



**Universidade Federal de Alagoas**  
Instituto de Química e Biotecnologia

***Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia***  
*PPGQB*

A large, semi-transparent graphic in the background of the cover. It features a red ribbon, a symbol for HIV/AIDS awareness, superimposed over a grayscale map of the world. The ribbon is positioned vertically, crossing itself in the center.

# **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIRRETROVIRAL DE PRODUTOS NATURAIS**

**Roberta Costa Santos Ferreira**

Maceió – Alagoas  
Julho de 2010

**ROBERTA COSTA SANTOS FERREIRA**



# **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIRRETROVIRAL DE PRODUTOS NATURAIS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biotecnologia  
Sub-área: Produtos Naturais

Orientador: Prof. .Dr. Antônio Euzébio  
Goulart Sant'Ana

Maceió – Alagoas  
Julho de 2010

**Catlogação na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

F385a    Ferreira, Roberta Costa Santos.  
          Avaliação da atividade antirretroviral de produtos naturais / Roberta Costa Santos Ferreira, 2010.  
          143 f. : il., grafs. e tabs.

          Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.  
          Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2010.

          Bibliografia. f. 118-141.  
          Glossário: f. 142-143.

          1. HIV. 2. Citotoxicidade. 3. Antivirais. 4. Produtos naturais. 4. Farmacologia.  
I. Título.

CDU



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1384, Fax: (82) 3214-1384  
email: cpqqb@qui.ufal.br

Membros da Comissão Julgadora de Defesa de Tese da doutoranda *Roberta Costa Santos Ferreira*, intitulada: “**Avaliação da Atividade Antirretroviral de Produtos Naturais**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 16 de julho de 2010, às 14h na Sala de Aulas do PPGQB/ UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Antonio Euzébio Goulart Sant'Ana  
Orientador – PPGQB/IQB/UFAL

Prof.ª Dr.ª Fabiane Caxico de Abreu Galdino  
PPGQB/IQB/UFAL

Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira  
IQUFPR

Dr. Alessandro Riffel  
EMBRAPA

Prof. Dr. Emílio de Oliveira Barreto  
ICBS/UFAL

Dedico este trabalho a meu esposo  
Marcos e às minhas filhas Renata e Maria  
Clara a quem amo muito

Dedico também a todos os pacientes com  
HIV que espero um dia poder ajudar.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pois só com Ele tudo é possível...

A meus pais amados **Elza Maria Costa Santos** e **Francisco Alberto Costa Santos** que souberam me educar e me ensinar o valor do estudo.

A meu marido **Marcos Antônio Leal Ferreira** que é minha fortaleza, pelo apoio incondicional, pelo incentivo nos momentos mais difíceis, pelo carinho e ainda pela cessão do seu laboratório para realização dos experimentos.

Às minhas filhas **Renata Costa Santos Ferreira** e **Maria Clara Costa Santos Ferreira**, que são minha vida e que muitas vezes tiveram que abrir mão do seu tempo comigo em função de minhas pesquisas.

Às minhas queridas irmãs **Anna Cristina Costa Santos Grandó** e **Elza Carolina Costa Santos** pelo verdadeiro sentido da palavra irmã e pelo incentivo.

Ao meu orientador **Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana**, que concordou em me orientar em uma nova linha de pesquisa e conduziu com sabedoria e paciência minha íngreme caminhada pela ciência.

Aos amigos-irmãos **Fernanda Braga Peixoto** e **Marcílio Otávio Brandão Peixoto**, pela amizade verdadeira e pelos momentos de descontração nesta difícil jornada.

Aos Professores **Roberto Soares Castro** e **Rita Maia**, da UFRPE, pela imprescindível e inestimável colaboração.

Aos professores que participaram das bancas de qualificação e de defesa desta tese, e que trouxeram importantes contribuições para melhorar a qualidade de nosso trabalho: **Alessandro Riffel**, **Brás Heleno de Oliveira**, **Emiliano de Oliveira**

**Barreto, Fabiane Caxico de Abreu Galdino, Marília Oliveira Fonseca e Silvana Ayres Martins**

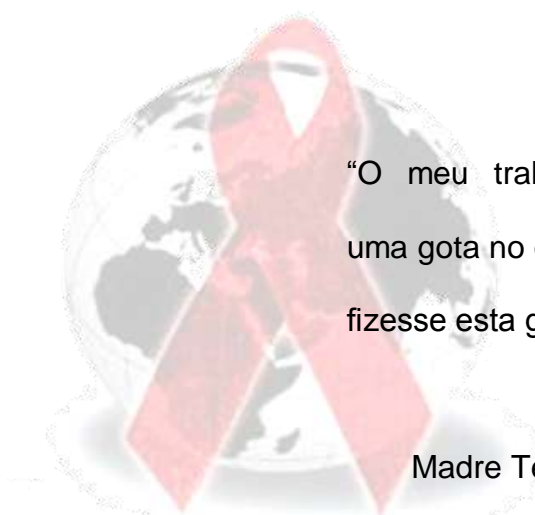
Aos **professores do programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia** da UFAL, que compartilharam seus conhecimentos ajudando na minha formação.

A todos que fazem parte do **Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais**, pelo convívio amigável e colaboração.

A **Michele Moreira** pela amizade e doação desinteressada de seus conhecimentos;

À aluna **Carla de Souza Alves**, bolsista do PPSUS, que ajudou na execução deste trabalho.

À **FAPEAL, CAPES, CNPq e Ministério da Saúde** pelo apoio financeiro ao grupo de pesquisa.



“O meu trabalho pode representar uma gota no oceano, mas se eu não o fizesse esta gota faltaria.”

Madre Teresa de Calcutá



## RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar a atividade antirretroviral de produtos naturais. Inicialmente implementamos o cultivo celular para realização de testes de citotoxicidade e alguns dos testes de atividade antiviral. Foram selecionados, baseados em dados pré-existentes na literatura de atividade antiviral no gênero ou família em estudo e ainda em uma abordagem quimiotaxonômica, 39 extratos (de 12 famílias de plantas e quatro famílias de algas brasileiras) e 11 substâncias puras do grupo das quinonas e dos terpenos. Todos foram avaliados quanto à citotoxicidade a fim de encontrarmos uma dose com baixa citotoxicidade para os testes antivirais (< 50%). A citotoxicidade foi avaliada pelos métodos de exclusão do Azul de Tripán e redução do MTT. A avaliação da atividade antiviral foi feita por duas metodologias: pesquisa da inibição de efeitos citopáticos (ECPs) característicos de retrovírus (sincício e lise) utilizando-se o vírus maedi visna que é um modelo *in vitro* e *in vivo* do HIV e inibição da transcriptase reversa (TR) do HIV-1. A atividade da TR do HIV-1 foi medida por um método colorimétrico quantitativo imunoenzimático (Reverse Transcriptase Assay, Roche<sup>®</sup>, Germany). Foi inicialmente testado um extrato de cada espécie de planta quanto à potencial atividade antiviral e quando o mesmo mostrava alguma atividade os outros extratos da mesma espécie eram testados. O efavirenz foi utilizado como controle antiviral e apresentou 75 e 98% de inibição do ECP e da TR, respectivamente, em uma concentração de 1 µg/mL. Dentre as substâncias puras os melhores resultados encontrados foram os das emotinas D e F que além de inibirem os ECPs em 37,5 e 25%, apresentaram 24,4 e 20,5% de inibição da TR, respectivamente, a 1 µg/mL. Entre as plantas testadas encontramos sete com atividade inibidora da TR do HIV-1. Entre estas encontramos uma planta cuja atividade foi muito elevada no extrato bruto quando comparada ao controle efavirenz e tem se mostrado ainda maior nas frações isoladas. Os extratos brutos das folhas (50 µg/mL) e da casca do caule (100 µg/mL) apresentaram 98 e 67% de inibição da TR, respectivamente. E as frações acetato (50 µg/mL) e clorofórmio (100 µg/mL) deste último, 95 e 89% de inibição, respectivamente. Nossos resultados sugerem que temos fortes candidatos para o combate ao HIV que podem se apresentar como uma rica fonte de substâncias inibidoras da TR.

Palavras-chaves: HIV, citotoxicidade, produtos naturais, antivirais

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antiretroviral activity of natural products. Initially implemented the cell culture for cytotoxicity tests and some tests of antiviral activity. Were selected based on pre-existing data in the literature of antiviral activity in the genus or family under study and also in a chemotaxonomic approach, 39 extracts (from 12 plant families and four families of Brazilian algae) and 11 pure compounds from the group of quinones and terpenes. All were evaluated for cytotoxicity in order to find a concentration with low cytotoxicity for testing antivirals (< 50%). Cytotoxicity was evaluated by the methods of Trypan Blue exclusion and MTT reduction. The evaluation of antiviral activity was done by two methods: research on the inhibition of cytopathic effects (ECPs) characteristic of retroviruses (syncytium and lysis) using maedi visna virus which is a model in vitro and in vivo of the HIV, and inhibition of activity of reverse transcriptase (RT) of HIV-1. The activity of RT HIV-1 was measured by a colorimetric method quantitative immunoassay (Reverse Transcriptase Assay, Roche ®, Germany). Was first tested an extract of each plant species on the potential antiviral activity, and when it showed some activity other extracts of the same species were tested. Efavirenz was used as control and showed antiviral inhibition of CPE and TR of 75 and 98%, respectively, at a concentration of 1 µg/mL. Among the pure compounds the best results were those of emotinas D and F, which also inhibit the ECPs in 37.5 and 25% were 24.4 and 20.5% inhibition of TR, respectively, 1 µg/mL. Among the tested plants found seven with inhibitory activity of HIV-1 RT. Among these we find a plant whose activity was very high in the crude extract when compared with control efavirenz and has been even greater in isolated fractions. The crude extracts of leaves (50 µg/mL) and stem bark (100 µg/mL) showed 98 and 67% inhibition of TR, respectively. The acetate (50 µg/mL) and chloroform (100 µg/mL) fractions of the latter, showed 95 and 89% of inhibition, respectively. Our results suggest that we have strong candidates for to combat the HIV that may present as a rich source of inhibitors of RT.

Key words: HIV, cytotoxicity, natural products, antiviral

## LISTA DE FIGURAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 1:</b> Substâncias isoladas de plantas inibidoras do HIV testadas clinicamente                       | <b>21</b> |
| <b>Figura 2:</b> Diagrama representativo da evolução de uma linhagem celular. (Adaptado de PERES e CURI, 2005) | <b>30</b> |
| <b>Figura 3:</b> Estrutura do Azul de Tripán (5)   | <b>32</b> |
| <b>Figura 4:</b> Redução do MTT (6) a formazana (7) por desidrogenases mitocondriais                           | <b>33</b> |
| <b>Figura 5:</b> Estruturas das naftoquinonas utilizadas nos testes  | <b>35</b> |
| <b>Figura 6:</b> Estruturas dos sesquiterpenos utilizados nos testes   | <b>36</b> |
| <b>Figura 7:</b> Filtração do extrato  | <b>37</b> |
| <b>Figura 8:</b> Soluções estoques dos extratos  | <b>37</b> |
| <b>Figura 9:</b> Partição líquido-líquido do extrato bruto da casca do caule da <i>L. pacari</i>               | <b>38</b> |
| <b>Figura 10:</b> Globo ocular (A) e rim (B) de ovinos   | <b>41</b> |
| <b>Figura 11:</b> Obtenção das linhagens celulares à partir do cultivo primário                                | <b>42</b> |
| <b>Figura 12:</b> Preparo de cultura primária de células epiteliais de córnea                                  | <b>44</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figura 13:</b> Preparo de cultura primária de fibroblastos renais por desagregação enzimática                                   | <b>46</b> |
| <b>Figura 14:</b> Preparo de cultura primária de fibroblastos renais pela técnica de explantes                                     | <b>47</b> |
| <b>Figura 15:</b> Preparo de placa para os testes de citotoxicidade pelos métodos de exclusão do Azul de Tripán e redução do MTT   | <b>52</b> |
| <b>Figura 16:</b> Células viável (A) e não-viável (B) observadas pelo teste de exclusão do Azul de Tripán                          | <b>53</b> |
| <b>Figura 17:</b> Diagrama do HIV. Adaptado de SIERRA et al., 2005   | <b>54</b> |
| <b>Figura 18:</b> Organização do genoma do HIV. O tamanho dos genes e proteínas codificadas não está em escala. Fonte: FREED, 2004 | <b>55</b> |
| <b>Figura 19:</b> Modelo do processo multi-etapas da entrada do HIV na célula do hospedeiro. Fonte: TILTON e DOMS, 2010            | <b>56</b> |
| <b>Figura 20:</b> Replicação do HIV. Fonte: GOLAN et al., 2008   | <b>57</b> |
| <b>Figura 21:</b> Estruturas dos desoxinucleosídeos e dos fármacos ITRN  | <b>61</b> |
| <b>Figura 22:</b> Estruturas dos fármacos ITRNN  | <b>62</b> |
| <b>Figura 23:</b> Estruturas dos fármacos inibidores de protease   | <b>63</b> |
| <b>Figura 24:</b> Estrutura dos inibidores de integrase raltegravir e do elvitegravir  | <b>64</b> |
| <b>Figura 25:</b> Estrutura da enfuvirtida (43). Fonte: CUNICO et al, 2008   | <b>65</b> |
| <b>Figura 26:</b> Estrutura do maraviroque (44). Fonte: CUNICO et al, 2008   | <b>66</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Figura 27:</b> Estruturas de substâncias isoladas de plantas com atividade inibitória da entrada do HIV na célula hospedeira, <i>in vitro</i>       | <b>70</b>  |
| <b>Figura 28:</b> Estruturas de substâncias isoladas de plantas com atividade inibitória da TR do HIV <i>in vitro</i>                                  | <b>71</b>  |
| <b>Figura 29:</b> Estruturas de substâncias isoladas de plantas com atividade inibitória da IN do HIV <i>in vitro</i>                                  | <b>82</b>  |
| <b>Figura 30:</b> Estruturas das substâncias 63 a 69 isoladas de plantas com atividade inibitória da PR do HIV <i>in vitro</i>                         | <b>83</b>  |
| <b>Figura 31:</b> Estruturas das substâncias 70 a 80 isoladas de plantas com atividade inibitória da PR do HIV <i>in vitro</i>                         | <b>84</b>  |
| <b>Figura 32:</b> Estruturas das substâncias 81 a 90 isoladas de plantas que apresentam atividade inibitória da replicação do HIV em cultivo celular   | <b>86</b>  |
| <b>Figura 33:</b> Estruturas das substâncias 91 a 98 isoladas de plantas que apresentam atividade inibitória da replicação do HIV em cultivo celular   | <b>87</b>  |
| <b>Figura 34:</b> Estruturas das substâncias 99 a 107 isoladas de plantas que apresentam atividade inibitória da replicação do HIV em cultivo celular  | <b>88</b>  |
| <b>Figura 35:</b> Estruturas das substâncias 108 a 118 isoladas de plantas que apresentam atividade inibitória da replicação do HIV em cultivo celular | <b>89</b>  |
| <b>Figura 36:</b> Estruturas das substâncias 119 a 125 isoladas de plantas que apresentam atividade inibitória da replicação do HIV em cultivo celular | <b>90</b>  |
| <b>Figura 37:</b> Etapas no desenvolvimento de medicamentos antirretrovirais segundo Van Rompay, 2010. Substâncias não efetivas ou tóxicas (círculos   | <b>100</b> |

abertos), substâncias eficazes (círculos pretos), (A) testes in vitro, (B) modelo roedor ou felino, (C) modelo primata não-humano, mais semelhantes dos seres humanos, (D) ensaios clínicos humanos, (E) uso generalizado

