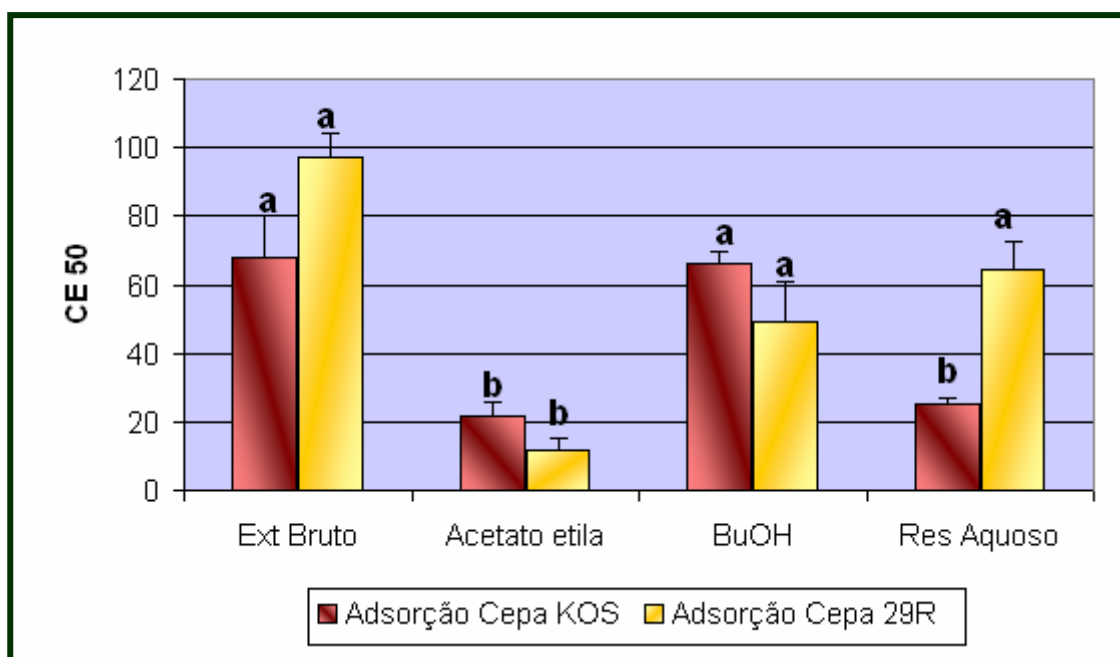
fagocitose ou fusão da membrana celular com o envelope viral (COLBERE, 1975). Devido a isso, a técnica do efeito do material-teste na adsorção viral é realizada a baixas temperaturas, para que o vírus apenas adsorva (ou não) às células, mas não penetre nelas, visto que para isso uma elevação da temperatura é requerida.

O efeito do extrato bruto e das frações de *Ilex paraguariensis* na adsorção viral foi realizada pela técnica de redução das placas de lise, segundo metodologia descrita no item 4.5.2.2, e os resultados são apresentados na tabela 7, mas podem ser melhor visualizados nos gráficos 5 e 6.

**Tabela 7:** Resultados do efeito do extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis* na adsorção do HSV-1 (cepas KOS e 29R), obtidos através da técnica de inibição das placas de lise.

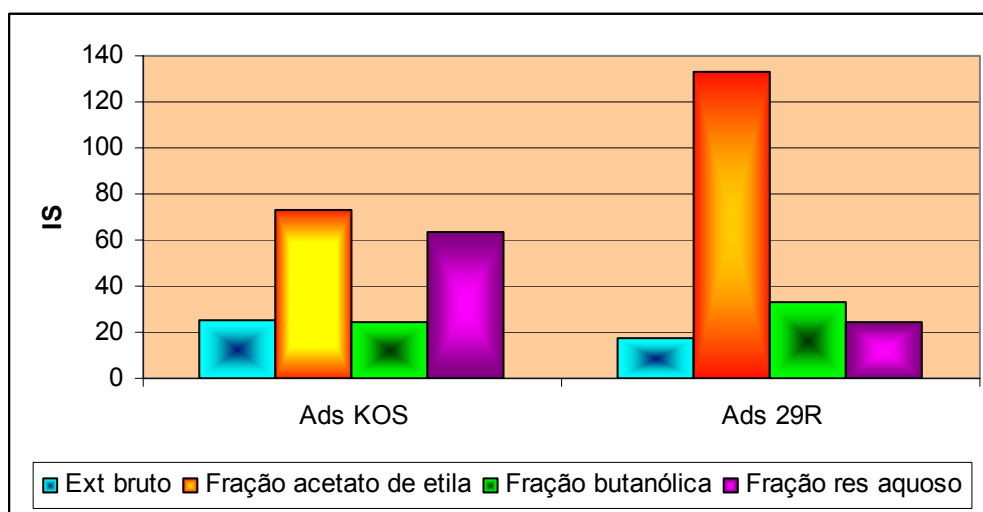
Material teste	KOS $CE_{50}$ *	KOS IS **	29R $CE_{50}$ *	29R IS **
Extrato bruto	68,1±12	24,8	97,3±7	17,4
Fração Acetato de etila	21,7±4	73,4	12,0±3	132,8
Fração butanólica	66,0±3,5	24,5	49,0±12	33,1
Resíduo Aquoso	25,2±1,5	63,4	64,5±8	24,7

\*Os valores representam a média ( $CE_{50} = \mu\text{g/mL}$ ) de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão da média; \*\*IS=  $CC_{50}/CE_{50}$ .



**Gráfico 5:** Resultados do efeito do extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis* na adsorção do HSV-1 (cepas KOS e 29R), obtidos através da técnica de inibição das placas de lise, expressos em valores de  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ). Os resultados representam a média,  $\pm$  erro padrão da média de três experimentos independentes. Utilizou-se os testes de ANOVA e Tukey; valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa das médias entre cada material teste e cepas testadas.

O efeito dos materiais-teste na adsorção viral foi bastante interessante, sendo que a fração acetato de etila foi a que mais se destacou apresentando valores de IS de 73,4 e 132,8 para as cepas KOS e 29R, respectivamente, seguida pelo resíduo aquoso, que apresentou um valor de IS de 63,4 para a cepa KOS, embora para a cepa 29 R ele tenha sido obtido um valor inferior - 24,7 (tabela 7 e gráfico 6). Embora os resultados de cada material-teste não apresentem diferenças significativas entre as duas cepas, eles apresentam diferenças significativas entre os diversos materiais-teste, indicando que o efeito de alguns deles na adsorção viral (p.ex: acetato de etila – KOS e 29R, BuOH – 29R, e resíduo aquoso KOS) se destacam mais do que os demais (extrato bruto – KOS e 29R, BuOH – KOS e Resíduo aquoso 29R). Isto se deve, provavelmente, ao fato da fração acetato de etila conter, provavelmente, substância(s) capazes de atuar com maior intensidade durante a fase da adsorção viral, como pode ser bem visualizado no gráfico 6.



**Gráfico 6:** Resultados do efeito do extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis* na adsorção do HSV-1 (cepas KOS e 29R), obtidos através da técnica de inibição das placas de lise, expressos em valores de IS ( $CC_{50}/CE_{50}$ ). Os resultados representam a média de três experimentos independentes.

## 5.6 EFEITO ANTIVIRAL EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ADIÇÃO DOS MATERIAIS-TESTE

O estudo do efeito antiviral em função do tempo de adição dos materiais-teste permite verificar em qual (quais) fase(s) do ciclo de replicação viral eles estão agindo. Se uma amostra for ativa somente quando adicionada durante as fases precoces da multiplicação viral, isto significa que ela pode agir das seguintes formas: inibindo a ação das DNA- ou RNA-polimerases que codificam o vírus, como é o caso da idoxuridina (IDU); inibindo a síntese do DNA viral, como faz o aciclovir (ACV); ou quando ela é incorporada nas regiões internucleotídeos do DNA viral, como faz a brivudina (BVDU)(BOYDE, 1987).

Quando um agente antiviral for ativo mesmo quando adicionado tardiamente, durante as últimas etapas do ciclo de multiplicação viral, é porque ele inibe, preferencialmente, a síntese das proteínas estruturais que formam o capsídeo, não agindo sobre a síntese dos ácidos nucléicos (HAYASHI et al., 1992).

Para verificar estas hipóteses, os materiais-teste foram adicionados às células em diferentes tempos: junto com os vírus ( $t_0$ ); e 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 e 24h após a inoculação viral.

Os gráficos 7 e 8 apresentam o efeito antiviral em função do tempo de adição do extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis*, na replicação do HSV-1, cepas KOS e 29R, respectivamente. Os resultados foram expressos em percentagem de proteção.

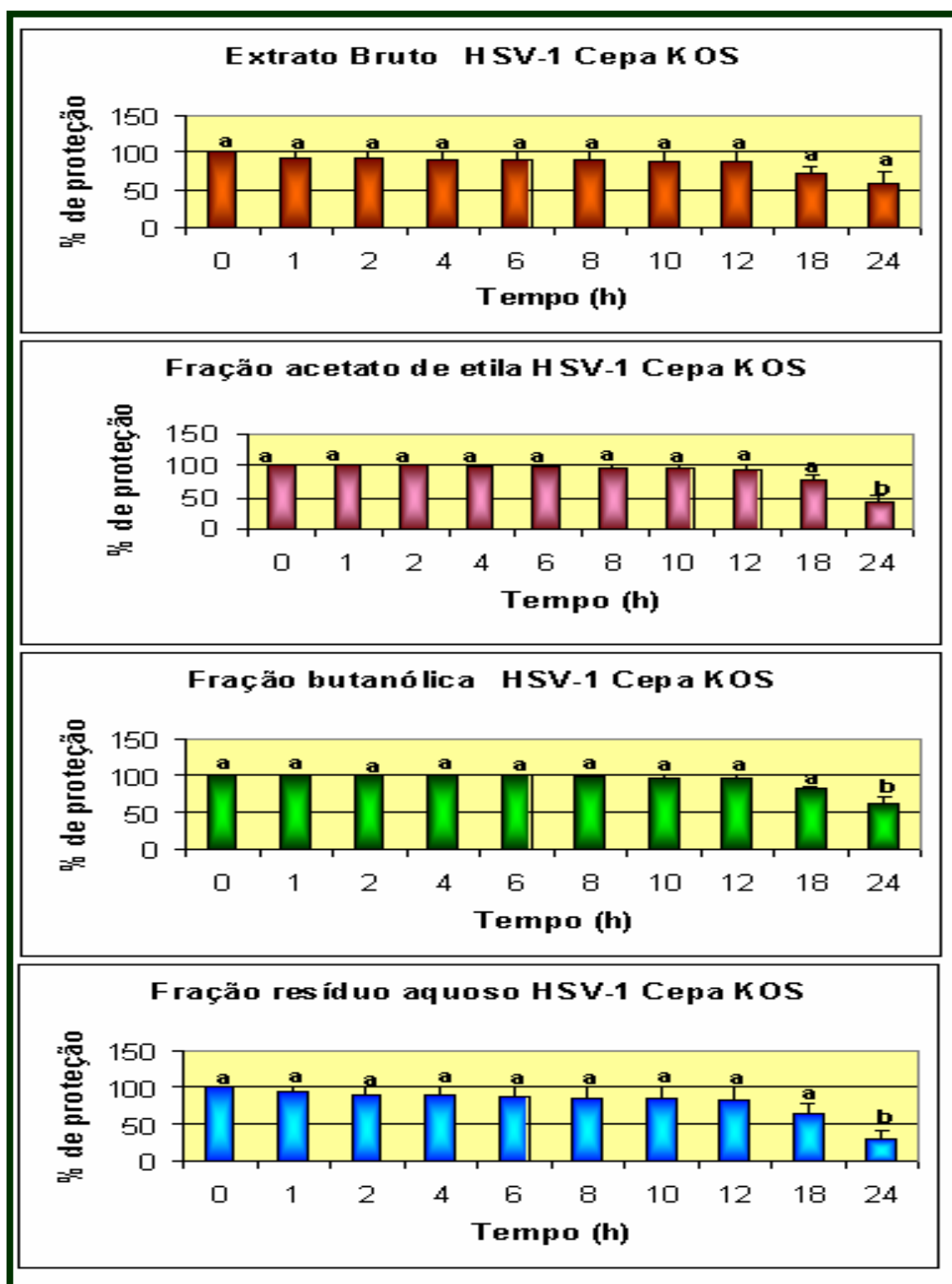
Para a cepa KOS do HSV-1, pôde-se verificar que o extrato bruto não apresentou diferenças estatísticas significativas na percentagem de proteção, entre os diferentes tempos analisados; no entanto, foi observada uma queda nos percentuais de proteção nos tempos de 18 e 24h, apesar dos valores permanecerem superiores a 50%. As demais frações apresentaram diferenças estatísticas com relação aos demais tempos de adição apenas 24 h após a infecção.

Para a cepa 29R do HSV-1, o extrato bruto e demais frações apresentaram um percentual de proteção estatisticamente semelhante até 18h, havendo após esse tempo (24h), uma queda da percentagem de proteção, estatisticamente diferente dos demais tempos.

