

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Análise química e avaliação da atividade antiviral de *Baccharis anomala*
D.C.**

CAROLINE RITA VENTURI

PORTO ALEGRE, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Análise química e avaliação da atividade antiviral de *Baccharis anomala*
D.C.**

Dissertação apresentada por **Caroline Rita Venturi** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Grace Gosmann

Co-orientador: Prof. Dr. Jarbas Alves Montanha

PORTO ALEGRE, 2009

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 22 de maio de 2009, perante a Comissão Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Amauri Simonetti
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki
Centro Universitário Feevale

Prof.^a Dr.^a Gilsane Lino von Poser
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

V469a Venturi, Caroline Rita
Análise química e avaliação da atividade antiviral de baccharis anômala D.C. / Caroline Rita Venturi. – Porto Alegre : UFRGS, 2009. – xvii, 77 p. : il., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Baccharis anomala. 2. Atividade antiviral. 3. Herpes simplex virus. I. Gosmann, Grace. II. Montanha, Jarbas Alves. III. Título.

CDU: 547.9:582.998.2

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Os procedimentos de preparação do material vegetal, obtenção e fracionamento dos extratos, bem como a caracterização química foram realizados no Laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A avaliação da atividade antiviral foi realizada no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da mesma Universidade. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.

Agradecimentos

A Deus, por ter me dado a vida.

Aos meus pais, Vilmar e Elizabeth, pelo incentivo, carinho e apoio em todos os momentos.

À minha irmã Vanessa e ao meu cunhado Fábio pela amizade e força sempre presentes.

Aos meus queridos avós, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo incentivo nesta caminhada.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Virologia e do Laboratório de Fitoquímica pelo apoio e coleguismo todos os dias.

À professora Dr^a. Grace Gosmann pela oportunidade de realizar o mestrado, apoio e confiança e pelos ensinamentos em cada etapa do trabalho.

Ao professor Dr. Jarbas Alves Montanha pela atenção e confiança durante todos os anos de pesquisa.

Ao professor Dr. Paulo Michel Roehle por disponibilizar o laboratório de Virologia, pelos ensinamentos e sugestões ao longo do trabalho.

Aos meus queridos amigos, que compreenderam que a ausência foi necessária.

A todas as pessoas que, de uma forma ou outra, me ajudaram a realizar este trabalho.

Índice de tabelas

Tabela 1. Classificação dos herpesvírus humanos	- 16 -
Tabela 2. Principais agentes antivirais utilizados contra o HSV	- 19 -
Tabela 3. Rendimento dos extratos aquoso e hidroetanólico de folhas de <i>Baccharis anomala</i>	- 39 -
Tabela 4. Rendimento do fracionamento do extrato aquoso com solventes de polaridade crescente em funil de separação	- 39 -
Tabela 5. Rendimento do fracionamento do extrato aquoso de folhas de <i>Baccharis anomala</i> por precipitação com etanol.....	- 40 -
Tabela 6. Rendimento do fracionamento da fração AQ PPT com etanol.....	- 41 -
Tabela 7. Rendimento do fracionamento da fração 4-5a obtida do fracionamento da fração AQ PPT	- 41 -
Tabela 8. Determinação de fenóis pela precipitação com proteínas.....	- 45 -
Tabela 9. Determinação de fenóis por catequina.....	- 46 -
Tabela 10. Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu com modificações.....	- 48 -
Tabela 11. Resultado da avaliação da citotoxicidade das amostras pela técnica a observação da alteração morfológica celular	- 52 -
Tabela 12. Demonstração da CC ₅₀ e CMNT pelo método de avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT) determinadas para as amostras menos tóxicas observadas pela técnica da alteração morfológica celular.....	- 54 -
Tabela 13. Representação das DE ₅₀ obtidas pelo método do das diluições-limite e os respectivos IS calculados para as amostras ativas	- 60 -

Índice de figuras

Figura 1. Morfologia dos herpesvírus	- 17 -
Figura 2. Foto da exsicata de <i>Baccharis anomala</i>	- 23 -
Figura 3. Organograma da purificação do extrato aquoso de <i>Baccharis anomala</i>	- 26 -
Figura 4. Cromatografia em camada delgada em gel de sílica.....	- 42 -
Figura 5. Cromatografia em camada delgada em gel de sílica.....	- 43 -
Figura 6. Cromatografia em camada delgada em celulose.....	- 44 -
Figura 7. Curva padrão do ácido gálico	- 47 -
Figura 8. Curva padrão da catequina	- 46 -
Figura 9. Curva padrão de ácido tânico	- 45 -
Figura 10. Monocamada de células Vero e efeito citopático do HSV-1	- 50 -
Figura 11. Gráficos da análise de regressão	- 53 -
Figura 12. Gráfico representando os resultados do teste de inibição do ECP (cepa ATCC-VR733 do HSV-1)	- 56 -
Figura 13. Gráfico representando os resultados do teste de inibição do ECP (cepa Aciclovir-resistente do HSV-1).....	- 58 -
Figura 14. Avaliação da atividade antiviral pelo método das diluições-limite para as amostras ativas contra a cepa ATCC-VR733 do HSV-1	- 59 -
Figura 15. Avaliação da atividade antiviral pelo método das diluições-limite para as amostras ativas contra a cepa Aciclovir-resistente do HSV-1	- 59 -
Figura 16. Gráficos representando a atividade virucida da amostra AQ PPT FR 4-5 para as cepas ATCC-VR733 e Aciclovir-resistente do HSV-1	- 62 -

Resumo

Análise química e avaliação da atividade antiviral de *Baccharis anomala* D.C.

Ocorrências comuns de infecções virais graves, aparecimento de cepas resistentes e um limitado número de quimioterápicos antivirais disponíveis mostram a necessidade da busca por novas substâncias ativas como antivirais. Muitas substâncias derivadas de plantas são candidatas ao estudo do seu potencial na terapia sistêmica e/ou profilaxia de herpes simplex virus 1 (HSV-1). Dentre as plantas com atividade antiviral, destacam-se as do gênero *Baccharis*. O objetivo geral do trabalho foi o estudo da composição química e avaliação da atividade antiviral das folhas de *Baccharis anomala* D.C. através de fracionamento bioguiado. Utilizando precipitação com etanol e fracionamento por permeação molecular foi possível separar os constituintes químicos ativos contra o vírus HSV-1 presentes no extrato aquoso de *Baccharis anomala*. Os testes de prospecção de constituintes químicos indicaram a presença de taninos, catequinas e saponinas no extrato aquoso da espécie. Através da análise cromatográfica foi possível detectar a presença de compostos fenólicos, utilizando-se coloração com cloreto férrico e reagente natural. Em relação à atividade antiviral, a fração ativa denominada AQ PPT FR 4-5 apresentou pronunciada atividade antiviral, inibindo a replicação viral em 100 % nas concentrações de 1,25, 0,625, 0,312 e 0,156 mg/mL, contra as cepas ATCC-VR733 e Aciclovir-resistente 29-R do HSV-1. Em relação ao mecanismo de ação, observou-se atividade virucida da fração AQ PPT FR 4-5. Estes resultados são muito importantes, pois, de acordo com a literatura, ainda não foram relatados compostos com atividade virucida úteis clinicamente para o tratamento de infecções por HSV-1. Conclui-se, portanto, que *Baccharis anomala* possui potente atividade antiviral contra o vírus HSV-1 e é promissora para estudos posteriores que visem ao isolamento, identificação e estudo do mecanismo de ação antiviral de compostos ativos da espécie, considerando a emergência de cepas resistentes e a necessidade de compostos com novos mecanismos de ação.

Palavras-chaves: atividade antiviral, planta, *Baccharis anomala*, herpes simplex virus

Abstract

Chemical analysis and antiviral activity evaluation of *Baccharis anomala* D.C.

Common occurrences of severe viral infections, emergence of resistant strains and a limited number of available antiviral chemotherapeutics show the need to search for new active substances as antiviral. Many compounds derived from plants are candidates for the study of their potential in systemic therapy and/or prophylaxis of herpes simplex virus type 1 (HSV-1). Among the plants with antiviral activity, those from the genus *Baccharis* are remarkable. The main objective of the work was the study of the chemical composition and evaluation of the antiviral activity of extracts from *Baccharis anomala* D.C., using bioactivity guided fractionation. Through precipitation with ethanol and fractionation by molecular permeation it was achieved the separation of the active chemical constituents against HSV-1 virus in the aqueous extract of *Baccharis anomala*. Phytochemical tests indicated the presence of tannins, catechins and saponins in the aqueous extract. By thin layer chromatography it was detected the presence of phenolic compounds using ferric chloride and natural reagent. Concerning the antiviral activity, the active fraction named AQ PPT FR 4-5 showed pronounced antiviral activity, represented by 100 % inhibition of viral replication at concentrations of 1.25, 0.625, 0.312 and 0.156 mg/mL, against the strains ATCC-VR733 and Acyclovir-resistant 29-R of HSV-1 virus. Regarding the mechanism of action, virucidal activity on the fraction AQ PPT FR 4-5 was detected, which is also very important because, as far as we know, compounds with virucidal activity for clinical use in the treatment of HSV-1 infections were not reported yet. In conclusion, *Baccharis anomala* displayed pronounced antiviral activity against HSV-1 virus and it is promising for further studies aimed to the isolation, identification and mechanism of action of antiviral active compounds of the species, considering the emergence of resistant strains and the need for compounds with new mechanisms of action.

Keywords: antiviral activity, plant, *Baccharis anomala*, herpes simplex virus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS GERAIS.....	- 6 -
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	- 6 -
2 REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS	- 9 -
2.2 ASPECTOS QUÍMICOS.....	- 10 -
2.2.1 TERPENÓIDES.....	- 11 -
2.2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	- 12 -
2.2.2.1 Flavonóides	- 12 -
2.2.2.2 Fenóis simples e outros compostos fenólicos	- 12 -
2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO GÊNERO <i>BACCHARIS</i>	- 13 -
2.3.1 ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	- 13 -
2.3.2 OUTRAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	- 14 -
2.4 REVISÃO DA METODOLOGIA	- 15 -
2.5 HERPESVÍRUS E TERAPIA ANTIVIRAL.....	- 16 -
2.5.1 CLASSIFICAÇÃO E MORFOLOGIA.....	- 16 -
2.5.2 CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL E TRANSMISSÃO.....	- 17 -
2.5.3 TERAPIA ANTIVIRAL.....	- 18 -
2.5.4 RESISTÊNCIA	- 19 -
3 PARTE EXPERIMENTAL	21
3.1 ANÁLISE QUÍMICA	- 23 -
3.1.1 SOLVENTES E REAGENTES	- 23 -
3.1.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	- 23 -
3.1.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO AQUOSO	- 24 -
3.1.3.1 Fracionamento do extrato aquoso de <i>Baccharis anomala</i> com solventes de polaridade crescente	- 24 -

3.1.3.2 Fracionamento do extrato aquoso de <i>Baccharis anomala</i> por precipitação na presença de etanol	- 25 -
3.1.3.3 Fracionamento da fração AQ PPT em cromatografia por coluna	- 25 -
3.1.3.4 Organograma da purificação do extrato aquoso de <i>Baccharis anomala</i> ..	- 25 -
3.1.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	- 27 -
3.1.4.1 Prospecção de constituintes químicos no extrato aquoso	- 27 -
3.1.4.2 Análise química das amostras AQ, HE, AQ FILT, AQ PPT, AQ PPT FR 1-3 e AQ PPT FR 4-5 por cromatografia em camada delgada	- 28 -
3.1.4.3 Quantificação dos compostos fenólicos.....	- 29 -
3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i>	- 31 -
3.2.1 CULTIVO CELULAR	- 31 -
3.2.2 SUSPENSÃO VIRAL.....	- 32 -
3.2.3 PREPARO DAS AMOSTRAS DE EXTRATOS VEGETAIS E FRAÇÕES	- 32 -
3.2.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	- 32 -
3.2.4.1 Técnica de observação da alteração morfológica	- 32 -
3.2.4.2 Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)	- 33 -
3.2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i>	- 34 -
3.2.5.1 Técnica da inibição do efeito citopático viral (ECP)	- 34 -
3.2.5.2 Técnica da redução do título infeccioso viral pelo método das diluições-limite (EPTT).....	- 35 -
3.2.5.3 Avaliação da atividade virucida da amostra AQ PPT FR 4-5.....	- 35 -
3.2.5.4 Avaliação do efeito da amostra AQ PPT FR 4-5 no pré-tratamento celular.....	- 36 -
3.2.5.5 Avaliação da atividade da amostra AQ PPT FR 4-5 após a penetração viral.....	- 36 -
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	- 37 -
4.1 ANÁLISE QUÍMICA	- 39 -
4.1.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	- 39 -
4.1.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO AQUOSO	- 39 -
4.1.2.1 Rendimento do fracionamento do extrato aquoso com solventes de polaridade crescente	- 39 -

4.1.2.2 Rendimento do fracionamento por precipitação com etanol.....	- 40 -
4.1.2.3 Fracionamento da fração AQ PPT em coluna	- 40 -
4.1.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	- 41 -
4.1.3.1 Prospecção de constituintes químicos no extrato aquoso	- 41 -
4.1.3.2 Cromatografia em camada delgada.....	- 42 -
4.1.3.3 Quantificação dos compostos fenólicos.....	- 44 -
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i>	- 49 -
4.2.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	- 51 -
4.2.1.1 Técnica da observação da alteração morfológica	- 51 -
4.2.1.2 Avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)	- 52 -
4.2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i>	- 55 -
4.2.2.1 Técnica da inibição do efeito citopático viral (ECP)	- 55 -
4.2.2.2 Técnica da redução do título infeccioso viral pelo método das diluições-limite (EPTT).....	- 59 -
4.2.2.3 Avaliação da atividade virucida da amostra AQ PPT FR 4-5.....	- 61 -
4.2.2.4 Avaliação do efeito da amostra AQ PPT FR 4-5 no pré-tratamento celular	- 63 -
4.2.2.5 Avaliação da atividade da amostra AQ PPT FR 4-5 após a penetração viral	- 63 -
5 CONCLUSÕES	65
6 REFERÊNCIAS.....	69

Os vírus são parasitas muito pequenos intracelulares. Seu genoma é composto de DNA ou RNA, sendo envolvido por uma capa protéica (CARTER e SAUNDERS, 2007).

Diferente da maioria das infecções bacterianas, fúngicas e parasíticas, os vírus não são organismos autônomos e requerem células vivas para a replicação. Conseqüentemente, a maioria dos passos na sua replicação envolve rotas metabólicas celulares normais, o que torna difícil administrar tratamentos que ataquem o vírion diretamente, ou sua replicação, sem que ocorram efeitos adversos nas células. Felizmente, sabe-se que muitos vírus apresentam características únicas em sua estrutura ou em seus ciclos de replicação, constituindo alvos potenciais da quimioterapia antiviral (HUDSON, 1990).

O sucesso dos vírus na evolução tem sido assegurado por quatro atributos gerais: variação genética, diversidade de métodos de transmissão, eficiente replicação dentro de células hospedeiras e capacidade de persistir no hospedeiro. Como conseqüência destas propriedades, os vírus tem se adaptado para todas as formas de vida e ocupado numerosos nichos ecológicos, resultando no fato de que humanos, animais e provavelmente muitas plantas, sofrem doenças disseminadas e pouco controladas (HUDSON, 1990).

Os herpes simplex virus (HSV) foram os primeiros herpesvírus humanos a serem descobertos e estão entre os vírus mais investigados. As suas propriedades biológicas são, particularmente: a habilidade de causar uma variedade de infecções, a capacidade de permanecer latente durante a vida do hospedeiro e ser reativado, causando ou não lesões nos arredores do sítio da infecção inicial (FIELDS *et al.*, 1996; FATAHZADEH e SCHWARTZ, 2007).

Estudos epidemiológicos utilizando sorologia vírus-específica e, em alguns casos, também técnicas de biologia molecular têm demonstrado os herpesvírus como endêmicos em todos os grupos da população humana estudada (PREISER *et*

al., 2003). Doenças associadas ao HSV estão entre as infecções mais difundidas, afetando 60 a 95 % de seres humanos adultos (FATAHZADEH e SCHWARTZ, 2007).

A maioria das espécies animais, incluindo os humanos, são hospedeiros para um herpesvírus particular e, às vezes, para dois ou mais. Todos os herpesvírus são morfologicamente idênticos e apresentam a importante propriedade de permanecerem latentes, na forma viável, dentro das células do hospedeiro após a infecção primária. O vírus latente persiste por longos períodos de tempo e, provavelmente, por toda a vida. Alguns herpesvírus são reativados de tempos em tempos do estado latente, para produzir infecção recorrente. Existem oito herpesvírus humanos reconhecidos: herpesvírus humano 1 (*herpes simplex virus 1*), herpesvírus humano 2 (*herpes simplex virus 2*), herpesvírus humano 3 (*varicella-zoster virus*), herpesvírus humano 4 (*Epstein-Barr virus*), herpesvírus humano 5 (*citomegalovirus*), herpesvírus humano 6, herpesvírus humano 7, herpesvírus humano 8 (HUDSON, 1990; TIMBURY, 1997).

O herpesvírus humano 1 ou herpes simplex virus 1 (HSV-1) causa lesões na pele, que apresenta características vesículo-ulcerativas. Também causa comumente gengivoestomatite, doença orolabial, doença ocular e infecções genitais. As doenças potencialmente fatais incluem infecção neonatal, encefalite e infecções disseminadas em pacientes com defeitos na imunidade celular (BRADY e BERNSTEIN, 2004). O HSV-1 causa principalmente lesões orofaciais e o herpes simplex virus 2 é a principal causa de herpes genital (TIMBURY, 1997).

O controle das infecções virais, como qualquer outro tipo de controle de infecção, pode ser efetuado como uma medida profilática ou terapêuticamente, com o objetivo de controlar e aliviar uma infecção viral já estabelecida no hospedeiro (HUDSON, 1990). Os agentes anti-herpesvírus aciclovir, valaciclovir, penciclovir, famciclovir (DE CLERCQ, 2001; DE CLERCQ, 2004; ABDEL-HAQ *et al.*, 2006), docosanol (BRADY e BERNSTEIN, 2004; ABDEL-HAQ *et al.*, 2006) são usados no tratamento de infecções por herpes simplex virus.

A maioria dos produtos antivirais possui atividade reversível e a síntese viral recomeça, uma vez que os compostos sejam omitidos. Estes compostos são,

conseqüentemente, incapazes de curar células infectadas. Existe também o problema da latência, pois em um hospedeiro infectado somente a multiplicação de partículas virais ativas é inibida, mas não os genomas latentes, que estão dispersos por todo o organismo (COLEGATE e MOLYNEUX, 1993).