**Figura 38:** Placa com titulação do vírus **103**

**Figura 39:** Células normais do controle (A) e ECPs do MVV (B e C) observados após 7 dias de cultivo de celular **107**

**Figura 40:** Inibição do ECP do MVV e da TR do HIV-1 por substâncias puras **109**

**Figura 41:** Inibição do ECP do MVV e da TR do HIV-1 por extratos a 50 µg/mL e pelo efavirenz a 1 µg/mL. F – folha; C- caule; CR- casca da Raiz **110**

**Figura 42:** Inibição do ECP do MVV e da TR do HIV-1 por extratos a 100 µg/mL pelo efavirenz a 1 µg/mL. CC- casca do caule; frC- fração clorofórmio; F – folha **110**

**Figura 43:** Inibição da TR do HIV-1 por extratos e substâncias puras. f – folha; C- caule; frAC – fração acetato da casca do caule; frCC - fração clorofórmio da casca do caule; CC – casca do caule **115**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1a:** Extratos etanólicos diluídos e esterilizados por filtração, utilizados nos experimentos **39**
- Tabela 1b:** Extratos de algas diluídos e esterilizados por filtração, utilizados nos experimentos **40**
- Tabela 1c:** Substâncias puras diluídas e esterilizadas por filtração, utilizados nos experimentos **40**
- Tabela 2a:** Resultados da citotoxicidade dos diferentes extratos pelo teste de exclusão do Azul de Tripán **59**
- Tabela 2b:** Resultados da citotoxicidade dos extratos de algas pelo teste de exclusão do Azul de Tripán **60**
- Tabela 2c:** Resultados da citotoxicidade das substâncias pelo teste de exclusão do Azul de Tripán **60**
- Tabela 3a:** Resultados da citotoxicidade dos diferentes extratos pelo teste de redução do MTT **61**
- Tabela 3b:** Resultados da citotoxicidade dos extratos de algas pelo teste de redução do MTT **61**
- Tabela 3c:** Resultados da citotoxicidade das substâncias pelo teste de redução do MTT **61**
- Tabela 4.** Relação dos medicamentos antirretrovirais distribuídos no Brasil **77**

|  |            |
|--|------------|
| <b>Tabela 5:</b> Plantas e seus constituintes isolados que apresentam atividade inibitória da entrada do HIV na célula             | <b>91</b>  |
| <b>Tabela 6:</b> Plantas e seus constituintes isolados que apresentam atividade inibitória da TR do HIV <i>in vitro</i>            | <b>91</b>  |
| <b>Tabela 7:</b> Plantas e seus constituintes isolados que apresentam atividade inibitória da IN do HIV <i>in vitro</i> .          | <b>94</b>  |
| <b>Tabela 8:</b> Plantas e seus constituintes isolados que apresentam atividade inibitória da PR do HIV <i>in vitro</i>            | <b>94</b>  |
| <b>Tabela 9:</b> Plantas e seus constituintes isolados que apresentam atividade inibitória da replicação do HIV em cultivo celular | <b>96</b>  |
| <b>Tabela 10a:</b> Resultados da pesquisa de inibição da TR por extratos de plantas  | <b>114</b> |
| <b>Tabela 10b:</b> Resultados da pesquisa de inibição da TR por Extratos de algas  | <b>114</b> |
| <b>Tabela 10c:</b> Resultados da pesquisa de inibição da TR por substâncias puras  | <b>115</b> |



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABC - Abacavir

Abs. – Absorvância

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

APV - Amprenavir

ATV - Atazanavir

AZT - Zidovudina

BIV - *Bovine immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência bovina)

CAEV - *Caprine arthritis encephalitis virus* (vírus da artrite-encefalite caprina)

ddC – Zalcitabina

ddl - Didanosina

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DRV - Darunavir

d4T - Estavudina

ECP - Efeito citopático

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EFV - Efavirenz

EIAV - *Equine infectious anaemia virus* (vírus da anemia infecciosa equina)

FDA – *Food and Drug Administration*

FIV - *Feline immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência felina)

FPV - Fosamprenavir

FTC - Emtricitabina

HIV – *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

HIV-1 - Vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HIV-2 - Vírus da imunodeficiência humana tipo 2

IDV - Indinavir

LPV/r -Lopinavir/ritonavir

MEM – Meio essencial mínimo

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbrometo

IN – Integrase

PBS – Tampão fosfato salino

PR - Protease

MVV - *Maedi-visna virus* (vírus maedi-visna)

RAL - Raltegravir

RNA – Ácido ribonucleico

RTV - Ritonavir

SFB - Soro fetal bovino

SIV - *Simian immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência símia)

SQV – Saquinavir

TCID<sub>50</sub> - Dose Infectante para 50% do Tecido Cultivado

TDF - Tenofovir

TR – Transcriptase reversa

T20- Enfuvirtida

3TC - Lamivudina

## SUMARIO

|   |           |
|---|-----------|
| RESUMO  | 7         |
| ABSTRACT  | 8         |
| LISTA DE FIGURAS  | 9         |
| LISTA DE TABELAS  | 13        |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS  | 15        |
| <br>  |           |
| INTRODUÇÃO  | 20        |
| JUSTIFICATIVA   | 22        |
| OBJETIVO GERAL  | 24        |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS   | 24        |
| <br>  |           |
| <b>PARTE I: CULTIVO CELULAR E TESTES DE CITOTOXICIDADE</b>                    | <b>25</b> |
| 1 REVISÃO DE LITERATURA   | 26        |
| 1.1 <b>Cultivo celular</b>  | 26        |
| 1.1.1 Tipos de cultivo celular  | 27        |
| 1.1.2 Manutenção das células  | 28        |
| 1.2 <b>Testes de citotoxicidade</b>   | 30        |
| 1.2.1 Método de exclusão do Azul de Tripán                                    | 31        |
| 1.2.2 Método de redução do sal de tetrazólio (MTT)                            | 32        |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS  | 34        |
| 1.3 <b>Reagentes</b>  | 34        |
| 1.4 <b>Extratos e substâncias testadas</b>                                    | 35        |
| 1.4.1 Obtenção das frações do extrato de <i>Lafoensia pacari</i>              | 37        |
| 1.5 <b>Implementação do cultivo celular</b>                                   | 41        |
| 1.5.1 Cultivo de células epiteliais de córnea                                 | 43        |
| 1.5.2 Cultivo de fibroblastos renais por desagregação enzimática com tripsina | 45        |
| 1.5.3 Cultivo de fibroblastos renais pela técnica de explantes                | 47        |
| 1.5.4 Manutenção e tripsinização das células                                  | 49        |

|            |                                     |           |
|------------|-------------------------------------|-----------|
| <b>1.6</b> | <b>Testes de citotoxicidade</b>     | <b>50</b> |
| 1.6.1      | Teste de exclusão do Azul de Tripan | 53        |
| 1.1.1      | Teste de redução do MTT             | 54        |
| <b>2.</b>  | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>       | <b>55</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Linhagens celulares</b>          | <b>55</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Manutenção das células</b>       | <b>55</b> |
| <b>2.3</b> | <b>Testes de citotoxicidade</b>     | <b>56</b> |

## **PARTE II: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIRRETROVIRAL DE PRODUTOS**

|            |   |            |
|------------|---|------------|
|            | <b>NATURAIS</b>   | <b>62</b>  |
| <b>1</b>   | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b>  | <b>63</b>  |
| <b>1.1</b> | <b>Aspectos gerais do HIV</b>   | <b>63</b>  |
| <b>1.2</b> | <b>Replicação do HIV</b>  | <b>65</b>  |
| <b>1.3</b> | <b>Fármacos usados na terapia antirretroviral</b>                       | <b>68</b>  |
| 1.3.1      | Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo (ITRN)      | 70         |
| 1.3.2      | Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Análogos de Nucleosídeo (ITRNN) | 72         |
| 1.3.3      | Inibidores da Protease (IP)   | 72         |
| 1.3.4      | Inibidores da Integrase   | 74         |
| 1.3.5      | Inibidores da entrada do vírus na célula                                | 74         |
| <b>1.4</b> | <b>Terapia antirretroviral no Brasil</b>                                | <b>76</b>  |
| <b>1.5</b> | <b>Produtos naturais com ação anti-HIV</b>                              | <b>77</b>  |
| 1.5.1      | Inibição da entrada do vírus na célula                                  | 78         |
| 1.5.2      | Inibição da transcriptase reversa                                       | 79         |
| 1.5.3      | Inibição da integrase   | 81         |
| 1.5.4      | Inibição da protease  | 83         |
| 1.5.5      | Outras atividades anti-HIV de produtos naturais                         | 85         |
| <b>1.6</b> | <b>Testes antivirais</b>  | <b>99</b>  |
| 1.6.1      | Modelos animais para teste anti-HIV                                     | 101        |
| <b>2</b>   | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b>   | <b>102</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Extratos e substâncias testadas</b>                                  | <b>102</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Amostra viral</b>  | <b>102</b> |
| <b>2.3</b> | <b>Titulação viral</b>  | <b>102</b> |

|     |  |            |
|-----|--|------------|
| 2.4 | <b>Teste de inibição da replicação do MVV em cultivo celular</b> | <b>103</b> |
| 2.5 | <b>Teste de inibição da TR do HIV-1</b>                          | <b>105</b> |
| 3   | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                    | <b>107</b> |
| 3.1 | <b>Propagação dos vírus e determinação do título viral</b>       | <b>107</b> |
| 3.2 | <b>Avaliação da atividade antiviral</b>                          | <b>108</b> |
| 4   | <b>CONCLUSÕES</b>  | <b>116</b> |
| 5   | <b>PERSPECTIVAS</b>  | <b>117</b> |
| 6   | <b>REFERÊNCIAS</b>   | <b>118</b> |
| 7   | <b>GLOSSÁRIO</b>   | <b>142</b> |

## INTRODUÇÃO

Por muitos séculos as plantas foram o principal meio de curar ou aliviar as enfermidades humanas. Na atualidade, as plantas também desenvolvem um papel de igual importância, na descoberta e no desenvolvimento de fármacos (SAKLANI e KUTTY, 2008). Aproximadamente 48% dos medicamentos empregados na terapêutica advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais que permanecem como uma das mais importantes fontes para obtenção de novos medicamentos (HARVEY, 2000; CARVALHO et al., 2007).

A grande diversidade estrutural que os produtos naturais oferecem, aliada às modernas técnicas de separação, elucidação estrutural, triagem e síntese combinatória, têm levado à revitalização do uso de plantas como fonte de novos fármacos (SAKLANI e KUTTY, 2008).

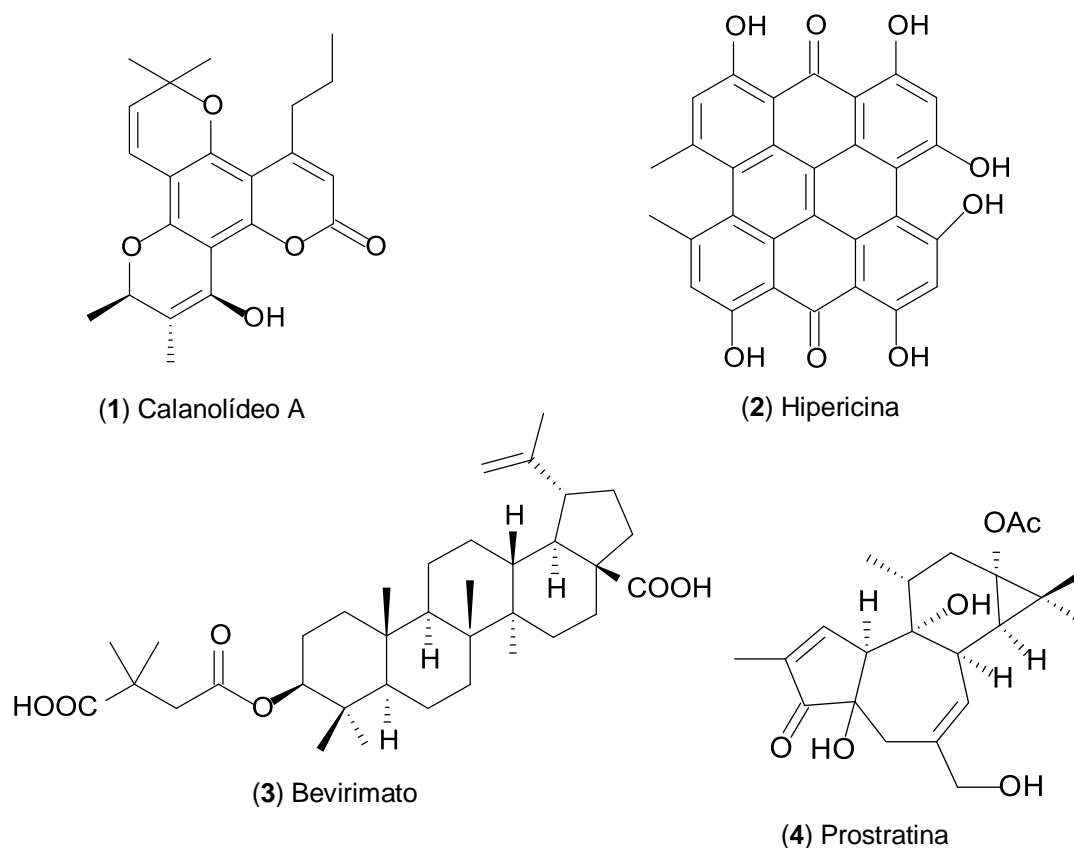
As plantas medicinais têm sido utilizadas para o tratamento de uma variedade de enfermidades infecciosas e não-infecciosas (COS et al., 2006; MUKHTAR et al., 2008), e várias plantas tem sido relatadas como possuidoras de propriedades anti-HIV (vírus da imunodeficiência humana) (COS et al., 2008).

O HIV é o retrovírus causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (VAISHNAV e WONG-STAAAL, 1991; CAMPBELL e ROBINSON, 1998), que permanece como um problema de saúde mundial de dimensões sem precedentes. Conhecido há pouco mais de 27 anos, o HIV já causou cerca de 25 milhões de mortes no mundo. Globalmente, foi estimado, que 33,4 milhões de pessoas viviam com HIV em 2008, tendo sido detectados, neste mesmo ano a ocorrência de 2,7 milhões de novos casos e cerca de 2 milhões de mortes relacionadas a esta infecção (UNAIDS, 2010). No Brasil, desde a identificação do primeiro caso em 1980 até junho de 2008, já foram identificadas aproximadamente 730 mil pessoas vivendo com HIV. Com relação à mortalidade, o número de óbitos gira em torno de 11 mil por ano, desde 1990 (UNAIDS, 2010).

Toda esta morbi-mortalidade estimulou o desenvolvimento de terapias antirretrovirais (ADAMSON e FREED, 2008). Entretanto, apesar de dispormos de medicamentos antivirais muito potentes, a falência terapêutica ainda ocorre, principalmente em decorrência da persistência e mutagenicidade do HIV e do uso de antivirais por período prolongado (REN et al., 2001; MARGOT et al., 2006). Além

disso, os vários efeitos adversos e a complexidade do esquema terapêutico reduzem a aderência e a continuidade do tratamento, contribuindo ainda mais para falhas na terapia antiviral (DE ARAGÃO et al., 2002; JAIME et al., 2004; DE OLIVEIRA et al., 2006). Por estas razões é real a necessidade de identificação e desenvolvimento de novas substâncias que possam ser utilizadas em substituição ou em combinação com os antivirais em uso (COS et al., 2004; AIKEN e CHEN, 2005; ADAMSON e FREED, 2008).