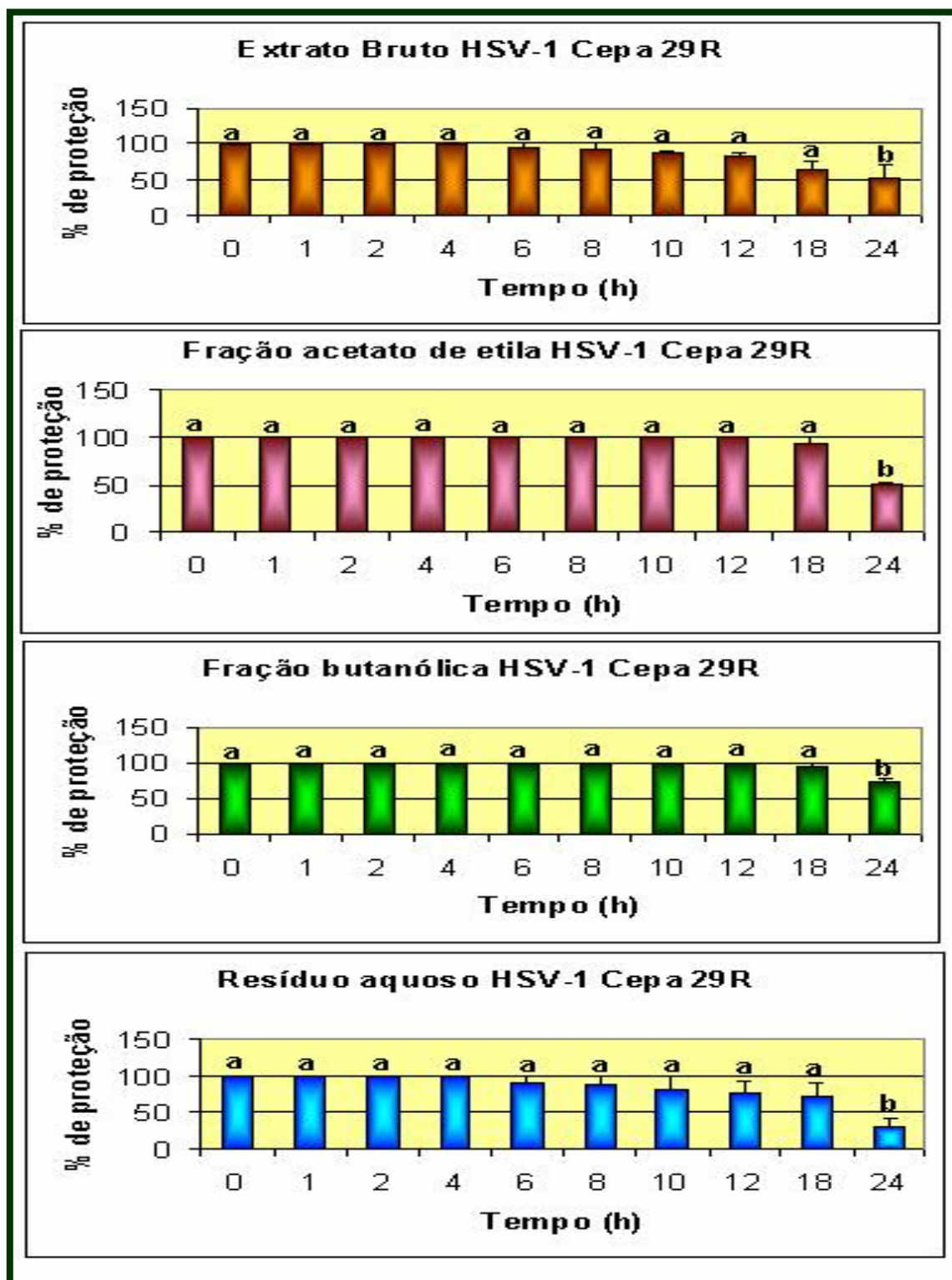
De modo geral, independentemente da cepa viral, pôde-se observar que os materiais-teste inibiram a replicação viral do tempo 0 até 18 h pós-infecção (PI),

indicando assim que eles agem provavelmente durante quase todas as etapas da replicação do HSV-1, com menor intensidade nas duas últimas que são a montagem e liberação dos vírus, e a exocitose (COLBERI, 1975).

Serkedjieva e Ivancheva (1999) também avaliaram a atividade anti-HSV-1 (cepa KOS) de *Geranium sanguineum*, e usando esta mesma estratégia metodológica, verificaram que o extrato aquoso inibiu significativamente a replicação viral quando adicionado após a infecção.



**Gráfico 7:** Efeito antiviral em função do tempo de adição do extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis* (500 µg/mL) frente a cepa KOS do HSV-1 expressos em valores de percentagem de proteção. Os resultados representam a média de três experimentos independentes ± erro padrão da média. Utilizou-se os testes de ANOVA e Tukey; valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias das % de proteção, considerando-se os diferentes tempos de adição.



**Gráfico 8:** Efeito antiviral em função do tempo de adição do extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis* (500 µg/mL) frente a cepa 29R do HSV-1 expressos em valores de percentagem de proteção. Os resultados representam a média de três experimentos independentes ± erro padrão da média. Utilizou-se os testes de ANOVA e Tukey; valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. Letras iguais indicam que não há diferença estatística significativa entre as médias das % de proteção, considerando-se os diferentes tempos de adição.

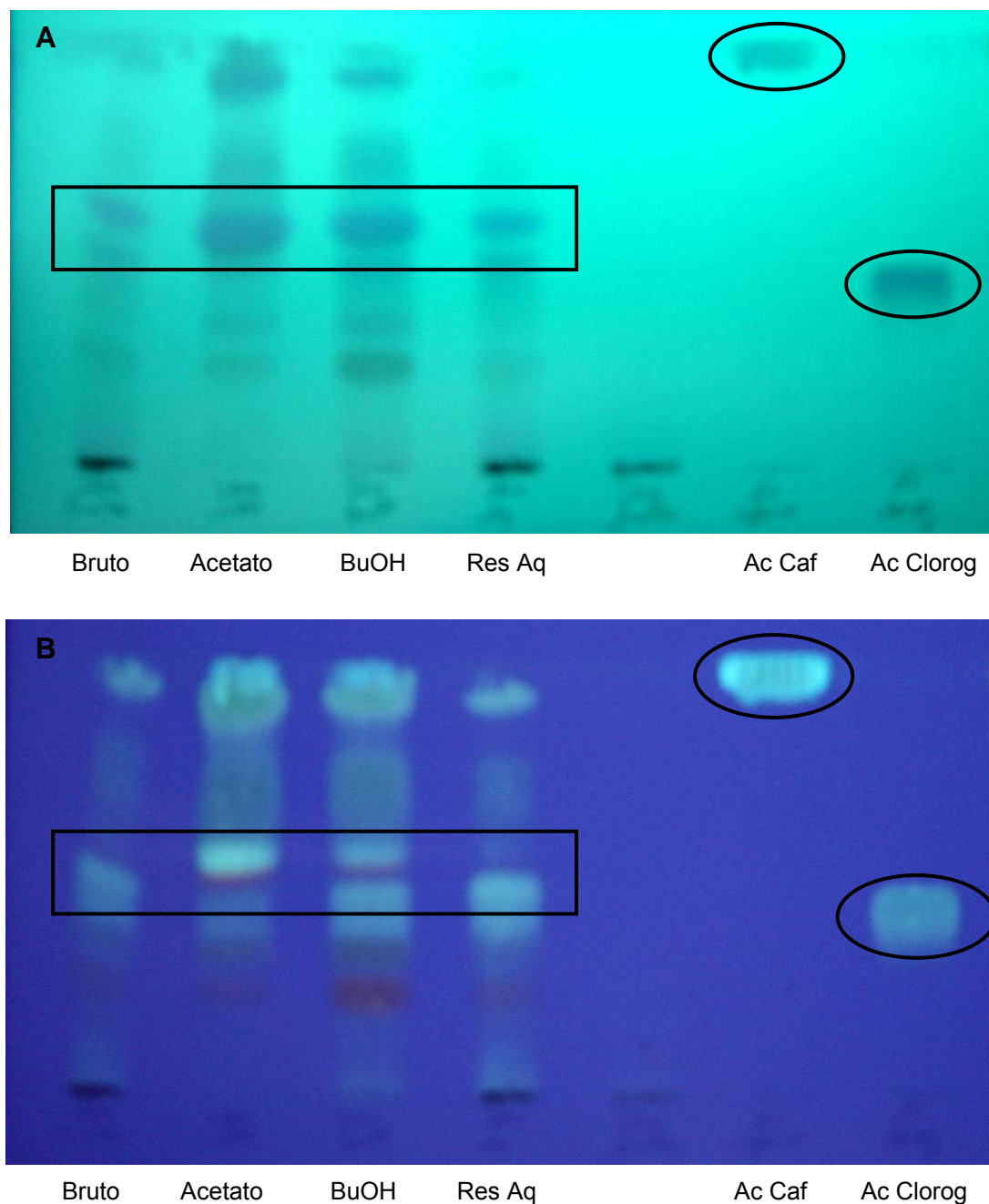
O estudo da ação antiviral em função do tempo de adição dos materiais-teste mostrou resultados semelhantes, o que poderia sugerir que a(s) substância(s) responsável(is) por esta atividade antiviral está(ão) presente(s) de forma equivalente em todas as amostras testadas. Este fator é enfatizado ao se analisar as outras estratégias metodológicas aqui testadas, que também apresentaram resultados semelhantes entre as amostras. Na tentativa de elucidar o(s) responsável(is) por esta ação antiviral, foram realizadas análises cromatográficas, objetivando identificar e quantificar os ácidos fenólicos em *Ilex paraguariensis*, visto que a literatura mostrou que dos constituintes da erva-mate, estes representam um dos grupos majoritários, com reconhecida ação antiviral.

## **5.7 RESULTADOS DAS ANÁLISES QUALITATIVAS E QUANTITATIVAS DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM *Ilex paraguariensis***

### **5.7.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

Com o intuito de avaliar o perfil cromatográfico dos materiais-teste utilizados nos ensaios da atividade anti-herpética, foram realizadas cromatografias em camada delgada (CCD), conforme preconizado por (WAGNER; BLADT, 1996) e detalhadas no item 4.7.

As figuras 4a e 4b mostram a análise cromatográfica por CCD do extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis* e das amostras autênticas dos ácidos caféico e clorogênico.



**Figura 4:** Análise por cromatografia em camada delgada do extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis*, ácidos caféico e clorogênico, rutina (Ru) e quercetina (Q). **Cromatograma A** - Fase Fixa: Sílica gel;  $F_{254\text{nm}}$ ; Fase Móvel: AcOEt:Ác. Fórm:Ác. Acético: Água (30:2:2:3 v/v); Revelador: UV 254 nm. **Cromatograma B** - Fase Fixa: Sílica gel  $F_{254\text{nm}}$ ; Fase Móvel: AcOEt:Ác. Fórm:Ác. Acético: Água (30:2:2:3 v/v); Revelador: Reagente Natural A/UV 366 nm

Como pode ser verificado no cromatograma acima, os ácidos caféico e clorogênico apresentaram valores de  $R_f$  de aproximadamente 0,9 e 0,45, respectivamente, dados condizentes com os da literatura (WAGNER; BLADT, 1996). A presença desses compostos foi verificada no extrato bruto e frações de *Ilex*



*paraguariensis*, estando o ácido clorogênico presente com maior intensidade nas frações *n*-butanólica, resíduo aquoso e extrato bruto, e o ácido caféico nas frações acetato de etila e *n*-butanólica.

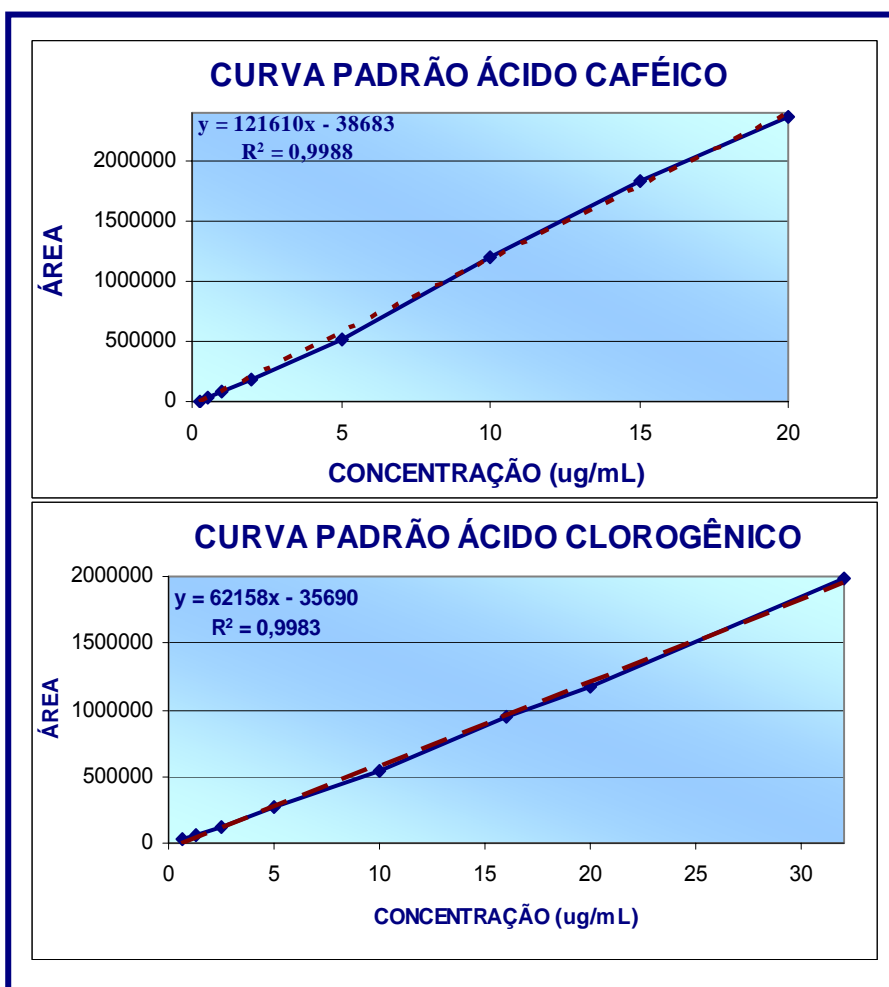
## 5.7.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

### 5.7.2.1 Seleção das condições cromatográficas

O estabelecimento dos parâmetros para a análise de ácidos fenólicos por CLAE foi fundamentada nos dados presentes na literatura (LI et al., 2004; FILIPIPI et al., 2001; WEN et al., 2005). Dessa forma, foi estabelecido para a realização destes ensaios a utilização de coluna de fase reversa (C-18) e detector UV (323 nm). A fase móvel (FM) utilizada nas análises foi definida após diversos testes, nos quais foram alterados os componentes da FM e suas respectivas proporções. A utilização de ácido acético 1% na fase móvel B permitiu a obtenção de picos bem resolvidos e com reduzida formação de cauda. Com as condições empregadas para a análise por CLAE os tempos de retenção para os ácidos clorogênico e caféico foram de aproximadamente 10,2 e 14,4 min, respectivamente.