Cepas de HSV resistentes a aciclovir e nucleosídeos análogos, freqüentemente são selecionadas durante o tratamento. Portanto, é necessária a pesquisa de novos agentes antivirais exibindo diferentes mecanismos de ação (KHAN *et al.*, 2005).

A atividade antiviral de muitos extratos de plantas e produtos naturais tem sido pesquisada e os resultados indicam que estes representam uma fonte útil de compostos antivirais (VANDEN BERGHE *et al.*, 1986; CHE, 1991). Os estudos realizados até hoje indicam que a maioria das substâncias naturais com atividade antiviral provém de plantas de origem tropical ou de regiões temperadas, já que cerca de 20 a 30 % destas espécies possuem atividade antiviral (GUTIÉRREZ, 2002).

A importância das plantas medicinais pode ser verificada de acordo com a estimativa da Organização Mundial da Saúde. Em alguns países da Ásia e África, 80 % da população dependem de medicina tradicional para cuidados primários à saúde e em muitos países desenvolvidos, 70 a 80 % da população têm utilizado alguma forma de medicina alternativa ou complementar. O tratamento com plantas é a forma mais popular de medicina tradicional, sendo altamente lucrativo no mercado internacional. A renda anual no oeste da Europa alcançou 5 bilhões de dólares em 2003-2004. Na China a venda totalizou 14 bilhões em 2005. A renda da medicina de plantas no Brasil foi de 160 milhões em 2007 (WHO, 2008).

Muitos agentes antivirais derivados de espécies vegetais são candidatos ao estudo do seu potencial na terapia sistêmica e/ou profilaxia de HSV. A busca mais promissora para a descoberta de novos agentes antivirais de plantas é a avaliação de extratos de espécies selecionadas para atividade antiviral, seguida por fracionamento bioguiado das frações ativas. Essas espécies ativas são consideradas líderes para a investigação futura, pois servem de base para estudos

posteriores (CHE, 1991; VLIETINCK *et al.*, 1997; VLIETINCK e VANDEN BERGHE, 1998).

Dentre as plantas com atividade antiviral, destacam-se as do gênero *Baccharis* (ABAD *et al.*, 1999a,b; ZANON *et al.*, 1999; SANCHEZ PALOMINO *et al.*, 2002; MONTANHA *et al.*, 2004).

Considerando a necessidade de busca de novos antivirais e os promissores resultados citados na literatura em relação a essa atividade em espécies do gênero *Baccharis*, é justificada a pesquisa da atividade antiviral de *Baccharis anomala* D.C. contra o herpesvírus humano 1.

1.1 Objetivos gerais

Estudo da composição química e avaliação da atividade antiviral dos extratos da espécie *Baccharis anomala* D.C., através de fracionamento bioguiado.

1.2 Objetivos específicos

- Preparar extrato aquoso e hidroetanólico de *Baccharis anomala* D.C.
- Fracionar os extratos ativos
- Realizar cromatografia em camada delgada dos extratos e das frações ativas para caracterização química
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do extrato aquoso e hidroetanólico de *Baccharis anomala*
- Avaliar a atividade antiviral contra o herpesvírus humano 1 (HSV-1) *in vitro* dos extratos aquoso e hidroetanólico de *Baccharis anomala*
- Avaliar a atividade antiviral *in vitro* das frações
- Avaliar a atividade antiviral *in vitro* das frações ativas antes e após a infecção viral e atividade virucida

2 Revisão da literatura

2.1 Aspectos botânicos

A família Asteraceae é o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1100 gêneros e 25000 espécies. São plantas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores. Cerca de 98 % dos gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte e são encontradas em todos os tipos de habitats, mas principalmente nas regiões tropicais montanhosas da América do Sul.

O gênero *Baccharis* está representado por mais de 500 espécies distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, ocupando as regiões mais elevadas. No Brasil estão descritas 120 espécies de *Baccharis*, com a maior parte delas localizadas na região sudeste do país. As espécies do gênero *Baccharis* são em geral arbustos como a carqueja, a vassoura ou vassourinha e medem, em média, cerca de 0,5 a 4 m de altura. Apresentam alto valor sócio-econômico, com ampla dispersão nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul, entre outras regiões do país, onde grande número delas é utilizado na medicina popular para controle ou tratamento de várias doenças. São consumidas principalmente na forma de chás com indicações para males do estômago, fígado, anemias, inflamações, diabetes, doenças da próstata, sendo também descritas como remédio para o processo de desintoxicação do organismo. O estudo de espécies do gênero *Baccharis* tem mostrado grandes avanços devido ao seu reputado uso na medicina caseira da América Latina (VERDI *et al.*, 2004).

A espécie *Baccharis anomala* D.C. é um arbusto lianoso, com ramos patentes e hispídeos, composto por folhas de ovais a ovadas, pecioladas, trinérveas, com 3 a 5 cm de comprimento e 2,5 a 3 cm de ápice agudo, margens denteadas, hispídas nas duas faces, principalmente sobre as nervuras. Pilosidade constituída de pêlos unisseriados, geralmente com a célula terminal mucronulada ou flageliforme, raramente obtusa. Os capítulos são dispostos em panículas policéfalas, com ramos

híspidos. Invólucro campanulado com cerca de 3 a 4 mm de altura e 3 a 4 mm de diâmetro.

Receptáculo do capítulo feminino laciniado, com lacínios longos. Flores de 30 a 50 cm em cada capítulo. Corola da flor feminina filiforme, densamente pilosa na metade superior do limbo, com pêlos clavados, unisseriados. Corola da flor masculina com cerca de 3 a 4 mm de comprimento, com o limbo dividido em lacínios lineares, enrolados em espiral. Estilete da flor masculina com ramos bem desenvolvidos, abertos. Aquênio com pêlos de paredes espessadas, geralmente bífidos no ápice.

A espécie *Baccharis anomala* distribui-se no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai. No Brasil ocorre nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Floresce de setembro até maio, frutificando logo após a floração. Sua ocorrência está associada primariamente à beira de rios, bordas de capões e clareiras, tornando-se, secundariamente comum através da sua transformação em uma das pioneiras antrópicas mais freqüentes em todo o Estado de Santa Catarina, ocupando capoeiras e capoeirões, onde pode formar grandes touceiras emaranhadas aos arbustos e arvoretas (BARROSO e BUENO, 2002).

A espécie *Baccharis anomala* é utilizada comumente no Rio Grande do Sul para lavagem de feridas e infecções gerais (SOUZA *et al.*, 2004).

2.2 Aspectos químicos

A fitoquímica do gênero *Baccharis* tem sido extensivamente estudada desde o início dos anos 1900. Até hoje, mais de 150 compostos deste gênero foram isolados e identificados. Os compostos mais proeminentes em *Baccharis* são os diterpenóides dos tipos clerodano e labdano e triterpenóides do tipo oleanano (LI *et al.*, 1997), embora existam outros constituintes ativos principais, como os compostos fenólicos e óleos essenciais, que têm sido reportados nos últimos anos. Sua fitoquímica destaca também a ocorrência de flavonóides, sendo nitidamente observado maior acúmulo de flavonas e flavonóis (VERDI *et al.*, 2004).

Para *Baccharis anomala*, identificou-se através de testes fitoquímicos a presença de taninos, triterpenos/esteróides e saponinas nas folhas e taninos e saponinas nos caules da espécie, em levantamento fitoquímico de alguns vegetais utilizados na medicina popular do Rio Grande do Sul (ALICE *et al.*, 1985).

Nesta revisão foi dada ênfase às principais classes de compostos isolados para espécies do gênero *Baccharis*.

2.2.1 Terpenóides

Óleos essenciais oriundos do gênero *Baccharis* têm sido estudados em muitas espécies da América do Sul. Mais de 100 constituintes foram identificados em estudos de composição do óleo essencial de espécies argentinas de *Baccharis*. MALIZIA *et al.*, 2005a,b investigaram os constituintes voláteis de óleos das folhas de quatro espécies do gênero *Baccharis* coletadas na Patagônia Argentina e os principais constituintes identificados foram: β -pineno, mirceno, limoneno, δ -cadineno, α - e β -pineno, terpinen-4-ol, dentre outros. Óleos essenciais de *Baccharis articulata* foram examinados e os principais constituintes da planta feminina foram β -pineno, espatulenol e (E)-nerolidol e o óleo da planta masculina apresentava espatulenol, β -cariofileno, biciclogermacreno e (E)-nerolidol (ZUNINO *et al.*, 2004). Outros mono e sesquiterpenóides foram identificados em espécies do gênero *Baccharis* (LOAYZA *et al.*, 1995; ZUNINO *et al.*, 1998; COBOS *et al.*, 2001; MALIZIA *et al.*, 2005a,b; FUKUDA *et al.*, 2006).

Diterpenóides do tipo neo-clerodano são característicos do gênero *Baccharis*, embora os derivados caurano e labdano tenham sido também isolados (HE *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1997; FERESIN *et al.*, 2003; VERDI *et al.*, 2004; GUO *et al.*, 2006). Dois diterpenos do tipo clerodano, juntamente com o conhecido diterpeno marrubiagenina foram isolados das partes aéreas de *Baccharis sagittalis* (CIFUENTE *et al.*, 2002). Exemplos de outros diterpenóides isolados do gênero *Baccharis* também incluem dois do tipo labdano de *Baccharis grisebachii* (FERESIN *et al.*, 2003) e do tipo caurano das flores de *Baccharis illinita* (VERDI *et al.*, 2004).

Triterpenóides do tipo oleanólico são os mais difundidos no gênero *Baccharis*. O estudo fitoquímico do extrato clorofórmico de *Baccharis pseudotenuifolia* levou ao

isolamento do triterpeno ácido oleanólico e α -espinasterol. Ácido oleanólico e ácido ursólico foram isolados de *Baccharis ligustrina* (MOREIRA *et al.*, 2003a,b).

2.2.2 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos estão os grupos mais importantes de metabólitos secundários em plantas. Esse grupo de compostos está presente em uma grande variedade de alimentos e é particularmente abundante em vinho, chás e sucos de frutas. Desde a descoberta destes compostos, estudos têm sido realizados em busca de seus efeitos biológicos (GONÇALVES *et al.*, 2007).

2.2.2.1 Flavonóides

Os exsudatos e extratos das partes aéreas de *Baccharis grisebachii* contém os flavonóides 5,7,4'-triidróxi-6-metoxiflavona e quercetina (TAPIA *et al.*, 2004). Nove flavonóides foram isolados do extrato etanólico de flores secas de *Baccharis illinita*: luteolina, aromadendrina, naringenina, 2'-metoxicrisina, apigenina, 3-O-metilquercetina, taxifolina, quercetina e crisoeridol. O extrato clorofórmico contém nobiletina, tangeretina, luteolina, naringenina e canferol (VERDI *et al.*, 2004).

Estudo fitoquímico do extrato metanólico de *Baccharis pseudotenuifolia* levou ao isolamento dos flavonóides hispidulina, naringenina, 3'-metoxiluteolina, apigenina, canferol, eriodictiol, aromadendrina, quercetina, 3'-metoxiquercetina, quercetina-3-O-ramnosídeo e quercetina-3-O-glucosídeo (MOREIRA *et al.*, 2003a,b).

Da espécie *Baccharis trinervis* foram isoladas flavonas 6-oxigenadas (SHARP *et al.*, 2001) e da espécie *Baccharis grisebachii* foram isoladas 5,7-diidroxi-6,8,4'-trimetoxiflavona e 5-hidroxi-6,7,8,4'-tetrametoxiflavona (FERESIN *et al.*, 2003).

2.2.2.2 Fenóis simples e outros compostos fenólicos

Estudos da composição de ácidos fenólicos simples no gênero *Baccharis* dizem respeito principalmente à espécie *Baccharis dracunculifolia* (originária da

própolis brasileira). Própolis é um produto resinoso originário das colméias, produzido pelas abelhas a partir de fontes vegetais. A composição da própolis depende da estação, vegetação e área de coleta. *Baccharis dracunculifolia* e própolis apresentaram derivados do ácido diidróxicinâmico e alta proporção do composto fenólico artepilina C (ácido 3,5-diprenil-4-hidróxicinâmico) (DE ALENCAR *et al.*, 2005) que apresenta várias atividades biológicas, entre elas antimicrobiana (SALOMÃO *et al.*, 2004) e antiinflamatória (PAULINO *et al.*, 2008). Glicosídeos fenólicos foram isolados de *Baccharis dracunculifolia* (NAGATANI *et al.*, 2001; NAGATANI *et al.*, 2002).

Foram isolados da espécie *Baccharis grisebachii* oito derivados do ácido *p*-cumárico (FERESIN *et al.*, 2003), e de *Baccharis myrsinites*, ésteres de ácido *trans* e *cis*-cumárico (LI *et al.*, 1997).

2.3 Atividades biológicas do gênero *Baccharis*

2.3.1 Atividade antiviral

Em estudo da avaliação antiviral de série de plantas medicinais reportadas na medicina folclórica da América do Sul como possuidoras de atividade anti-infecciosa, o extrato aquoso de *Baccharis trinervis* inibiu a replicação do herpesvírus humano 1, sem apresentar citotoxicidade, nas doses de 50 a 200 µg/mL. O extrato aquoso de *Baccharis teindalensis* (50-125 µg/mL) inibiu a replicação do vírus da estomatite vesicular. Ambos os extratos não apresentaram atividade contra poliovírus 1 (ABAD *et al.*, 1999b).

Extratos aquoso e etanólico de *Baccharis genistelloides*, proveniente da floresta tropical boliviana e utilizada na medicina folclórica como anti-helmíntica, antiúlcera e para o tratamento de influenza, foram testados contra herpesvírus humano 1, vírus da estomatite vesicular e poliovírus 1. O extrato aquoso de *Baccharis genistelloides* (25-50 µg/mL) inibiu a replicação do herpesvírus humano 1 e do vírus da estomatite vesicular (ABAD *et al.*, 1999a).

O extrato alcoólico de *Baccharis articulata* inibiu a replicação viral do vírus da pseudorraiva cepa RC/79 (herpesvírus suíno 1) (ZANON *et al.*, 1999).

Em estudo de plantas utilizadas para o tratamento de doenças virais na medicina folclórica da região Sul do Brasil, extrato hidrometanólico de *Baccharis trimera* em dose de 500 a 100 µg/mL apresentou atividade contra poliovírus 2 (SIMÕES *et al.*, 1999).

Extrato aquoso de *Baccharis trinervis* (400 µg/mL) e duas frações obtidas da purificação do extrato aquoso em coluna Sephadex LH-20 (10-200 µg/mL) exibiram potente atividade anti-HIV *in vitro* (SANCHEZ PALOMINO *et al.*, 2002).

Em estudo de plantas provenientes da região Sul do Brasil, extratos hidroetanólicos de *Baccharis erioclada* (0,25-0,5 mg/mL), *Baccharis megapotamica* (0,0048 mg/mL) e *Baccharis uncinella* (0,312-1,25 mg/mL) apresentaram atividade contra o herpesvírus humano 1, bem como o extrato aquoso de *Baccharis erioclada* (0,312-1,25 mg/mL) (MONTANHA *et al.*, 2004).

2.3.2 Outras atividades biológicas

Foram descritas muitas atividades biológicas para espécies do gênero *Baccharis*, dentre elas, destacam-se as atividades anti-úlceras (LEMOS *et al.*, 2007), antibacteriana (COBOS *et al.*, 2001; FERESIN *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2005), antioxidante (MONGELLI *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2003; TAPIA *et al.*, 2004), antiinflamatória (GENE *et al.*, 1996; ABAD *et al.*, 2006), antifúngica (RAHALISON *et al.*, 1995; FERESIN *et al.*, 2003), inibitória do crescimento de tumor (MONGELLI *et al.*, 1997) e analgésica (GENE *et al.*, 1996).

A espécie *Baccharis anomala* possui poucas atividades biológicas estudadas. Nesta revisão da literatura verificou-se que VARGAS *et al.* em 1991 demonstraram a atividade mutagênica *in vitro* de extrato aquoso das folhas de *Baccharis anomala* D.C. através do teste de Ames (*Salmonella/microsomo*), utilizando dose de 100 mg de extrato/placa.

Devido aos resultados promissores encontrados na literatura com relação à atividade antiviral para espécies do gênero *Baccharis* e o fato de a espécie *Baccharis anomala* ser utilizada comumente no Rio Grande do Sul para lavagem de

feridas e infecções gerais (SOUZA *et al.*, 2004), torna-se importante o estudo da atividade antiviral da espécie.

2.4 Revisão da metodologia

A maioria dos estudos direcionados à busca de atividade antiviral de plantas medicinais utiliza extratos aquosos e alcoólicos (MUKHTAR *et al.*, 2008). Estes extratos são submetidos à triagem para a seleção dos ativos. Uma pesquisa da literatura indica que no mundo, estudos de cerca de 4000 plantas para atividade antiviral têm sido publicados desde 1968. Os resultados mostram que mais de 450 espécies exibem algum nível de atividade antiviral *in vitro* contra uma ou mais espécies de vírus. Destes extratos ativos, somente alguns recebem estudos para a avaliação dos princípios ativos (CHE, 1991; MUKHTAR *et al.*, 2008). Como foi citado anteriormente, a busca mais promissora para a descoberta de novos agentes antivirais de plantas é a avaliação de extratos de plantas selecionadas para atividade antiviral, seguida por fracionamento bioquímico das frações ativas. O extrato é submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridade crescente, como o diclorometano, acetato de etila e butanol, visando uma separação das substâncias de diferentes polaridades presentes nos extratos. Estas frações são testadas e aquela(s) que apresentar(em) o efeito biológico mais pronunciado é (são) submetida(s) aos procedimentos cromatográficos para o isolamento e purificação dos compostos. Em geral, inicialmente é empregada a cromatografia em coluna aberta e as frações obtidas são reunidas segundo o perfil cromatográfico, verificado por cromatografia em camada delgada (HARBORNE, 1998; CECHINEL FILHO e YUNES, 2001).

Classicamente, a caracterização dos principais grupos de substâncias vegetais de interesse tem sido obtida pela realização de reações químicas que resultem no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico (FALKENBERG *et al.*, 2003).

2.5 Herpesvírus e terapia antiviral

2.5.1 Classificação e morfologia

Mais de 100 herpesvírus foram identificados até o presente, dos quais 8 são conhecidos como patógenos humanos. O herpesvírus humano 1 pertence à família *Herpesviridae*, a qual subdivide-se em 3 subfamílias, como descrito na tabela 1:

Tabela 1. Classificação dos herpesvírus humanos. Fonte: PREISER *et al.*, 2003; FATAHZADEH e SCHWARTZ, 2007; CARTER e SAUNDERS, 2007.