Neste contexto, vários grupos vêm realizando trabalhos com plantas (LAM et al., 2000; KLOS et al., 2009) e produtos isolados de plantas (DE SOUZA e DE ALMEIDA, 2003; COS et al., 2008), mostrando que muitos apresentam atividade inibitória da replicação do HIV e alguns deles, como calanolídeo A (1) (SAKLANI e KUTTY, 2008), hipericina (2) (GULICK et al., 1999), bevirinato (3) (CUNICO et al., 2008) e prostratina (4) (YANG et al., 2001) já estão sendo testados clinicamente, com resultados favoráveis.



**Figura 1:** Substâncias isoladas de plantas inibidoras do HIV testadas clinicamente.

## JUSTIFICATIVA

O Brasil é o país com a maior biodiversidade vegetal do mundo, com mais de 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total mundial (BRASIL, 2010a). Esta grande diversidade cria a oportunidade para a identificação de novas plantas com propriedades terapêuticas (SIMÕES et al., 2007), incluindo propriedades anti-HIV.

Além disso, no Brasil a lei Nº 9.313, de 13 de novembro de 1996 garante, aos portadores de HIV e doentes de AIDS, recebimento gratuito do Sistema Único de Saúde, de toda a medicação necessária a seu tratamento (Ministério da Saúde, 2010). Os gastos do governo só com a importação de antirretrovirais chegam a R\$ 610 milhões por ano. Se não fosse possível a fabricação nacional de alguns medicamentos os gastos chegariam a R\$ 1,325 bilhões, fator que tornaria o programa de distribuição universal e gratuita inviável (BRASIL, 2010b). Assim, a descoberta de novos antirretrovirais, a partir de nossa flora, pode se apresentar como uma futura alternativa terapêutica de grande importância clínica e social.

O uso contínuo dos antirretrovirais em altas doses, além da produção de efeitos adversos tem contribuído para o crescente aparecimento de resistência viral (EPSTEIN et al., 2002; CHEUNG et al., 2004; HUELSMANN, 2006) o que leva a falhas na terapia antirretroviral. Estas falhas, associadas ao alarmante crescimento do número de casos de HIV, tornam a necessidade de identificar novas substâncias antivirais não apenas uma mera curiosidade acadêmica, mas uma necessidade real.

Entretanto, a pesquisa da atividade antirretroviral por vezes é limitada pelo risco de contaminação com o material contendo amostras infectantes do HIV. Assim, um dos caminhos para testar a potencial atividade antirretroviral de fármacos é o uso de modelos animais que não sejam patogênicos para o homem (KERN, 1995; LEWIS e JOHNSON, 1995; SALVATORI et al., 2002), ou o uso de enzimas isoladas do HIV. O vírus Maedi-visna (MVV) pode ser usado como modelo de infecção, *in vitro*, para o HIV. Este retrovírus, pertencente ao mesmo gênero do HIV, acomete ovinos e apresenta semelhanças na seqüência gênica, organização genômica, mecanismos de patogênese e susceptibilidade *in vitro* aos fármacos, porém não é patogênico para o homem (SONIGO, 1985; SALVATORI et al., 2001). O *screening*



antirretroviral primário em cultivos celulares não é especificamente baseado no mecanismo de ação, mas facilita a identificação de produtos naturais que bloqueiem diferentes etapas do ciclo de replicação viral, permitindo que sejam selecionados os compostos ativos a serem testados em enzimas específicas do HIV.

No que tange a investigação de novas substâncias com finalidade medicinal, de origem vegetal ou não, os primeiros passos compreendem os testes *in vitro*, dentre os quais podemos citar os testes de citotoxicidade em cultivo celular, que são essenciais para estimar a segurança dos futuros fármacos (LÜLLMANN et al., 2000; DOUBLE, 2002; BRUNTON, 2006). Desta forma, iniciamos este projeto com a implementação do cultivo celular e o desenvolvimento dos testes de citotoxicidade.

## **OBJETIVO GERAL**

- Pesquisar a atividade antirretroviral de produtos naturais.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Implementar o cultivo celular para testes de citotoxicidade e de atividade antiviral, na Universidade Federal de Alagoas
- Verificar a toxicidade de extratos vegetais e substâncias isoladas sobre o cultivo celular.
- Pesquisar a atividade inibitória da replicação do MVV em cultivo celular, por extratos vegetais e substâncias isoladas.
- Pesquisar a atividade inibitória da TR do HIV-1, por extratos vegetais e substâncias isoladas.

# **PARTE 1: CULTIVO CELULAR E TESTES DE CITOTOXICIDADE**

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Cultivo Celular

O cultivo *in vitro* de células é uma poderosa técnica para pesquisas e oferece muitas vantagens no teste de fármacos e outros compostos. Em particular, abre a possibilidade de diminuir o número de animais experimentais e aumenta o potencial de manipulações das propriedades do ambiente celular (CASTRO-MUÑOZLEDO, 2008).

O cultivo celular começou com o cultivo de tecidos em 1907 quando Ross Granviele Harrison cultivou pequenos fragmentos de tubo neural de embrião de rã em linfa da mesma espécie (PERES e CURI, 2005). Poucos anos depois, Aléxis Carrel (1912) publicou um trabalho onde cultivando fragmentos de embrião de galinha, descrevia formas de prolongar o tempo de vida das células *in vitro* com o manejo da temperatura e o uso de solução de Ringer, plasma e extrato de músculo para nutrir as células.

Mas só em 1948, Katherine Sanford e colaboradores demonstraram que células individuais podiam ser mantidas em cultivo. Isto, juntamente com a demonstração de Harry Eagle em 1955, de que a mistura de extratos de tecidos, coágulos e outros ingredientes anteriormente utilizados para cultivar células poderia ser substituída por "...uma mistura arbitrária de aminoácidos, vitaminas, cofatores, carboidratos e sais, suplementados com uma pequena quantidade de proteína de soro" abriu uma nova área de cultivo de células (MATHER e ROBERTS, 1998).

Hoje, sabe-se que para o adequado crescimento e multiplicação das células *in vitro*, as condições do cultivo devem mimetizar as condições *in vivo*, não só no que diz respeito aos nutrientes, mas também à temperatura, pH, osmolaridade, concentração de oxigênio e de CO<sub>2</sub> (MATHER e ROBERTS, 1998; MASTERS, 2000).

O meio de cultivo fornece os nutrientes essenciais que são incorporados pelas células em divisão, tais como aminoácidos, vitaminas, sais minerais, açúcares, e cofatores, além dos íons e moléculas necessários para manter o ambiente químico apropriado para a célula. Alguns componentes podem executar ambos os papéis;

por exemplo, o bicarbonato de sódio pode ser usado como uma fonte do carbonato, mas também, pode exercer um importante papel na manutenção do pH e osmolaridade apropriados. A quantidade adequada de bicarbonato fornece um sistema de tamponamento que contribui para que o pH do meio permaneça entre 7,0 e 7,4. Os níveis de bicarbonato devem ser ajustados para que ele possa tamponar corretamente de acordo com o nível de CO<sub>2</sub> fornecido pela incubadora (MATHER e ROBERTS, 1998). Em geral, utiliza-se um nível de CO<sub>2</sub> de 5%, para mimetizar sua concentração no sangue (GUYTON e HALL, 2006). A má combinação dos níveis de bicarbonato do meio e dos níveis do CO<sub>2</sub> da incubadora pode resultar em um pH do meio fora da escala ótima para crescimento celular, tendo por resultado crescimento mais lento ou a morte das células (MATHER e ROBERTS, 1998). O CO<sub>2</sub> influencia também na proliferação de células de mamíferos através de sua participação como doador de carbono para a biossíntese de nucleotídeos (NELSON et al, 2005, ).

### **1.1.1. Tipos de cultivo celular**

O termo **cultura de tecidos** define a manutenção *in vitro* de fragmentos de tecido denominados explantes, mas é comumente aplicado como um termo genérico que indica a cultura de explantes de tecidos, órgãos e células dispersas, incluindo o cultivo de linhagens celulares.

O **cultivo celular**, ou seja o cultivo de células isoladas, pode iniciar-se à partir de um cultivo primário ou pelo uso de linhagens de células imortalizadas.

**Cultivo primário** é definido como o cultivo que começou a partir de células, tecidos ou órgãos retirados diretamente do organismo doador (humano, animal ou vegetal). O cultivo primário pode ser considerado como tal até que seja subcultivado pela primeira vez. Torna-se então uma linhagem celular (MASTERS, 2000; FRESHNEY, 2005). As linhagens celulares podem ser finitas e imortalizadas (ou linhagens contínuas) (MASTERS, 2000).

As **células imortalizadas** (permanentes, contínuas ou transformadas) em geral são derivadas de células tumorais ou de células que foram transfectadas com oncogenes ou tratadas com carcinogênicos. As células imortalizadas podem não possuir malignidade, porém possuem crescimento celular contínuo com vida infinita. As células oriundas de cultivo primário possuem tempo limitado de vida (são

linhagens finitas), entretanto o ambiente de cultivo favorece o espraiamento e a proliferação celular fazendo com que *in vitro* as células se proliferem mais rapidamente do que aconteceria *in vivo* (PERES e CURI, 2005).

As linhagens celulares permanentes têm como principais vantagens a ótima reprodutibilidade, a facilidade de manutenção e o controle de qualidade assegurado pelos fornecedores, principalmente, no que se refere à presença de contaminantes e endotoxinas. Porém, deve-se levar em consideração que, assim como ocorre em todos os tipos de cultivo *in vitro*, sua manipulação deve seguir critérios rigorosos que evitem a contaminação posterior no ambiente do laboratório. Uma das maiores desvantagens do uso de linhagens permanentes é o fato de que as células sofrem um processo de desdiferenciação que pode levar à perda de características funcionais importantes, como por exemplo, a de atividades enzimáticas. Uma maneira de contornar-se esse problema é o uso de culturas primárias que, embora não sejam submetidas a um controle de qualidade semelhante ao das culturas permanentes, são de fácil obtenção e manipulação e dentro de certos limites de tempo permitem a fácil reprodutibilidade do experimento (D'ÁNGELO et al., 2002), além de expressarem melhor as características do tecido de onde foram retiradas (MASTERS, 2000).

As linhagens celulares imortalizadas ou oriundas de cultivo primário podem ser aderentes e em suspensão (não aderentes). Esta classificação se refere à necessidade de ancoragem que as linhagens aderentes apresentam. As células aderentes dependem da fixação à base das garrafas ou placas de cultura para se proliferarem, e representam a grande maioria das linhagens em estudo. A habilidade de se proliferar em suspensão é restrita a células hematopoéticas, linhagens transformadas e células tumorais malignas (PERES e CURI, 2005).

### **1.1.2. Manutenção das células**

Para manutenção de células *in vitro* é necessária a troca regular do meio de cultivo pois isto possibilita a nutrição adequada das células e a eliminação de metabólitos secretados para o meio. Com isso, as condições de cultivo são mantidas estáveis, favorecendo o crescimento celular (PERES e CURI, 2005). Algumas culturas de crescimento rápido, tais como as linhagens de células transformadas, como HeLa (Linhagem de células oriundas de carcinoma cervical humano), exigem

uma troca de meio a cada dois ou quatro dias. Isto é normalmente indicado por um aumento da acidez, onde o pH cai abaixo de 7,0 (MASTERS, 2000). Uma vez que a maioria dos meios contém o vermelho de fenol como um indicador de pH é possível fazer uma rápida avaliação visual do pH do meio de todas as culturas em uma incubadora (MATHER e ROBERTS, 1998).

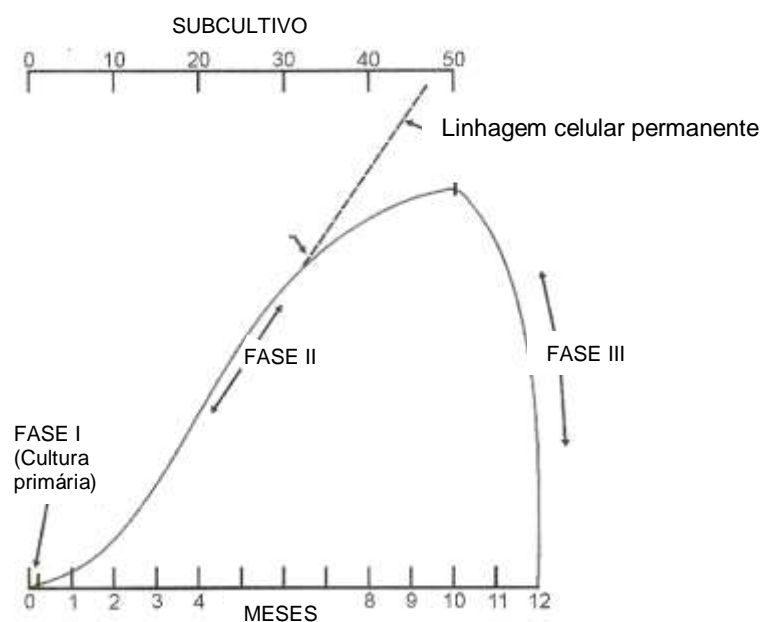
Entretanto, mesmo sem uma mudança maior de pH, o meio também pode se deteriorar, e alguns componentes, como glutamina, são instáveis, o que requer que o meio seja trocado pelo menos uma vez por semana (MASTERS, 2000).

Além da troca regular de meio, outro fator crucial para manutenção e crescimento das linhagens celulares é o subcultivo. Nas culturas de células aderidas em geral, o crescimento é inibido pelo contato, o que ocorre em alta confluência. Se as células permanecerem nesta condição, descolam do frasco, o que inviabiliza a cultura. Assim, quando a cultura atinge 80 a 90 % de confluência é necessário subcultivá-la. Uma cultura em monocamada pode ser diluída e transferida para um segundo frasco pela dissociação das células da monocamada por enzimas como a tripsina (culturas em suspensão só precisam ser diluídas) (MASTERS, 2000; PERES e CURI, 2005).

O intervalo entre cada subcultivo dependerá do número de células semeadas e da taxa de duplicação da linhagem. Diferentemente da cultura em suspensão, numa cultura de células aderidas é fácil saber quando se faz necessário tripsinizar, sem necessariamente contar as células. Basta observar a confluência que essas apresentam. Culturas de células aderidas são, normalmente, examinadas em microscópio invertido de modo que se possa observar o aspecto geral e a confluência da cultura. Vale salientar, que as células aderidas não apresentam uniformidade quanto à morfologia, como normalmente se observa em cultivos de células em suspensão. Isto porque, quando em contato umas com as outras ou com o material do frasco, as células adquirem formas distintas, o que facilita a aderência. As células aderidas são normalmente subcultivadas em um número de  $5 \times 10^4$  em uma garrafa de  $25\text{cm}^2$ . Entretanto cada linhagem celular deve ser avaliada individualmente (PERES e CURI, 2005).

Na figura 2 podemos observar um diagrama representativo da evolução de uma linhagem celular. A fase I, ou fase de cultura primária, representa o estágio inicial que termina com a formação da primeira camada celular confluenta. Neste ponto é feito o primeiro subcultivo, sendo contada a primeira passagem. Começa

então a fase II que se caracteriza por crescimento intenso e necessidade de muitos subcultivos. Em determinado momento pode acontecer uma alteração que transforma a cultura finita em uma linhagem permanente, ou da-se início à fase III com senescência e morte celular (PERES e CURI, 2005).