### 5.7.2.2 Curvas padrão dos ácidos caféico e clorogênico

Para a quantificação dos ácidos caféico e clorogênico nos materiais-teste, foi necessário, primeiramente, realizar suas respectivas curvas padrão, que foram preparadas relacionando-se as áreas dos picos com as concentrações das amostras analisadas ( $n=8$ ) e expressas pela equação da reta. As curvas padrões dos ácidos fenólicos analisados estão apresentadas no gráficos 9.



**Gráfico 9:** Curvas padrão dos ácidos caféico e clorogênico, com as respectivas equações das retas, onde Y= área do pico e X= concentrações dos ácidos. A leitura foi realizada a 323nm. Cada ponto representa a média das três injeções de cada amostra.

Como pode ser observado, a análise de regressão linear apresentou um  $r^2$  superior a 0,99 indicando boa linearidade para o método na faixa de trabalho selecionada. Através das análises cromatográficas e da equação da reta também foi possível estabelecer os limites de detecção para os ácidos caféico e clorogênico, os quais foram, respectivamente, de 0,25 e 0,625  $\mu\text{g/mL}$ .

Para a análise por CLAE de alguns ácidos fenólicos presentes em uma planta chinesa, Li e colaboradores (2004) utilizaram coluna Hypersyl ODS-2 (200 x 4,6 mm diâmetro interno e 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro de partícula), e detector UV com comprimento de onda de 300nm. Como fase móvel foi usado uma mistura de metanol:tampão acetato (15:85 v/v), com fluxo de 1 mL/min.

As equações da reta obtidas foram, respectivamente:  $y=94796x - 45627$  ( $r^2=0,9983$ ) e  $y=54710x - 151702$  ( $r^2=0,9993$ ) para os ácidos caféico e clorogênico. Os limites de detecção obtidos para os ácidos caféico e clorogênico foram de 0,10 e

0,78 µg/mL, respectivamente. Os tempos de retenção obtidos foram de 6,71 e 11,97 min para os ácidos clorogênico e caféico.

Filipip e colaboradores (2001) avaliaram compostos fenólicos presentes em sete espécies de *Ilex*, dentre elas, *Ilex paraguariensis*. Para isso, a coluna utilizada foi uma C18 (5 µm, 250 X 4,6 m diâmetro interno); fase móvel A: água/AcOH 98:2; B: MeOH/AcOH 98:2 – gradiente, no comprimento de onda de 325 nm. As equações da reta obtidas para os ácidos caféico e clorogênico foram  $y = 2,23 \times 10^4 x - 5,8470$  ( $r^2=0,9982$ ) e  $y = 1,15 \times 10^4 x - 2,12430$  ( $r^2= 0,9995$ ), respectivamente. Os tempos de retenção encontrados foram de 10,5 e 12,4 min para os ácidos clorogênico e caféico. Os limites de detecção não foram relatados.

Para a determinação dos teores de ácidos fenólicos em plantas medicinais, Wen e colaboradores (2005), utilizaram uma coluna Agela XBP-C18 (5 µm, 4,6mm x 150 mm) com sistema de eluição de gradiente binário, e obtiveram limites de detecção de 0,018 e 0,007 mg/mL e tempos de retenção de 11,27 e 16,10 min para os ácidos clorogênico e caféico, respectivamente. As equações da reta obtidas para os ácidos caféico e clorogênico foram  $y=91.806 X + 7.5795$  ( $r^2=1$ ) e  $y=46.523X - 0.6877$  ( $r^2=1$ ). O fluxo utilizado foi de 0,5 mL/min e a fase móvel era composta por 0,02% de ácido trifluoracético (A) e metanol: 0,02% de ácido trifluoracético (B). O comprimento de onda de detecção utilizado foi de 320 nm.

Devido aos diferentes equipamentos e variáveis utilizados por cada grupo de pesquisa, a comparação dos resultados obtidos se torna difícil, mas pode-se observar que os resultados desta dissertação são semelhantes aos encontrados pelos autores citados acima.

### 5.7.2.3 Validação da técnica

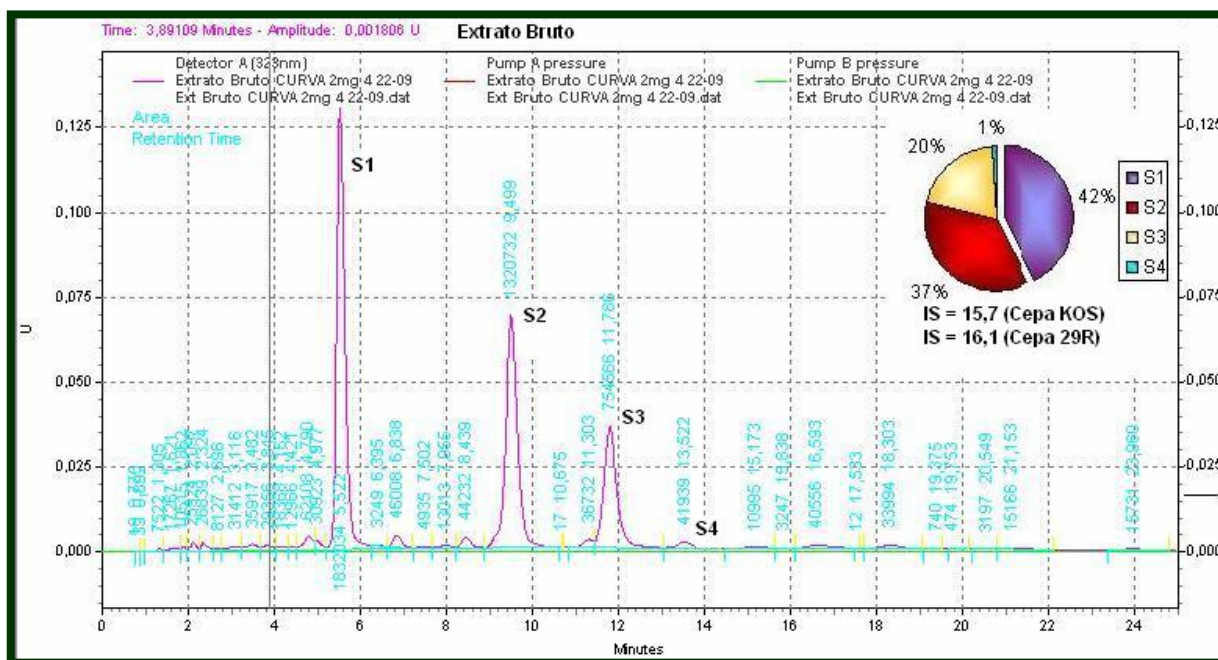
Um método de análise foi desenvolvido e validado para quantificar ácidos fenólicos em *Ilex paraguariensis*. A exatidão do método foi de 104,65% para o ácido clorogênico e 97,4% para o ácido caféico. As equações da reta para a calibração das curvas de ácido caféico e clorogênico foram respectivamente:  $y =121610X - 3860$  ( $r^2= 0,9988$ ) e  $y =62158X - 35690$  ( $r^2=0,9983$ ). Os limites de detecção obtidos para os ácidos caféico e clorogênico foram, respectivamente, de 0,25 e 0,625 µg/mL.

A precisão intermediária foi mostrada com CV de 3,6 %, variação considerada satisfatória.

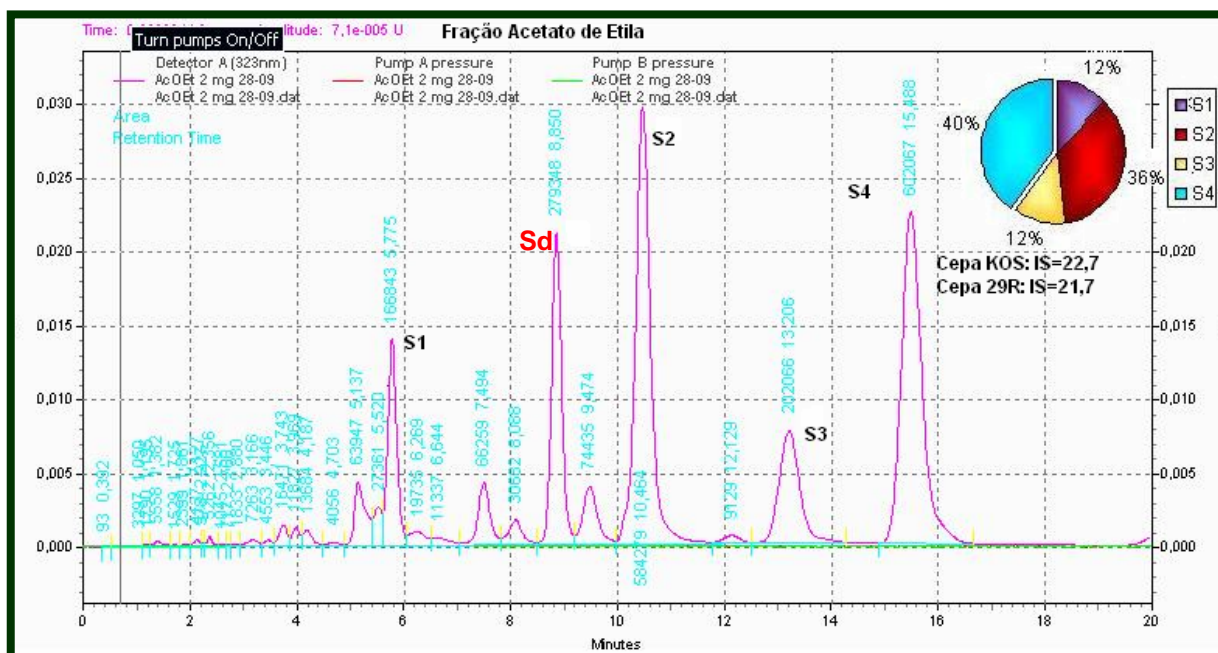
### 5.7.3 Quantificação dos ácidos caféico e clorogênico nos materiais- teste

A análise por CLAE indicou a presença de quatro substâncias majoritárias, com características cromatográficas de ácidos fenólicos, no extrato bruto de *Ilex paraguariensis* (fig 5) e nas frações acetato de etila (fig 6), *n*-butanol (fig 7), e no resíduo aquoso (fig 8), as quais foram codificadas, de acordo com a ordem crescente dos seus tempos de retenção como: S1, S2, S3 e S4. Os teores das substâncias foram calculados utilizando-se o peso seco da matéria-prima vegetal utilizada e o rendimento do extrato obtido.

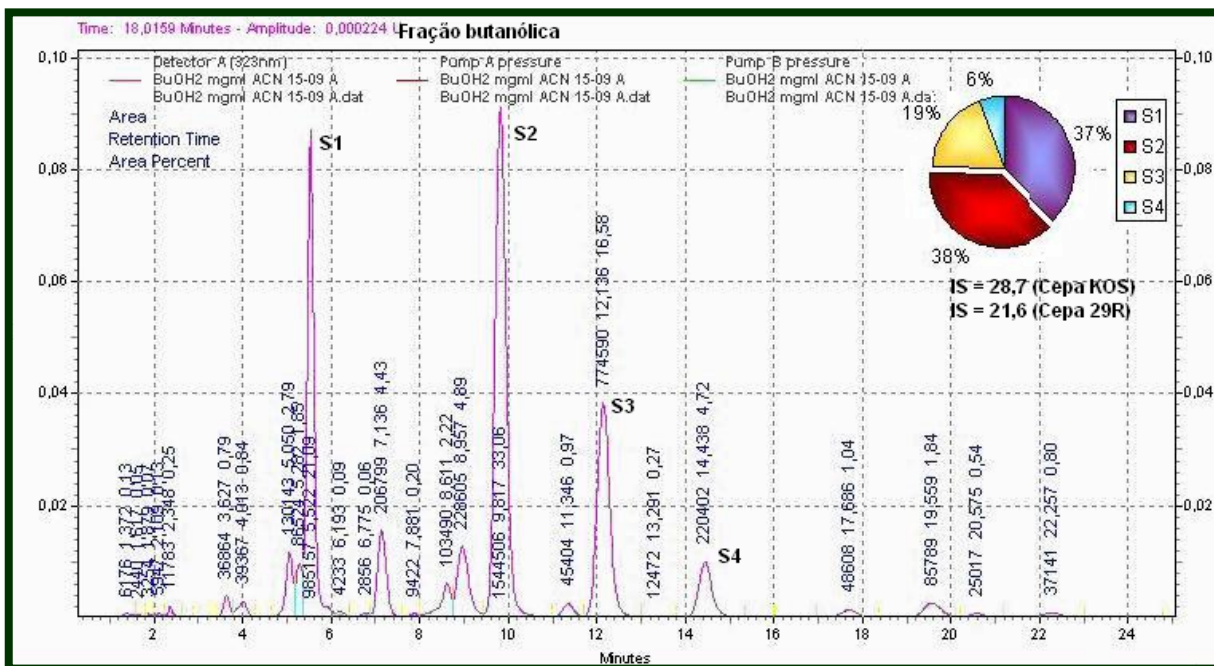
A seguir são apresentados, apenas a título ilustrativo, exemplos de cromatogramas obtidos para o extrato bruto (fig 5) e para as frações acetato de etila (fig 6), *n*-butanol (fig 7), resíduo aquoso (fig 8) e ácidos caféico e clorogênico (fig 9). É importante ressaltar que as ilustrações não representam a média dos valores obtidos e sim os valores obtidos em uma única aplicação isolada, portanto, variações nas áreas e tempos de retenção obtidos podem ser verificados quando comparados com os valores das médias, apresentados na tabela 12, ou seja, os valores a serem considerados são os apresentados na tabela. É importante lembrar também que o eixo das ordenadas *y* varia proporcionalmente à concentração dos compostos em estudo, por isso, materiais-teste que apresentaram menor quantidade de ácidos fenólicos (por exemplo: fração acetato de etila) estão ilustrados nos cromatogramas em menor escala no eixo *y*.