Subfamília	Gênero	Designação
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	Herpesvírus humano 1 ou <i>Herpes simplex virus 1</i> (HSV-1)
		Herpesvírus humano 2 ou <i>Herpes simplex virus 2</i> (HSV-2)
	<i>Varicellovirus</i>	Herpesvírus humano 3 ou <i>Varicella-zoster virus</i> (VZV)
<i>Bethaherpesvirinae</i>	<i>Citomegalovirus</i>	Herpesvírus humano 5 ou <i>Citomegalovirus</i> (CMV)
	<i>Roseolovirus</i>	Herpesvírus humano 6 (HHV-6)
		Herpesvírus humano 7 (HHV-7)
<i>Gammapherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	Herpesvírus humano 4 ou <i>Epstein-Barr virus</i> (EBV)
	<i>Rhadinovirus</i>	Herpesvírus humano 8 (HHV-8) ou herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (HSVH)

Os herpesvírus humanos medem aproximadamente 200 nm de diâmetro e apresentam vírions relativamente complexos, são compostos de um grande número de proteínas, organizadas em três estruturas distintas: capsídeo, tegumento e envelope. O genoma viral é uma molécula de DNA dupla fita linear, que varia em tamanho, de 125 a 240 Kpb. O DNA é coberto pelo capsídeo icosaédrico, e este é

envolvido pelo tegumento, e pelo envelope glicoprotéico (FATAHZADEH e SCHWARTZ, 2007; CARTER e SAUNDERS, 2007). A morfologia dos herpesvírus está apresentada na figura 1.

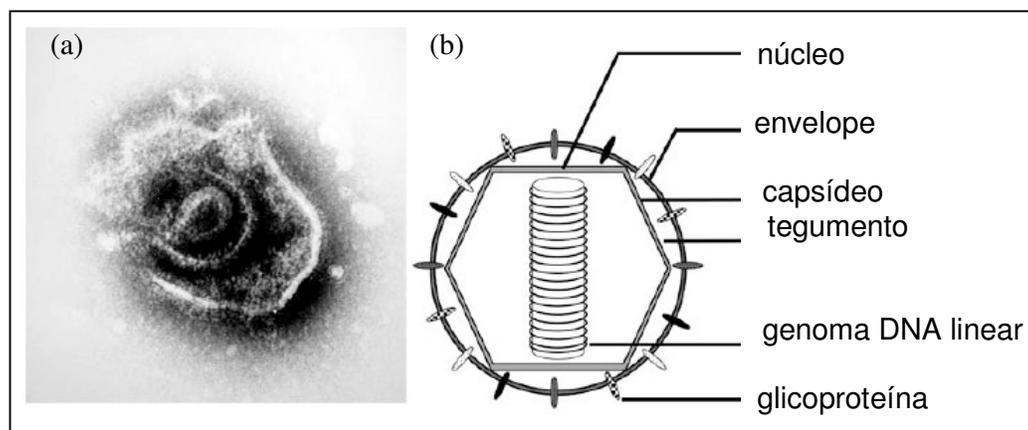


Figura 1. Morfologia dos herpesvírus. (a) elétron-micrografia de uma partícula típica de herpesvírus; (b) representação esquemática do vírion. Fonte: PREISER *et al.*, 2003.

2.5.2 Ciclo de replicação viral e transmissão

Nos estágios iniciais de infecção o vírus é prontamente detectado na superfície das células. Ocorre a ligação inicial de glicoproteínas virais com receptores diferentes da superfície celular, que causa a fusão do envelope com a membrana celular. Durante o curso do ciclo normal de vida, o HSV pode infectar e replicar em dois tipos diferentes de células: epiteliais e neurônios. A penetração pode ser um evento em vários estágios e envolve mais do que uma glicoproteína viral. Em consequência da entrada na célula, o capsídeo desenvolvido é então transportado aos poros nucleares onde o DNA é liberado no núcleo. A transcrição, a replicação do DNA viral e a formação dos novos capsídeos ocorrem no núcleo. O DNA viral é transcrito através do ciclo reprodutivo pela RNA polimerase II do hospedeiro, mas com a participação dos fatores virais em todos os estágios de infecção. A síntese de produtos do gene viral é estritamente regulada. A expressão

dos genes virais é coordenadamente regulada e seqüencialmente ordenada em cascata. Os produtos genéticos estudados formam pelo menos cinco grupos que dão a informação para a base da regulação transcricional e pós-transcricional. Vários produtos genéticos são enzimas e proteínas ligantes de DNA, envolvidas na replicação do DNA viral. O DNA viral é sintetizado por um mecanismo em círculo, produzindo várias cópias de seqüências DNA poliméricas que são clivadas em monômeros, que por sua vez, são envolvidos pelos capsídeos. A montagem ocorre em estágios; após a colocação do DNA nos capsídeos pré-montados, o vírus amadurece e adquire infectividade, começando através da lamela interna da membrana nuclear. Em cultura celular totalmente permissiva, o processo de replicação leva aproximadamente 18 a 20 horas. A célula infectada sofre alterações estruturais e bioquímicas que resultam na sua destruição (FIELDS *et al.*, 1996).

O principal modo de aquisição da doença é através da exposição direta das membranas mucosas ou pele não íntegra a secreções mucosas ou lesões de indivíduo com infecção ativa primária ou recorrente. O vírus pode também ser transmitido por gotículas do trato respiratório ou exposição a secreções mucocutâneas de pessoa assintomática, onde se multiplica sem causar manifestação clínica (FATAHZADEH e SCHWARTZ, 2007).

2.5.3 Terapia antiviral

O presente manejo da infecção por HSV não objetiva a erradicação viral, mas a prevenção da transmissão, supressão da recorrência, atenuação do curso clínico e complicações, bem como paliação e promoção da cicatrização. Os agentes antivirais não curam infecções por HSV, mas modificam o curso clínico da doença através da inibição da replicação viral e subsequente dano epitelial. Antivirais podem ser utilizados via oral, tópica ou intravenosa. A intervenção sistêmica com antivirais é indicada para eczema herpético, herpes neonatal, encefalite herpética, herpes ocular e infecções em pacientes imunodeprimidos (FATAHZADEH e SCHWARTZ, 2007). Os principais agentes antivirais utilizados contra o HSV estão resumidos na tabela 2:

Tabela 2. Principais agentes antivirais utilizados contra o HSV. Fonte: FATAHZADEH e SCHWARTZ, 2007; CERNIK *et al.*, 2008.

Agente antiviral	Via de administração	Mecanismo de ação
Docosanol	Tópica	Álcool primário com 22 carbonos interfere na ligação dos receptores da célula epitelial a proteínas do envelope viral
Penciclovir	Tópica	Análogo acíclico de guanossina interfere na replicação do DNA viral, inibindo irreversível e competitivamente a DNA polimerase
Aciclovir	Tópica, oral e intravenosa	Análogo acíclico de guanossina interfere na replicação do DNA viral inibindo seletivamente a DNA polimerase e incorporação à cadeia de DNA em replicação, ocorrendo terminação irreversível da elongação
Valaciclovir	Oral	Pró-fármaco do aciclovir (éster valina)
Famciclovir	Oral	Pró-fármaco do penciclovir (éster diacetil)
Foscarnet	Intravenosa	Análogo de pirofosfato bloqueia competitivamente os sítios de ligação do pirofosfato na DNA polimerase viral, diretamente inibindo sua atividade

2.5.4 Resistência

O tratamento de escolha para infecções por HSV é o aciclovir, um análogo nucleosídeo da guanossina, que é fosforilado três vezes. A primeira fosforilação é completada pela proteína timidina quinase, que permite o a ativação do aciclovir somente nas células infectadas. As segunda e terceira fosforilações são realizadas por timidilato quinases celulares. O aciclovir trifosfato atua por inibição competitiva da DNA polimerase viral e é um terminador de cadeia de DNA. O amplo uso de aciclovir tem levado a emergência de cepas resistentes. Os primeiros casos de cepas resistentes foram publicados em 1982 (MORFIN e THOUVENOT, 2003).

Os mecanismos que podem estar envolvidos na resistência do HSV ao aciclovir são: perda da atividade da timidina quinase, redução da produção da

timidina quinase, alteração na especificidade da timidina quinase ao substrato (a enzima é capaz de fosforilar a timidina (seu substrato natural), mas não o aciclovir) e/ou uma alteração da especificidade da DNA polimerase ao substrato. Mutações que ocorrem no gene viral da timidina quinase são as mais freqüentes e 95% das cepas aciclovir resistentes isoladas apresentam um fenótipo timidina quinase deficiente (GILBERT *et al.*, 2002; MORFIN e THOUVENOT, 2003).

Cepas aciclovir-resistentes são mais freqüentemente isoladas em hospedeiros imunocomprometidos e os isolados têm sido associados com doenças persistentes e/ou disseminadas. O problema da resistência ao tratamento com aciclovir continua a crescer, particularmente na população HIV positiva (a taxa de HSV resistentes ao aciclovir isolados tem variado de 4,3 a 14 % entre os grupos imunocomprometidos), e, desde que a maioria das cepas aciclovir-resistentes isoladas são timidina quinase deficientes, a avaliação de terapias alternativas tem recebido maior atenção. Além disso, todos os agentes antiherpéticos possuem a DNA polimerase como alvo, portanto existe uma necessidade urgente de desenvolvimento e avaliação de novos antivirais com diferentes mecanismos de ação (FIELD e BIRON, 1994; GILBERT *et al.*, 2002).

3 Parte Experimental

3.1 Análise química

3.1.1 Solventes e reagentes

Todos os solventes utilizados foram de grau p.a. O reagente Folin-Ciocalteu é da marca comercial Próton Química. As substâncias de referência catequina, ácido tânico e aciclovir são da marca comercial Sigma. Os reagentes e as substâncias SDS/TEA (dodecil sulfato de sódio/trietanolamina), BSA (albumina de soro bovino), FeCl_3 são da marca comercial Merck.

3.1.2 Coleta do material vegetal e preparação dos extratos

O material vegetal foi coletado em março de 2007 no Morro Pelado em área nativa no município de Canela-RS. Exsicata foi depositada no herbário da UFRGS sob o número ICN 151379. A figura 2 ilustra a exsicata depositada no herbário da UFRGS.



Figura 2. Foto da exsicata de *Baccharis anomala* depositada no herbário da UFRGS.

A estabilização do material vegetal foi realizada em estufa de ar circulante a 30 °C por 7 dias. As folhas da espécie foram moídas em moinho de facas.

Preparou-se o extrato aquoso a 50 °C por 1 hora, utilizando-se 1 g de material vegetal para cada 10 mL de água destilada. Após, filtrou-se em funil de Büchner e o material vegetal foi submetido a uma nova extração por 1 hora, após a qual o extrato foi filtrado e o volume reduzido à metade por eliminação do solvente utilizando-se evaporador rotatório, obtendo-se extrato concentrado, que foi submetido à liofilização por 7 dias.

Preparou-se o extrato hidroetanólico por maceração, utilizando-se 1 g de material vegetal para 10 mL de uma mistura de água destilada e etanol 96 % 1:1 v/v. Após 3 dias de maceração estática, filtrou-se o extrato e o material vegetal foi submetido a nova maceração. O extrato foi seco em evaporador rotatório.

Após a secagem dos extratos estes foram mantidos em dessecador com gel de sílica até o momento do uso (CECHINEL FILHO e YUNES, 2001).

3.1.3 Fracionamento do extrato aquoso

3.1.3.1 Fracionamento do extrato aquoso de Baccharis anomala com solventes de polaridade crescente

Dissolveu-se 1 g do extrato aquoso em 100 mL de água destilada, colocando-se em um funil de separação. Em seguida adicionou-se 25 mL de diclorometano. Aguardou-se até que as duas fases (aquosa e diclorometano) estivessem separadas e então recolheu-se a fração diclorometano. O procedimento foi repetido com mais 3 porções de 25 mL de diclorometano, reunindo-se as porções. Repetiu-se o procedimento anterior para os solventes acetato de etila e *n*-butanol. A fase remanescente aquosa foi liofilizada. As frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol foram secas em evaporador rotatório (CECHINEL FILHO e YUNES, 2001).

3.1.3.2 Fracionamento do extrato aquoso de Baccharis anomala por precipitação na presença de etanol

O extrato aquoso foi fracionado com solvente de maior polaridade com relação aos solventes utilizados no fracionamento descrito no item citado anteriormente. Para tanto, foi selecionado o solvente etanol, de acordo com XU *et al.*, 1999, WU *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007, com adaptações.

O extrato aquoso seco foi dissolvido em água destilada (1 g de extrato para 10 mL de água). Adicionou-se etanol absoluto p.a. e filtrou-se em funil de Büchner. O precipitado I obtido (74 % da massa do extrato aquoso) foi lavado duas vezes com etanol absoluto p.a. Depois 7 g desse precipitado I foi ressuspenso em água destilada e submetido à nova precipitação com etanol, obtendo-se o precipitado II, ou fração AQ PPT (81 % da massa do precipitado I).

3.1.3.3 Fracionamento da fração AQ PPT em cromatografia por coluna

Para dar continuidade ao processo de purificação descrito no item 3.1.3.2, o precipitado obtido com etanol foi submetido à cromatografia em coluna com adsorvente de permeação molecular, utilizando-se como eluente misturas de metanol e água originando duas frações, fração 1-3a e fração 4-5a.

A fração 4-5a foi submetida novamente a cromatografia em coluna, utilizando-se como eluente misturas de metanol e água como descrito no parágrafo anterior, para maior purificação, originando as frações AQ PPT FR 1-3 e AQ PPT FR 4-5.

3.1.3.4 Organograma da purificação do extrato aquoso de Baccharis anomala

A figura 3 esquematiza as etapas de purificação do extrato aquoso de *Baccharis anomala*.

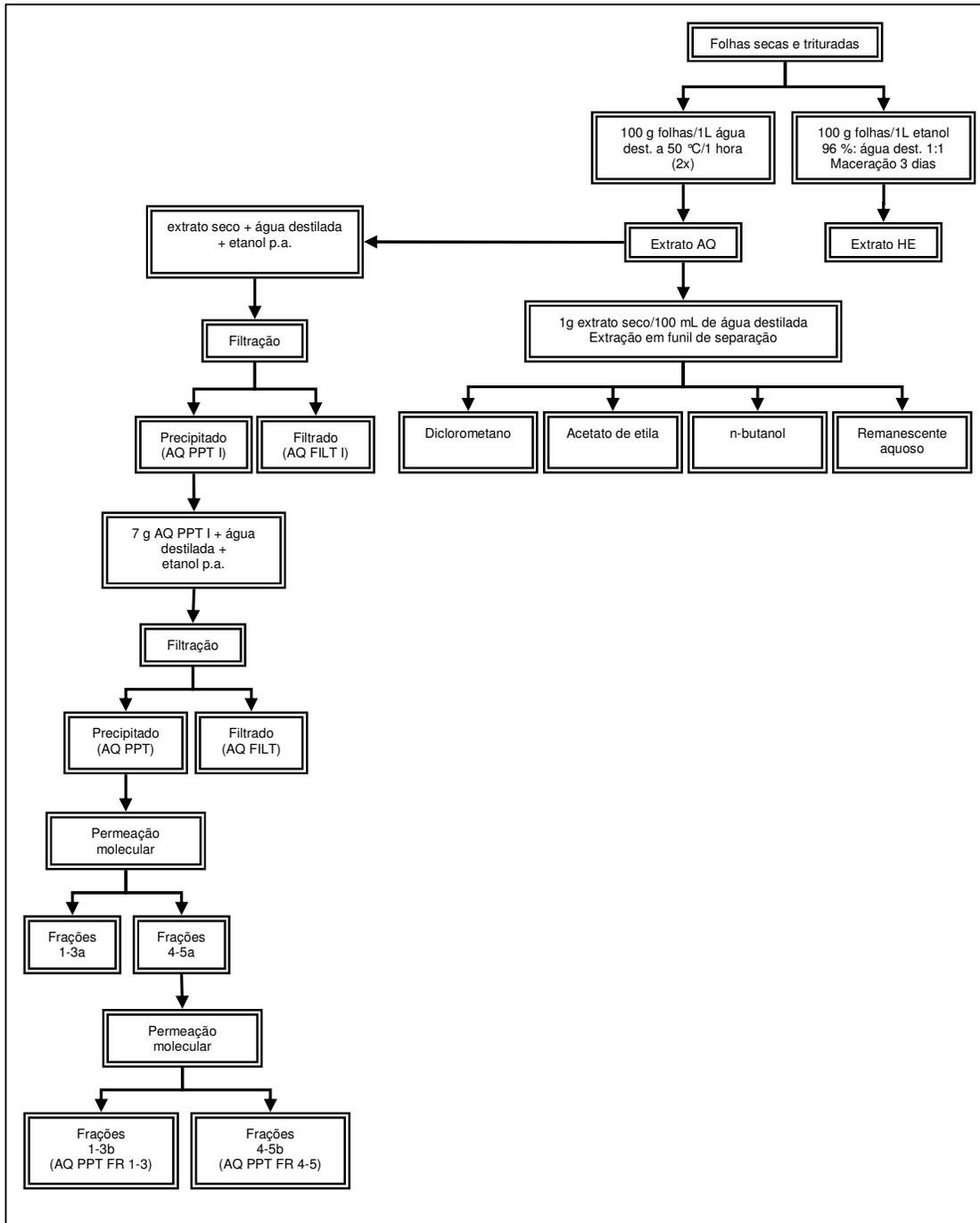


Figura 3. Organograma da purificação do extrato aquoso de *Baccharis anomala*.

3.1.4 Caracterização química

3.1.4.1 Prospecção de constituintes químicos no extrato aquoso

A partir do extrato aquoso seco, preparou-se solução de 1 g/20 mL em água destilada. Separou-se 7 porções de aproximadamente 3 mL em tubos de ensaio.

Teste para fenóis e taninos – foram adicionadas 3 gotas de solução alcoólica de cloreto férrico ao tubo de ensaio e agitou-se. Comparando-se com teste em branco com água, observou-se qualquer variação da cor ou formação de precipitado. Coloração variável entre azul e vermelho é indicativo da presença de fenóis. Precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos hidrolisáveis, enquanto a coloração verde pode indicar a presença de taninos condensados (HARBORNE, 1998; FALKENBERG *et al.*, 2003).

Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides – a amostra em três tubos de ensaio foi submetida a diferentes pH (pH 3,0; 8,5 e 11). Observou-se qualquer mudança na coloração do material (HARBORNE, 1998; FALKENBERG *et al.*, 2003).

Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas – à amostra foi adicionado magnésio granulado (alguns centigramas) e 0,5 mL de ácido clorídrico concentrado. Aguardou-se o término da reação indicada pelo fim da efervescência e observou-se mudança na cor. Aparecimento ou intensificação da cor vermelha é indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos (HARBORNE, 1998; FALKENBERG *et al.*, 2003).