**Figura 2:** Diagrama representativo da evolução de uma linhagem celular. (Adaptado de PERES e CURI, 2005)

## 1.2. Testes de citotoxicidade

Os questionamentos quanto ao uso de animais de laboratório, na avaliação de risco dos produtos de uso humano, resultou em vários estudos a partir da década de 60, visando estabelecer metodologias que utilizam tecidos e células de mamíferos, organismos inferiores e substratos inertes. Também foram desenvolvidos bancos de dados informatizados e programas que avaliam a toxicidade pela determinação de relação estrutura-atividade (BAGLEY et al., 1996; CRUZ et al., 2004).

Os modelos experimentais com cultivos celulares são atualmente muito aceitos, exeqüíveis e reproduzíveis. Não são modelos isentos de problemas, mas permitem efetuar uma grande diversidade de técnicas de estudo sobre células



específicas em condições pré-fixadas pelo observador e se mostram como uma alternativa válida para algumas fases de experimentação animal e humana (COFÁN e FERNÁNDEZ-SOLÁ, 1992; UKELIS et al., 2008). As células utilizadas podem ser de vários tecidos, tanto de origem humana quanto animal (DE LIMA et al., 2003, CRUZ et al., 2004).

Ensaio de citotoxicidade basal *in vitro* apresentam boa reprodutibilidade e refletem os efeitos adversos sobre as estruturas e processos da célula que são intrínsecos a todas as células, uma vez que as funções celulares basais suportam as funções celulares órgão-específicas. A citotoxicidade basal é expressa como  $CC_{50}$  (concentração citotóxica para 50% das células quando comparado às células controle não-tratadas), a qual pode ser matematicamente calculada. Vários métodos aplicados para testar a toxicidade geral são úteis na toxicologia *in vitro*. Como regra geral, as células são expostas a diferentes concentrações de um produto químico por um dado período de tempo, sendo posteriormente a viabilidade celular mensurada de diferentes maneiras (VALADARES, 2006). Esta viabilidade ou mesmo a proliferação celular, podem ser avaliadas por métodos como: contagem do número de células, uso de corantes vitais, mensuração de produtos de metabolismo celular e incorporação de radioisótopos (CRUZ et al., 2004).

### **1.2.1 Método de exclusão do Azul de Tripán**

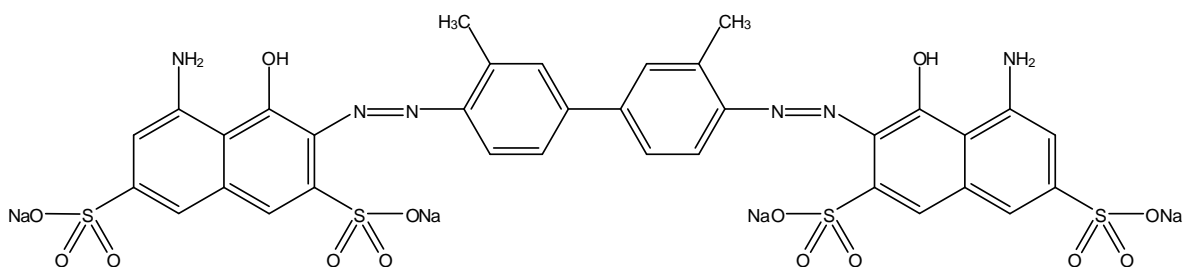
Muitos testes de viabilidade celular avaliam a perda da integridade da membrana que pode ser observada pela absorção de um corante para o qual a membrana é normalmente impermeável (por exemplo, Azul de Tripán, eritrosina, ou preto de naftaleno) ou pela liberação de corantes que normalmente seriam retidos por células viáveis (por exemplo, fluoresceína e vermelho neutro) (FRESHNEY, 2005).

O teste de exclusão do Azul de Tripán (0,4%) está entre os mais utilizados e é baseado no princípio de que células viáveis (vivas) apresentam membranas intactas, que evitam a entrada do corante, enquanto que as membranas metabolicamente inativas de células mortas (não viáveis) não conseguem evitar a penetração do corante na célula, tornando-se azuis (MASTERS, 2000; FRESHNEY, 2005). Este ensaio é habitualmente realizado pela contagem, de preparações de células com o corante, em um hemocitômetro. A diferença entre o número total de células (coradas

e não coradas) e o número de células mortas (coradas) será o número de células viáveis numa dada amostra.

Entre as limitações desta técnica estão: (a) a necessidade de avaliar a preparação dentro de um tempo determinado após a introdução do corante, já que as células vão começar a acumular o corante após exposição prolongada, (b) a pouca capacidade para distinguir entre as células tumorais viáveis e as células não-tumorais viáveis presentes na preparação, e (c) a possibilidade de subestimar as células inviáveis (WEISENTHAL et al., 1983).

O Azul de Tripán (5) ( $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$ ) é um corante ácido azul (Figura 3) que contém dois grupos cromóforos azo (-N=N-). É um corante indicado para estimar a viabilidade celular. A coloração ajuda também na visualização da morfologia celular e facilita a contagem das células.

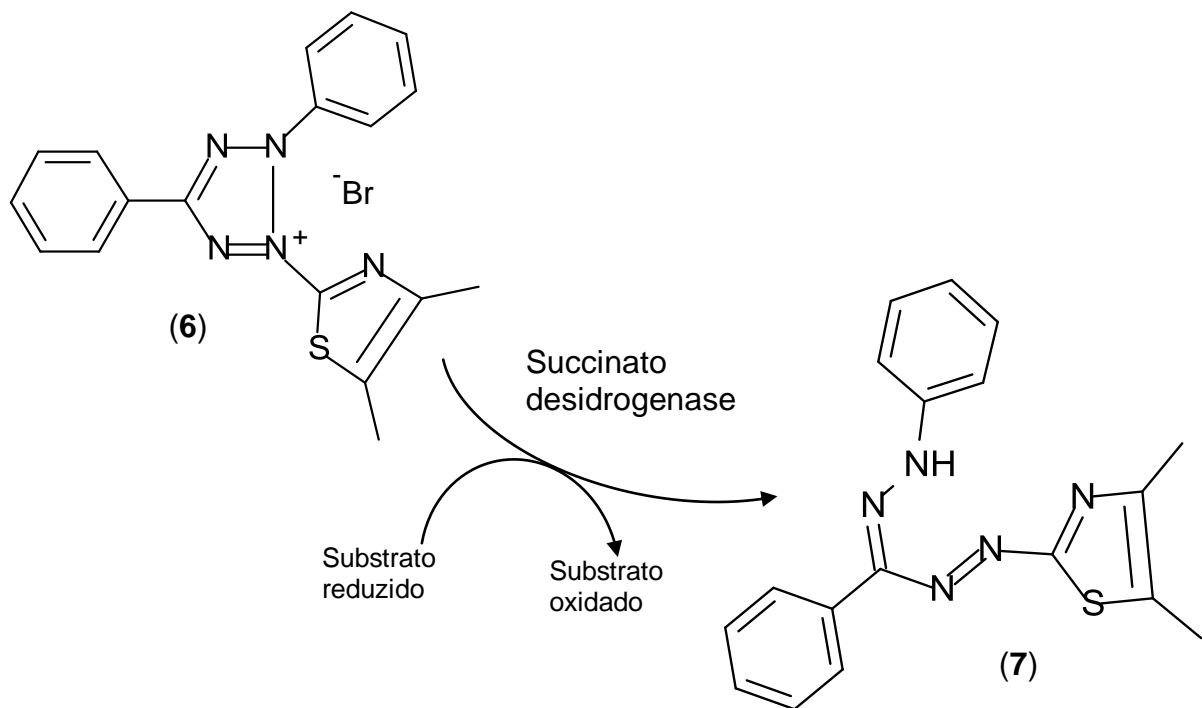


**Figura 3:** Estrutura do Azul de Tripán (5)

### 1.2.2 Método de redução do sal de tetrazólio (MTT)

O ensaio do MTT (6) ou brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, é um teste usado para avaliar a viabilidade celular baseado em uma reação colorimétrica. O MTT penetra na célula e ao chegar à mitocôndria da célula viável é reduzido pela enzima succinato desidrogenase, produzindo cristais de formazana detectados em um comprimento de onda de 560nm. A quantidade de cristais formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Assim, quanto mais escura a coloração ao final da reação, maior é a viabilidade celular. A densidade óptica resultante do teste MTT é determinada em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983)

O MTT (**6**, Figura 4) é um sal amarelo, solúvel em água, que após redução pela succinato desidrogenase, transforma-se em um produto azul insolúvel (formazana, **7**) (CRUZ et al., 2004). Desta forma, podemos utilizar o método do MTT para medir o dano induzido por diferentes substâncias no metabolismo celular, mais especificamente na atividade de enzimas desidrogenases. Este teste mede indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática, especialmente das mitocôndrias, das células vivas.



**Figura 4:** Redução do MTT (**6**) a formazana (**7**) por desidrogenases mitocondriais.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas em 21 de dezembro de 2007, sob o número 016841/2007-64.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Recursos Naturais da Universidade Federal de Alagoas (LPqRN-UFAL) e no Laboratório de Biotecnologia Celular da Universidade de Ciências da Saúde de Alagoas (LABIC-UNCISAL).

### 2.1 Reagentes

**Meio de cultura:** o Meio Essencial Mínimo Eagle (MEM; Sigma-Aldrich) foi solubilizado em água milli-Q, suplementado de com 2,2g de bicarbonato de sódio, 1% de antimicrobiano e 2,38g de tampão HEPES, sendo denominado MEM completo. O mesmo foi esterilizado por filtração em filtro Millipore de 0,22µm (Sterile Millex<sup>®</sup> Filter Unit).

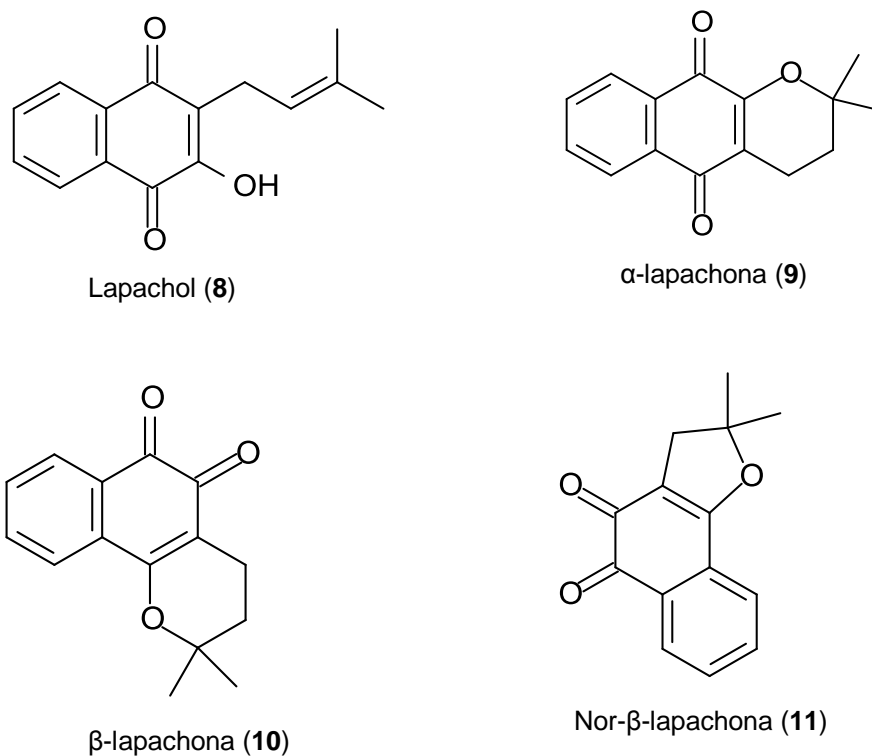
**Soro Fetal Bovino (SFB):** foi utilizado SFB estéril, inativado pelo calor (Sigma-Aldrich) adicionado ao MEM, na proporção de 10% para manutenção e crescimento das células.

**Antibióticos e antifúngico:** foram adicionados ao meio a fim de minimizar as contaminações bacterianas e/ou fúngicas das culturas celulares. Inicialmente o antimicrobiano utilizado foi a gentamicina (Sigma), na proporção de 50 mg/L de MEM; entretanto na primeira tentativa de cultivo primário de córnea houve proliferação de leveduras, provavelmente oriundas da própria córnea. Desta forma passamos a utilizar uma solução de penicilina, estreptomicina e anfotericina B (Antibiótic antimycotic solution<sup>®</sup> – Sigma), uma vez que anfotericina B tem boa ação contra leveduras (BROOKS et al., 2000), fornecendo assim, 100.000UI de penicilina G, 100mg de estreptomicina e 250µg de anfotericina B por litro de MEM.

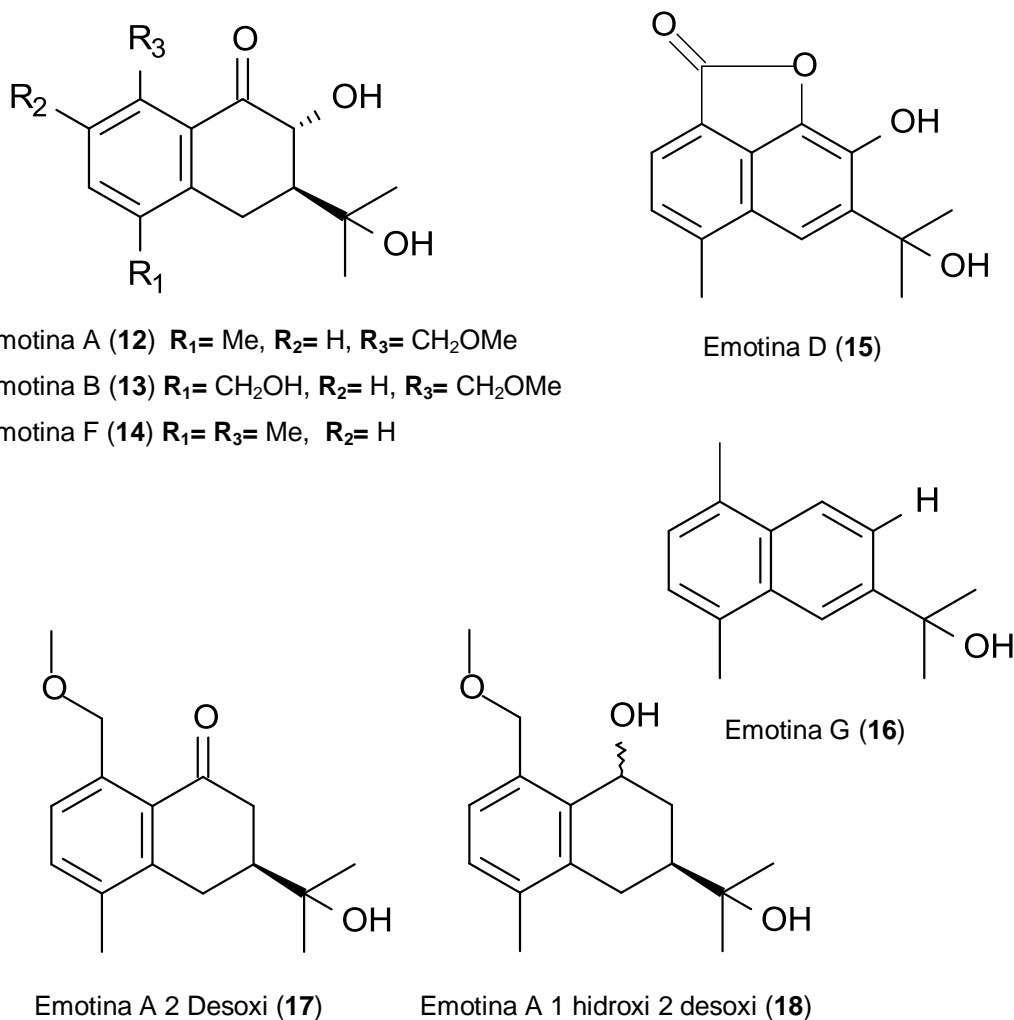
**Tripsina-EDTA:** foram utilizadas tripsina 1:250 (Amresco) e ácido etilenodiaminotetracético - EDTA (Sigma) diluídas em solução salina na proporção de 0,05% e 0,02%, respectivamente. Após o preparo o pH foi ajustado para 7,8 com  $\text{NaHCO}_3$  e a solução foi filtrada (em filtro Millipore de  $0,22\mu\text{m}$  - Sterile Millex<sup>®</sup> Filter Unit), alíquotada e congelada. No momento do uso era aquecida a  $37^\circ\text{C}$ .