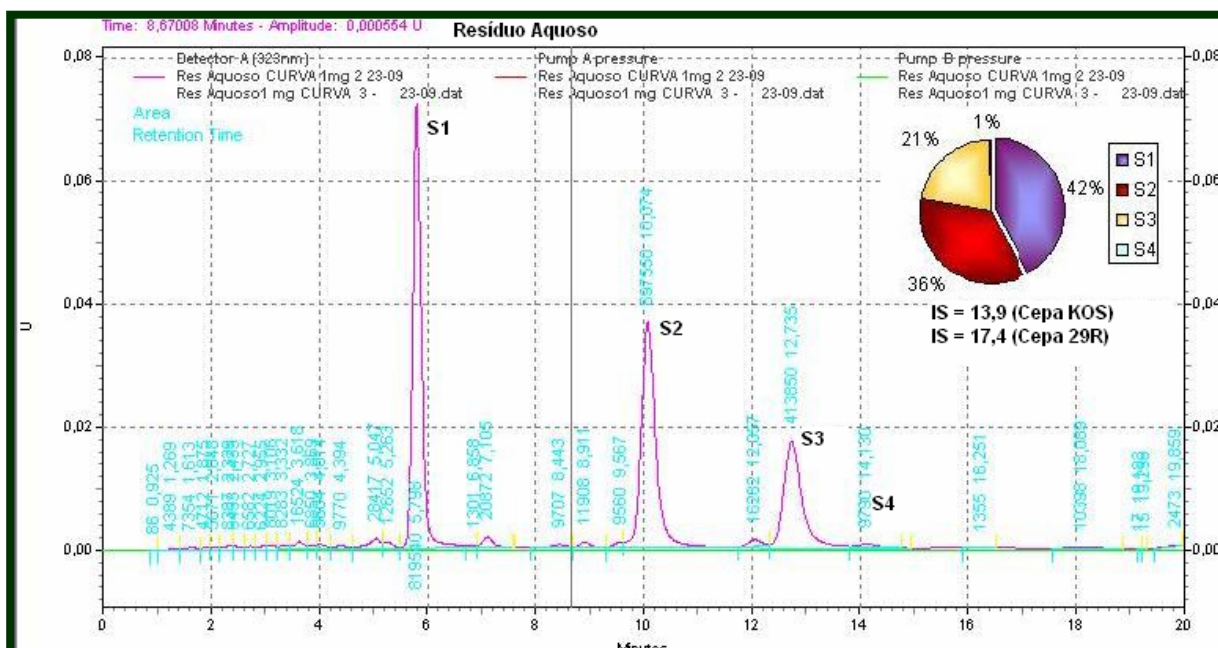
**Figura 5:** Perfil cromatográfico (CLAE) do Extrato Bruto obtido a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* (2000µg/mL). Condições cromatográficas: Fase móvel: [A: Metanol; B:(Ácido acético 1%: MeOH - 95:5) (5:95 v/v)]. Fluxo: 0,8mL/min; Fase fixa: coluna RP-C18 Phenomenex® (150 x 4,6mm 5µm). Detecção: UV 323nm.



**Figura 6:** Perfil cromatográfico (CLAE) da Fração Acetato de Etila obtido a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* (2000µg/mL). Condições cromatográficas: Fase móvel: [A: Metanol; B:(Ácido acético 1%: MeOH - 95:5) (5:95 v/v)]. Fluxo: 0,8mL/min; Fase fixa: coluna RP-C18 Phenomenex® (150 x 4,6mm 5µm). Detecção: UV 323nm.

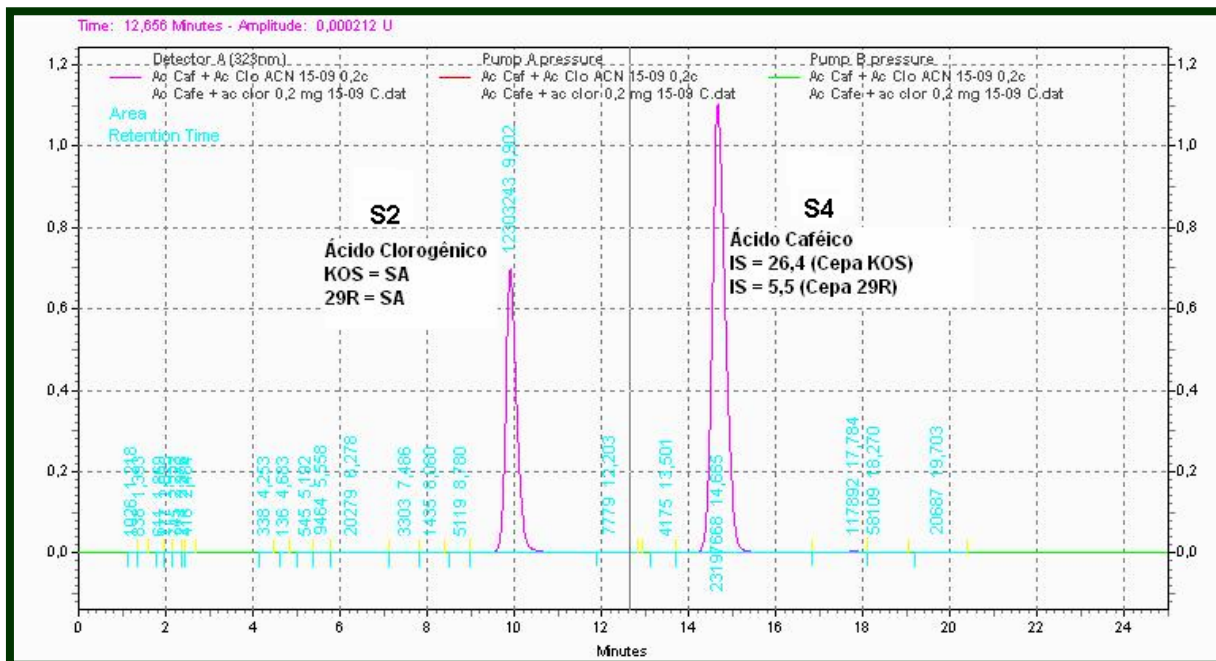


**Figura 7:** Perfil cromatográfico (CLAE) da Fração *n*-BuOH obtido a partir de folhas de *Illex paraguariensis* (2000µg/mL). Condições cromatográficas: Fase móvel: [A: Metanol; B:(Ácido acético 1%: MeOH - 95:5) (5:95 v/v)]. Fluxo: 0,8mL/min; Fase fixa: coluna RP-C18 Phenomenex® (150 x 4,6mm 5µm). Detecção: UV 323nm.



**Figura 8:** Perfil cromatográfico (CLAE) do Resíduo aquoso obtido a partir de folhas de *Illex paraguariensis* (1000µg/mL). Condições cromatográficas: Fase móvel: [A: Metanol; B:(Ácido acético 1%: MeOH - 95:5) (5:95 v/v)]. Fluxo: 0,8mL/min; Fase fixa: coluna RP-C18 Phenomenex® (150 x 4,6mm 5µm). Detecção: UV 323nm.

As substâncias S2 e S4 apresentaram tempos de retenção idênticos aos observados para as amostras autênticas dos ácidos clorogênico e caféico, com tempos de aproximadamente 10,2 e 14,4 min, respectivamente (fig 9).



**Figura 9:** Perfil cromatográfico (CLAE) das amostras de referência Ácido Clorogênico ( $t_r=9,7$  min) e Ácido caféico ( $t_r=14,4$  min). Condições cromatográficas: Fase móvel: [A: Metanol; B:(Ácido acético 1%: MeOH - 95:5) (5:95 v/v)]. Fluxo: 0,8mL/min; Fase fixa: coluna RP-C18 Phenomenex® (150 x 4,6mm 5 $\mu$ m). Detecção: UV 323nm.

A partir dos valores das áreas e das equações das retas obtidas para os ácidos clorogênico (S2) e caféico (S4), foram calculadas as concentrações de cada ácido em cada material-teste (tabela 8).

**Tabela 8:** Concentrações (%) das substâncias S2 e S4 (com tempos de retenção semelhantes aos dos ácidos clorogênico e caféico, respectivamente) presentes em *Ilex paraguariensis*.

Material-teste	S2		S4	
	$\mu\text{g/mL}$	%	$\mu\text{g/mL}$	%
Extrato bruto	11,74	1,17	0,48	0,05
Fração acetato	4,76	0,48	2,71	<b>0,27</b>
Fração butanólica	13,79	<b>1,38</b>	1,35	0,15
Res aquoso	11,66	1,17	0,40	0,04

Os valores apresentados na tabela 8 se aproximam dos encontrados por Filipip e colaboradores (2001), que analisaram um extrato aquoso de folhas de *Ilex*

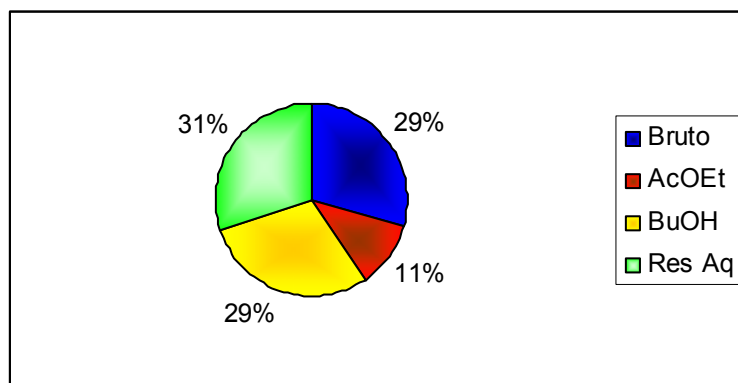
*paraguariensis*. Esses autores encontraram valores de 2,8 e 0,023 % para os ácidos clorogênico (S2) e caféico (S4), respectivamente, valores estes relativamente aparentados aos encontrados para o extrato bruto nesta dissertação.

### 5.8 ESTABELECIMENTO DA CORRELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE ANTI-HERPÉTICA E OS TEORES DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM *Ilex paraguariensis*

**Extrato bruto:** Através do ensaio da redução das placas de lise foi possível verificar que o extrato bruto de *Ilex paraguariensis* apresentou valores de índices de seletividade de 15,7 e 16,1, respectivamente, para as cepas KOS e 29R do HSV-1 (tabela 9), sendo que esses resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si (dados não mostrados).

No ensaio de inibição da adsorção viral, os valores de IS obtidos foram de 24,8 e 17,4 para as cepas KOS e 29R, respectivamente, valores esses superiores aos obtidos na avaliação simultânea, mas não estatisticamente diferentes daqueles.

A análise química deste extrato pela técnica de CLAE demonstrou que a substância S1 é majoritária (42%) nesta amostra, quando comparada com as demais substâncias (fig 5). Para a substância S2, que possui comportamento cromatográfico semelhante ao do ácido clorogênico, foi detectado que ela ocorre em menor quantidade (37%) do que a substância S1. A substância que apresentou características cromatográficas semelhantes às do ácido caféico (S4), é a que se encontra em menor quantidade no extrato bruto (1%). Esta fração possui 29% dos fenólicos totais analisados (Gráfico 10).



**Gráfico 10:** Distribuição das substâncias analisadas por CLAE (fenólicos totais) nos materiais-teste. Os valores representam a soma da área das substâncias analisadas (ácidos fenólicos).



**Fração acetato de etila:** esta fração apresentou índices de seletividade de 22,7 e 21,7, respectivamente, para as cepas KOS e 29R, e esses resultados também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si (dados não mostrados).

Na avaliação da inibição da adsorção viral, foi verificado um aumento da atividade, pois os valores de IS aumentaram bastante (IS = 73,4 e 132,8, respectivamente, para as cepas KOS e 29R).

Sua análise cromatográfica (figura 6) demonstrou que nesta fração, o ácido fenólico presente em maior quantidade é o que apresentou tempo de retenção semelhante ao ácido caféico - S4 - (40%), seguido pela substância com características cromatográficas semelhantes as do ácido clorogênico - S2 - (36%). As substâncias S1 e S3 se distribuem igualmente (12% cada). No entanto, somando-se as áreas dos quatro ácidos fenólicos, verificou-se que a fração acetato de etila é a que possui menor percentagem de fenólicos totais (11%) (gráfico 10). É importante ressaltar que nesta fração foi verificada a presença de uma quinta substância, de forma majoritária, identificada na figura 6 como "Sd" (Substância desconhecida). Não é descartada a possibilidade desta substância ser também responsável pela ação antiviral detectada para esta fração.

**Fração *n*-butanólica:** esta fração foi a que apresentou os melhores índices de seletividade para a cepa KOS, quando comparada ao extrato bruto e demais frações, pela técnica das placas de lise (tratamento simultâneo), com valores de IS de 28,7 e 21,6, respectivamente, para as cepas KOS e 29 R (tabela 9).

Pela técnica de inibição da adsorção viral, os valores de IS obtidos foram de 24,5 e 33,1, para as cepas KOS e 29R, respectivamente.

Sua análise cromatográfica (figura 7) mostrou que estão presentes em quantidades semelhantes as substâncias S1 (38%) e S2 (37%), sendo esta última, cromatograficamente semelhante ao ácido clorogênico; em menores quantidades estão presentes as substâncias S3 (19%) e S4 (6%), esta última cromatograficamente semelhante ao ácido caféico. Essa fração ocupa 29% do total de ácidos fenólicos, valor idêntico ao do extrato bruto (gráfico 10).