Teste para esteróides e triterpenóides (Lieberman-Burchard) – solução de 500 mg/10 mL de amostra foi colocada em béquer em banho-maria até a secura. O resíduo seco do béquer foi extraído 3 vezes com 2 mL de clorofórmio. A solução clorofórmica foi filtrada em pequeno funil fechado com algodão, coberto com alguns decigramas de sulfato de sódio anidro, para um tubo de ensaio seco. Foi adicionado 1 mL de anidrido acético, agitou-se suavemente e adicionou-se cuidadosamente 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Agitou-se e observou-se se ocorreu rápido desenvolvimento de cores. Coloração azul evanescente seguida de verde permanente é indicativa da presença de esteróides livres. Coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres (FALKENBERG *et al.*, 2003).

Teste de saponinas – O resíduo insolúvel em clorofórmio, separado no teste anterior, foi redissolvido com 10 mL de água destilada e a solução foi filtrada para tubo de ensaio. O tubo foi agitado vigorosamente por 2 minutos e observou-se a formação de espuma. Espuma persistente e abundante indica a presença de heterosídeos saponínicos. Adicionou-se 2 ml de ácido clorídrico concentrado ao tubo preparado no teste anterior e deixou-se por uma hora imerso em banho-maria. Após esfriar, o tubo foi neutralizado e agitado novamente. A presença de precipitado e não formação de espuma confirma a presença de saponinas (FALKENBERG *et al.*, 2003).

Teste para alcalóides – Uma solução de 500 mg/10 mL de amostra foi acidulada a pH 4 e filtrada. Um terço da solução foi alcalinizada a pH 11 com hidróxido de amônio e extraída com 3 porções sucessivas de éter-clorofórmio (3+1) em funil de separação. A solução éter-clorofórmica foi tratada com sulfato de sódio anidro para eliminar o excesso de água. O filtrado foi submetido a re-extração com três pequenas porções de ácido clorídrico 0,1 M. A solução aquosa ácida obtida foi separada em 3 tubos de ensaio. A cada tubo de ensaio foram adicionadas 3 gotas dos reagentes de precipitação de alcalóides, Bertrand (ácido sílico-túngstico), Mayer (iodo-mercurato de potássio) e Dragendorff (iodo-bismutato de potássio). O aparecimento de precipitado floculoso em pelo menos dois tubos é indicativo de alcalóides (HARBORNE, 1998; FALKENBERG *et al.*, 2003).

Teste para a detecção de taninos – Preparou-se reagentes de: gelatina a 1 %, NaCl a 1 % e gelatina a 1 % mais NaCl a 10 %. Adicionou-se 3 ml de solução da amostra a 10 ml de cada um desses reagentes. O teste é positivo para taninos quando ocorre precipitado branco no tubo contendo gelatina e/ou gelatina com cloreto de sódio e ausência de precipitado no tubo contendo somente cloreto de sódio (ALICE *et al.*, 1985; FALKENBERG *et al.*, 2003).

3.1.4.2 Análise química das amostras AQ, HE, AQ FILT, AQ PPT, AQ PPT FR 1-3 e AQ PPT FR 4-5 por cromatografia em camada delgada

Os extratos AQ, HE, as frações AQ FILT, AQ PPT, AQ PPT FR1-3 e AQ PPT FR 4-5 foram analisadas por cromatografia em camada delgada em gel de

sílica, utilizando-se o sistema eluente *n*-butanol:ácido acético:água 2:1:1, ou em celulose, utilizando-se o sistema Forestal como eluente (ácido acético:água:ácido clorídrico conc 30:10:3). Os reveladores utilizados foram: solução metanólica de cloreto férrico a 1 % e reagente natural (composição segundo WAGNER *et al.*, 1984) (STAHL, 1969).

3.1.4.3 Quantificação dos compostos fenólicos

Para os ensaios de quantificação dos compostos fenólicos, foram testados o extrato aquoso, a fração AQ PPT e a fração AQ PPT FR 4-5. Com a finalidade de avaliar o conteúdo de fenóis como taninos, utilizou-se o método de determinação de fenóis por precipitação com proteínas. Para a determinação de fenóis como taninos condensados, utilizou-se o método de determinação de fenóis por catequina. O terceiro método utilizado foi a quantificação de fenóis totais pelo método de Folin Ciocalteau com modificações.

3.1.4.3.1 Preparação das amostras para determinação de fenóis por precipitação com proteínas (Adaptado de: HAGERMAN e BUTLER, 1978)

Para a preparação da curva padrão do ácido tânico foram preparados 25 mL de solução de ácido tânico em metanol na concentração 1000 µM e realizadas as diluições das soluções padrões para as concentrações de 100 a 500 µM. Foram adicionados 2 mL de solução tampão de BSA (albumina de soro bovino) a 1 mL de cada solução padrão. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, o precipitado foi dissolvido em 4 mL de SDS/TEA (dodecil sulfato de sódio/trietanolamina) e 1 mL de FeCl₃. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorvância a 510 nm de todas as concentrações, tendo como branco o metanol e todos os reagentes, exceto o ácido.

Foram pesados, em triplicata, 0,0715 g do extrato AQ, 0,0734 g da fração AQ PPT e 0,0717 g da fração AQ PPT FR 4-5 de *Baccharis anomala* e adicionados 2,5 mL de acetona 70 %. As amostras foram homogeneizadas e deixadas 20 minutos no ultrassom sendo após centrifugadas por 10 minutos (3000 rpm). O sobrenadante foi

retirado e reservado. Ao precipitado remanescente, foram adicionados mais 2,5 mL de acetona 70 % e colocados novamente no ultrassom por 20 minutos e centrifugado após por 10 minutos. Os sobrenadantes das duas extrações foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório para a retirada da acetona. Este concentrado resultante das duas extrações foi utilizado para determinação do conteúdo de fenóis por precipitação com proteínas e por catequina (item 3.1.4.3.2).

As amostras obtidas segundo parágrafo anterior foram redissolvidas em 10 mL de metanol 50 % em balão volumétrico.

Foram colocados 2 mL da solução BSA (albumina de soro bovino) em um tubo de centrífuga e adicionados 1 mL da solução obtida acima, foi agitado manualmente e deixado repousar na geladeira. As amostras foram retiradas da geladeira após 24 horas, centrifugadas por 15 minutos (3000 rpm) e retirou-se o sobrenadante. O precipitado foi redissolvido em 4 mL de SDS/TEA e 1 mL de FeCl_3 . Após 15 minutos fez-se a leitura da absorvância em 510 nm. Utilizou-se como branco: 4 mL de SDS/TEA e 1 mL de FeCl_3 .

3.1.4.3.2 Determinação de fenóis por catequina (Adaptado de: SEDDON e DOWNEY, 2008)

Para a preparação da curva padrão de catequina foram preparados 10 mL de solução de catequina em metanol na concentração 1000 μM e realizadas as diluições das soluções padrões para as concentrações de 10 a 50 μM . A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorvância a 280 nm de todas as concentrações, tendo como branco o metanol.

As amostras preparadas segundo o item 3.1.4.3.1 foram redissolvidas em 10 mL de metanol 50 % em balão volumétrico. Uma alíquota de 1 mL desta última solução foi finalmente diluída em 10 mL de metanol 50 % em balão volumétrico, as quais foram utilizadas para a realização da leitura da absorvância em 280 nm.

3.1.4.3.3 Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu com modificações (BONOLI et al., 2004)

Para a obtenção da curva padrão do ácido gálico foram preparados 4 mL de solução de ácido gálico em metanol na concentração de 500 μ M e realizadas as diluições das soluções padrões para as concentrações 10 a 30 μ M. Cada solução padrão foi agitada manualmente com 500 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min; passado este tempo, 2 mL de Na₂CO₃ a 15 % foram adicionados à mistura e agitada por 30 s. Finalmente, as soluções tiveram seus volumes completados para 20,0 mL com água destilada. Após 2 h, a absorvância das amostras foi medida a 750 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como "branco" o metanol e todos os reagentes, exceto o ácido.

A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorvância a 750 nm de todas as concentrações.

Para as amostras AQ, AQ PPT e AQ PPT FR 4-5, 7,5 mg de cada foram diluídos em 50 mL de metanol. Retirou-se uma alíquota de 5 mL e diluiu-se a 7 mL com metanol. Esta solução foi agitada com 500 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min; passado este tempo 2 mL de Na₂CO₃ a 15 % foram adicionados à mistura e agitada por 30 s. Finalmente, a solução teve seu volume completado para 20,0 mL com água destilada. Após 2 h, a absorvância das amostras foi medida a 750 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como "branco" o metanol e todos os reagentes, menos a amostra. As análises foram feitas em triplicata.

3.2 Avaliação da atividade antiviral *in vitro*

3.2.1 Cultivo celular

Foram utilizadas células Vero (ATCC CCL-81), fibroblastos de rim de macaco (African green monkey). O cultivo celular foi mantido em meio mínimo essencial de Eagle (E-MEM) com 10 % de soro fetal bovino (SFB), antimicrobiano enrofloxacino e antifúngico anfotericina B.

3.2.2 Suspensão viral

Foram empregadas as cepas ATCC-VR733 e Aciclovir-resistente 29-R do HSV-1. O vírus foi cultivado em células Vero e armazenado em nitrogênio líquido até o momento do uso. O título viral foi determinado pelo método de Kärber e expresso em TCID₅₀/50µL (dose infectante para 50 % do tapete celular) (MAHY e KANGRO, 1996). Foram utilizadas suspensões virais com título entre 10⁵ e 10^{6,25} TCID₅₀/50µL.

3.2.3 Preparo das amostras de extratos vegetais e frações

Para os testes de citotoxicidade e atividade antiviral, amostras dos extratos vegetais e frações obtidas segundo item 3.1 foram preparadas diluindo-se o extrato/fração seco em tampão fosfato (PBS) com o auxílio de 10 % de DMSO quando necessário e armazenando-os a -20 °C até o momento do uso.

3.2.4 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

A determinação da citotoxicidade é uma parte importante da avaliação de um agente antiviral potencial, uma vez que um composto útil não deve demonstrar toxicidade aguda ou crônica contra o hospedeiro (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2003).

Para o teste de citotoxicidade foram realizadas duas técnicas: observação da alteração morfológica e avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT) (este último foi realizado apenas para as amostras ativas). Estas técnicas permitiram a determinação da concentração citotóxica para aproximadamente 50 % do tapete celular (CC₅₀) e da concentração máxima não-tóxica (CMNT) da amostra.

3.2.4.1 Técnica de observação da alteração morfológica

A técnica de observação da alteração morfológica é caracterizada pela incubação de amostra em contato com o tapete celular por determinado período de

tempo, após o qual observa-se as alterações morfológicas, como perda da confluência, arredondamento das células, diminuição do tamanho, granulação e vacuolização do citoplasma (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2003).

Para a realização da técnica, preparou-se suspensão de células Vero, contendo aproximadamente 3×10^5 células/mL, através da tripsinização de frasco de cultura celular. Essa suspensão foi distribuída em microplaca de 96 cavidades (100 μ L por cavidade). Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂, o tapete celular estava confluyente e foram feitas diluições ao meio da amostra e aplicadas na placa em quadruplicata. Após incubação a 37 °C por 72 horas, a citotoxicidade foi determinada por observação da alteração morfológica da célula, em microscópio invertido de contraste de fase. A concentração de amostra na qual o tapete celular foi reduzido aproximadamente à metade dos controles foi denominada concentração citotóxica para aproximadamente 50 % do tapete celular (CC₅₀) e a concentração máxima de amostra que não causou alterações no tapete celular foi denominada concentração máxima não tóxica (CMNT) (MONTANHA *et al.*, 2004; FRITZ *et al.*, 2007). Foram realizados três experimentos em dias distintos.

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

A avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT), para as amostras ativas, foi realizada preparando-se suspensão de células Vero, contendo aproximadamente 3×10^5 células/mL, através da tripsinização de frasco de cultura celular. Essa suspensão foi distribuída em microplaca de 96 cavidades (100 μ L por cavidade). Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂, o tapete celular estava confluyente e foram feitas diluições ao meio da amostra e aplicadas na placa em quadruplicata. Após incubação a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ por 72 horas, o sobrenadante foi retirado, adicionou-se 20 μ L de solução de MTT (2 mg/mL em PBS) por cavidade e a microplaca foi incubada em estufa a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ por 3 horas. Após o período de incubação,

retirou-se o MTT de cada cavidade e adicionou-se 50 µL de etanol p.a. e a microplaca foi incubada em estufa por 5 minutos para que todo o formazan fosse solubilizado. O sobrenadante foi coletado e submetido a leitor tipo ELISA a 550 e 620 nm. Após a leitura, subtraíram-se os valores obtidos a 620 nm dos obtidos a 550 nm e realizou-se o cálculo da viabilidade celular, comparando-se com os controles, segundo a fórmula: DO teste/DO controle x 100.

A CC_{50} das amostras foi calculada a partir das porcentagens de células viáveis em relação aos controles celulares, por análise de regressão (SERKEDJEVA e IVANCHEVA, 1999; BARRIO e PARRA, 2000; ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2003). Foram realizados três experimentos em dias distintos.

3.2.5 Avaliação da atividade antiviral *in vitro*

Após o ensaio de citotoxicidade, a avaliação da atividade antiviral dos extratos e frações foi primeiramente realizada através da técnica de inibição do efeito citopático viral (ECP) e, para as amostras ativas, realizou-se a avaliação da redução do título viral pelo método das diluições-limite (EPTT – do inglês “endpoint titration technique”).

A fração que apresentou maior atividade foi avaliada posteriormente através das técnicas de avaliação da atividade antiviral antes e após a infecção viral e atividade virucida.

3.2.5.1 Técnica da inibição do efeito citopático viral (ECP)

Prepararam-se microplacas de 96 cavidades, conforme o item 3.2.4.1. Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂, o tapete celular estava confluyente, quando se adicionou 6 diluições da amostra ao tapete celular e o vírus foi empregado a 100 doses infectantes. As placas foram incubadas por cerca de 72 horas (4 ciclos de multiplicação viral) em estufa a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂ (FRITZ *et al.*, 2007). Soluções de aciclovir Sigma[®] (diluições ao meio, de 100 a 3,12 µg/mL) foram utilizadas como controle positivo.

O efeito citopático viral foi observado em microscópio invertido de contraste de fase e graduado em um sistema de 0 a 4; 0 (não ocorre ECP), 1 (menos de 50 % das células exibem ECP), 2 (cerca de 50 % das células exibem ECP), 3 (cerca de 75 % das células exibem ECP), 4 (monocamada totalmente destruída ou exibindo 100 % de ECP) (MAHY e KANGRO, 1996). Foram realizados três experimentos em dias distintos.

3.2.5.2 Técnica da redução do título infeccioso viral pelo método das diluições-limite (EPTT)

Para as amostras que apresentaram atividade, realizou-se a técnica de diluições-limite (EPTT – do inglês “endpoint titration technique”). Prepararam-se microplacas de 96 cavidades, conforme o item 3.2.4.1. Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂, o tapete celular estava confluyente e ¼ da microplaca foi tratada com a amostra na CMNT e diluições subseqüentes a esta, até a diluição capaz de inibir o ECP em 50 % e a ¼ da microplaca foi adicionado E-MEM. Após, diluições ao décimo de vírus foram adicionadas a culturas celulares tratadas e não-tratadas. Após incubação por 72 horas a 37°C, os títulos virais nas células tratadas e não-tratadas foram determinados. A atividade antiviral foi expressa como percentagem de inibição (PI) da replicação viral e calculada de acordo com a fórmula: $1 - (\text{antilogaritmo do título do teste} / \text{antilogaritmo do título do controle}) \times 100$ (MIRANDA *et al.*, 2002). Foram realizados três experimentos em dias distintos.

3.2.5.3 Avaliação da atividade virucida da amostra AQ PPT FR 4-5

A habilidade da amostra de diretamente inativar a partícula viral (efeito virucida) foi investigada misturando-se, em tubos Eppendorf[®], quantidades iguais de suspensão viral estoque e diluições da amostra, partindo-se da CMNT. Como controle, fez-se incubação de uma mistura da suspensão viral estoque com meio de cultivo celular nas mesmas quantidades empregadas para a mistura em teste. Após 1 hora de incubação realizou-se a titulação pelo método de Kärber (PAYMENT e

TRUDEL, 1989) e determinou-se o índice virucida (IV), utilizando-se a fórmula: $IV = \text{título do controle} / \text{título do teste}$. Índices menores ou iguais a 1 não foram considerados significantes (MIRANDA *et al.*, 2002). Foram realizados três experimentos em dias distintos.

3.2.5.4 Avaliação do efeito da amostra AQ PPT FR 4-5 no pré-tratamento celular

Prepararam-se microplacas de 96 cavidades, conforme o item 3.2.4.1. Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂, o tapete celular estava confluyente e meia microplaca foi tratada com a amostra na CMNT e CMNT/2 (teste) e a outra metade com E-MEM. As células foram incubadas por 1 hora a 37 °C. Após, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e inoculadas com diluições ao décimo de vírus. As microplacas foram, então, incubadas por 1 hora a 37 °C, lavadas 3 vezes, foi adicionado E-MEM e as placas foram incubadas por 72 horas a 37 °C. Os títulos do vírus nos controles e teste foram calculados pelo método de Kärber e a atividade antiviral foi expressa como descrita na seção 3.2.5.2 (MIRANDA *et al.*, 2002). Foram realizados três experimentos em dias distintos.

3.2.5.5 Avaliação da atividade da amostra AQ PPT FR 4-5 após a penetração viral

Prepararam-se microplacas de 96 cavidades, conforme o item 3.2.4.1. Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂, o tapete celular estava confluyente e a microplaca foi tratada com diluições ao décimo de vírus. As células foram incubadas por 1 hora a 37 °C. Após, o tapete celular foi lavado 3 vezes, a amostra foi adicionada na CMNT e CMNT/2 (teste) a meia placa e E-MEM a outra metade. As microplacas foram, então, incubadas por 1 hora a 37 °C, as células lavadas 3 vezes, foi adicionado E-MEM e as placas foram incubadas por 72 horas a 37 °C. Os títulos do vírus nos controles e teste foram calculados pelo método de Kärber e a atividade antiviral foi expressa como descrita na seção 3.2.5.2 (MIRANDA *et al.*, 2002). Foram realizados três experimentos em dias distintos.

4 Resultados e Discussão

4.1 Análise química

4.1.1 Preparação dos extratos

A tabela 3 apresenta os rendimentos dos extratos preparados a partir das folhas secas trituradas de *Baccharis anomala*.

Tabela 3. Rendimento dos extratos aquoso e hidroetanólico de folhas de *Baccharis anomala*.