## 2.2 Extratos e substâncias testadas

Foram avaliados 39 extratos de 12 famílias de plantas e quatro famílias de algas brasileiras e ainda o antirretroviral efavirenz (**32**) e 11 substâncias puras do grupo das quinonas (Figura 5) e dos terpenos (Figura 6). A seleção dos extratos foi baseada em dados pré-existentes na literatura de atividade antiviral no gênero ou família em estudo e ainda em uma abordagem quimiotaxonômica.



**Figura 5:** Estruturas das naftoquinonas utilizadas nos testes.



**Figura 6:** Estruturas dos sesquiterpenos utilizados nos testes.

Todos os extratos e substâncias isoladas foram pesados, testados quanto à solubilidade, diluídos e levados ao ultrassom para completa dissolução. A seguir as soluções foram levadas para a capela de fluxo laminar onde foram esterilizadas por filtração (Figura 7) em filtro Millipore com poros de  $0,45\mu\text{m}$  (Sterile Millex® Filter Unit), acondicionadas em tubos estéreis (Figura 8) e armazenadas em geladeira. Foram preparadas soluções estoques de 10 mL nas concentrações de 1 mg/mL e 0,1 mg/mL para extratos (Tabelas 1a e 1b) e substâncias isoladas (Tabela 1c), respectivamente. As demais concentrações utilizadas nos experimentos foram obtidas por diluições seriadas a partir das soluções estoques. A maioria das substâncias foi solubilizada em solução hidroalcoólica a 40%, entretanto a

concentração final desta solução nos testes foi de no máximo 4%. Da mesma forma, a concentração final de DMSO utilizado para solubilizar alguns extratos (inicialmete a 1%) foi de no máximo 0,1% nos testes.



**Figura 7:** Filtração do extrato

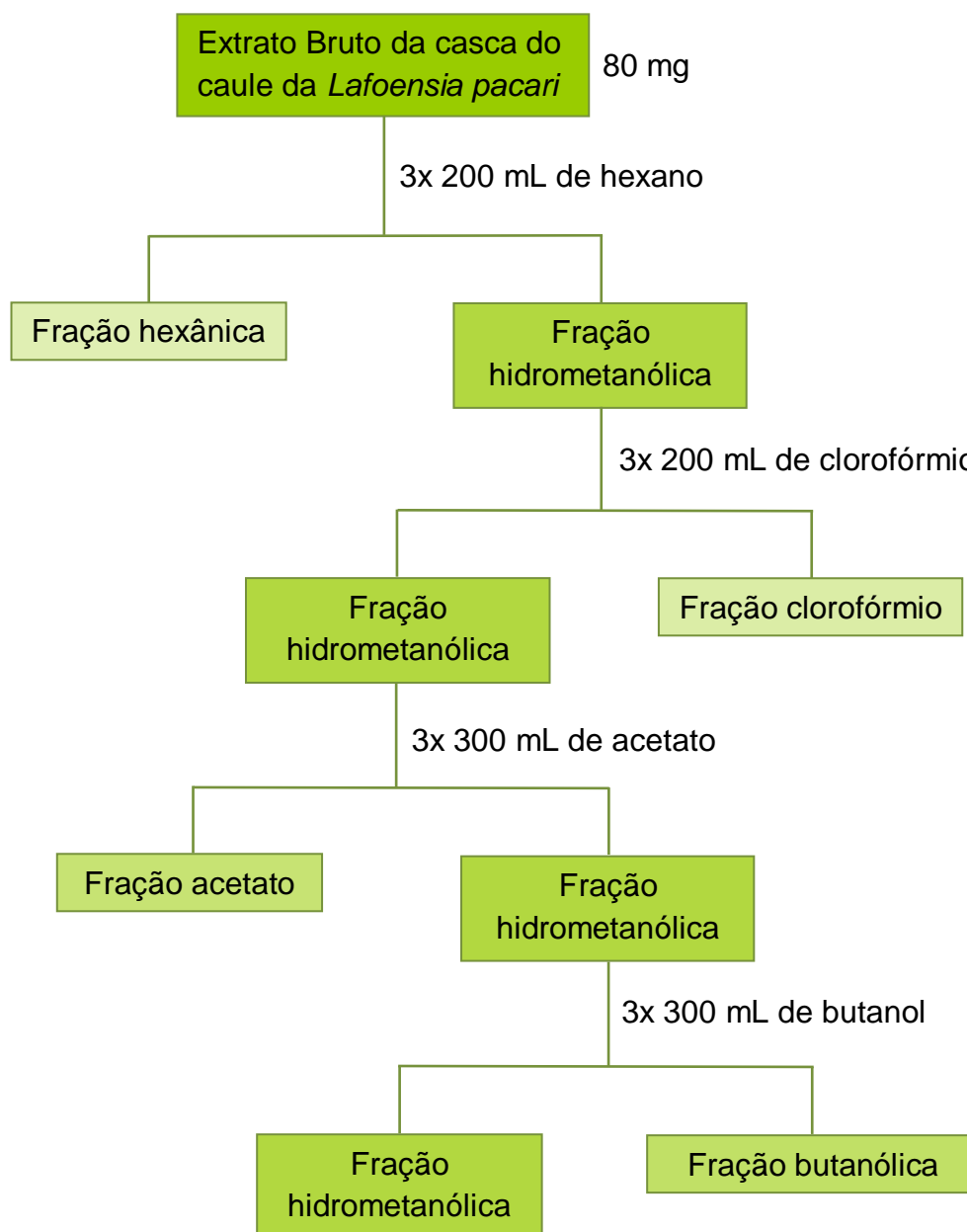


**Figura 8:** Soluções estoques dos extratos

### **2.2.1 Obtenção das frações do extrato de *Lafoensia pacari***

Do extrato bruto da casca do caule da *Lafoensia pacari* foi feita partição líquido-líquido, para obtenção das frações. Partindo-se de 80g do extrato etanólico bruto diluído em solução hidrometanólica (na proporção de 1:1), foi realizada a partição utilizando-se solventes de polaridade crescente: hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol. Foram obtidas as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila, butanólica e a hidrometanólica remanescente, conforme demonstrado na figura 9. Após a obtenção das frações, estas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, com aquecimento em banho-maria à temperatura de aproximadamente 40°C. O resíduo correspondente foi transferido para um recipiente, levado à capela para secagem completa e em seguida pesado.

Após secagem, as frações foram pesadas, solubilizadas, esterilizadas por filtração e armazenadas para realização dos testes futuros.



**Figura 9:** Partição líquido-líquido do extrato bruto da casca do caule da *L. pacari*



**Tabela 1a:** Extratos etanólicos diluídos e esterilizados por filtração, utilizados nos experimentos

| Família / Espécie  | Nome vulgar   | Parte utilizada             | Solvente usado para dissolução |
|--|---------------|-----------------------------|--------------------------------|
| <b>Anacardiaceae</b>                                       |               |                             |                                |
| <i>Spondias purpurea</i> L.                                | Seriguela     | Casca do fruto              | EtOH 40%                       |
| <i>Spondias purpurea</i> L.                                | Seriguela     | Semente                     | EtOH 40%                       |
| <i>Spondias tuberosa</i>                                   | Umbu          | Casca do fruto              | EtOH 40%                       |
| <i>Spondias tuberosa</i>                                   | Umbu          | Semente                     | EtOH 40%                       |
| <b>Araliaceae</b>  |               |                             |                                |
| <i>Didymopanax morototoni</i> Decne. & Planch.             | Morototó      | Casca do caule              | EtOH 40%                       |
| <i>Didymopanax morototoni</i> Decne. & Planch.             | Morototó      | Fração CHCl <sub>3</sub>    | EtOH 40%                       |
| <b>Arecaceae</b>   |               |                             |                                |
| <i>Cocos nucifera</i> L. var. <i>Typica</i>                | Coco gigante  | Fibra do fruto              | EtOH 40%                       |
| <i>Cocos nucifera</i> L. var. <i>Nana</i> cultivar amarela | Coco amarelo  | Fibra do fruto              | EtOH 40%                       |
| <i>Cocos nucifera</i> L. var. <i>Typica</i>                | Coco gigante  | Fibra do fruto              | Água                           |
| <i>Cocos nucifera</i> L. var. <i>Nana</i> cultivar amarela | Coco amarelo  | Fibra do fruto              | Água                           |
| <b>Boraginaceae</b>  |               |                             |                                |
| <i>Cordia salzmanni</i> DC.                                | Maria preta   | Caule                       | DMSO 1%                        |
| <b>Cecropiaceae</b>  |               |                             |                                |
| <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul                        | Embaúba       | Folha                       | EtOH 40%                       |
| <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul                        | Embaúba       | Raiz                        | EtOH 40%                       |
| <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul                        | Embaúba       | Casca da raiz               | EtOH 40%                       |
| <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul                        | Embaúba       | Caule                       | EtOH 40%                       |
| <b>Clusiaceae</b>  |               |                             |                                |
| <i>Rheedia brasiliensis</i> (Mart.) Planch. & Triana       | Bacupari      | Raiz                        | EtOH 40%                       |
| <i>Rheedia brasiliensis</i> (Mart.) Planch. & Triana       | Bacupari      | Caule                       | EtOH 40%                       |
| <b>Euphorbiaceae</b>                                       |               |                             |                                |
| <i>Jatropha mollissima</i> *                               | Pinhão branco | Casca do caule              | EtOH 40%                       |
| <i>Jatropha mollissima</i>                                 | Pinhão branco | Caule                       | EtOH 40%                       |
| <b>Fabaceae</b>  |               |                             |                                |
| <i>Camptosema coriaceum</i> Benth.                         |               | Raiz                        | EtOH 40%                       |
| <i>Erythrina mulungu</i> Mart.                             | Mulungu       | Casca do caule              | EtOH 40%                       |
| <i>Erythrina mulungu</i> Mart.                             | Mulungu       | Caule                       | EtOH 40%                       |
| <i>Erythrina mulungu</i> Mart.                             | Mulungu       | Casca da raiz               | EtOH 40%                       |
| <b>Lythraceae</b>  |               |                             |                                |
| <i>Lafoensia pacari</i> A.St.-Hil.                         | Dedaleira     | Casca do caule              | EtOH 40%                       |
| <i>Lafoensia pacari</i> A.St.-Hil.                         | Dedaleira     | Folha                       | EtOH 40%                       |
| <i>Lafoensia pacari</i> A.St.-Hil.                         | Dedaleira     | Fr. acetado da CC           | EtOH 40%                       |
| <i>Lafoensia pacari</i> A.St.-Hil.                         | Dedaleira     | Fr. CHCl <sub>3</sub> da CC | DMSO 1%                        |
| <b>Olacaceae</b>   |               |                             |                                |
| <i>Ximenia Americana</i> L.                                | Ameixa brava  | Folha                       | DMSO 1%                        |
| <b>Rubiaceae</b>   |               |                             |                                |
| <i>Genipa americana</i> L.                                 | Jenipapo      | Casca do fruto              | EtOH 40%                       |
| <i>Genipa americana</i> L.                                 | Jenipapo      | Semente                     | EtOH 40%                       |
| <b>Simaroubaceae</b>                                       |               |                             |                                |
| <i>Simaba mayana</i> Casar                                 | Pau pra tudo  | Raiz                        | EtOH 40%                       |
| <i>Simaba mayana</i> Casar                                 | Pau pra tudo  | Casca da raiz               | EtOH 40%                       |
| <i>Simaba mayana</i> Casar                                 | Pau pra tudo  | Casca do caule              | EtOH 40%                       |
| <i>Simaba mayana</i> Casar                                 | Pau pra tudo  | Caule                       | EtOH 40%                       |

\* Extrato metanólico \*\* Extrato aquoso Fr. = fração CC=casca do caule

**Tabela 1b:** Extratos de algas diluídos e esterilizados por filtração, utilizados nos experimentos

| Família / Espécie           | Parte utilizada /<br>solvente da extração | Solvente usado<br>para dissolução |
|-----------------------------|---|-----------------------------------|
| <b>Dictyotaceae</b>         |   |                                   |
| <i>Dictyota cervicornis</i> | Toda a alga / Água                        | Água                              |
| <i>Dictyota cervicornis</i> | Toda a alga / EtOH                        | EtOH 40%                          |
| <b>Phaeophyceae</b>         |   |                                   |
| <i>Padina boergesenii</i>   | Toda a alga / EtOH                        | EtOH 40%                          |
| <b>Sargassaceae</b>         |   |                                   |
| <i>Sargassum vulgare</i>    | Toda a alga / EtOH                        | EtOH 40%                          |
| <b>Ulvaceae</b>             |   |                                   |
| <i>Ulva lactuca</i>         | Toda a alga / Água                        | Água                              |

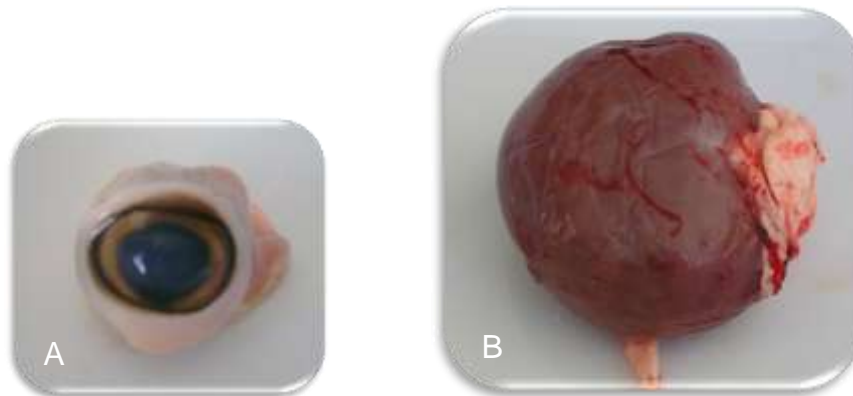
**Tabela 1c:** Substâncias puras diluídas e esterilizadas por filtração, utilizadas nos experimentos

| Classe / substância               | Planta                      | Solvente usado<br>para dissolução |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| <b>Naftoquinonas</b>              |                             |                                   |
| Lapachol (8)                      | <i>Tabebuia avellanedae</i> | EtOH 40%                          |
| $\alpha$ -Lapachona (9)           | Produto semi-sintético      | EtOH 40%                          |
| $\beta$ -Lapachona (10)           | Produto semi-sintético      | EtOH 40%                          |
| Nor $\beta$ -Lapachona (11)       | Produto semi-sintético      | EtOH 40%                          |
| <b>Sesquiterpenos</b>             |                             |                                   |
| Emotina A (12)                    | Produto semi-sintético      | EtOH 40%                          |
| Emotina B (13)                    | <i>Emmotum nitens</i>       | EtOH 40%                          |
| Emotina F (14)                    | <i>Emmotum nitens</i>       | EtOH 40%                          |
| Emotina D (15)                    | <i>Emmotum nitens</i>       | EtOH 40%                          |
| Emotina G (16)                    | <i>Emmotum nitens</i>       | EtOH 40%                          |
| Emotina A 2 Desoxi (17)           | Produto semi-sintético      | EtOH 40%                          |
| Emotina A 1 hidroxí 2 desoxi (18) | <i>Emmotum nitens</i>       | EtOH 40%                          |
| <b>Antirretroviral</b>            |                             |                                   |
| Efavirenz (32)                    | Produto sintético           | EtOH 40%                          |

## 2.3 Implementação do cultivo celular

Para implementar o cultivo celular foram feitos cultivos primários de células epiteliais de córnea e de células fibroblásticas renais de ovinos, por diferentes métodos, a fim de selecionar o mais eficiente para a implantação do cultivo.