**Resíduo aquoso:** este apresentou valores de IS de 13,9 e 16,1 respectivamente, para as cepas KOS e 29R (Tabela 9), inferiores aos obtidos para o extrato bruto ou para as demais frações.

No entanto, na técnica de inibição da adsorção viral, os valores de IS obtidos foram de 63,4 e 24,7, para as cepas KOS e 29R, respectivamente.

A análise cromatográfica (Fig 8) mostrou que nesta fração a substância S1 é majoritária (42%), seguida pelas substâncias S2 (36%), S3 (21%) e S4 (1%). Essa fração apresentou a maior quantidade de fenólicos totais (31%) (gráfico 10).

A tabela 9 mostra a área dos ácidos fenólicos detectados em *Ilex paraguariensis*, em condições experimentais propícias para sua identificação.

**Tabela 9:** Área dos ácidos fenólicos majoritários observados em *Ilex paraguariensis* e valores de IS obtidos pela técnica de inibição das placas de lise.

Extratos/Frações	ÁREA					IS (CC <sub>50</sub> /CE <sub>50</sub> )	
	S1	S2	S3	S4	TOTAL	Placas de lise	
						KOS	29R
<b>Extrato Bruto</b>	798189	694330	377985	20324	1890828	15,7	16,1
<b>Fração Acetato</b>	89679	260646	86248	<b>290740</b>	727313	22,7	21,7
<b>Fração butanólica</b>	545154	<b>821342</b>	407948	126073	1900517	28,7	21,6
<b>Res Aquoso</b>	816437	689206	410183	9848	1925674	13,9	16,1

Segundo a literatura (LI; BUT; OOI, 2005), ensaios com o ácido clorogênico na sua forma isolada não apresentaram promissores resultados na inibição da replicação do HSV-1, utilizando-se células VERO e a cepa KOS. No intuito de confirmar esses dados, ensaios empregando ácido clorogênico foram realizados no presente trabalho, os quais apresentaram 13,5% e 12% de inibição na concentração de 62,5ug/mL para as cepas KOS e 29R, respectivamente, semelhantes aos citados na pela literatura, sugerindo que essa substância (S2) não poderia ser considerada como a única responsável pela ação anti-herpética detectada.

O ácido caféico também foi testado individualmente, e apresentou valores de IS de 26,4 e 5,5, para as cepas KOS e 29R, respectivamente. Os resultados mostraram que, embora o ácido caféico apresente uma atividade anti-herpética importante, ela não pode ser comparada com aquela detectada para as frações, pois é bem inferior a estas.

A fração butanólica foi a que apresentou o melhor resultado para a cepa KOS, no tratamento simultâneo, na técnica de inibição das placas de lise (IS= 28,7), e a fração acetato de etila no ensaio de inibição da adsorção viral (IS= 73,4). Para a cepa 29R, os melhores resultados obtidos foram para as frações butanólica e

acetato de etila no tratamento simultâneo, pela técnica das placas de lise (IS = 21,7 e 21,6, respectivamente), e para a fração acetato de etila no ensaio de inibição da adsorção (IS = 132,8), valor esse aumentado cerca de cinco vezes em comparação ao tratamento simultâneo.

Na fração butanólica, encontrou-se a maior quantidade de S2 (cromatograficamente semelhante ao ácido clorogênico), mas também foi a fração que apresentou o segundo maior teor de S4 (cromatograficamente semelhante ao ácido caféico) (6%).

A fração acetato de etila foi a que apresentou maior quantidade do ácido caféico (S4) - 40% - e apresentou os melhores resultados na inibição da adsorção viral.

Considerando-se que a fração acetato de etila apresentou um valor de IS semelhante ao detectado para a fração butanólica e superior aos valores de IS encontrados para o extrato bruto e resíduo aquoso (tabela 9), e que essa diferença aumentou na técnica de inibição da adsorção, é possível inferir que a atividade antiviral verificada para *Ilex paraguariensis* não esteja diretamente relacionada apenas ao teor de fenólicos presente no extrato vegetal, visto que a fração acetato é a que apresenta menor quantidade de ácidos fenólicos totais.

A análise dos resultados obtidos com o extrato bruto, frações e compostos isolados de *Ilex paraguariensis*, comparados com os obtidos nas análises cromatográficas reforçam a hipótese de que a inibição da replicação viral obtida não está diretamente relacionada somente aos teores de ácidos fenólicos presentes.

Considerando que as frações acetato de etila e butanólica apresentam saponinas e flavonóides em sua composição química, estes metabólitos secundários que poderiam ser também responsáveis pela ação antiviral de *Ilex paraguariensis*, detectada nesta dissertação. No entanto, devido à sua indisponibilidade, eles não foram testados.

Estes resultados sugerem que a fração acetato de etila provavelmente apresenta substâncias em proporções diferentes dos outros materiais-teste, os quais agem sinergicamente, potencializando a ação desta fração principalmente na inibição da adsorção viral.

O termo sinergismo é utilizado para designar todo tipo de interação entre constituintes de um extrato vegetal, bem como de componentes de uma mistura de várias plantas (WILLIAMSON; 2001). Ele é normalmente assumido como o grande responsável pelo efeito medicinal de extratos de plantas, e é considerado um dos

grandes recursos da fitoterapia. Sabe-se que as plantas contêm uma enorme diversidade de metabólitos secundários, constituintes químicos aos quais muitas vezes fornecemos o status de princípios ativos. Esta diversidade de substâncias dentro de uma mesma planta pressupõe uma alta probabilidade de interações entre elas. Neste contexto, as interações sinérgicas são aquelas na qual a atividade combinada de duas ou mais substâncias é maior que aquela esperada pela somatória das suas atividades individuais. Por sinergismo, verifica-se que algumas substâncias isoladas e em conjunto com outras, podem potencializar os efeitos benéficos ou então atenuar os efeitos adversos. Como pôde-se verificar, os compostos isolados inibiram a replicação viral em menor intensidade que o extrato bruto e frações, sugerindo haver sinergismo entre as substâncias presentes em cada extrato/fração.

## 6 CONCLUSÕES

- Dos oito extratos vegetais testados na triagem anti-herpética, apenas o extrato bruto e as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila dos caules de *Sloanea guianensis* e a fração clorofórmio de *Lafoensia pacari* apresentaram considerável citotoxicidade.
- Com relação a ação anti-herpética, resultados promissores foram obtidos para *Lafoensia pacari*, *Passiflora edulis*, *Rubus imperialis*, *Sloanea guianensis* e *Ilex paraguariensis*.
- Optou-se dar continuidade ao estudo de *Ilex paraguariensis*, pois este material-teste estava presente em maior quantidade e também pela disponibilidade dos ácidos caféico e clorogênico, como substâncias-referência.
- O extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis* apresentaram baixa citotoxicidade; entretanto, os compostos isolados, ácidos caféico e clorogênico, apresentaram alta citotoxicidade, provavelmente devido às suas características ácidas.
- O ensaio de inibição das placas de lise com estes materiais-teste comprovou os resultados obtidos pela técnica do MTT e, embora tenha apresentado valores de IS maiores, não foram detectadas diferenças estatísticas significativas entre esses e aqueles obtidos com a técnica do MTT.
- O extrato bruto e frações apresentaram resultados bastante encorajadores no tratamento simultâneo e no pós-tratamento pela técnica do MTT, mas não mostraram ação anti-herpética promissora, quando do pré-tratamento.
- O ácido clorogênico não apresentou resultados promissores na inibição da replicação viral, já o ácido caféico apresentou uma inibição significativa (se comparada a do ácido clorogênico), mas inferior à obtida pelo extrato bruto e frações de *Ilex paraguariensis*.

- Os resultados obtidos na inibição da adsorção viral foram mais promissores que os obtidos na técnica de tratamento simultâneo, principalmente para a fração acetato de etila, mostrando que os materiais-teste atuam inibindo/prejudicando a adsorção viral.
- O ensaio de avaliação da atividade antiviral pelo tempo de adição das amostras-teste mostrou que estas atuam provavelmente durante quase todas as etapas da replicação do HSV-1, com menor intensidade nas duas últimas que são a montagem e liberação dos vírus, e a exocitose.
- As análises cromatográficas por CCD e CLAE permitiram detectar e identificar duas das quatro substâncias majoritárias presentes em *Ilex paraguariensis* como sendo os ácidos caféico (S4) e clorogênico (S2).
- As substâncias S1, S2 e S3 distribuem-se de forma semelhante e majoritária no extrato bruto, fração butanólica e resíduo aquoso.
- A substância S4 está presente em maior quantidade na fração acetato de etila, que foi o material-teste que apresentou o efeito mais importante na inibição da adsorção do HSV-1 (cepas KOS e 29R).
- A quantificação destes ácidos fenólicos mostrou que a atividade anti-herpética detectada não está direta e especificamente relacionada com os ácidos fenólicos detectados, mas deve-se, provavelmente, ao efeito sinérgico entre essas e outras substâncias presentes nos materiais-testados, tais como os flavonóides e as saponinas triterpênicas, já detectados neste vegetal.

## 7 PERSPECTIVAS

- Realizar o fracionamento biomonitorado com os extratos que mostraram resultados promissores na triagem antiviral (*Lafoensia pacari*, *Passiflora edulis*, *Rubus imperialis* e *Sloanea guianensis*);
- Realizar ensaios de adsorção e ação antiviral em função do tempo com o ácido caféico;
- Continuar o fracionamento biomonitorado da fração acetato de etila de *Ilex paraguariensis*;
- Realizar outros ensaios antivirais, tais como inibição da penetração viral, e sinergismo entre frações e o aciclovir;
- Isolar e identificar as substâncias S1 e S3, bem como realizar ensaios antivirais com elas, caso não existam estudos na literatura;
- Avaliar a ação anti-herpética das saponinas e dos flavonóides da erva-mate.

---

**REFERÊNCIAS**

- ABDEL-KADER, M.S. Phenolic constituents of *Ononis vaginalis* roots. **Planta Medica**, v. 67, p. 388-390, 2001.
- ALBANO, A.; DE DONATO, S. On the antiviral properties of some plant extracts. Experiments in vitro with poliomyelitis viruses and ECHO viruses, **Boll Ist Sieroter Milan**. v. 41, p. 608-617, 1962.
- ALCHE, L.E.; BARQUERO, A.A.; SANJUAN, N.A.; COTO, C.E. An antiviral principle present in a purified fraction from *Melia azedarach* L. leaf aqueous extract retains herpes simplex virus type 1 propagation. **Phytotherapy Research**, v.16, p. 348–352, 2002.
- ALONSO, R.; CADAVID, I.; CALLEJA, J.M. A preliminary study of hypoglycemic activity of *Rubus fruticosus*. **Planta Medica**; Suppl:102-106. 1980.
- AMOROS, M.; FAUCONNIER, B.; GIRRE, R.L. *In vitro* antiviral activity of a saponin from *Anagallis arvensis*, Primulaceae, against herpes simplex virus and poliovirus. **Antiviral Research**, v. 8, p. 13-25, 1987.
- 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.
- ANDREI, G.M.; COTO, C.E.; DE TORRES, R.A. Assays of cytotoxicity and antiviral activity of crude and semipurified extracts of green leaves of *Melia azedarach* L, **Rev Argent Microbiol**, V. 17, p. 187-194, 1985.
- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. **Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *Chromobacterium violaceum***, 2003, 135f, Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-graduação em Farmácia – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- ANDRIGHETTI-FROHNER, C.R.; SINCERO, T.C.; DA SILVA, A.C.; SAVI, L.A.; GAIDO, C.M.; BETTEGA, J.M.; MANCINI, M.; DE ALMEIDA, M.T.; BARBOSA, R.A.; FARIAS, M.R.; BARARDI, C.R.; SIMÕES, C.M. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest, **Fitoterapia**. v. 76, p. 374-378, 2005.
- AOKI, H.; AKAIKE, T.; ABE, K.; KURODA, M.; ARAI, S.; OKAMURA, R.; NEGI, A.; MAEDA, H. Antiviral effect of oryzacystatin, a proteinase inhibitor in rice, against herpes simplex virus type 1 in vitro and in vivo. **Antimicrob Agents Chemother**. V. 39(4), p.846-9, 1995.