Extrato	Massa da planta moída e seca (g)	Massa de extrato seco (g)	Rendimento (%)
Aquoso	10	2,4	24
Hidroetanólico	10,6	2,9	28

4.1.2 Fracionamento do extrato aquoso

4.1.2.1 Rendimento do fracionamento do extrato aquoso com solventes de polaridade crescente

Tabela 4. Rendimento do fracionamento do extrato aquoso com solventes de polaridade crescente em funil de separação.

Extrato fracionado	Massa	Frações	Massa das frações secas (mg)	Rendimento (%)
Extrato aquoso das folhas de <i>Baccharis anomala</i>	1 g	diclorometano	3,5	0,35
		acetato de etila	11,8	1,18
		<i>n</i> -butanol	56,9	5,69
		remanescente aquoso	863,2	86,32

Devido ao fato de que o remanescente aquoso contém o maior percentual de rendimento, decidiu-se avaliar o comportamento dessa fração em relação a solventes de polaridade maior do que o *n*-butanol. Verificou-se, então, que parte do extrato aquoso precipita na presença de etanol p.a. e optou-se por realizar o fracionamento do extrato aquoso por precipitação com etanol (duas vezes). O rendimento deste fracionamento está apresentado na tabela 5.

4.1.2.2 Rendimento do fracionamento por precipitação com etanol

Tabela 5. Rendimento do fracionamento do extrato aquoso de folhas de *Baccharis anomala* por precipitação com etanol.

Amostra	Massa (g)	Massa filtrado (g)	Massa precipitado (g)	% filtrado	% precipitado
Extrato aquoso	13,3	3,5	9,8 (AQ PPT I)	26	74
Precipitado I (submetido à segunda pptação)	7,1	1,3	5,8 (AQ PPT)	19	81

Com a finalidade de purificação da fração AQ PPT obtida com etanol p.a foi realizado fracionamento em coluna de permeação molecular (2 vezes), gerando duas frações em cada fracionamento.

4.1.2.3 Fracionamento da fração AQ PPT em coluna

Ao realizar o fracionamento da fração AQ PPT em coluna de permeação molecular, utilizando-se misturas de metanol e água como eluente, obteve-se 5 frações. Estas foram avaliadas por cromatografia em camada delgada em gel de sílica, utilizando-se o sistema eluente *n*-butanol:ácido acético:água 2:1:1 e, por apresentarem perfil cromatográfico semelhante, reuniu-se as frações 1 a 3 e 4 a 5, originando duas frações. O rendimento deste fracionamento está apresentado na tabela 6.

Tabela 6. Rendimento do fracionamento da fração AQ PPT com etanol.

Frações obtidas	Massa (mg)	% frações
Fração 1-3a	492,3	16
Fração 4-5a	2580,9	84

Como a fração 4-5 foi majoritária e apresentou maior atividade antiviral do que a fração 1-3 realizou-se novo fracionamento por permeação molecular monitorado por cromatografia em camada delgada. Este fracionamento originou cinco frações e, por apresentarem perfil cromatográfico semelhante, reuniu-se as frações 1 a 3 e 4 a 5, originando duas frações. O rendimento deste fracionamento está apresentado na tabela 7.

Tabela 7. Rendimento do fracionamento da fração 4-5a obtida do fracionamento da fração AQ PPT.

Frações obtidas	Massa (mg)	% frações
Fração 1-3b (AQ PPT FR 1-3)	241,5	19
Fração 4-5b (AQ PPT FR 4-5)	1020	81

Através dos fracionamentos realizados, pode-se concluir que foi conseguida a separação dos constituintes químicos da fração AQ PPT em duas frações com perfil cromatográfico diferente (como apresentado no item 4.1.3.2) para a avaliação da atividade antiviral contra o vírus HSV-1.

4.1.3 Caracterização química

4.1.3.1 Prospecção de constituintes químicos no extrato aquoso

Os testes de prospecção de constituintes químicos indicaram a presença de taninos, catequinas e saponinas e ausência de antocianinas, antocianidinas, flavonóides (flavanonas, flavonóis, flavanonas, flavononóis, xantonas), esteróides, triterpenóides, e alcalóides. O teste de precipitação com gelatina indicou a presença de taninos no extrato aquoso de *Baccharis anomala*.

Os resultados dos ensaios de prospecção dos constituintes químicos de *Baccharis anomala* corroboram com os encontrados por ALICE *et al.*, 1985, para

taninos e saponinas, mas diferem quanto à presença de triterpenos/esteróides, provavelmente porque naquele estudo o extrato realizado foi etanólico e este estudo foi realizado com o extrato aquoso devendo, portanto, conter quantidades menores e/ou indetectáveis de triterpenos/esteróides pelo método utilizado.

4.1.3.2 Cromatografia em camada delgada

Após testes com vários sistemas eluentes, reveladores e fases estacionárias para cromatografia em camada delgada com a finalidade de avaliar a composição química de extratos e frações de *Baccharis anomala*, selecionou-se o sistema eluente *n*-butanol:ácido acético:água (2:1:1) para cromatografia em camada delgada em sílica gel e o eluente Forestal (ácido acético:água:ácido clorídrico conc 30:10:3) para cromatografia em camada delgada em celulose.

Através das duas cromatografias em camada delgada apresentadas nas figuras 4 e 5, pode-se observar a presença de compostos fenólicos em todas as amostras (devido à utilização de cloreto férrico e reagente natural como reveladores). Como citado na revisão da literatura, os compostos fenólicos são encontrados em muitas espécies do gênero *Baccharis*.



Figura 4. Cromatografia em camada delgada em gel de sílica, eluente: *n*-butanol:ácido acético:água (2:1:1), revelador: cloreto férrico a 1 % em metanol. Legenda: 1= HE, 2 = AQ, 3 = AQ FILT, 4 = AQ PPT, 5 = AQ PPT FR 1-3, 6 = AQ PPT FR 4-5. Ver organograma de purificação, figura 3, página 26.

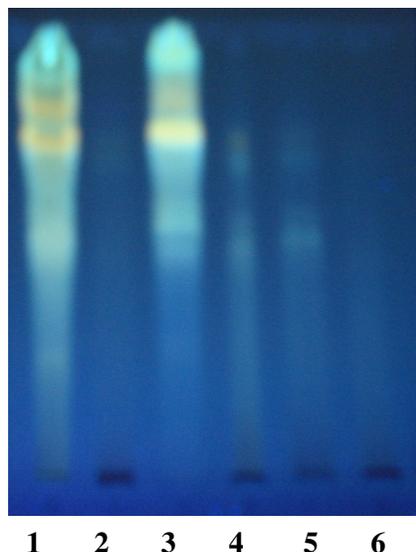


Figura 5. Cromatografia em camada delgada em gel de sílica, eluente: *n*-butanol:ácido acético:água (2:1:1), revelador: reagente natural/UV366 nm. Legenda: 1= HE, 2 = AQ, 3 = AQ FILT, 4 = AQ PPT, 5 = AQ PPT FR 1-3, 6 = AQ PPT FR 4-5. Ver organograma de purificação, figura 3.

Pode-se observar nas figuras 4 e 5 que as amostras representativas das etapas do fracionamento do extrato aquoso (amostras AQ, AQ PPT e AQ PPT FR 4-5), apresentam maior polaridade (ocorre menor migração da amostra na placa de gel de sílica) do que as amostras HE, AQ FILT e AQ PPT FR 1-3 (ocorre maior migração da amostra). Na amostra AQ FILT da figura 5 podemos observar, ainda, a presença de flavonóides, que não foram detectados pelos testes de prospecção no extrato aquoso (originário da amostra AQ FILT), devido ao fato de a análise por cromatografia em camada delgada representar um método mais sensível do que os métodos utilizados nos testes de prospecção.

Como os compostos na fase aquosa são muito polares decidiu-se utilizar celulose como fase estacionária no lugar de gel de sílica. Através da cromatografia em camada delgada apresentada na figura 6, podemos observar a migração das substâncias presentes em abundância nas amostras ativas. A migração dessas substâncias foi possível apenas com a utilização do eluente Forestal em placas de celulose.

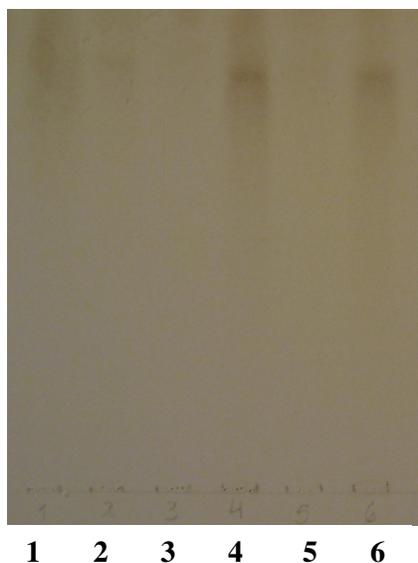


Figura 6. Cromatografia em camada delgada em celulose. Eluente: Forestal (ácido acético:água:HCl conc 30:10:3). Legenda: 1= HE, 2 = AQ, 3 = AQ FILT, 4 = AQ PPT, 5 = AQ PPT FR 1-3, 6 = AQ PPT FR 4-5. Ver organograma de purificação, figura 3.

4.1.3.3 *Quantificação dos compostos fenólicos*

Para os ensaios de quantificação dos compostos fenólicos, foram testados o extrato aquoso, a fração AQ PPT e a fração AQ PPT FR 4-5. A determinação de compostos fenólicos foi realizada através da determinação de fenóis por precipitação com proteínas, por catequina e pelo método de Folin-Ciocalteu.

4.1.3.3.1 *Determinação de fenóis por precipitação com proteínas*

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrão de ácido tânico (100 a 500 µg/mL) e expressos como mg de EAT (equivalentes de ácido tânico) por g de extrato.

A equação do gráfico da curva de calibração de ácido tânico foi $y = 0,1459x + 0,0335$ e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9991$ (Figura 7).

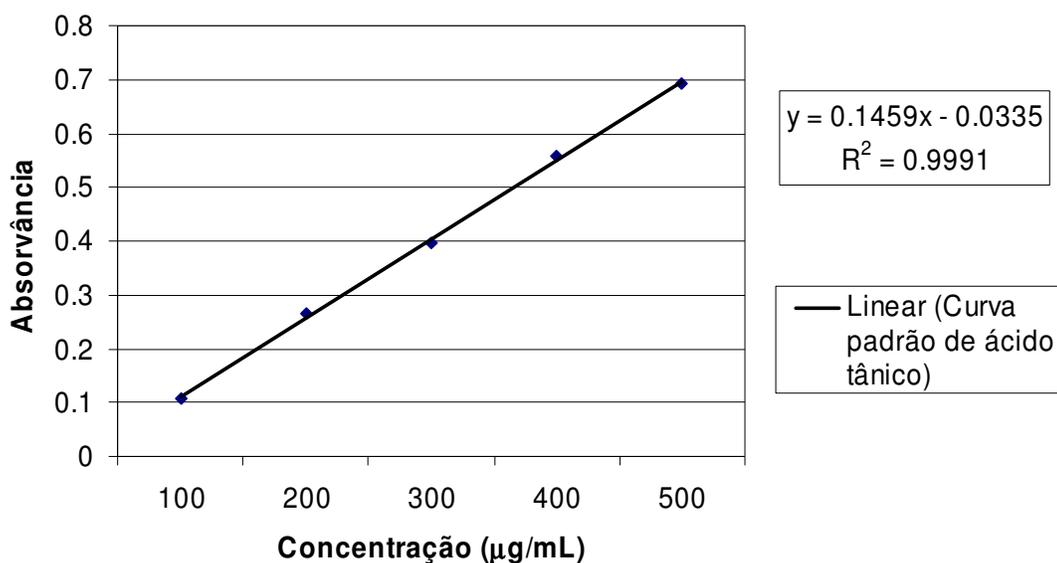


Figura 7. Curva padrão de ácido tânico nas concentrações de 100 a 500 µg/mL.

Os resultados obtidos para determinação de fenóis por precipitação com proteínas está apresentado na tabela 8.

Tabela 8. Determinação de fenóis por precipitação com proteínas

Amostra	Conteúdo fenólico (EAT/ g do extrato) ^a
AQ	0,337
AQ PPT	0,083
AQ PPT FR 4-5	0,120

^a Dados de fenóis expressos como mg de EAT (equivalentes de ácido tânico) por grama de amostra.

4.1.3.3.2 Determinação de fenóis por catequina

A determinação de compostos fenólicos foi realizada também através da determinação de fenóis por catequina.

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras em uma curva de calibração padrão de catequina (10 a

50 µg/mL) e expressos como mg de EC (equivalentes de catequina) por g de amostra.

A equação do gráfico da curva de calibração da catequina foi $y = 0,134x + 0,0018$ e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9999$ (Figura 8).

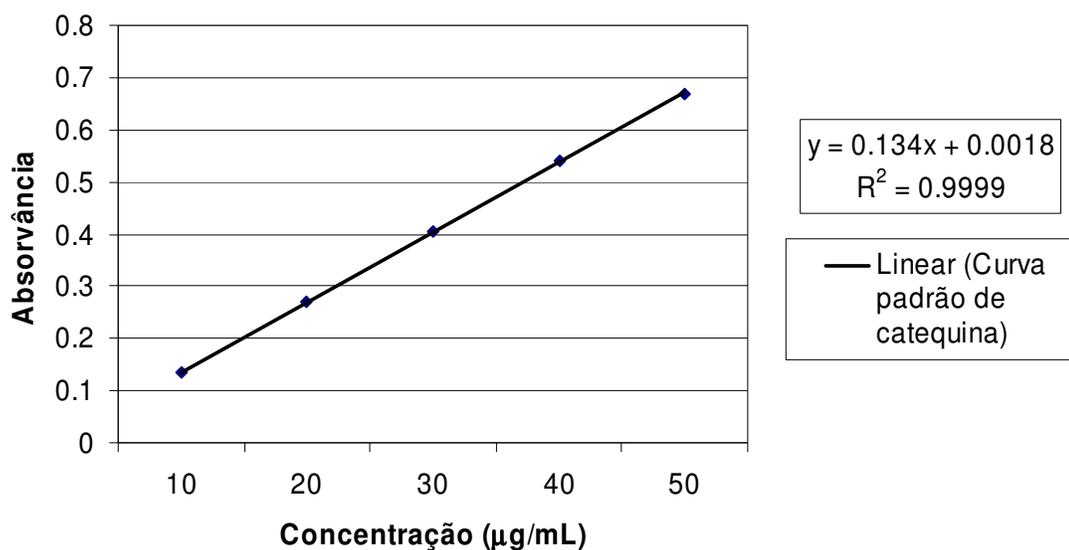


Figura 8. Curva padrão da catequina nas concentrações de 10 a 50 µg/mL.

Os resultados obtidos para determinação de fenóis por catequina estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Determinação de fenóis por catequina

Amostra	Conteúdo fenólico (EC/ g do extrato) ^a
AQ	24,55
AQ PPT	9,30
AQ PPT FR 4-5	5,75

^a Dados de fenóis expressos como mg de EC (equivalentes de catequina) por grama de amostra.

4.1.3.3.3 Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu com modificações (BONOLI et al., 2004)

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras em uma curva de calibração padrão de ácido gálico (10 a 30 µg/mL) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de amostra.

A equação do gráfico da curva de calibração de ácido gálico foi $y = 0,0297x - 0,035$ e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9989$ (Figura 9). As análises foram realizadas em triplicata.

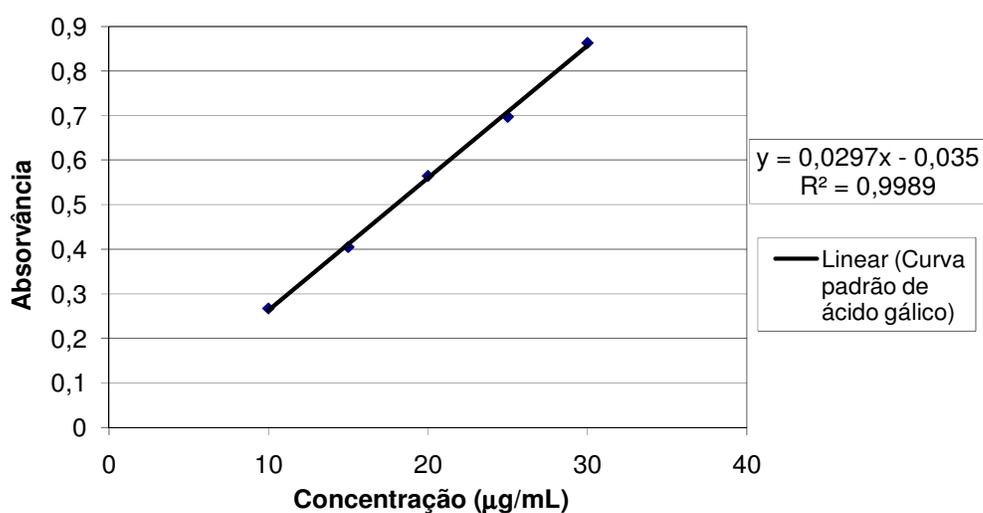


Figura 9. Curva padrão do ácido gálico nas concentrações de 10 a 30 µg/mL.

Os resultados obtidos na determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu, expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de amostra, são apresentados na tabela 10.

Tabela 10. Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu com modificações (BONOLI *et al.*, 2004).

Amostra	Conteúdo fenólico^a (EAG/ g de amostra)^b
AQ	252,45 ± 14,3089
AQ PPT	186,56 ± 47,4579
AQ PPT FR 4-5	163,93 ± 30,9278

^a Média ± desvio padrão do ensaio em triplicata

^b Dados de fenóis totais expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de amostra.

Os resultados apresentados pelas diferentes amostras obtidas na determinação de fenóis totais pelo método de Folin Ciocalteu foram comparados e demonstraram diferença estatística significativa entre as amostras AQ e AQ PPT, para um intervalo de confiança de 5 %, após análise por ANOVA, seguida pelo teste de Tukey, realizada utilizando-se GraphPad Prism versão 4.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia USA, www.graphpad.com.

Os resultados da determinação de fenóis totais pelo método de Folin Ciocalteu do extrato e frações de *Baccharis anomala* indicam teores de compostos fenólicos de 252,45, 186,56 e 163,93 EAG/ g de amostra, para o extrato AQ e as frações AQ PPT e AQ PPT FR 4-5, respectivamente. De todas as amostras analisadas, o extrato AQ apresentou o maior teor de fenóis totais, seguida da fração AQ PPT, superior à fração AQ PPT FR 4-5.