Os rins e globos oculares (Figura 10) foram retirados de animais recém-abatidos em um abatedouro local (Mapresal<sup>®</sup>), de fiscalização federal, o que garante a sanidade dos animais doadores uma vez que os mesmos são utilizados para consumo humano.

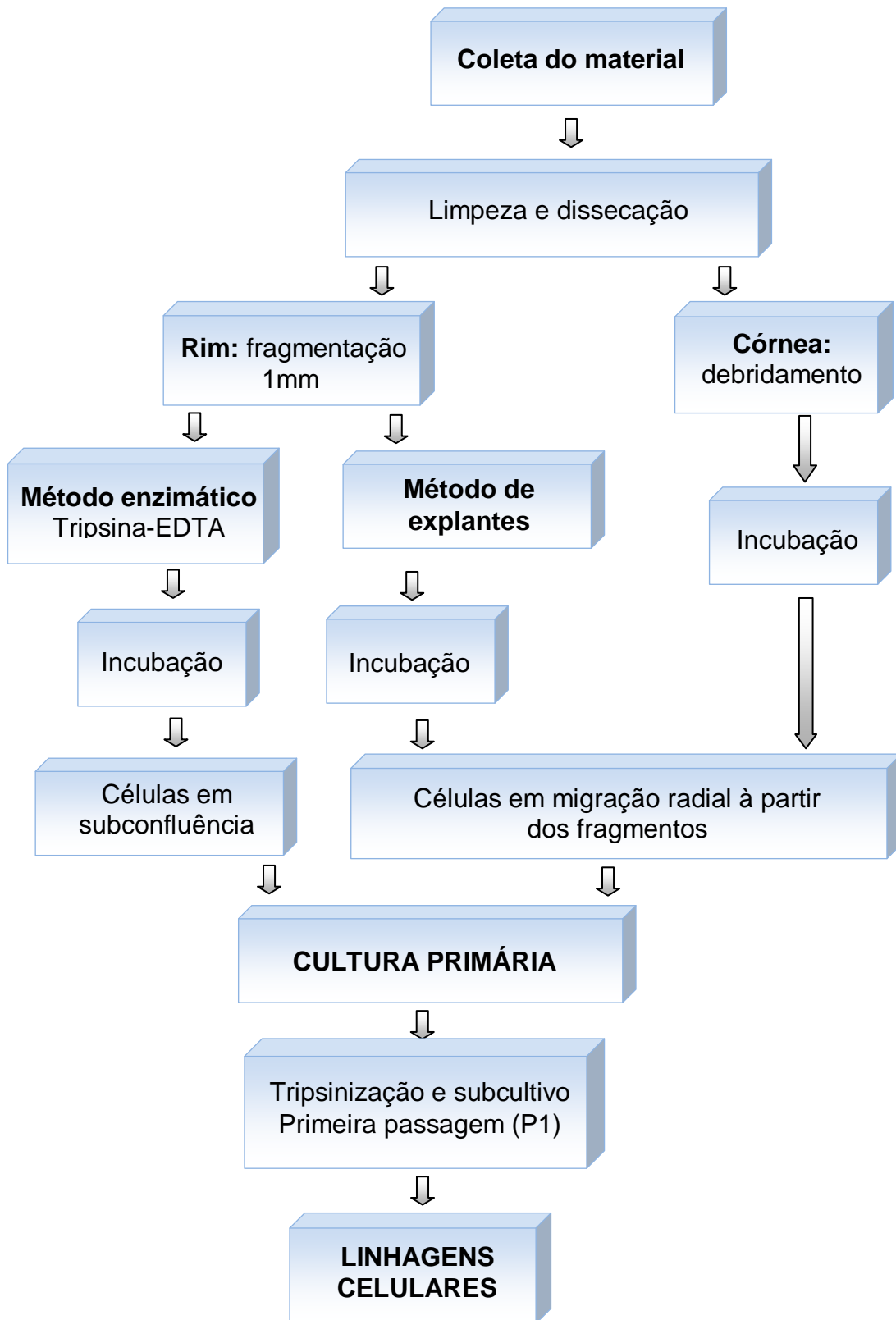


**Figura 10:** Globo ocular (A) e rim (B) de ovinos

Imediatamente após o abate do animal, os órgãos foram coletados e depositados, separadamente, em recipientes contendo solução fisiológica. Os mesmos foram transportados para o laboratório em isopor com gelo. Chegando ao laboratório o material coletado foi lavado com solução fisiológica para retirar o sangue e fragmentos de tecido indesejados, e levado ao fluxo laminar para dar-se início à coleta de células para o cultivo primário.

De acordo com o material coletado (rim ou globo ocular) utilizou-se uma das três técnicas de cultivo: método mecânico (córnea); técnica de explante (rim) ou desagregação enzimática com tripsina (rim), como descrito por Freshney (2005) (Figura 11).

Cada metodologia foi realizada no mínimo duas vezes para observarmos a praticidade, o tempo transcorrido desde o início do cultivo até o primeiro subcultivo e a velocidade das células em atingir a confluência na garrafa após cada subcultivo.



**Figura 11:** Obtenção das linhagens celulares à partir do cultivo primário

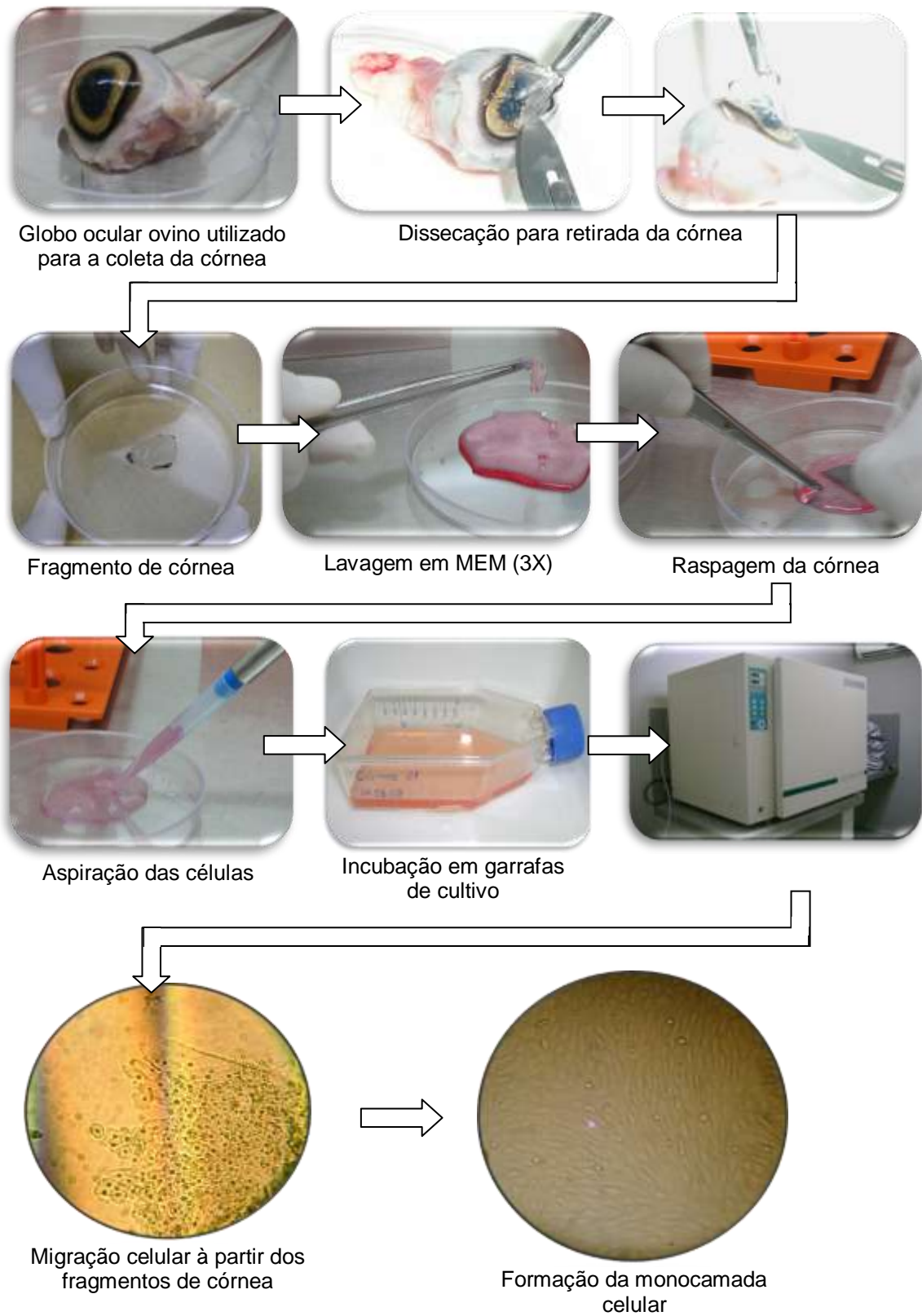
### **2.3.1 Cultivo de células epiteliais de córnea**

No fluxo laminar, o globo ocular (Figura 12) foi lavado novamente com solução fisiológica e com auxílio de pinça e bisturi estéreis a córnea foi retirada e transferida para uma placa de Petri estéril a fim de realizar a coleta de material para o cultivo celular (Adaptado de OLIVEIRA et al, 2008). A córnea foi lavada três vezes com MEM + 10% de SFB, e a cada lavagem foi transferida para uma nova placa de Petri.

Com auxílio de um bisturi estéril a córnea foi debridada a fim de liberar pequenos explantes e células, que foram posteriormente aspirados e transferidos para uma garrafa pequena de cultura de células (25 cm<sup>2</sup>). Nesta foram adicionados 2 mL de MEM + 10% de SFB e a mesma foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Após este período foram adicionados mais 2 mL de MEM + 10% de SFB.

As garrafas foram observadas diariamente para verificação da migração de células. O meio foi trocado semanalmente ou a intervalos menores, quando necessário, até a formação de uma monocamada confluyente de células.

O preenchimento de toda a garrafa pela monocamada indicava que as mesmas estavam prontas para serem tripsinizadas (cerca de 20 dias). As tripsinizações ou passagens celulares permitiram a duplicação da garrafa de cultura, o que era feito a cada sete dias a depender da velocidade do crescimento celular.



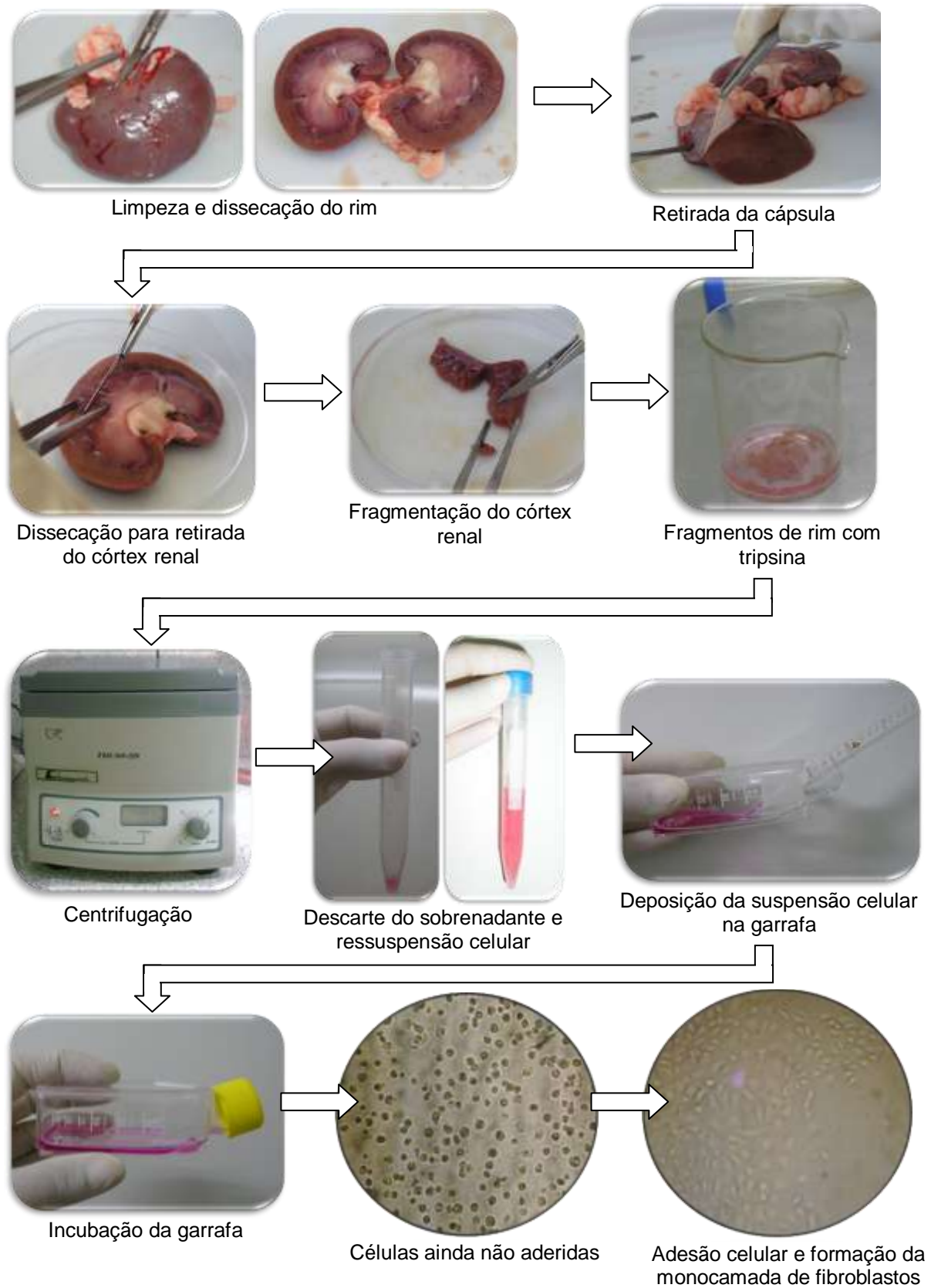
**Figura 12:** Preparo de cultura primária de células epiteliais de córnea

### ***2.3.2 Cultivo de fibroblastos renais por desagregação enzimática com tripsina***

Na cabine de fluxo laminar o rim foi novamente lavado com solução fisiológica e, com material cirúrgico estéril, foi dissecado a fim de se retirar a cápsula renal (Figura 13) e seccioná-lo longitudinalmente. A seguir, retirou-se toda a medula renal e a camada cortical restante foi colocada em uma placa de Petri estéril onde foi lavada três vezes com tampão fosfato salino (PBS) estéril. Assim como no caso da córnea, a cada lavagem era transferida para uma nova placa de Petri.