- APERS, S.; BARONIKOVA, S.; SINDAMBIWE, J.B.; WITVROUW, M.; DE CLERCQ, E.; VANDEN BERGHE, D.; VAN MARCK, E.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L. Antiviral, haemolytic and molluscicidal activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*: establishment of structure-activity relationships. **Planta Medica**. v. 67, p. 528–532, 2000.
- ASANO, J.; CHIBA, K.; TADA, M.; YOSHII, T. Antiviral activity of lignans and their glycosides from *Justicia procumbens*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 713-717, 1996.
- BADAEV, F.A. Antiviral activity of aqueous extracts from certain plants, **Veterinaria**. v. 49, p. 42-44, 1973.
- BALUNAS, M.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants, **Life Science**. v. 78, p. 431-441, 2005.
- BARILE, F.A. Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanism and methods. **Boca Raton : CRC**, 1994.
- BECKER, Y. Antiviral agents from natural sources, **Pharmacology Therapy**, v. 10, p. 119-159, 1980.
- BENENCIA, F.; COURREGES, M.C. Antiviral activity of sandalwood oil against herpes simplex viruses-1 and-2. **Phytomedicine**, v.6, p.119-123, 1999.
- BETANCUR-GALVIS, L.; ZULUAGA, C.; ARNO, M.; GONZALEZ, M.A.; ZARAGOZA, R.J. Structure-activity relationship of in vitro antiviral and cytotoxic activity of semisynthetic analogues of scopadulane diterpenes. **Journal of Natural Products**, v. 64, p.1318-1321, 2001.
- BETANCUR-GALVIS, L.A.; MORALES, G.E.; FORERO, J.E.; ROLDAN, J. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the *Euphorbia* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 541-546, 2002.
- BETTEGA, J.M.R. **Avaliação da atividade antiviral de extratos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam) DC., Astereceae – Marcela**, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.
- BOGDANOVA, N.S.; NIKOLAEVA, I.S.; SHCHERBAKOVA, L.I.; TOLSTOVA, T.I.; MOSKALENKO, N.I.U.; PERSHIN, G.N. Study of antiviral properties of *Calendula officinalis*. **Farmakol Toksikol**. v. 33, p. 349-355, 1970.
- BOURNE, N.; STANBERRY, L.R.; KERN, E.R.; HOLAN, G.; MATTHEWS, B.; BERNSTEIN, D.I. Dendrimers, a new class of candidate topical microbicides with activity against *herpes simplex virus* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 2471-2474, 2000

- BRACESCO, N.; DELL, M.; ROCHA, A.; BEHTASH, S.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A.; NUNES, E. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. **J Altern Complement Med.** v. 9, p. 379-387, 2003.
- BRADY, R.C.; BERNSTEIN, D.J. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**, v. 61, p. 73-81, 2004.
- BURLESON, F.G.; CHAMBERS, T.M.; WIEDBRAUK, D.L. **Virology**: a laboratory manual. San Diego: Academic, p.250, 1992.
- CALLE, M.; CABALLERO, J.D. Anti-herpes and anti-aphtha effects of *Spilanthes americana* (Chisaca). **Rev Fed Odontol Colomb**, v. 24, p. 59-66, 1977.
- CARLUCCI, M.J.; CIANCIA, M.; MATULEWICZ, M.C.; CEREZO, A.S.; DAMONTE, E.B.. Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. **Antiviral Research**, v. 43(2), 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.
- CARRIEL, M.C. **Triagem da potencial atividade antiviral de peptídeos antimicrobianos e da hemolinfa de ostras**, 92f, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- CASSADY, K.A.; WHITLEY, R.J. New therapeutic approaches to the alphaherpesvirus infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.39, p. 119-128, 1997.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. In: **Plantas medicinais sob a ótica da Química medicinal moderna**. Chapecó: Agros. P.45, 2001.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, p. 99-105, 1998.
- CLEMENTS, J.B.; TIMBURY, M.C.; GRIFFITHS, P.D. Herpesviridae. In: COLLIER, L.H.; TYMBURY, M.C. (eds.) **Topley & Wilson's. Principles of Bacteriology, virology and immunity**, 8 ed., v.4. p. 415-429, London: Edward Arnold, 1990.
- CLIFFORD, M.N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J.R. Chlorogenic acids and Purine Contents of Mate (*Ilex paraguariensis*) Leaf and Beverage. **Food Chem.** v. 35, p. 13-21, 1990.
- CHARLTON, J.L. Antiviral activity of lignans. **Journal of Natural Products**, v.61, p.1447-1451, 1998.

- CHÁVEZ, J. H. **Avaliação da atividade anti-rábica *in vitro* de compostos fenólicos sintéticos**. 2005, 114p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia -Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- CHE, C.T. Plants as a source of potential antiviral agents. In: WAGNER, H.; FARNSWORTH, N.R. (eds.) **Economic and Medicinal Plants Research**, v. 5. London: Academic, p. 167- 251, 1991.
- CHENG, H.Y.; LIN, T.C.; YANG, C.M.; WANG, K.C.; LIN, L.T.; LIN, C.C.; Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits both virus entry and late stage of herpes simplex virus type 2 infection *in vitro*. **Antimicrobiology Chemotherapy**, v.53, p. 577-583, 2004.
- CHIANG, L.C.; CHIANG, W., CHANG, 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.
- CHOPPIN, P. W.; Infectious agents and host responses. **Trans. Assoc. Am. Physicians.**, v. 99, p. ccxii-ccxxx, 1986.
- CHU. K.; CUTLER, H.G. **Natural products as antiviral agents**. Plenum Press. New York and London, p. 279, 1992,
- COELHO, G.C.; ATHAYDE, M.L.; SCHENKEL, E.P. Methylxanthines of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. Var. *vestita* Loes. and var. *paraguariensis*. **Rev. Bras. Ciências Farm.** v. 37, p.153–158, 2001.
- COHEN, R.A.; KUCERA, L.S.; HERRMANN, E.C. Jr. Antiviral activity of *Melissa officinalis* (lemon balm) extract. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 117, p. 431-434, 1964.
- COLBERE, F.; L'herpès simplex: structure, replication et biologie. **Bulletin de L'institut Pasteur**. V. 73, p. 203-254. 1975.
- CRUZ, G.L.Dicionário das plantas úteis do Brasil, 2.ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 1982.
- DA SILVA, A.G. Propriedades gerais dos herpesvirus. In: LUPI, O.; SDA SILVA, A.G.; PEREIRA JR, A.C. (Org). **Herpes: clinica, diagnóstico e tratamento**, p. 1-14, Rio de Janeiro: Medsi, 2000.
- DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 445-459, 1999.
- DE CLERCQ, E. Strategies in the design of antiviral drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, p. 13-25, 2002.

- DE CLERCQ, E.; Recent highlights in the development of new antiviral drugs. **Current Opinion in Microbiology**. v. 8, p. 552–560. 2005.
- DE JALON, E.G.; BLANCO-PRIETO, M.J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. Increased efficacy of acyclovir-loaded microparticles against herpes simplex virus type 1 in cell culture. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 183-187, 2003
- DE TOMASI, N.; CONTI, C.; STEIN, M.L.; PIZZA, C. Structure and in vitro antiviral activity of triterpenoid saponins from *Calendula arvensis*. **Planta medica**, v. 57, p. 250-253, 1991.
- DEIG, E.F.; EHRESMANN, D.W.; HATCH, M.T.; RIEDLINGER, D.J. Inhibition of herpesvirus replication by marine algae extracts. **Antimicrob Agents Chemother**. v.6, p.524-525, 1974.
- 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 insularis* essential oil. **Antiviral Research**, v. 68, p. 177-185, 2000.
- DENIZOT, F.; LANG, R.; Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 89. p.271-277, 1986.
- DERMARDEROSIAN, A., BEUTLER, J.A. (Eds.). The Review of Natural Products®, Third Edition. Facts and Comparisons®: St. Louis. 2002.
- DEY, P. M.; HARBONE, J. B. Methods in plant biochemistry. San Diego: Academic. v. 6, 1991.
- DIMMOCK, N.J.; Review article initial stages in infection with animal viruses. **J Gen Virol**. v. 59, p. 1-22, 1982.
- DU, J.; HE, Z.D.; JIANG, R.W.; YE, W.C.; XU, H.X.; BUT, P.P.H. Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. **Phytochemistry**, v. 62, p. 1235-1238, 2003.
- DULBECCO R, VOGT M. Some problems of animal virology as studied by the plaque technique. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**; v. 18, p. 273–279, 1953.
- ELISABETSKI, E. New directions in ethnopharmacology. **Journal of ethnobiology**, v. 6, p. 121-128, 1986.
- ELOFF, J.N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? **J Ethnopharmacol**. v. 60, p. 1-8, 1998.
- ERDELMEIER, C.A.; CINATL, J.JR; RABENAU, H.; DOERR, H.W.; BIBER, A.; KOCH, E. Antiviral and antiphlogistic activities of *Hamamelis virginiana* bark. **Planta Medica**, v. 62, p.241-245, 1996.

ESQUENAZI, D.; WIGG, M.D.; MIRANDA, M.M.F.S.; RODRIGUES, H.M.; TOSTES, J.B.F.; ROZENTAL, S.; SILVA, A.J.R.; ALVIANO, C.S. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 647-652, 2002.

EVTUSHENKO, A.I. Antiviral activity of *Kalanchoe sap.* **Mikrobiol Zh.**, v. 44, p. 79-81, 1982.

FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health perspectives**, v. 109, p. 69-75. 2001.

FISCHER, G.; GARDELL, S.; JORPES, E. On the chemical nature of acerin and the virucidal and antiviral effects of some vegetable tannins. **Experientia**, v. 10, p. 329-330, 1954.

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GIBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G.. Phenolic compounds in seven south american *Ilex* species. **Fitoterapia**, v.72, p. 774-778, 2001.

FIELDS, B. N. Fundamental Virology (Eds.). Lippincott-Raven Press: Philadelphia, 1998

FREITAS, A. M. **Avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral de extratos de *Araucária angutifolia* (Bert.) O. Kuntze, Araucariae**, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

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

FUKUCHI, K.; SAKAGAMI, H.; OKUDA, T.; HATANO, T.; TANUMA, S.; KITAJIMA, K.; INOUE, Y.; INOUE, S.; ICHIKAWA, S.; NONOYAMA, M.; Inhibition of herpes simplex virus infection by tannins and related compounds. **Antiviral Res**, v.11, p.285-297, 1989.

GALAGOVSKY KURMAN, L. Química orgânica: fundamentos teórico-práticos para el laboratorio. Buenos Aires, 1995.

GALT, C.; DARGAN, D.J.; SUBAK-SHARPE.J.H. *In vitro* studies of the antiviral range of cicloxolone sodium and identification of cell lines tolerant to the drug. **Antivir. Chem. Chemother**, v.1, p. 115-121, 1990.

GHISALBERTI, E.L.; ROWLAND ,C.Y. Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. **Natural Products**. v.56, p. 1799-1804, 1993.

GILANI, A.H.; RAHMAN, A.U. Trends in ethnopharmacology. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, p. 43-49, 2005.

GIRARD, M.; HIRTH, L. **Virologie Moleculaire**. 2.ed. Paris: Doin, p. 617, 1989.

- GNOATTO, S. C.B., SCHENKEL, E. P.; BASSANI V. L. HPLC Method to Assay Total Saponins in *Ilex paraguariensis* Aqueous Extract. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, p. 723-726, 2005.
- GORZALCZANY, S.; FILIP, R.; ALONSO, M.R.; MINO, J.; FERRARO, G.E.; ACEVEDO, C. Choleric effect and intestinal propulsion of 'mate' (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. **J Ethnopharmacol.** V. 75, p. 291-294, 2001.
- GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; TAKETA, A.T.C.; SCHENKEL, E.P. Triterpenoids saponins from mate, *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 438-441, 1995.
- GOSMANN, G. **Saponinas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate)**, 1989, 106 p, Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós Graduação em Farmácia - Porto Alegre – Universidade Federal do rio Grande do Sul.
- GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P.; SELIGMANN, O. A new saponin from Mate, *Ilex paraguariensis*. **Journal Natural Products**. v. 52, p. 1367-70, 1989.
- GOSSE, B.; GNABRE, J.; BATES, R.B; DICUS, C.W.; NAKKIEW, P.; HUANG, R.C. Antiviral saponinas from *Tieghemella heckelii*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1942-1944, 2002.
- GOTTLIEB, O.; KAPLAN, M.A. Das plantas medicinais aos fármacos naturais, **Ciência hoje**, v. 15, p. 51-54, 1993.
- GRAHAM, H.N. Mate. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 158, p.179-183, 1984.
- GREEN, R. H. Inhibition of multiplication of Influenza virus by extracts of tea. **Proceedings Society of Experimental Biology**, v.71, p.84-85, 1949.
- GUDEJ, J., TOMCZYK, M. Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus* L. species. **Arch. Pharm. Res.**, v. 27, p.1114-1119, 2004.
- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O.; REIS, M.S.; SCHIMIDT, W. Agriculture, Biodiversity, and “Appropriate Biotechnologies” in Brazil. **Ciência e Cultura**, V.50, p. 408-416, 1998.
- GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. **Life Science**, v.72, p. 279-292, 2002.
- GULAKOWSKI, R.J.; McMAHON, J.B.; BUCHEIT, R.W.Jr.; GUSTAFSON, K.R.;BOYD, M.R. Antiviral Research, v. 33, p. 87-97, 1997.

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

HASUI, M.; MATSUDA, M.; OKUTANI, K.; SHIGETA, S. In vitro antiviral activities of sulfated polysaccharides from a marine microalga (*Cochlodinium polykrikoides*) against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17, p. 293-7, 1995.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; MORITA, N. Mechanism of action of the antiherpesvirus biflavone ginkgetin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 36, p. 1890-3, 1992.

HAYASKI, K.; HAYASKI, H.; HIRAOKA, N.; IKESHIRO, Y. Inhibitory activity of soyasaponin II on virus replication *in vitro*. **Planta Medica**, v. 63, p. 102-105, 1997.

HAYASHI, K.; 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.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J.L.; RODRIGUEZ, S. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. **Planta medica**. v. 63, p. 2-10, 1997.

HOUGHTON, P.J.; RAMAN, A. Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts. London: Chapman & Hall. 1998

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

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

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

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

IKEDA, T.; ANDO, J.; MIYAZONO, A.; ZHU, X.H.; TSUMAGARI, H.; NOHARA, T.; YOKOMIZO, K.; UYEDA, M. Anti-herpes virus activity of Solanum steroidal glycosides. **Biological pharmaceutical bulletin**. v. 23 , p. 363-364, 2000.

IKEDA, T.; YOKOMIZO, K.; OKAWA, M.; TSUCHIHASHI, R.; KINJO, J.; NOHARA, T.; UYEDA, M. Anti-herpes virus type 1 activity of oleanane-type triterpenoids, **Biol. Pharm. Bull.**, V. 28, p.1779-1781, 2005.