Como se pode verificar para os diferentes métodos de quantificação de compostos fenólicos, a amostra AQ apresentou os maiores teores de fenóis totais quantificados através do método de Folin Ciocalteu, e também maior conteúdo de fenóis expressos como taninos condensados do que a amostra AQ PPT e esta última, apresentou maior teor de fenóis totais e fenóis expressos como taninos condensados do que a amostra AQ PPT FR 4-5 de *Baccharis anomala*. Para o ensaio de determinação de compostos fenólicos como taninos pelo método de precipitação com proteínas, também a amostra AQ apresentou maiores teores de

fenóis, mas amostra AQ PPT FR 4-5 apresentou maior quantidade de fenólicos do que a amostra AQ PPT.

4.2 Avaliação da atividade antiviral *in vitro*

Primeiramente, realizou-se a avaliação da citotoxicidade dos extratos AQ e HE e frações do extrato aquoso de *Baccharis anomala* em células Vero através da técnica da observação da alteração morfológica. Esta técnica permitiu estimativa da CMNT e CC₅₀ das amostras durante as etapas de purificação do extrato ativo.

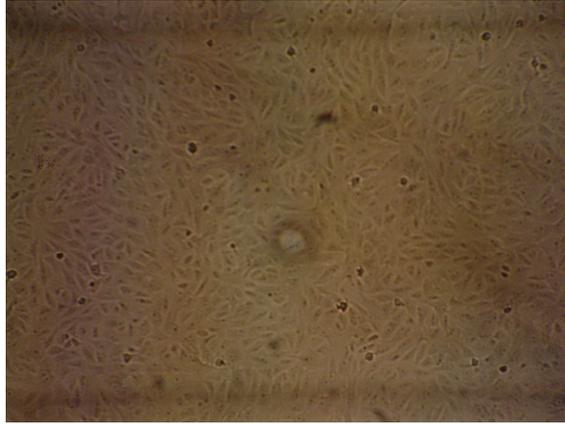
A utilização de corante para a avaliação da citotoxicidade é muito importante além de somente a técnica da observação da alteração morfológica (SMEE *et al.*, 2002).

Realizou-se, então, a avaliação da citotoxicidade através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 difenil brometo de tetrazolium]) para as amostras AQ, AQ PPT e AQ PPT FR 4-5, que representam as três etapas de purificação da fração com atividade antiviral.

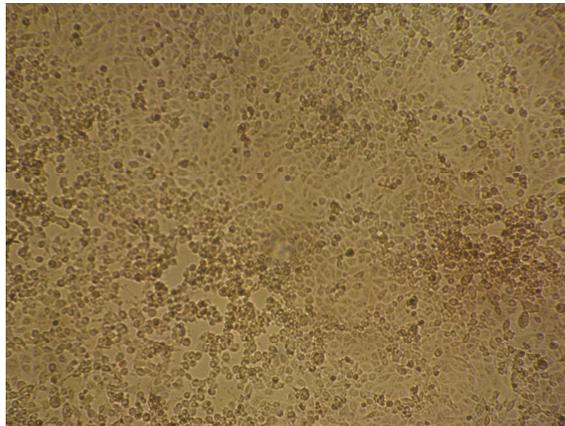
Após a avaliação da citotoxicidade, iniciou-se a avaliação da atividade antiviral dos extratos AQ, HE e frações AQ PPT, AQ FILT, AQ PPT FR 1-3 e AQ PPT FR 4-5 de *Baccharis anomala* através do ensaio de observação da inibição do efeito citopático viral (ECP) pela amostra. O ECP do herpesvírus em células Vero é caracterizado pela formação de aglomerado de células alargadas e arredondadas (MAHY e KANGRO, 1996), como apresentado na figura 10.

O ensaio de avaliação da inibição do efeito citopático viral foi utilizado para avaliação preliminar da atividade antiviral dos extratos AQ, HE e frações AQ PPT, AQ FILT, AQ PPT FR 1-3 e AQ PPT FR 4-5 nas diferentes etapas de purificação. Para a determinação da dose efetiva para 50 % do tapete celular (DE₅₀) utilizou-se o método das diluições-limite (EPTT) para as amostras ativas AQ, AQ PPT e AQ PPT FR 4-5, para a posterior realização do cálculo do índice de seletividade das amostras (IS).

a)



b)



c)

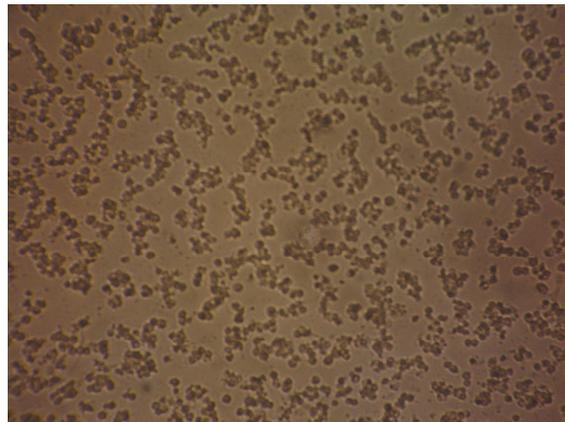


Figura 10. a) Monocamada de células Vero confluentes. b) Efeito citopático do HSV-1 em aproximadamente 50 % da monocamada de células Vero. c) Efeito citopático do HSV-1 em 100 % da monocamada de células Vero. Foto do autor. Aumento 10x4.

Com a finalidade de estudar o possível mecanismo de ação da fração ativa AQ PPT FR 4-5, realizou-se a avaliação da atividade antiviral antes e após a penetração viral e atividade virucida.

4.2.1 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* é realizada usualmente utilizando-se testes de viabilidade celular, como a entrada de corante em células mortas, após a queda da barreira de permeabilidade celular (ex. azul de Trypan) ou por função mitocondrial (ex. MTT), mas outros parâmetros, como observação de mudanças na morfologia celular em microscópio, têm também sido utilizados como indicadores de citotoxicidade de compostos (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2003).

A toxicidade das amostras em células Vero neste estudo foi avaliada primeiramente pela técnica da observação da alteração morfológica. Após a avaliação da atividade antiviral pela técnica da inibição do efeito citopático viral foi realizado, para as amostras ativas, o ensaio colorimétrico com o MTT, a fim de se determinar a concentração máxima não-tóxica (CMNT) e concentração citotóxica para 50 % do tapete celular (concentração esta utilizada posteriormente para o cálculo do índice de seletividade das amostras ativas).

4.2.1.1 Técnica da observação da alteração morfológica

Os extratos e frações obtidas de *Baccharis anomala* foram analisados e os resultados estão apresentados na tabela 11.

A técnica de observação da alteração morfológica é caracterizada pela incubação de amostra em contato com o tapete celular por determinado período de tempo, após o qual observam-se as alterações morfológicas, como perda da confluência, arredondamento das células, diminuição do tamanho, granulação e vacuolização do citoplasma (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2003).

Observou-se que apresentaram maior toxicidade o extrato HE e a fração AQ FILT, por apresentarem concentração máxima não-tóxica (CMNT) de 0,625 mg/mL e

o extrato AQ, as frações AQ PPT, AQ PPT FR 1-3 e AQ PPT FR 4-5 apresentaram menor toxicidade, com CMNT de 1,25 mg/mL..

Tabela 11. Resultado da avaliação da citotoxicidade das amostras pela técnica a observação da alteração morfológica celular. Os resultados apresentados foram obtidos a partir de três experimentos independentes*.

Amostra	CC₅₀ (mg/mL)**	CMNT (mg/mL)**
HE	5	0,625
AQ	5	1,25
AQ PPT	5	1,25
AQ FILT	2,5	0,625
AQ PPT FR 1-3	2,5	1,25
AQ PPT FR 4-5	5	1,25

*resultados obtidos a partir de três experimentos independentes, não houve variação observável.

**concentração citotóxica para aproximadamente 50 % do tapete celular (CC₅₀) e concentração máxima não-tóxica (CMNT) das amostras.

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

A redução do MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 difenil brometo de tetrazolium]) nas células avalia a integridade funcional da mitocôndria baseada na redução enzimática do sal de tetrazolium pela desidrogenase mitocondrial nas células viáveis. O MTT é um dos indicadores colorimétricos mais comuns da viabilidade celular e tem sido usado para avaliar a citotoxicidade de um modo quantitativo, em contraste com a avaliação da morfologia celular por microscopia invertida, que é qualitativo e mais subjetivo (SMEE *et al.*, 2002).

Para determinar a CC₅₀ das amostras menos tóxicas (extrato AQ e frações AQ PPT e AQ PPT FR 4-5) foi realizada análise por regressão linear simples para a amostra AQ PPT FR 4-5 e análise por regressão não-linear para as amostras AQ e AQ PPT, apresentado na figura 11. A CMNT foi obtida por determinação experimental. Os resultados estão apresentados na tabela 12.

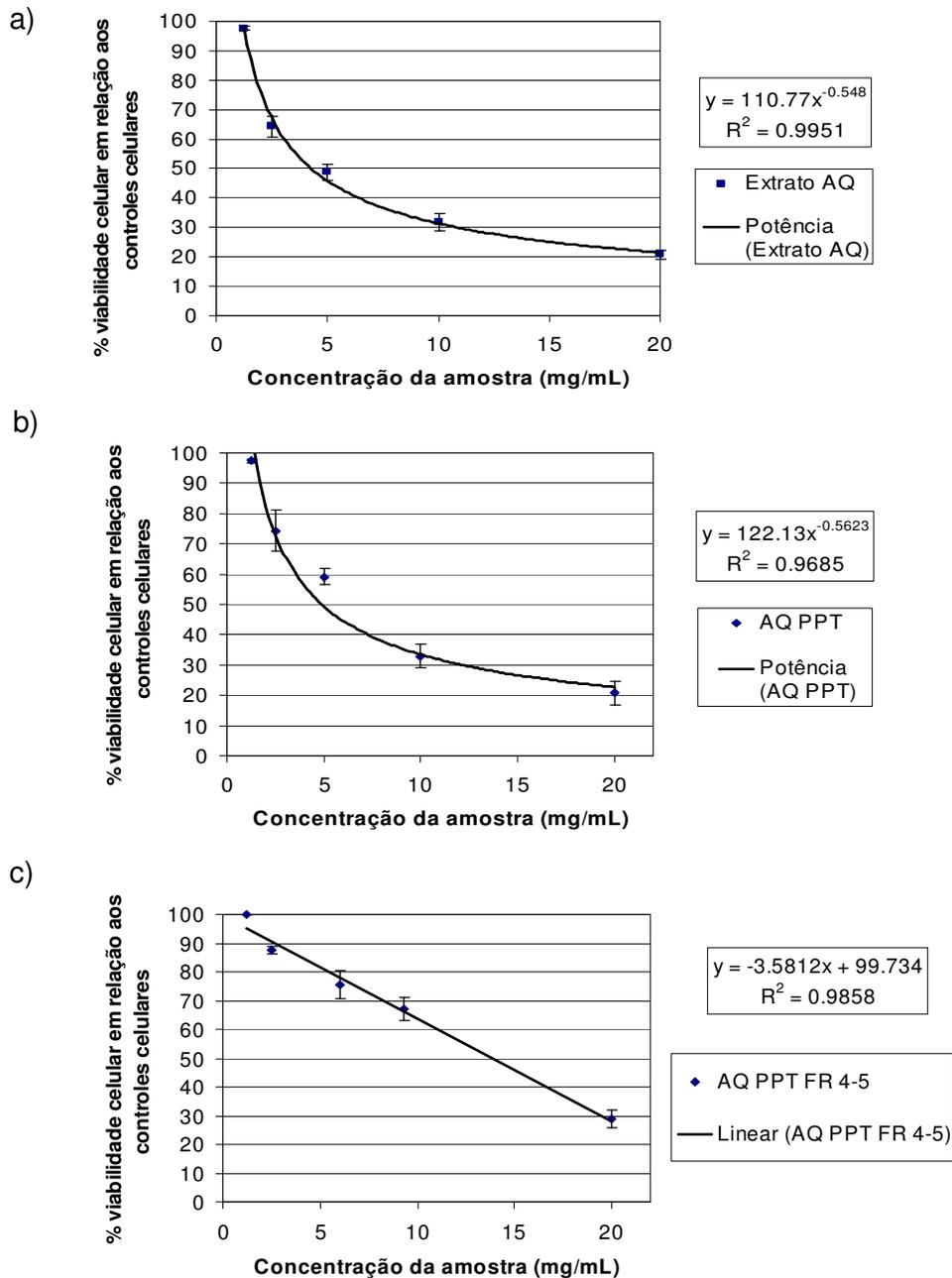


Figura 11. a) Gráfico da análise de regressão não-linear para a avaliação da citotoxicidade da amostra AQ em células Vero pela técnica de avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT). b) Gráfico da análise de regressão não-linear para a avaliação da citotoxicidade da amostra AQ PPT em células Vero. c) Gráfico da análise de regressão linear para a avaliação da citotoxicidade da amostra AQ PPT FR 4-5 em células Vero. Os resultados representam a média±desvio padrão obtidos a partir de três experimentos independentes.

Tabela 12. Demonstração da CC₅₀ e CMNT pelo método de avaliação da viabilidade celular através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT) determinadas para as amostras menos tóxicas observadas pela técnica da alteração morfológica celular. Os resultados apresentados foram obtidos a partir de três experimentos independentes.

Amostra	CC₅₀ (mg/mL)*	CMNT (mg/mL)*
AQ	4,325±0,063	1,25
AQ PPT	4,911±0,423	1,25
AQ PPT FR 4-5	13,908±0,718	1,25

*concentração citotóxica para aproximadamente 50 % do tapete celular (CC₅₀) (média±desvio padrão) e concentração máxima não-tóxica (CMNT) das amostras.

As CC₅₀ determinadas pela avaliação da citotoxicidade foram diferentes para as diferentes técnicas utilizadas. É importante ressaltar que os testes foram realizados sob as mesmas condições e que o ensaio com sal de tetrazolium é mais confiável do que a avaliação da alteração morfológica, pois é um dos indicadores colorimétricos mais comuns da viabilidade celular e tem sido usado para avaliar a citotoxicidade de um modo quantitativo, em contraste com a avaliação da morfologia celular por microscopia invertida, que é qualitativo e mais subjetivo (SMEE *et al.*, 2002).

A avaliação da citotoxicidade através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium permitiu a determinação da CC₅₀ e CMNT das amostras menos tóxicas observadas pela técnica da alteração morfológica celular. Este resultado foi utilizado posteriormente para o cálculo do índice de seletividade (IS) das amostras ativas.

Em relação aos dados a respeito de citotoxicidade em células Vero apresentados na literatura para outras espécies do gênero *Baccharis*, SIMÕES *et al.* (1999) encontraram para extratos hidrometanólicos da espécie *Baccharis trimera* CC₅₀ de 1 mg/mL, CMNT de 0,5 mg/mL e, para *Baccharis ochracea*, CC₅₀ de 0,0312 mg/mL e CMNT de 0,0156 mg/mL. MONTANHA *et al.* (2004) encontraram, para o extrato aquoso da espécie *Baccharis erioclada* CC₅₀ de 2,5 mg/mL, CMNT de 1,25 mg/mL e, para o extrato hidroetanólico, CC₅₀ de 1 mg/mL e CMNT de 0,5 mg/mL.

MONTANHA *et al.* (2004) encontraram, ainda, para extrato hidroetanólico de *Baccharis megapotamica* CC₅₀ de 0,0097 mg/mL, CMNT de 0,0048 mg/mL e para o extrato hidroetanólico de *Baccharis uncinella*, CC₅₀ de 2,5 mg/mL e CMNT de 1,25 mg/mL.

Comparando-se os resultados obtidos neste estudo com os apresentados na literatura, pode-se considerar que os extratos e frações obtidos de *Baccharis anomala* estão entre aqueles preparados a partir de espécies do gênero *Baccharis* que apresentam menor toxicidade em células Vero.

4.2.2 Avaliação da atividade antiviral *in vitro*

Para vírus como o HSV, que causam efeito citopático (ECP) discernível nas células, o escore visual da inibição do ECP é o teste realizado mais freqüentemente porque é rápido e permite a avaliação de grande número de compostos utilizando placas de 96 cavidades (SMEE *et al.*, 2002). Este teste foi realizado para monitorar a atividade antiviral nas diferentes etapas de fracionamento do extrato ativo. Para a determinação da dose efetiva para 50 % do tapete celular das amostras ativas (DE₅₀), utilizou-se o método das diluições-limite (EPTT), por ser um método mais acurado para esta determinação. Os títulos virais foram determinados nas diferentes concentrações pelo método de Karber e os resultados foram plotados em curva dose-resposta.

4.2.2.1 Técnica da inibição do efeito citopático viral (ECP)

Através da técnica da inibição do efeito citopático viral pode-se avaliar e monitorar a atividade antiviral durante as etapas de fracionamento do extrato ativo. Os gráficos das figuras 12 e 13 apresentam os resultados da técnica da inibição do ECP para as cepas ATCC-VR733 e Aciclovir-resistente 29-R do HSV-1, respectivamente.