Com auxílio de um bisturi foram cortados fragmentos de  $1\text{mm}^2$  como indicado por alguns autores (MASTERS, 2000; FRESHNEY, 2005). Estes fragmentos foram lavados três vezes com PBS a fim de retirar o sangue e os pedaços muito pequenos que estavam excessivamente dilacerados. Os fragmentos de  $1\text{mm}^2$  foram imersos em solução de Tripsina –EDTA (0,05% e 0,02%) aquecida a  $37^\circ\text{C}$ , por 10 minutos. Após o tempo de ação da tripsina, o sobrenadante foi aspirado e depositado em tubos Falcon estéreis contendo meio completo com 10% de SFB no mesmo volume do aspirado. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1000 RPMs e o sobrenadante foi descartado, sendo adicionado novo MEM com 10% de SFB. Após homogenização retirou-se uma alíquota da suspensão celular e contou-se em câmara de Neubauer. A concentração celular foi ajustada para  $1 \times 10^6$  células/mL e foram depositados 2 mL por garrafa de cultivo que foi incubada em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 24 h adicionou-se mais 2 mL de MEM com 10% de SFB.

As culturas foram observadas periodicamente para verificar o crescimento celular e o meio foi trocado quando necessário até a formação de um tapete confluyente de células. Ao atingir a confluência as células foram tripsinizadas.



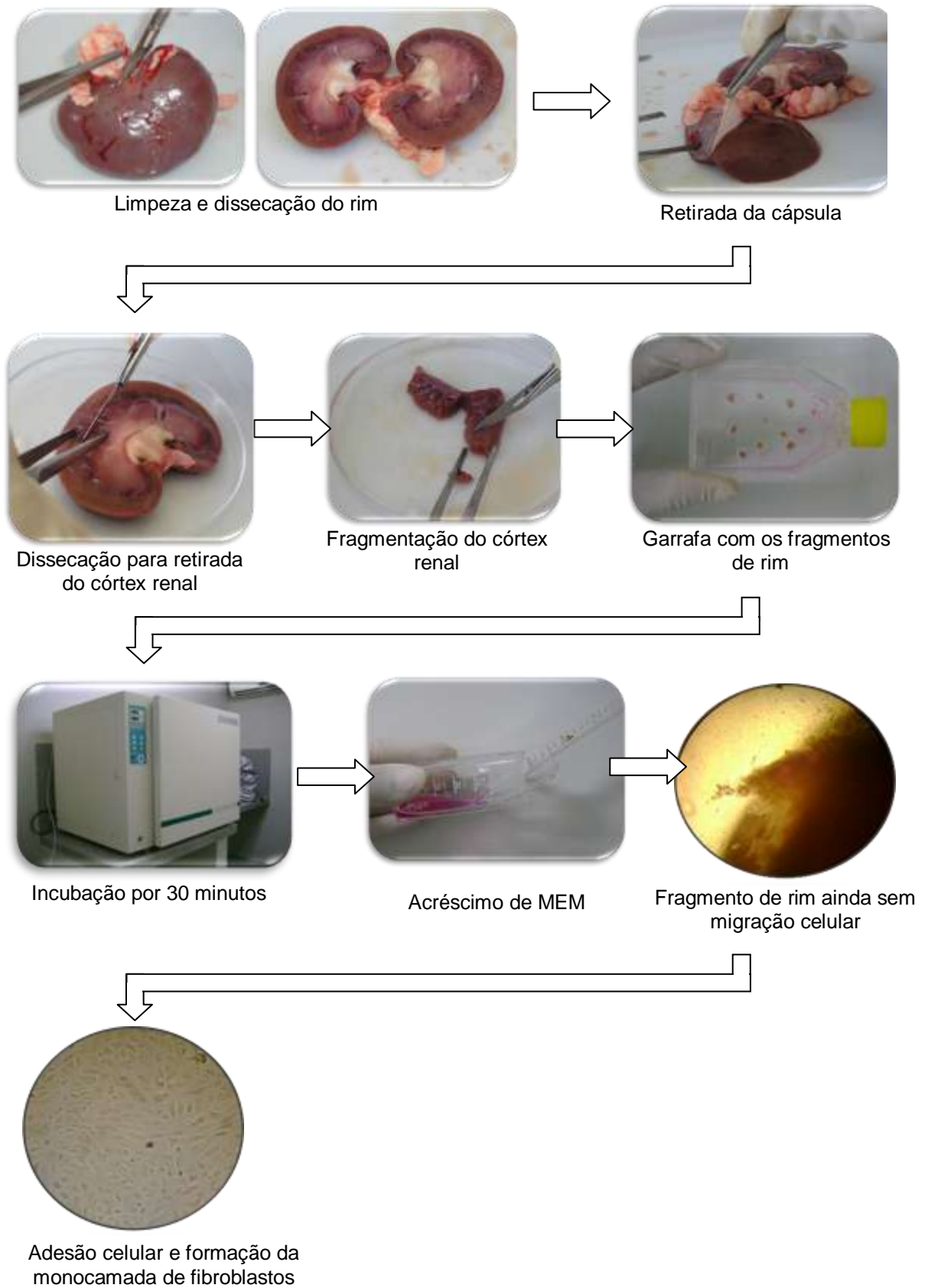
**Figura 13:** Preparo de cultura primária de fibroblastos renais por desagregação enzimática



### ***2.3.3 Cultivo de fibroblastos renais pela técnica de explantes***

Na cabine de fluxo laminar o rim foi novamente lavado com solução fisiológica e, com material cirúrgico estéril, foi dissecado a fim de se retirar a cápsula renal (Figura 14) e seccioná-lo longitudinalmente. A seguir, retirou-se toda a medula renal e a camada cortical restante foi colocada em uma placa de Petri estéril onde foi lavada três vezes com PBS. Assim como no caso da córnea, a cada lavagem era transferida para uma nova placa de Petri.

Com auxílio de um bisturi foram cortados fragmentos de  $1\text{mm}^2$  como indicado por alguns autores (MASTERS, 2000; FRESHNEY, 2005). Estes fragmentos foram lavados três vezes com PBS a fim de retirar o sangue e os fragmentos muito pequenos que estavam excessivamente dilacerados. Após lavagem, os fragmentos de  $1\text{mm}^2$  foram umedecidos com MEM com 10% de SFB e com auxílio de uma agulha estéril foram transferidos para um garrafa pequena de cultivo ( $25\text{cm}^2$ ) umedecida com MEM + 10% de SFB. A garrafa foi levada à estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos para os fragmentos aderirem à garrafa. Após este período, adicionou-se cuidadosamente 2 mL de MEM com 10% de SFB e incubou-se novamente em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ . Após 24 h, adicionou-se mais 2 mL de MEM com 10% de SFB. As culturas foram observadas diariamente para verificar a migração de celular. O meio foi trocado quando necessário, até a formação de um tapete confluyente de células, quando as células foram então tripsinizadas.



**Figura 14:** Preparo de cultura primária de fibroblastos renais pela técnica de explantes

### **2.3.4. Manutenção e tripsinização das células**

As células cultivadas foram observadas e monitoradas em microscópio invertido a cada dois dias. Conforme necessário, o meio das garrafas foi substituído por meio completo fresco (em torno de duas vezes por semana). Um indicativo da necessidade de troca do meio de cultivo era a observação de alteração da coloração deste, indicando alteração de pH devido à atividade metabólica celular intensa. As células não viáveis oriundas do cultivo primário foram removidas na primeira mudança de meio.

Para ampliação do estoque celular as garrafas foram subcultivadas, na razão de 1:1 em passagens subseqüentes, sempre que as células apresentavam pelo menos 80% de subconfluência. As células das garrafas começaram a ser utilizadas para os testes depois da quarta passagem. À partir daí as garrafas foram tripsinizadas sempre que atingiram confluência; para manutenção do estoque ou para o preparo de suspensão celular para os testes de citotoxicidade ou atividade antiviral.

Para tripsinização, o meio da garrafa foi desprezado, o tapete celular foi lavado com 2 mL da solução Tripsina –EDTA (0,05% e 0,02%) aquecida a 37°C e depois a garrafa foi incubada em estufa a 37°C por 5 minutos com 2 mL desta solução para obter individualização celular. Após observação da liberação das células, em microscópio invertido, a tripsina foi inativada pela adição de 4 mL de MEM com 10% de SFB. O conteúdo da garrafa foi transferido para um tubo Falcon e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso em 2 a 8 mL de MEM com 10% de SFB, à depender do tamanho do *pellet* e da finalidade da tripsinização.

Para o preparo de uma nova garrafa, foram adicionados 8 mL de meio e a suspensão celular foi homogenizada e dividida nas duas garrafas.

Para o preparo de uma placa de 96 poços era necessário conhecer a concentração celular. Desta forma, adicionou-se inicialmente 2 a 4 mL de MEM com 10% de SFB, à depender do tamanho do *pellet*, a suspensão celular foi homogenizada e então uma alíquota de 200 µL foi transferida para um *ependorf* contendo 200 µL de Azul de Tripán a 0,4% a fim de proceder-se à contagem celular. Após 5-10 minutos em contato com o Azul de Tripán, as células foram contadas em

um hemocitômetro (Câmara de Neubauer). A quantidade de células por mililitro (cel/mL) foi calculada com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ total de células contadas} \times 10^4 \times \text{fator de diluição}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}} = \text{n}^\circ \text{ de células/mL}$$

A seguir, a suspensão celular era ajustada para a concentração celular e volume desejados.

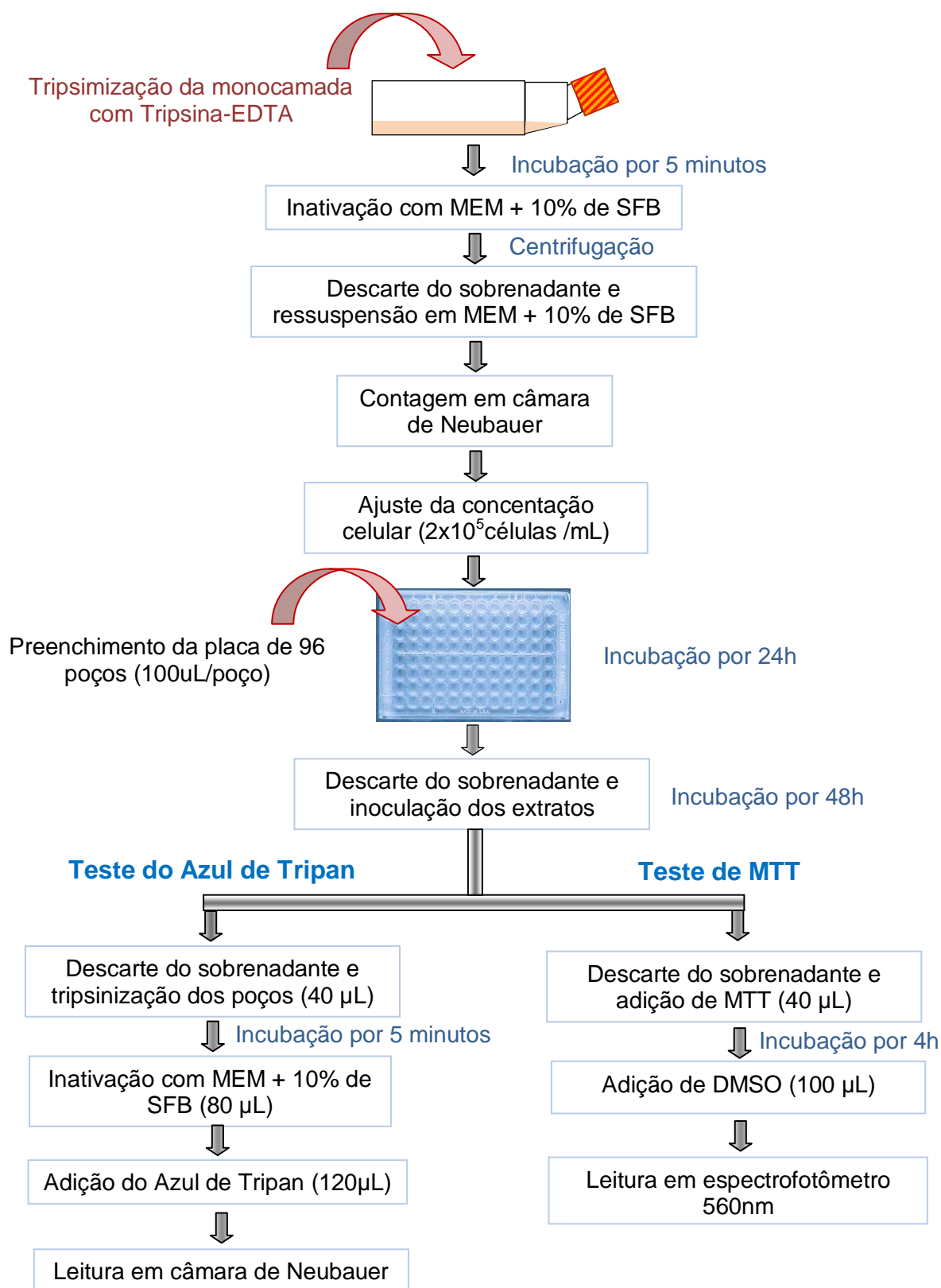
## 2.4 Testes de citotoxicidade

Para a pesquisa da atividade antiviral de uma amostra qualquer é indispensável à avaliação prévia de sua possível toxicidade em relação às células permissivas ao vírus em estudo. Neste trabalho a citotoxicidade foi avaliada por duas metodologias: exclusão do Azul de Tripán (adaptado de WEISENTHAL et al., 1983 e STROBER, 1997) e redução do MTT (adaptado de MOSMANN, 1983 e VALADARES, 2006). Todos os extratos e substâncias isoladas foram testados pelo método de exclusão do Azul de Tripán e os extratos e substâncias com toxicidade muito elevada na dosagem inicial (próximo de 100%) foram testados pelo método de redução do MTT.

Para realização dos testes de citotoxicidade uma garrafa de cultura com monocamada celular confluenta era tripsinizada seguindo os passos da figura 15.

Após tripsinização, 100  $\mu\text{L}$  da suspensão celular a uma concentração de  $2 \times 10^5$  células por mL de MEM com 10% de SFB foram depositados em cada poço de uma microplaca de 96 poços. Esta concentração celular foi adotada após estudo prévio, utilizando diferentes concentrações de células. Após vinte e quatro horas de incubação em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , com 5% de  $\text{CO}_2$ , tendo ocorrido confluência celular, o meio de cultivo foi removido e 200  $\mu\text{L}$  de meio fresco contendo os extratos ou as substância estudadas foi adicionado. Para o controle utilizou-se meio sem os extratos e com as mesmas concentrações dos diluentes dos extratos testados.

As microplacas eram incubadas em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Após este período o meio foi descartado e as placas utilizadas para avaliação da citotoxicidade pelo método de exclusão do Azul de Tripán ou pelo método de redução do MTT.