INTERNATIONAL Conference on Harmonization. 4. *Closing Report*. Brussels, 1997

- KANE, C. J.M.; MENNA, J.H.; SUNG, C. C.; YEH, Y. C. Methyl gallate, methyl-3,4,5-trihydroxy-benzoate, is a potent and highly specific inhibitor of herpes simplex virus *in vitro*. II. Antiviral activity of methyl gallate and its derivatives. **Bioscience Reports**, v.8, p.95-101, 1988.
- KANEKO, H.; KEIICHIRO, K.; MORI, S.; SHIGETA, S. antiviral activity of NMSO3 against adenovirus *in vitro*. **Antiviral Research**, v. 52, p. 281-288, 2001.
- KERNAN, M.R; SENDL, A.; CHEN, J.L.; JOLAD, S.D.; BLANC, P.; MURPHY, J.T.; STODDART, C.A.; NANAKORN, W.; BALICK, M.J.; ROZHON, E.J. Two new lignans with activity against influenza virus from the medicinal plant *Rhinacanthus nasutus*. **Journal Natural Products**, v. 60, p.635-637, 1997.
- KHAN M. T. H.; ATHER A.; THOMPSON K. D.; GAMBARI R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral Research** V. 67p.107–119. 2005
- KLOCKING, R.; HELBIG, B.; SCHOTZ, G.; SCHAKE, M.; WUTZLER, P. Anti-HSV-1 activity of synthetic humic acid-like polymers derived from p-diphenolic starting compounds. **Antivir. Chem. Chemoter.**, v. 13, p. 241-249, 2002.
- 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.
- KONOSHIMA, T.; YASUDA, I.; KASHIWADA, Y.; COSENTINO, L.M.; LEE, K.H. Anti-AIDS agents, 21. Triterpenoid saponins as anti-HIV principles from fruits of *Gleditsia japonica* and *Gymnocladus chinensis*, and a structure-activity correlation. **J. Nat. Prod.**, v. 58, p. 1372-1377, 1995.
- KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J.I. Virus inactivation by grapes and wines. **Appl Environ Microbiol.** v. 32, p. 757-763, 1976 .
- KORZENIEWSKI, C.; CALLEWAERT, D.M. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v.64, p.313-320, 1983.
- KRAEMER, K.H., TAKETA, A.T.C. , SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G. AND GUILLAUME, D. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemistry**, v. 42, p.1119-1122, 1996.
- KUCERA, L.S.; COHEN, R.A.; HERRMANN, E.C. JR. Antiviral activities of extracts of the lemon balm plant. **Ann N Y Acad Sci.** v.130, p. 474-482, 1965.
- KUO, Y.C.; CHEN, C.C.; TSAI, W.J.; HO, Y.H. Regulation of herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by *Psychothria serpens*: relationship to gene expression, DNA replication, and protein synthesis. **Antiviral research**, v. 51, p. 95-109, 2001.



- KUROKAWA, M., BASNET, P., OHSUGI, M., HOZUMI, T., KADOTA, S., NAMBA, T., KAWANA, T., SHIRAKI, K.. Anti-herpes simplex virus activity of moronic acid purified from *Rhus javanica* in vitro and in vivo. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 289, p. 72–78, 1999.
- LI, Y.; BUT, P.P.H.; OOI, V.E.C. Antiviral activity and mode of action of caffeoylquinic acids from *Schefflera heptaphylla* (L.) Frodin. **Antiviral Research**, v. 68, p.1-9, 2005.
- LI, B.Q.; FU, T.; DONGYAN, Y.; MIKOVITS, J.A.; RUSCETTI, F.W.; WANG, J.M. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at level of viral entry. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 276, p.534-538, 2000.
- LI, X.P.; YU, J.; LUO, J.Y.; LI, H.S.; HAN, F.J.; CHEN, X.G.; HU, Z.D. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid, protocatechuic acid protocatechuic aldehyde in Chinese herbal preparation by RP-HPLC. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. V. 52, p. 1251-1254, 2004.
- LIKHITWITAYAWUID, K.; SRITULARAK, B.; BENCHANAK, K.; LIPIPUM, V.; MATHEW, J.; SCHINAZI, R.F. Phenolics with antiviral activity from *Millettia erythrocalyx* and *Artocarpus lakoocha*. **Natural Products Research**, v.2, p.177-82, 2005
- 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 bioflavonoids. **Planta Médica**, v.65, p. 120-125, 1999.
- LIU, Y.; PETERSON, D. A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **Journal of Neurochemistry**, v 69, p.581-593, 1997.
- LIU, Y.; SCHUBERT, D. Cytotoxic Amyloid Peptides Inhibit Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction by Enhancing MTT Formazan Excitotoxicity. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, p. 2285-2293, 1997.
- LIU, K.; LIN, M.T.; LEE, S.S.; CHIOU, J.F.; REN, S.; LIEN, E.J. Antiviral tannins from two *Phyllanthus* species. **Planta Medica**, v.65, p.43-46, 1999.
- LUCIW, P.A. Human immunodeficiency viruses and their replication. In: Fundamental Virology. Fields, B.N.; Knipe, D.M.; Howley, P.M. (Eds.). Lippincott-Raven Press: Philadelphia, p. 845-916, 1996.
- LUPI, O.; PEREIRA, JR, A.C. herpes simples. In: LUPI, O.; DA SILVA, A.G.; FERREIRA JR, A.C. **Herpes – clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Medsi, p. 43-70, 2000.

- MADUREIRA, A.M., ASCENSO, J.R., VALDEIRA, L., DUARTE, A., FRADE, J.P., FREITAS, G., FERREIRA, M.J. Evaluation of the antiviral and antimicrobial activities of triterpenes isolated from *Euphorbia segetalis*. **Nat. Prod. Res.** v.17, p. 375–380, 2003.
- MARASCHIN, M.; VERPOOTE, R. In: **Plantas medicinais sob a ótica da Química medicinal moderna** Eds Calixto, J.B.; Yunes, R.A. Chapecó: editora Argos. P. 147, 2001
- MARLES, R.J.; HUDSON, J.B.; GRAHAM, E.A.; et al. Structure-activity studies of photoactivated antiviral and cytotoxic tricyclic thiophenes. **Phytochem. Photobiol.**, v. 56, p. 479-487, 1992.
- MARTIN, K. W.; ERNST, E. Antiviral agents from plants and herbs: a systematic review. **Antiviral Therapy**, **V. 8**, p.77-90, 2003.
- MARTINET, A.; NDJOKO, K.; TERREAUX, C.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K.; SCHUTZ, Y. NMR and LC-MSn characterisation of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*. **Phytochem Anal.** v. 12, p. 48-52, 2001.
- MAY, G.; WILLUHN, G. Antiviral effect of aqueous plant extracts in tissue culture. **Arzneimittelforschung.** v. 28, p. 1-7, 1978.
- MAZZAFERA, P. Caffeine, theobromine and theophylline distribution in *Ilex paraguariensis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal.** v. 6, p. 149-151, 1994.
- MCCORMICK, J. L.; MCKEE, T. C.; CARDELLINA, J.H.; BOYD, M.R. HIV inhibitory natural products. 26 Quinoline alkaloids from *Euodia roxburghiana*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 469-471, 1996.
- MEERBACH A.; NEYTS J.; BALZARINI J.; HELBIG B.; DE CLERCQ E.; WUTZLER P. *In vitro* activity of polyhydroxycarboxylates against herpesviruses and HIV. **Antiviral Chemistry Chemotherapy**, v. 12, p.337-345, 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 Celular & Developmental Biology: Animal**, v. 36, p.639-453, 2000.
- MENGONI F.; LICHTNER M.; BATTINELLI L.; MARZI M.; MASTROIANNI C.M.; VULLO V.; MAZZANTI G. *In vitro* anti-HIV activity of oleanolic acid on infected human mononuclear cells. **Planta Medica** v. 68, p. 111–114, 2002.
- MICHELINI, F.M.; RAMIREZ, J.A.; BERRA, A.; GALAGOVSKY L. R.; ALCHE L. E. *In vitro* and *in vivo* antiherpetic activity of three new synthetic brassinosteroid analogues **Steroids** v. 69 p. 713–720. 2004.
- MIDDLETON, E., KANDASWAMI, C., THEOHARIDES, T.C.,. The effects of plants flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol. Rev.** v. 52, p. 673-751. 2000.

- MONTANHA, J.A. Estudo químico e biológico das saponinas de *Ilex paraguariensis* St. Hil. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Farmácia da UFRGS, 85 p. Dissertação de Mestrado em Farmácia, 1990.
- MONTANHA, J.A.; AMOROS, M.; BOUSTIE, J.; GIRRE, L.; Anti-herpes activity of aporphine alkaloids. **Planta Medica.**, v. 61, p. 419-424, 1995.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation na cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods.** v. 65. p. 55-63, 1983.
- MOSIMANN, A. L. P. ; WILHELM FILHO, D. ; SILVA, E. L. . Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* (mate) attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Biofactors**, Tóquio - Japão, v. In press, 2005.
- 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,, p.471-495, 1977
- NIELSEN, J. Combinatorial synthesis of natural products. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 297-305, 2002.
- OJWANG, J.O.; WANG, Y.H.; WYDE, P.R.; FISCHER, N.H.; SCHUEHLY, W.; APPLEMAN, J.R.; HINDS, S.; SHIMASAKI, C.D. ANovel inhibitor of respiratory syncytial virus isolated from ethnobotanicals. **Antiviral Research.** v.68, p. 163-172. 2005.
- PALOMINO, S.S., ABAD, M.J., BEDOYA, L.M., GARCIA, J., GONZALES, E., CHIRIBOGA, X., BERMEJO, P., ALCAMI, J. Screening of South American plants against human immunodeficiency virus: preliminary fractionation of aqueous extract from *Baccharis*. **Biol. Pharm. Bull.** v. 25, p. 1147-1150, 2005.
- PAUWELS, R.; BALZARINI, J.; BABA, M.; SNOECK, R.; SCHOLS, D.; HERDEWIJN, P.; DESMYTER, J.; DE CLERCQ, E. Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. **J Virol Methods.** v. 20, p. 309-321, 1988.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.
- PIO-CORRÊA. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, v. 6. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926-1979.
- POTT, A.; POTT, V. Plantas do Pantanal. EMBRAPA-CPAP, p. 187, 1994.
- 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. **Clin Dermatol.** v.20, p. 474-80, 2002.

REGINATTO, F. H.; ATHAYDE, M.L.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species –caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 10, p. 443-446, 1999.

REGINATTO, F.H., KAUFFMANN, C., SCHRIPSEMA, J., GUILLAUME, D., GOSMANN, G., SCHENKEL, E.P.. Steroidal and triterpenoidal glucosides from *Passiflora alata*. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 12, p. 32-36, 2001.

RICE, W.G.; BADER, J.P. Discovery and in vitro development of AIDS antiviral drugs as biopharmaceuticals, **Advances in pharmacology.** v. 33, p. 389-438, 1995.

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.

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

ROIZMAN, B.; KNIFE, D. Herpes simplex viruses and their replication. In: KNIFE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D.; LAMB, R.; MARTIN, M.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. (Eds.). **Fields Virology**, 4 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven,. p. 2399-2459, 2001.

SÁNCHEZ, I.; GÓMEZ-GARIBAY, F.; TABOADA, J.; RUIZ, B.H. Antiviral Effect of Flavonoids on the Dengue Vírus. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 89-92, 2000.

SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F.; SALATINO, A. Foliar flavonóides of *Lafoensia* (*Lythraceae*). **Biochem. System. Ecol.**, v. 28, p. 487-488, 2000.

SANTOS, O.L.R.; SILVA, A.G.; PEREIRA JUNIOR, A.C. **Herpes - clínica, diagnóstico e tratamento**, Rio de Janeiro: Medisi, 278 p., 2000.

SAVI, L. A. **Avaliação da genotoxicidade e das atividades anti-herpética e antioxidante de compostos fenólicos**, 2004 128f, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SAVI, L.A.; LEAL, P.C.; VIEIRA, T. O.; ROSSO, R.; NUNES, R.J.; YUNES, R.A.; PASA-CRECYNSKI, T.B.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C.M.O. Evaluation of Anti-herpetic and Antioxidant Activities, and Cytotoxic and Genotoxic Effects of Synthetic Alkyl-Esters of Gallic Acid. **Arzneimittelforschung**, v.55, p.66-75, 2005.

SCARPATI, M. L.; GUIISO, M. Structure of the three Dicaffeoyl-quinic acids of Coffee (Isochlorogenic Acid) **Tetrahedron Lett.** v.39, p. 2851-53, 1964.

- SCHENKEL, E.P.; MONTANHA, J.A.; GOSMANN, G. Triterpene saponins from mate, *Ilex paraguariensis*, **Exp Med Biol.** v. 405, p. 47-56, 1996.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MONTANHA, J.A.; HEIZMANN, B.M. ATHAYDE, M.L.; TAKETA, A.T.C.; PIRES, V.; GUILLAUME, D. *Ciência e cultura*, v. 49, p. 359, 1997.
- SCHIMITT, E.; ROMERO, A.L.; OLIVEIRA, C.M.A.; SILVA, C.C. Triterpeno e esteróide glicosilado de *Sloanea guianensis* (Elaeocarpaceae). XI Encontro de Química da Região Sul (XI SBQSUL), QO-79, Pelotas, 2003.
- SCHINELLA, G. R.; TROIANI, G.; DAVILA, V.; DE BUSCHIAZZO, P. M.; TOURNIER, H. A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 269, p. 357-360, 2000.
- SENIOR, K. Pharmaceuticals from plants: promises and progress, **Molecular Medicine Today.** v. 2, p. 60-64, 1996
- SERKEDJIEVA, J.,. Combined antiinfluenza virus activity of Flos verbasci infusion and amantadine derivatives. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 571-574, 2000.
- SERKEDJIEVA, J.; IVANCHEVA, S. Antiherpes virus of extract from the *Geranium sanguineum* L **Journal of Ethnopharmacology.** V.64, p. 59-68, 1999.
- SERKEDJIEVA, J.; HAY, A. J. In vitro anti-influenza virus activity of a plant preparation from *Geranium sanguineum* L. **Antiviral Research**, v. 37, p. 121-130, 1998.
- SHAHAT, A.A.; COS, P.; DE BRUYNE., APERS, S.; HAMMOUDA, F.M.; ISMAIL, S.I.; AZZAM, S.; CLAEYS, M.; GOOVAERTS, E.; PEITERS, L.; VANDEN BERGHE, D. VLIETINCK, A.J. Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sianica*. **Planta Medica**, v. 68, p.539-541, 2002.
- SHIROBOKOV, V.P.; EVTUSHENKO, A.I.; LAPCHIK, V.F.; SHIROBOKOVA, D.N.; SUPTTEL' E.A. Antiviral activity of representatives of the family Crassulaceae, **Antibiotiki.** V. 26, p. 897-900, 1981.
- SIDWELL, R.W. Determination of antiviral activity. **Drugs Pharmaceutical Science**, v.27, p. 433-480, 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, IC<sub>50</sub> – values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 813-823, 1995.
- SIMOES, C.M.; FALKENBERG, M.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Antiviral activity of south Brazilian medicinal plant extracts, **Phytomedicine.**V. 6, p. 205-214, 1999.