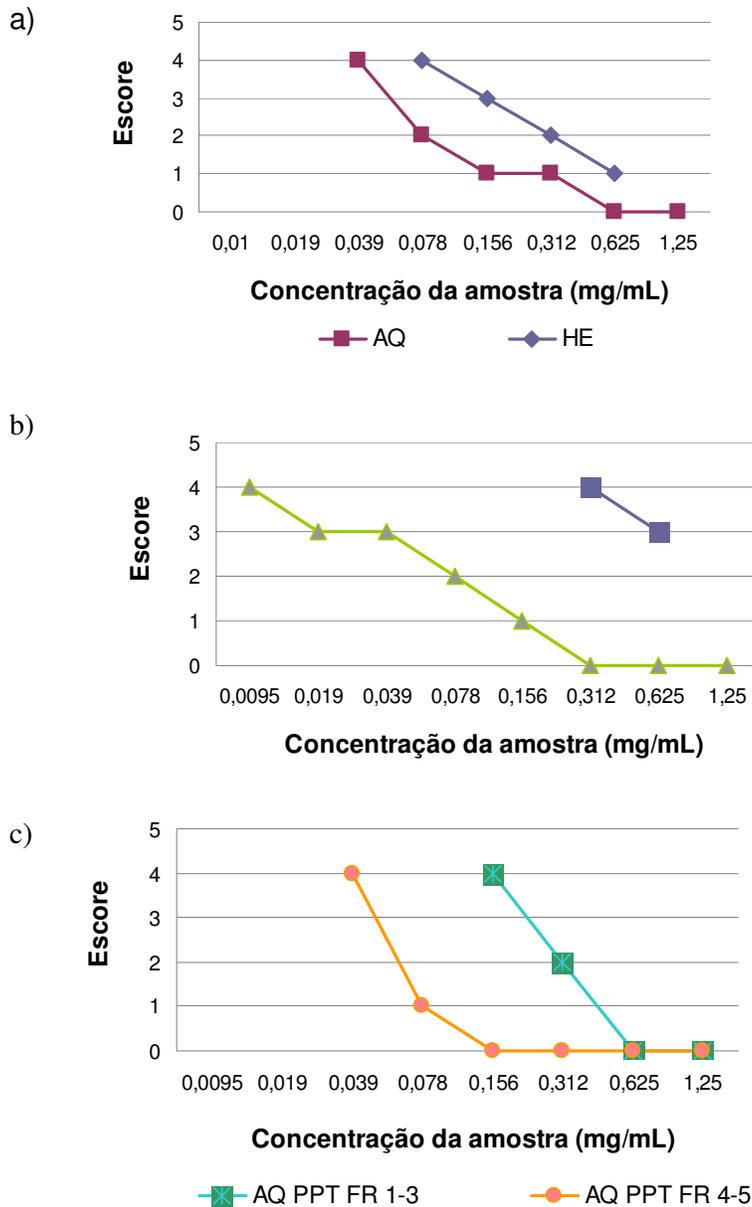


Figura 12. Gráfico representando os resultados do teste de inibição do efeito citopático viral (ECP) para a cepa ATCC-VR733 do HSV-1 das amostras a) AQ e HE; b) AQ PPT e AQ FILT; c) AQ PPT FR 1-3 e AQ PPT FR 4-5. Escore: 0 (não ocorre ECP), 1 (menos de 50 % das células exibem ECP), 2 (cerca de 50 % das células exibem ECP), 3 (cerca de 75 % das células exibem ECP), 4 (monocamada totalmente destruída, ou exibindo 100 % de ECP). Os resultados apresentados foram obtidos a partir de três experimentos independentes, não houve variação observável.

Os três gráficos da figura 12 representam a atividade antiviral medida pela técnica de observação da inibição do efeito citopático viral (cepa ATCC-VR733 do HSV-1) para as diferentes etapas de purificação das amostras ativas. No gráfico (a), observa-se maior atividade antiviral da amostra AQ do que para a amostra HE. A primeira apresenta cerca de 100 % de inibição do efeito citopático viral nas concentrações 1,25 e 0,625 mg/mL, enquanto a segunda não inibe o ECP em 100 %, mesmo na CMNT. No gráfico (b), observa-se atividade antiviral da amostra AQ PPT, que nas concentrações de 1,25, 0,625 e 0,312 mg/mL, inibe em cerca de 100 % o ECP, enquanto a amostra AQ FILT apresenta 25 % de inibição do ECP apenas na CMNT (amostra considerada então inativa). O gráfico (c) apresenta as duas frações obtidas na última etapa de purificação. Ambas apresentam atividade, mas a AQ PPT FR 4-5 apresenta inibição do ECP cerca de 100 % em quatro concentrações: 1,25, 0,625, 0,312 e 0,156 mg/mL, enquanto a amostra AQ PPT FR 1-3 inibe o ECP em cerca de 100 % apenas nas concentrações 1,25 e 0,625 mg/mL. Aciclovir (controle positivo) inibiu em 100 % o efeito citopático viral nas concentrações de 100 a 3,12 µg/mL.

Pode-se concluir, então, que o fracionamento do extrato aquoso foi efetivo para a separação dos compostos que apresentam atividade antiviral na espécie *Baccharis anomala*.

Para a cepa Aciclovir-resistente 29-R do HSV-1 a atividade antiviral das amostras, avaliada pela técnica da inibição do ECP, ilustrada na figura 13, foi semelhante à encontrada para a cepa ATCC-VR733.

No gráfico (a) da figura 13 observa-se a amostra AQ, que inibe em cerca de 100 % o ECP nas concentrações 1,25, 0,625 e 0,312 mg/mL, sendo mais ativa do que a HE. No gráfico (b) observa-se que a amostra AQ PPT é ativa porque inibe em cerca de 100 % o ECP nas concentrações de 1,25, 0,625, 0,312 e 0,156 mg/mL, enquanto que a amostra AQ FILT é inativa. No gráfico (c) observam-se duas amostras ativas, sendo a AQ PPT FR 4-5 mais ativa do que a AQ PPT FR 1-3, pois a primeira inibe em cerca de 100 % o ECP nas concentrações de 1,25, 0,625, 0,312 e 0,156 mg/mL.

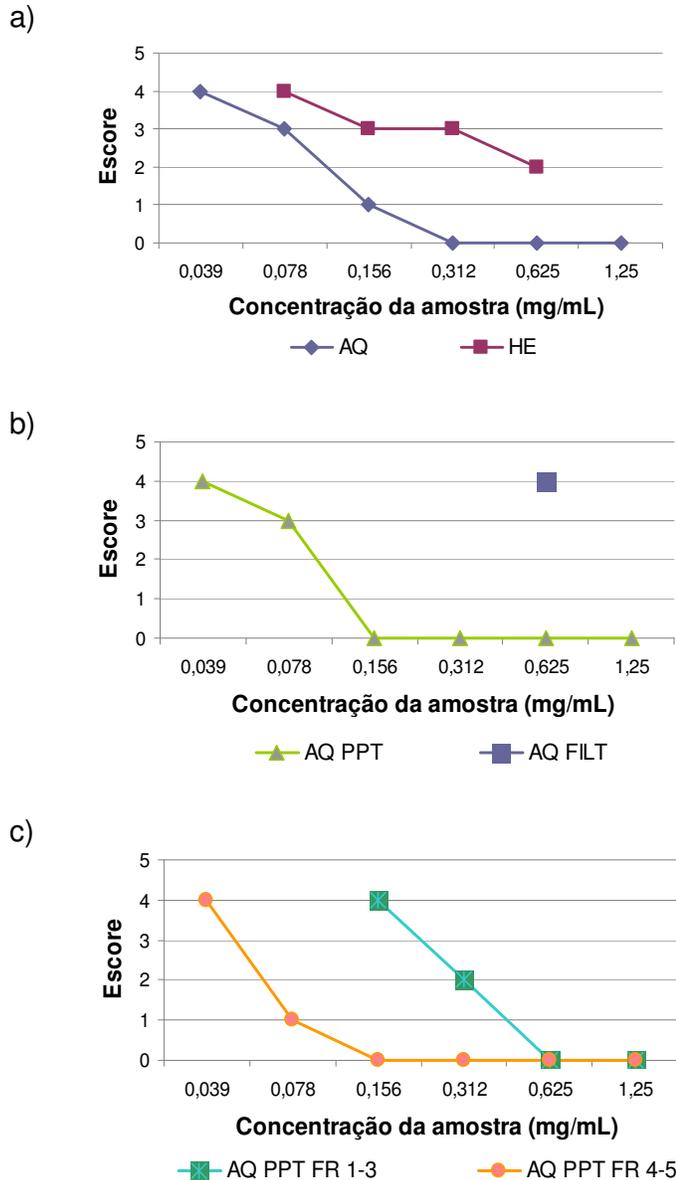


Figura 13. Gráfico representando os resultados do teste de inibição do ECP para a cepa Aciclovir-resistente 29-R do HSV-1 das amostras A) AQ e HE; B) AQ PPT e AQ FILT; C) AQ PPT FR 1-3 e AQ PPT FR 4-5. Escore: 0 (não ocorre ECP), 1 (menos de 50 % das células exibem ECP), 2 (cerca de 50 % das células exibem ECP), 3 (cerca de 75 % das células exibem ECP), 4 (monocamada totalmente destruída, ou exibindo 100 % de ECP). Os resultados apresentados foram obtidos a partir de três experimentos independentes, não houve variação observável.

Então, como conclusão, da técnica da inibição do efeito citopático viral, as amostras AQ, AQ PPT e AQ PPT FR 4-5 são mais ativas que as amostras HE e AQ PPT FILT consideradas inativas para as cepas ATCC-VR733 e Aciclovir-resistente 29-R do HSV-1.

4.2.2.2 Técnica da redução do título infeccioso viral pelo método das diluições-limite (EPTT)

As figuras 14 e 15 apresentam os resultados da avaliação da atividade antiviral pelo método das diluições-limite das amostras ativas AQ, AQ PPT e AQ PPT FR 4-5 para a cepa ATCC-VR733 e Aciclovir-resistente 29-R do HSV-1, respectivamente.

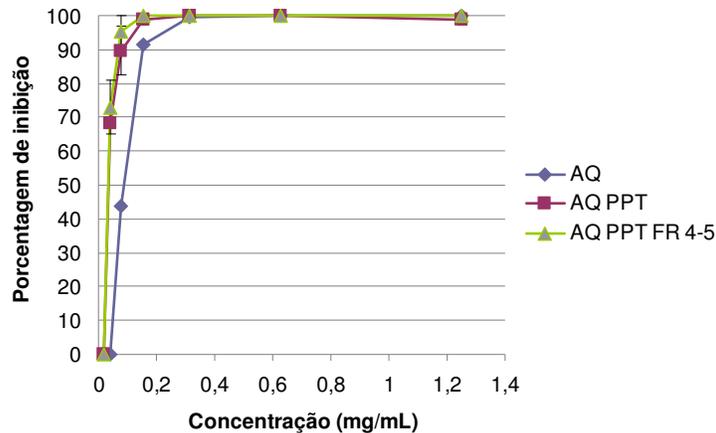


Figura 14. Avaliação da atividade antiviral pelo método das diluições-limite para as amostras ativas contra a cepa ATCC-VR733 do HSV-1. Os resultados representam a média±desvio padrão obtidos a partir de três experimentos independentes.

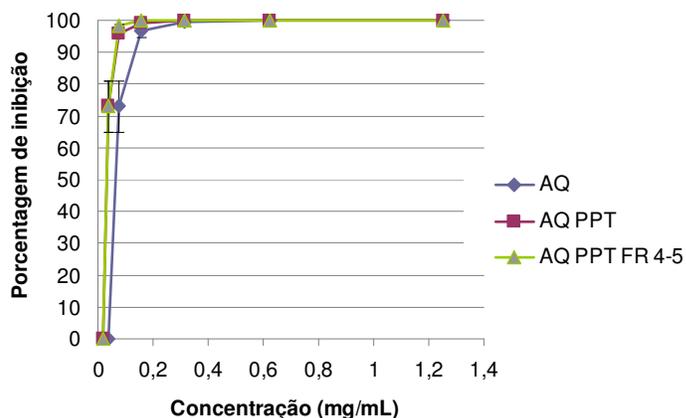


Figura 15. Avaliação da atividade antiviral pelo método das diluições-limite para as amostras ativas contra a cepa Aciclovir-resistente 29-R do HSV-1. Os resultados representam a média±desvio padrão obtidos a partir de três experimentos independentes.

Através dos gráficos plotados com os resultados do método das diluições-limite para avaliação da atividade antiviral, pode-se determinar a dose efetiva para 50 % do tapete celular (DE_{50}) a partir dos gráficos das figuras 14 e 15 para as duas cepas do HSV-1 utilizadas neste estudo, demonstrada na tabela 13. O índice de seletividade ($IS = CC_{50}/DE_{50}$) das amostras ativas foi calculado.

Tabela 13. Representação das DE_{50} obtidas pelo método do das diluições-limite e os respectivos IS calculados para as amostras ativas.

Amostra	Cepa do HSV-1	CC_{50} (mg/mL)	DE_{50} (mg/mL)	IS
AQ	ATCC-VR733	4,325±0,063	0,088±0,001	49,14
	Aciclovir-resistente 29-R	4,325±0,063	0,065±0,0026	66,53
AQ PPT	ATCC-VR733	4,911±0,423	0,034±0,000	144,44
	Aciclovir-resistente 29-R	4,911±0,423	0,033±0,0017	148,82
AQ PPT FR 4-5	ATCC-VR733	13,908±0,718	0,033±0,0017	421,21
	Aciclovir-resistente 29-R	13,908±0,718	0,033±0,0017	421,21

Observou-se, segundo a tabela 13, que as amostras apresentaram atividade antiviral seletiva em cultivo celular ($IS \geq 10$, segundo BARRIO e PARRA, 2000). Observa-se também que a amostra AQ PPT FR 4-5 é a mais seletiva, demonstrando que o fracionamento resultou na busca de fração mais ativa como antiviral para as cepas ensaiadas.

Comparando-se com outros estudos de avaliação de atividade antiviral de extratos e frações provenientes de espécies vegetais, conclui-se que os índices de seletividade obtidos neste estudo estão entre os mais altos encontrados na literatura. Como exemplos, podemos citar SIMÕES *et al.* (1999), que encontraram $IS = 10$ para extrato hidrometanólico de *Baccharis trimera* (Less.) DC. para o poliovírus 2, BARRIO e PARRA (2000) encontraram, para o extrato aquoso de *Phyllanthus orbicularis*, $IS = 12,3$ para o vírus do herpes bovino 1 e 26,03 para o HSV-2. SERKEDJEVA e IVANCHEVA (1999) encontraram, para extratos metanólicos e etanólicos de *Geranium sanguineum* L., IS de 3,4 a 13,5 para o vírus HSV-1. MIRANDA *et al.* (2002) estudaram a atividade antiviral de extrato da semente de

Licania tomentosa (Benth) e encontraram IS de 851 para cepa Aciclovir-resistente do HSV-1.

Assim, para avaliar o mecanismo de ação da atividade antiviral verificada para a amostra AQ PPT FR 4-5 foram realizados os ensaios de avaliação da atividade virucida, avaliação do efeito da amostra no pré-tratamento celular e avaliação da atividade da amostra após a penetração viral, apresentados abaixo.

4.2.2.3 Avaliação da atividade virucida da amostra AQ PPT FR 4-5

Na figura 16 está demonstrada a pronunciada atividade virucida (caracterizada quando se observa índices virucidas maiores que 2, segundo VANDEN BERGHE *et al.* (1986), para as concentrações 1,25, 0,625 e 0,312 mg/mL da amostra, para as duas cepas do HSV-1 estudadas. Nos dois gráficos apresentados na figura 16, pode-se observar atividade virucida dose-dependente da amostra AQ PPT FR 4-5.

Os resultados apresentados para as cepas ATCC-VR733 e Aciclovir-Resistente na avaliação da atividade virucida de BA AQ FO PPT FR 4-5 foram comparados e demonstraram diferença estatística significativa entre as duas cepas de HSV-1 estudadas, para um intervalo de confiança de 5 %, após análise por teste t, realizada utilizando-se GraphPad Prism versão 4.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia USA, www.graphpad.com.

Comparando-se os resultados encontrados na literatura sobre extratos de espécies vegetais com atividade virucida contra herpesvírus, conclui-se que o índice virucida de 3,25 encontrado no presente estudo para a concentração de 1,25 mg/mL da fração AQ PPT FR 4-5 de *Baccharis anomala* indica que a espécie está entre as de mais pronunciada atividade virucida e menor toxicidade. MIRANDA *et al.*, (2002) encontraram, em estudo da atividade contra HSV-1 de extrato das sementes *Licania tomentosa*, índice virucida de 2,46 para a concentração máxima não-tóxica (0,625 mg/mL). BARRIO e PARRA (2000) encontraram, após o tratamento direto de preparações de HSV-2 com extrato aquoso de *Phyllanthus orbicularis* a 0,075 mg/mL, redução do título viral de 2,75 (ou índice virucida, como denominado no

presente estudo). YOOSOOK *et al.*, (1999), estudaram a atividade virucida contra HSV-2 de extrato metanólico de *Barleria lupulina* a 1,5 mg/mL e encontraram redução do título viral maior do que 3,15 (ou índice virucida, como denominado no presente estudo).

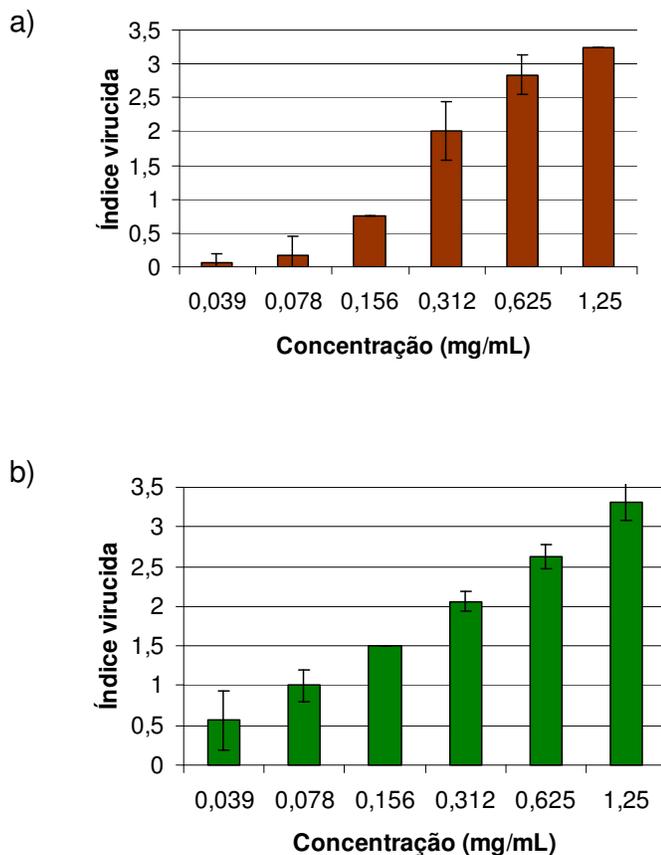


Figura 16. Gráficos representando a atividade virucida da amostra AQ PPT FR 4-5 para as cepas ATCC-VR733 (gráfico a) e Aciclovir-resistente 29-R (gráfico b) do HSV-1. Os resultados representam a média±desvio padrão de três experimentos independentes.

Este ensaio foi útil na demonstração da atividade da amostra diretamente sobre a partícula viral, ou seja, atividade virucida. Segundo COLEGATE e MOLYNEUX (1993), pode ser possível o uso de compostos virucidas na inibição de vírus envelopados, os quais são mais sensíveis a baixas concentrações de substâncias virucidas do que outros vírus, mas até hoje não têm sido relatados compostos deste tipo clinicamente úteis para o tratamento.

4.2.2.4 Avaliação do efeito da amostra AQ PPT FR 4-5 no pré-tratamento celular

Para o ensaio de avaliação do efeito da amostra no pré-tratamento celular, pode-se afirmar que, para as cepas ATCC-VR733 e Aciclovir-resistente 29-R do HSV-1 não ocorreu inibição significativa da replicação viral que pudesse indicar atividade no pré-tratamento celular. Todos os resultados representaram porcentagem de inibição da replicação viral menores do que 50 %.