SIMÕES, C.M.O.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 323-328, 1999.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre, UFRGS/UFSC, 1999.

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 Natural Products**. V. 61, p. 585-590, 1998

SILVA, A.C. **Avaliação da Citotoxicidade e Triagem da Potencial Antiviral de Produtos Marinhos: esponjas coletadas na costa brasileira e compostos de organismos marinhos**, 2005, Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-graduação em Farmácia – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

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

SNOECK, R.; Antiviral therapy of herpes simplex. **Int. J. of Antimic. Agents**. v. 16, p. 157–159, 2000

SOKMEN, M.; ANGELOVA, M.; KRUMOVA, E.; PASHOVA, S.; IVANCHEVA, S.; SOKMEND, A.; SERKEDJIEVA J., In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. **Life Sciences** v. 76, p. 2981–2993. 2005.

SÓLON S.; LOPES L.; SOUZA JR, P.T.; SCHMEDA-HIRSCHMANN G. Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. **J. Ethnopharmacol**. v. 72, p. 173-178, 2000.

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

SPEAR P. G.; MANOJ S.; YOON M.; JOGGER C. R.; ZAGO A.; MYSCOFSKI D.; Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. **Virology** V. 344 p.17 – 24. 2006.

STRAUSS, E.G.; STRAUSS, J.H.; LEVINE, A.J. Virus evolution. In: Fundamental Virology. Fields, B.N.; Knipe, D.M.; Howley, P.M. (Eds.). Lippincott-Raven Press: Philadelphia, p. 141-159, 1996.

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.

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.

SUGANDA, X.V.; AMOROS, X.V.; GIRRE, X.V.; FAUCONNIER, X.V. Inhibitory effects of some crude and semi-purified extracts of indigenous French plants on the multiplication of human herpesvirus 1 and poliovirus 2 in cell culture **Natural Products**, v. 46, p. 626-632, 1983.

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Analytical Method Development and Validation. Marcel Dekker: New York. 1997

TAKEMOTO, K.K.; LIEBHABER, H. Virus-polysaccharide interactions. I. An agar polysaccharide determining plaque morphology of EMC virus. **Virology**, v, 14, p. 456-62, 1961.

TAKETA, A.T.; SCHMITTMANN-SCHLAGER, T.; GUILLAUME, D.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P.. Triterpenoid glycosides and a triterpene from *Ilex brevicuspis*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 901-904, 2000.

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.

THE UNITED States Pharmacopeia. 25.ed., Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2002. 4. Suppl. p. 3260-3262

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

TURAN, K.; NAGATA, K.; KURU, A. Antiviral effect of *Sanicula europaea* L. leaves extract on Influenza virus-infected cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.225, p.22-26, 1996.

VACIK, J.P.; DAVIS, W.B.; KELLING, C.S.; SCHERMEISTER, L.J.; SCHIPPER, I.A. Current status of studies on the antiviral activity of a water-soluble extract from narcissus bulb against herpes viruses. **Adv Ophthalmol**, V. 38, p. 281-287, 1979.

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

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. **J Pharm Pharmacol**, v. 52, p. 253-262, 2000.

VINCENT. D.; Antiviral plants. *Presse Med*. v.61, p. 417, 1953.

VISTICA, D. T.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; PITTMAN, A.; BOYD, M.R. Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production. **Cancer Research**, v. 51, p. 2515-2520, 1991.

- VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D. A.; Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. (Ed.). **Methods in Plant Biochemistry**. London: Academic, v. 6, p. 47-69. 1991
- VLIETINCK, A.J.; DE BRUYNE, T.; VANDEN BERGHE, D. A. Plant substances as antiviral agents. **Current Organic Chemistry**, v. 1, p. 307-344, 1997.
- VLIETINCK, A.J.; VANDEN BERGHE, D. A. Leads for Antivirals from traditional medicines. In: PREBBERGASTM, H.D.V.; ETKIN, N.L.; HARRIS, D.R.; HOUGHTON, P.J. (Ed.). **Plants for Food and Medicine**. London: Royal Botanic Gardens, p. 333-344, 1998.
- WAGNER, H.; BLADT, S. Flavonoid drugs including ginkgo biloba and echinaceae species. In: **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2ed. Munich: Springer, 1996. 210, 362.
- WEN, D.; LI, C.; DI, H.; LIAO, Y.; LIU, H. A Universal HPLC method for the determination of phenolic acids in compound herbal medicines, **Journal of agricultura and food chemistry**. v, 53, p.6624-6629, 2005.
- WHITE, D.O.; FENNER, F.J. **Medical Virology**. 4.ed. San Diego: Academic, 603 p. 1994.
- WILLIAMSON, E.M.; **Phytomedicine**. P. 401, 2001.
- XU, Z.X.; QU, F.Z.; YU, L.; LI, L.Q.; LIU, Y.Y. Antiviral effect of extract of *Luffa cylindrica* sprout in vivo, **Fitoterapia**, V.6, p.12-16, 1984.
- YASIN, B.; PANG, M.; TURNER, J. S.; CHO, Y.; DINH, N-N.; WARING, A. J.; LEHRER, R. I.; WAGAR E. A. Evaluation of the inactivation of infectious herpes simplex virus by host-defense peptides. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 19, p. 187-194, 2000.
- YOSHIDA, T.; ITO, H., HATANO, T.; KURATA, M., NAKANISHI, T.; INADA, A.; MURATA, H.; INATOMI, H.; New hydrolysable tannins, shephagenins A and B, from *Shepherdia argentea* as HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. **Chem. Pharmaceutical Bul.** (Tokyo).v. 44, p.1436-1439, 1996.
- ZENEBE W, PECHANOVA O. Effects of red wine polyphenolic compounds on the cardiovascular system. **Bratisl Lek Listy**, v.103, p.159-165, 2002.



## **APÊNDICES**

## APÊNDICE 1

### Resultados obtidos na análise dos frutos de *Ilex paraguariensis*

Durante a realização desta dissertação, também foi testado o extrato bruto dos frutos de *Ilex paraguariensis*. Como dito anteriormente, o objetivo principal era realizar o fracionamento biomonitorado com o material-teste que tivesse apresentado melhores resultados; desta forma, os resultados obtidos com os frutos não foram mostrados anteriormente.

No entanto, a comparação entre os resultados obtidos, tanto nos ensaios de avaliação da atividade antiviral, quanto no isolamento e identificação de compostos fenólicos, evidenciou as diferenças existentes entre os frutos e folhas de *Ilex paraguariensis*, e permitiu maior sustentação da hipótese de que os ácidos fenólicos agem sinergicamente produzindo ação antiviral.

A tabela 1 mostra os resultados obtidos com o extrato bruto dos frutos de *Ilex paraguariensis*.

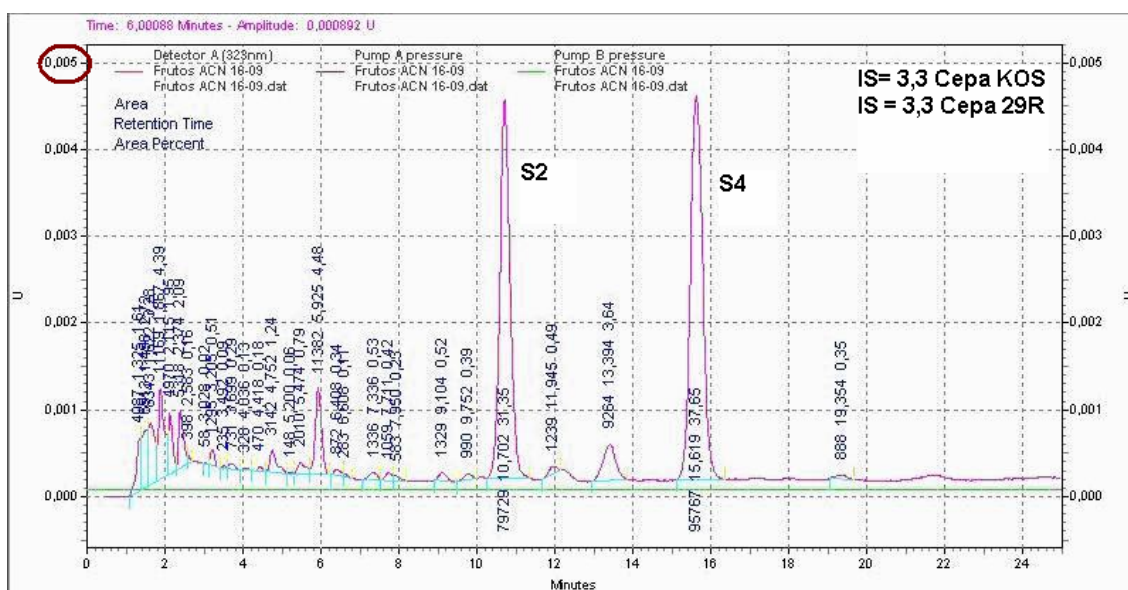
**Tabela 1:** Resultados de citotoxicidade e avaliação da potencial atividade anti-herpética do extrato bruto dos frutos de *Ilex paraguariensis*, obtidos pela técnica do MTT e diferentes estratégias metodológicas.

Frutos	Cito ( $\mu\text{g/mL}$ )	Pré-tratamento				Tratamento Simultâneo				Pós-tratamento			
		KOS		29R		KOS		29R		KOS		29R	
	VERO	CE <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	IS	CE <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	IS	CE <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	IS	CE <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	IS	CE <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	IS	CE <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	IS
	1526 $\pm$ 161	855 $\pm$ 125	1,8	730 $\pm$ 111	2,1	457 $\pm$ 73	3,3	469 $\pm$ 90	3,3	378 $\pm$ 100	4	407 $\pm$ 98	3,7

$$\text{IS} = \text{CC}_{50} / \text{CE}_{50}$$

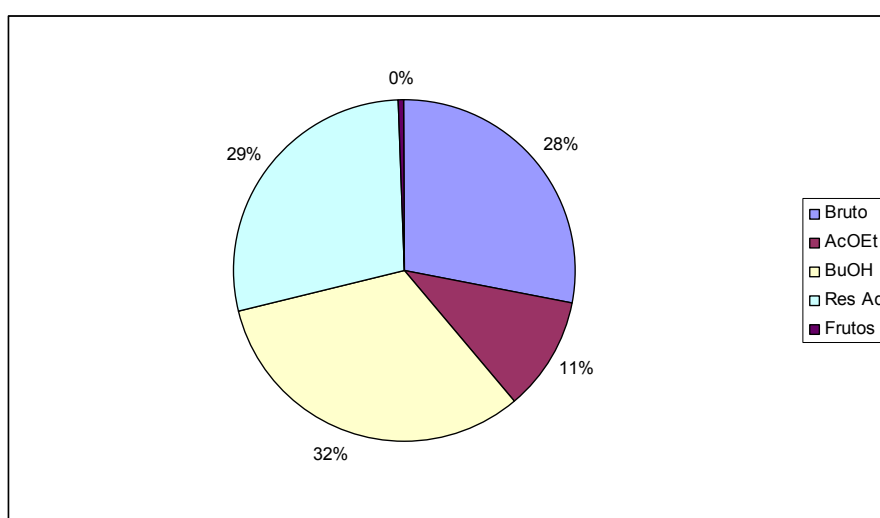
Como pode ser observado nesta tabela, o extrato dos frutos de *Ilex paraguariensis* apresentam baixa citotoxicidade ( $\text{CC}_{50} = 1.526 \mu\text{g/mL}$ ) e também baixa atividade antiviral, quando comparado aos demais materiais-teste, em todas as estratégias metodológicas usadas.

A análise do perfil cromatográfico do extrato bruto dos frutos de *Ilex paraguariensis* é mostrada na figura 1:



**Figura 1:** Perfil cromatográfico (CLAE) do extrato bruto dos frutos de *Ilex paraguariensis*. Condições cromatográficas: Fase móvel: [A: Acetonitrila; B:(Ácido acético 1%: MeOH - 95:5) (5:95 v/v)]. Fluxo: 0,8mL/min; Fase fixa: coluna RP-C18 Phenomenex® (150 x 4,6mm 5µm). Detecção: UV 323nm.

Como pode ser observado na figura 1, a quantidade de ácidos fenólicos nos frutos de *Ilex paraguariensis* é extremamente pequena (ver escala achurada em vermelho). Considerando-se a área total de fenólicos totais, e distribuindo-a para todas as amostras-teste, incluindo os frutos, este possui quantidade tão pequena que fornece uma percentagem de 0% (gráfico 1).



**Gráfico 1:** percentagem de fenólicos totais distribuídos nas amostras teste incluindo os frutos.

A análise destes resultados reforçam o indício de que os ácidos fenólicos são um dos responsáveis pela ação antiviral das folhas de *Ilex paraguariensis*, visto que esta diminuiu bastante (tabela 1) para os frutos, que possuem um ínfimo teor de ácidos fenólicos totais.