4.2.2.5 Avaliação da atividade da amostra AQ PPT FR 4-5 após a penetração viral

Para o ensaio de avaliação do efeito da amostra na inibição intracelular, pode-se afirmar que, para as cepas ATCC-VR733 e Aciclovir-resistente 29-R do HSV-1 não ocorreu inibição significativa da replicação viral que pudesse indicar atividade antiviral após a penetração viral. Todos os resultados representaram porcentagem de inibição da replicação viral menores do que 50 %.

Em relação aos ensaios de avaliação de atividade antiviral, pode-se afirmar que a espécie *Baccharis anomala* é potente inibidora da replicação do HSV-1, cepas ATCC-VR733 e Aciclovir resistente 29-R *in vitro* em concentrações não-tóxicas e os ensaios de avaliação do mecanismo de ação antiviral sugerem ação direta de *Baccharis anomala* sobre a partícula viral.

No presente estudo, o extrato aquoso representou quase 25 % da massa das folhas secas da espécie, sendo que praticamente 80 % da massa deste extrato precipita na presença de etanol p.a., originando a fração denominada AQ PPT. Esta, por sua vez, foi fracionada por permeação molecular, originando as frações 1-3 e 4-5.

Através da análise cromatográfica pode-se detectar a presença de compostos fenólicos, através de coloração com cloreto férrico e reagente natural. A migração da fração mais polar (ativa) foi conseguida apenas quando utilizou-se o eluente Forestal utilizando celulose como fase estacionária.

Segundo os ensaios realizados para avaliar o conteúdo de fenóis nas amostras AQ, AQ PPT e AQ PPT FR 4-5, pode-se observar a redução da quantidade de compostos fenólicos com a purificação da amostra.

Dentre os compostos fenólicos, observa-se a presença de taninos na espécie *Baccharis anomala*, e sugere-se a hipótese de que poderiam ser os responsáveis pela ação virucida da espécie, atuando por precipitação, interferindo com as proteínas do capsídeo e/ou envelope viral.

Quanto à avaliação da citotoxicidade *in vitro*, as amostras obtidas neste trabalho estão entre as menos tóxicas encontradas na literatura, comparando-se com estudos de avaliação da citotoxicidade de extratos e frações de espécies vegetais em células Vero. Este resultado é importante, visto que os antivirais utilizados atualmente no tratamento de infecções por HSV-1 apresentam toxicidade elevada e efeitos colaterais.

Em relação à atividade antiviral, a técnica de inibição do ECP foi satisfatória para avaliação e monitoramento da atividade das frações resultantes da purificação do extrato. O extrato aquoso apresentou atividade antiviral maior que o extrato hidroetanólico.

A fração AQ PPT FR 4-5 apresentou pronunciada atividade antiviral, apresentando porcentagem de inibição da replicação viral de 100 % nas concentrações de 1,25, 0,625, 0,312 e 0,156 mg/mL, contra as cepas ATCC-VR733 e Aciclovir-resistente 29-R do HSV-1. Este resultado é muito importante, pois, com o surgimento de cepas resistentes ao aciclovir, existe urgência da descoberta de compostos ativos contra estas cepas.

Em relação ao mecanismo de ação, observou-se atividade virucida da fração AQ PPT FR 4-5 nas concentrações de 1,25, 0,625 e 0,312 mg/mL, o que também é muito importante pois, com a emergência de cepas resistentes, existe a necessidade de compostos com diferentes mecanismos de ação e, de acordo com a literatura, ainda não têm sido relatados compostos com atividade virucida úteis clinicamente para o tratamento de infecções por HSV-1.

Conclui-se, portanto, que a espécie *Baccharis anomala* possui pronunciada atividade antiviral contra o vírus HSV-1, baixa citotoxicidade em células Vero e é promissora para estudos posteriores que visem ao isolamento, identificação e mecanismo de ação antiviral de compostos ativos da espécie.

Algumas perspectivas para a continuação do trabalho são: testar a atividade antiviral de *Baccharis anomala* contra vírus não-envelopados, isolar e identificar constituintes ativos da fração AQ PPT FR 4-5, testar a atividade antiviral desses e realizar a avaliação da atividade antiviral de *Baccharis anomala in vivo*.

6 Referências

ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; GONZALES, E.; IGLESIAS, I.; IRURZUN, A.; CARRASCO, L. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. **General Pharmacology**, v.32, p.499–503, 1999a.

ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; SANCHEZ PALOMINO, S.; CHIRIBOGA, X.; CARRASCO, L. Antiviral activity of some South American medicinal plants. **Phytotherapy Research**, v.13, n.2, p.142-146, 1999b.

ABDEL-HAQ, N.; CHEARSKUL, P.; AL-TATARI, H.; ASMAR, B. New antiviral agents. **Indian Journal of Pediatrics**, v.73, p.313-321, 2006.

ALICE, C.B.; SILVA, G.A. de A.B. e; SIQUEIRA, N.C.S.; MENTZ, L.A. Levantamento fitoquímico de alguns vegetais utilizados na medicina popular do Rio Grande do Sul (Parte 1). **Caderno de Farmácia**, v.1, n.2, p.83-94, 1985.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; ANTONIO, R.V.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.6, p.843-848, 2003.

BARROSO, G.M.; BUENO, O.L. Compostas – 5. Subtribo - *Baccharidinae*. In: REIS, A. (Ed.) **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: IOESC, 2002. p.1000-1004.

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

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Antioxidant phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L. Flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.16, p.5195-5200, 2004.

BRADY, R.C.; BERNSTEIN, D.I. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**, v.61, p.73-81, 2004.

CARTER, J.B.; SAUNDERS, V.A. (Eds.). **Virology: principles and Applications**. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd., 2007. 358p

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (Eds.) **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos-Editora Universitária UNOESC, 2001. p.47-75.

CERNIK, C., GALLINA, K., BRODELL, R.T. The treatment of herpes simplex infections. **Archives of Internal Medicine**, v.168, n.11, p.1137-1144, 2008.

CHE, C-T. Plants as a source of potential antiviral agents. In: Wagner, H., Farnsworth, N.R. (eds.). **Economic and Medicinal Plant Research**. v.5. New York: Academic Press, 1991. p.167-251.

CIFUENTE, D. A.; BORKOWSKI, E. J.; SOSA, M. E.; GIANELLO, J. C.; GIORDANO, D. S.; TONN, C. E. Clerodane diterpenes from *Baccharis sagittalis*: insect antifeedant activity. **Phytochemistry**, v.61, n.8, p.899-905, 2002.

COBOS, M.I.; RODRÍGUEZ, J.L.; OLIVA, M.L.; DEMO, M.; FAILLACI, S.M.; ZYGADLO, J.A. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Baccharis notoserjila*. **Planta Medica**, v.67, n.1, p.84-86, 2001.

COLEGATE, S.M.; MOLYNEUX, R.J. **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination**. Boca Raton: CRC Press, 1993. 544 p.

DE ALENCAR, S. M.; DE AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMAN, J.; PARK, Y. K. Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.909-915, 2005.

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

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of Clinical Virology**, v.30, p.115-133, 2004.

FATAHZADEH, M. SCHWARTZ, R.A. Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.57, n.5, p.737-763, 2007.

FALKENBERG, M. de B., SANTOS, R.I. dos; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/Editora da UFSC, 2003. p.229-245.

FERESIN, G.E.; TAPIA, A.; GIMENEZ, A.; RAVELO, A.G.; ZACCHINO, S.; SORTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.89, p.73-80, 2003.

FIELD, A.K.; BIRON, K.K. "The End of Innocence" Revisited: Resistance of Herpesviruses to Antiviral Drugs. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7, n.1, p.1-13, 1994.

FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M (Eds). **Fundamental Virology**. 3.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1996. 1340 p.

FRITZ, D.; VENTURI, C.R.; CARGNIN, S.; SCHRIPSEMA, J.; ROEHE, P.M.; MONTANHA, J.A.; von POSER, G.L. Herpes virus inhibitory substances from

Hypericum connatum Lam., a plant used in southern Brazil to treat oral lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p.517-520, 2007.

FUKUDA, M.; OHKOSHI, E.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y. Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.54, n.10, p.1465-1468, 2006.

GENE, R.M.; CARTANA, C.; ADZET, T.; MARIN, E.; PARELLA, T.; CANIGUERAL, S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. **Planta Medica**, v.62, n.3, p.232-235, 1996.

GILBERT, C.; BESTMAN-SMITH, J.; BOIVIN, G. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. **Drug Resistance Updates**, v.5, p.88-114, 2002.

GONÇALVES, R.; SOARES, S.; MATEUS, N.; FREITAS, V. de. Inhibition of trypsin by condensed tannins and wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.7596-7601, 2007.

GUO, Y.; LI, Y.; XU, J.; WATANABE, R.; OSHIMA, Y.; YAMAKUNI, T.; OHIZUMI, Y. Bioactive ent-clerodane diterpenoids from the aerial parts of *Baccharis gaudichaudiana*. **Journal of Natural Products**, v.69, n.2, p.274-276, 2006.

GUTIÉRREZ, R.M.P. **Compuestos aislados de plantas com actividad antiinflamatoria, antiviral e hipogluceante**. México: Instituto Politécnico Nacional, 2002. 192 p.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L.G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.26, n.4, p.809-812, 1978.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 3.ed. London: Chapman&Hall, 1998. 302 p.

HE, K.; MONTENEGRO, G.; HOFFMANN, J.J.; TIMMERMANN, B.N. Diterpenoids from *Baccharis linearis*. **Phytochemistry**, v.41, n.4, p.1123-1127, 1996.

HUDSON, J.B. **Antiviral Compounds from Plants**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 216 p.

KHAN, M.T.H.; ATHER, A.; THOMPSON, K.D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral Research**, v.67, p.107-119, 2005.

LEMOS, M.; de BARROS, M. P.; SOUSA, J. P. B.; da SILVA FILHO, A. A.; BASTOS, J. K.; de ANDRADE, S. F. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.59, n.4, p.603-608, 2007.

LI, C.J.; AHMED, A.A.; ARIAS, A.C.; MABRY, T.J. Clerodane diterpenoids, long chain esters of coumaric acid and other compounds from *Baccharis myrsinites*. **Phytochemistry**, v.45, n.3, p.571-574, 1997.

LOAYZA, I.; ABUJDER, D.; ARANDA, R.; JAKUPOVIC, J.; COLLIN, G.; DESLAURIERS, H.; JEAN, F-I. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. **Phytochemistry**, v.38, n.2, p.381-389, 1995.

MAHY, B.W.J.; KANGRO, H.O. (Eds.). **Virology Methods Manual**. London: Academic Press, 1996. 366p.

MALIZIA, R.A.; CARDELL, D.A.; MOLLI, J.S.; GONZALEZ, S.; GUERRA, P.E.; GRAU, R.J. Volatile constituents of leaf oils from the genus *Baccharis*. Part I: *B. racemosa* (Ruiz et Pav.) D.C. and *B. linearis* (Ruiz et Pav.) Pers. species from Argentina. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, p.103-106, 2005a.

MALIZIA, R.A.; CARDELL, D.A.; MOLLI, J.S.; GONZALEZ, S.; GUERRA, P.E.; GRAU, R.J. Volatile constituents of leaf oils from the genus *Baccharis*. Part II: *Baccharis obovata* Hooker et Arnott and *B. salicifolia* (Ruiz et Pav.) Pers. species from Argentina. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, p.194-197, 2005b.

MIRANDA, M.M.F.S.; GONÇALVES, J.L.S.; ROMANOS, M.T.V., SILVA, F.P.; PINTO, L.; SILVA, M.H.; EJZEMBERG, R.; GRANJA, L.F.Z.; WIGG, M.D. Anti-herpes simplex virus effect of a seed extract from the tropical plant *Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch (Chrysobalanaceae). **Phytomedicine**, v.9, p.641-645, 2002.

MONGELLI, E.; DESMARCHELIER, C.; RODRIGUEZ TALOU, J.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v.58, n.3, p.157-163, 1997.

MONTANHA, J. A.; MOELLERKE, P.; BORDIGNON, S. A. L.; SCHENKEL, E. P.; ROEHE, P. M. Antiviral activity of Brazilian plant extracts. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.23, p.183-186, 2004.

MOREIRA, F.P.M.; BRANCO, A.; PIZZOLATTI, M.G.; MORAIS, A.A.; MONACHE, F.D. Acid triterpenes and flavonoids from *Baccharis ligustrina* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.31, p.319-321, 2003a.

MOREIRA, F.P.M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A.B.P.; CARO, M.S.B.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v.26, n.3, p.309-311, 2003b.

MORFIN, F.; THOUVENOT, D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. **Journal of Clinical Virology**, v.26, p.29-37, 2003.

MUKHTAR, M.; ARSHAD, M.; AHMAD, M.; POMERANTZ, R.J.; WIGDAHL, B.; PARVEEN, Z. Antiviral potentials of medicinal plants. **Virus Research**, v.131, p.111-120, 2008.

NAGATANI, Y.; WARASHINA, T.; NORO, T. Studies on the constituents from the aerial part of *Baccharis dracunculifolia* DC. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v.49, n.11, p.1388-1394, 2001.

NAGATANI, Y.; WARASHINA, T.; NORO, T. Studies on the constituents from the aerial part of *Baccharis dracunculifolia* DC. II. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v.50, n.5, p.583-589, 2002.

OLIVEIRA, S.Q. de; DAL-PIZZOL, F.; GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; MOREIRA, J.C.; SCHENKEL, E.P. Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity. **Free Radical Research**, v.37, n.5, p.555-559, 2003.

OLIVEIRA, S.Q. de; TRENTIN, V.H.; KAPPEL, V.D.; BARELLI, C.; GOSMANN, G.; REGINATTO, F.H. Screening of antibacterial activity of South Brazilian *Baccharis* species. **Pharmaceutical Biology**, v.43, n.5, p.434-438, 2005.

PAYMENT, P.; TRUDEL, M. (Ed.) **Manuel de techniques virologiques**. Québec: Presses de l'Université du Québec, 1989. 350 p.

PAULINO, N.; ABREU, S.R.L.; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSH, V.M.; VOLLMAR, A.M.; SCREMIN, A.; BRETZ, W.A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v.587, p.296–301, 2008.

PREISER, W.; DOERR, H.W.; VOGEL, J-U. Virology and epidemiology of oral herpesvirus infections. **Medical Microbiology and Immunology**, v.192, p.133-136, 2003.

RAHALISON, L.; BENATHAN, M.; MONOD, M.; FRENK, E.; GUPTA, M.P.; SOLIS, P.N.; FUZZATI, N.; HOSTETTMANN, K. Antifungal principles of *Baccharis pedunculata*. **Planta Medica**, v.61, n.4, p.360-362, 1995.

SALOMÃO, K.; DANTAS, A.P.; BORBA, C.M.; CAMPOS, L.C.; MACHADO, D.G.; AQUINO NETO, F.R.; DE CASTRO, S.L. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, p.87–92, 2004.

SANCHEZ PALOMINO, S.; ABAD, M.J.; BEDOYA, L.M.; GARCÍA, 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 trinervis*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.25, p.1147-1150, 2002.

SEDDON, T.J.; DOWNEY, M.O. Comparison of analytical methods for the determination of condensed tannins in grape skin. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v.14, p.54-61, 2008.

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

SHARP, H.; BARTHOLOMEW, B.; BRIGHT, C.; LATIF, Z.; SARKER, S.D.; NASH, R.J. 6-Oxygenated flavones from *Baccharis trinervis* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, p.105-107, 2001.

SIMÕES, C.M.O; FALKENBERG, M.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Antiviral activity of South Brazilian medicinal plant extracts. **Phytomedicine**, v.6, n.3, p.205-214, 1999.

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

SOUZA, G.C. de; HAAS, A.P.S; von POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p.135-143, 2004.

STAHL, E. **Thin-Layer Chromatography A Laboratory Handbook**. 2.ed. New York Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1969. 1041 p.

TAPIA, A.; RODRIGUEZ, J.; THEODULOZ, C.; LOPEZ, S.; FERESIN, G.E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p.155-161, 2004.

TIMBURY, M.C. **Notes on Medical Virology**. 11. ed. New York: Churchill Livingstone, 1997. cap. 11. p.93-109.

VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J.; VAN HOOFF, L. Plant products as potential antiviral agents. **Bulletin de L'institut Pasteur**, v.84, p.101-147, 1986.

VARGAS, V.M.; GUIDOBONO, R.R.; HENRIQUES, J.A. Genotoxicity of plant extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, n.2, p.67-70, 1991.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; SCHRIPSEMA, J.; BRAZ FILHO, R.; PIZZOLATTI, M.G. Kaurene diterpenes and flavonoids from *Baccharis illinita* flowers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, n.9, p.837-840, 2004.

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: PRENDERGAST, H.D.V; ETKIN, N.L.; HARRIS, D.R.; HOUGHTON, P.J. (Eds). **Plants for food and medicine**. Royal Botanic Gardens, Kew, 1998. p.333-344.

WAGNER, H., BLAND, S., ZGAINSKI, E.M. **Plant Drug Analysis – Thin Layer Chromatography Atlas**. Berlin: SPRINGER-VERLANG, 1984. 320p.

WHO - World Health Organization. **Traditional Medicines**. Fact sheet n.134, dezembro 2008.

WU, Y.; CUI, S.W.; TANG, J.; WANG, Q.; GU, X. Preparation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds. **Carbohydrate Polymers**, v.70, p.437-443, 2007.

XU, H-X.; LEE, S.H.S.; LEE, S.F.; WHITE, R.L.; BLAY, J. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*. **Antiviral Research**, v.44, p.43-54, 1999.

YOOSOOK, C.; PANPISUTCHAI, Y.; CHAICHANA, S.; SANTISUK, T.; REUTRAKUL, V. Evaluation of anti-HSV-2 activities of *Barleria lupulina* and *Clinacanthus nutans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.67, p.179-187, 1999.

ZANON, S.M.; CERIATTI, F.S.; ROVERA, M.; SABINI, L.J.; RAMOS, B.A. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Cordoba, Argentina. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v.41, p.59-62, 1999.

ZHANG, Y.; BUT, P.P-H.; OOI, V.E-C.; XU, H-X.; DELANEY, G.D.; LEE, S.H.S.; LEE, S.F. Chemical properties, mode of action, and in vivo anti-herpes activities of a lignin-carbohydrate complex from *Prunella vulgaris*. **Antiviral Research**, v.75, p.242-249, 2007.

ZUNINO, M.P.; NEWTON, M.N.; MAESTRI, D.M.; ZYGADLO, J.A. Essential oils of three *Baccharis* species. **Planta Medica**, v.64, n.1, p.86-87, 1998.

ZUNINO, M.P.; LOPEZ, M.L.; ZYGADLO, J.A.; LOPEZ, A.G. Essential oil composition of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. **Journal of Essential Oil Research**, v.16, p.29-30, 2004.