**Figura 15:** Preparo de placa para os testes de citotoxicidade pelos métodos de exclusão do Azul de Tripán e redução do MTT.

### 2.4.1. Teste de exclusão do Azul de Tripán

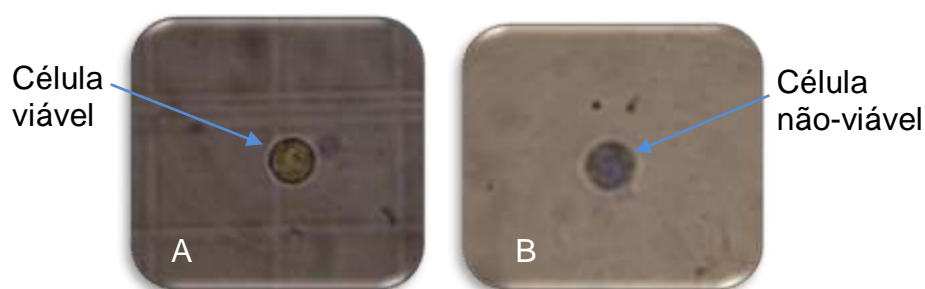
Após descarte do MEM da microplaca, as monocamadas foram tripsinizadas com solução de tripsina-EDTA (0,05% e 0,02%) a 37°C, e incubadas por 5 minutos em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Após verificado o arredondamento das células ao microscópio (indicativo de que uma célula se dissociou da outra) a tripsina foi inativada com MEM + 10% de SFB e adicionou-se solução de Azul de Tripán a 0,4%, na proporção de 1:1. A seguir as células viáveis e não viáveis foram contadas em câmara de Neubauer (Figura 16) e aplicou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Células viáveis} \times 100}{\text{Células viáveis} + \text{células não viáveis}}$$

A viabilidade do controle foi normalizada para 100%. A toxicidade das substâncias testadas foi calculada comparada ao controle com a seguinte fórmula:

$$\text{Toxicidade comparada ao controle (\%)} = 100 - \frac{\text{Viabilidade do teste} \times 100}{\text{Viabilidade do controle}}$$

Inicialmente os extratos e as substâncias isoladas foram testados a 100 e 10µg/mL, respectivamente. Quando a toxicidade era muito elevada (acima de 50%) nestas concentrações, eram testadas concentrações menores.



**Figura 16:** Células viável (A) e não-viável (B) observadas pelo teste de exclusão do Azul de Tripán

Os testes foram realizados em triplicata, sendo calculada a média e o desvio padrão de cada tratamento. Os resultados foram avaliados pelo teste Tukey com 5% de significância.

#### **2.4.2. Teste de redução do MTT**

Foram testados pelo método do MTT os extratos e substâncias com toxicidade muito elevada na dosagem inicial (próximo de 100%) a fim de fazermos uma curva para identificar a melhor concentração a ser usada nos testes antivirais. Para o preparo do MTT, 5mg do sal de tetrazólio em pó (Sigma<sup>®</sup>) foi diluído em 2mL de PBS para obter uma solução estoque 2,5 mg/mL. O MTT foi mantido protegido da luz a – 20°C.

Após a retirada do meio das microplacas que haviam sido incubadas, adicionou-se 40 µL da solução estoque de MTT e incubou-se novamente por mais 4 h, a 37°C. Em seguida, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e adicionou-se 100 µL de DMSO.

As placas foram mantidas sob agitação durante 10 minutos para a solubilização dos cristais de formazana e a absorvância correspondente a cada amostra foi medida no leitor de espectrofotômetro a 560nm. Os dados de absorvância obtidos em cada tratamento foram normalizados com a fórmula abaixo:

$$\text{Toxicidade (\%)} = 100 - \frac{\text{Abs. do tratamento} - \text{Abs. do branco} \times 100}{\text{Abs. do Controle} - \text{Abs. do branco}}$$

Abs. = absorvância

A seguir foi calculada a média e o desvio padrão da viabilidade obtida em cada tratamento. A absorvância, obtida das células controle não-tratadas, foi considerada como 100% de viabilidade celular, como indicado por Mosmann (1983).

A leitura da absorvância dos cristais de formazana é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis metabolizando o MTT (MOSMANN, 1983).



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Linhagens celulares

Foi possível estabelecer linhagens celulares finitas com os três métodos testados, podendo os mesmos ser utilizados para obtenção de linhagens de células epiteliais e de fibroblastos. Entretanto, optamos pelo cultivo de células epiteliais de córnea, pela praticidade, menor tempo na fase I (fase de cultura primária) e maior taxa de crescimento na fase II. No método dos explantes renais houve uma certa demora na transição da fase 1 para a fase 2, talvez pelo tamanho dos explantes. No método enzimático houve muita morte celular no início, também dificultando a formação da monocamada. Isto pode se dever à ação da tripsina que apesar de promover uma desagregação mais completa, pode danificar as células (FRESHNEY, 2005). Tentamos em um segundo cultivo diminuir a concentração de tripsina, mas a quantidade de células recuperadas foi muito pequena. Outra desvantagem deste método foi o gasto de reagentes para estabelecer o cultivo primário. Outras enzimas como colagenase e dispase são menos nocivas, podendo ser uma opção à tripsina. Porém sua ação depende do tipo de tecido que se deseja isolar (FRESHNEY, 2005).

A melhor proliferação das células epiteliais de córnea, quando comparada ao cultivo de fibroblastos renais pode dever-se ao alto *turnover* do epitélio corneano, que é parte integrante da superfície ocular e está em constante regeneração. Estima-se que o epitélio seja renovado (*epithelial turnover*) a cada sete a dez dias (AMBROSIO JR, 2004).

#### 3.2. Manutenção das células

Para manutenção das células, o meio recebia bicarbonato de sódio que ajudava a manter o pH estável. Entretanto, com o decorrer do cultivo observamos que o bicarbonato acrescentado ao meio não estava sendo suficiente para tamponar o mesmo, então foram acrescentados 2,38 g de tampão HEPES (10 mM). O HEPES fornece capacidade tamponante adicional às culturas e estabiliza o pH durante o tempo em que as culturas estão fora da incubadora e em atmosfera normal para observação e manipulação. Vale salientar que a concentração de HEPES pode ser

mantida em 10 mM se o SFB for usado como um complemento, uma vez que este tem uma considerável capacidade tamponante (MATHER e ROBERTS, 1998).

O SFB fornece nutrientes, hormônios e fatores de crescimento necessários para funções celulares, substâncias para adesão (por exemplo, fibronectina e vitronectina) e inibidores de protease. Ele ainda apresenta ação tamponante do pH e se liga e inativa, ou seqüestra, materiais tóxicos, como compostos orgânicos, traços de metais e produtos secretados por células (MATHER e ROBERTS, 1998).

Para subcultivar as células utilizou-se solução de Tripsina-EDTA, que age permitindo o "descolamento" das células dos frascos de cultivo e/ou a desagregação das células entre si. A tripsina através de sua propriedade proteolítica age digerindo e clivando proteínas intercelulares de adesão e o EDTA quelata os cátions divalentes livres (como  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ ), alterando a estabilidade das membranas, uma vez que as proteínas de adesão celular necessitam de cálcio e magnésio para exercerem sua função (PERES e CURI, 2005).

### 3.3. Testes de citotoxicidade

Inicialmente foram realizados testes de citotoxicidade com os dois tipos celulares (células epiteliais e fibroblastos) e pudemos observar que tanto as células epiteliais de córnea como os fibroblastos renais são adequados para realização destes testes. Entretanto, para diminuir as variáveis no trabalho optamos por usar um único tipo celular para dar continuidade aos testes de citotoxicidade e atividade antiviral.

Os resultados dos testes de atividade citotóxica com células epiteliais de córnea pelos métodos de exclusão do Azul de Tripán e redução do MTT podem ser observados nas tabelas 2a, 2b, 2c, 3a e 3b. As tabelas 2a, 2b, 2c apresentam os dados brutos e os dados normalizados pela viabilidade do controle celular que foi considerada como 100%.

Todos os extratos com toxicidade elevada (maior que 50%) foram testados em concentrações menores, como observado com os extratos de *Cecropia*, *Rheedia*, *Simaba* e *Jatropha* (Tabela 2a). A citotoxicidade observada com os extratos oriundos de frutos (casca e sementes de *S.purpurea*, *S. tuberosa* e *G.*

*americana*) a 100µg/mL foi  $\leq 8,2\%$ , exceto com as fibras do fruto dos extratos de *Cocos nucifera*; provavelmente devido à presença de taninos (JOHNSON et al., 1986; MAGIATIS et al., 2001) normalmente encontrada neste extrato (BRÍGIDA e ROSA, 2003).

No tocante às algas, em todas com exceção da *Ulva lactuca*, observou-se elevada toxicidade a 100µg/mL ( $\geq 98,91\%$ ), sendo testadas em concentrações menores (Tabela 2b). As algas são fontes de importantes substâncias com atividades antiinflamatórias, antibacterianas, antivirais, antifúngicas, nematocidas, antineoplásicas e imunossupressoras (EL GAMAL, 2010). Em uma tentativa de encontrar novas drogas anticâncer, muitas algas têm sido examinadas quanto à citotoxicidade, exibindo potente ação citotóxica contra várias linhagens de células cancerosas (HARADA e KAMEI, 1997; MAYER e LEHMANN, 2001; EL GAMAL, 2010; KHANAVI et al., 2010)

No grupo das naftoquinonas também foi encontrada elevada citotoxicidade (Tabela 2c), principalmente com a  $\beta$ -Lapachona (**10**) e Nor- $\beta$ -Lapachona (**11**). A citotoxicidade das naftoquinonas já foi relatada anteriormente, principalmente em linhagens de células tumorais (HUSSAIN et al, 2007) e pode estar relacionada com suas ações inibidoras de sistemas celulares reparadores. Como exemplo, destaca-se o estresse oxidativo que provocam ao induzirem a formação deletéria endógena de espécies bioativas derivadas do oxigênio, como ocorre no *Trypanosoma cruzi*. Outra atividade marcante destas substâncias, é a inibição do complexo das topoisomerasas, ação que provoca o desencadeamento da apoptose celular (DA SILVA et al., 2003; LI et al., 2003). Estas ações podem em parte explicar a ação citostática, não só para o agente patogênico em questão como para outras células.

Dentre as naftoquinonas naturais destaca-se o lapachol (**8**), encontrado como constituinte de várias plantas. Muitas atividades farmacológicas foram atribuídas ao lapachol (**8**) e aos seus derivados semi-sintéticos, tais como ação antineoplásica, antibacteriana, antifúngica, cercaricida, moluscicida (contra caramujos *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*), leishmanicida; tripanossomicida, antimalárica (atividade contra *Plasmodium falciparum*), antiinflamatória, antiulcerante e antiviral (LIMA et al., 2002; FONSECA et al., 2003; DA SILVA et al., 2003; HUSSAIN et al, 2007; EYONG et al, 2008). Esta gama de ações terapêuticas, em especial antiviral, nos levou a avaliar a citotoxicidade das

mesmas em concentrações decrescentes a fim de detectar uma concentração com citotoxicidade menor que 50% para usarmos nos testes antivirais (Tabela 2c).

Os testes de citotoxicidade são essenciais para as fases iniciais de desenvolvimento de drogas antivirais, uma vez que definem a concentração a ser utilizada em etapas posteriores de avaliação. Além disso, evitam danos celulares e asseguram a seletividade dos vírus *in vitro* (EISENBRAND et al., 2002).

Como citado anteriormente, alguns extratos e substâncias isoladas foram testados pelo método do MTT a fim de identificarmos a melhor concentração a ser usada nos testes antivirais. Na maioria dos extratos a citotoxicidade foi dose-dependente, mas para algumas substâncias esta correlação não foi encontrada, isso pode se dever ao número de células por poço ou pelo efeito não ser dose dependente. Os resultados foram expressos em % de inibição após aplicação da fórmula descrita no item 2.4.2.

**Tabela 2a:** Resultados da citotoxicidade dos diferentes extratos pelo teste de exclusão do Azul de Tripán

| Família / Espécie                 | Parte utilizada <sup>a</sup> | Toxicidade (%) <sup>b, c</sup> |                   |                   |
|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|
|                                   |                              | 100 µg/mL                      | 50 µg/mL          | 10 µg/mL          |
| <b>Anacardiaceae</b>              |                              |                                |                   |                   |
| <i>S. purpurea</i> L.             | CF                           | 10,03±0,85 (8,2)               | -                 | -                 |
| <i>S. purpurea</i> L.             | S                            | 9±0,6 (7,14)                   | -                 | -                 |
| <i>S. tuberosa</i>                | CF                           | 3±0,3 (1,02)*                  | -                 | -                 |
| <i>S. tuberosa</i>                | S                            | 9,8±0,78 (7,96)                | -                 | -                 |
| <b>Araliaceae</b>                 |                              |                                |                   |                   |
| <i>D. morototoni</i> .            | CC                           | 2±0,2 (0,0)*                   | -                 | -                 |
| <i>D. morototoni</i> .            | Fr.CHCl <sub>3</sub>         | 5,72±0,5(3,79)                 | -                 | -                 |
| <b>Arecaceae</b>                  |                              |                                |                   |                   |
| <i>C. nucifera</i> L. var. Typica | FF                           | 32,67±0,52 (30,6)              | -                 | -                 |
| <i>C. nucifera</i> L. var. Nana   | FF                           | 33,5±0,78 (31,45)              | -                 | -                 |
| <i>C. nucifera</i> L. var. Typica | FF                           | 13,7±0,86 (11,03)              | -                 | -                 |
| <i>C. nucifera</i> L. var. Nana   | FF                           | 28,2±0,98 (26,0)               | -                 | -                 |
| <b>Boraginaceae</b>               |                              |                                |                   |                   |
| <i>Cordia salzmanni</i> DC.       | C                            | 3,59±0,6 (0,64)*               | -                 | -                 |
| <b>Cecropiaceae</b>               |                              |                                |                   |                   |
| <i>C. pachystachya</i> Trécul     | F                            | 92±4,2(91,76)                  | 38,4±1,2 (35,8)   | -                 |
| <i>C. pachystachya</i> Trécul     | R                            | 100±0 (100)                    | 33,45±1,3 (30,7)  | -                 |
| <i>C. pachystachya</i> Trécul     | CR                           | 100±0 (100)                    | 24,8±0,85 (21,65) | -                 |
| <i>C. pachystachya</i> Trécul     | C                            | 100±0 (100)                    | 41,9±1,3 (39,52)  | -                 |
| <b>Clusiaceae</b>                 |                              |                                |                   |                   |
| <i>R. brasiliensis</i>            | R                            | 63±2,48(61,5)                  | 20,53±0,9 (17,23) | -                 |
| <i>R. brasiliensis</i>            | C                            | 100±0 (100)                    | 33,4±0,55 (30,67) | -                 |
| <b>Euphorbiaceae</b>              |                              |                                |                   |                   |
| <i>J. mollissima</i>              | CC                           | 59,1±1,21 (57,4)               | 20,4±0,8 (17,08)  | -                 |
| <i>J. mollissima</i>              | C                            | 18,14±0,75 (14,8)              | -                 | -                 |
| <b>Fabaceae</b>                   |                              |                                |                   |                   |
| <i>C. coriaceum</i> .             | R                            | 29,7±0,67 (26,86)              | -                 | -                 |
| <i>E. mulungu</i> Mart.           | CC                           | 11,78±0,79 (8,2)               | -                 | -                 |
| <i>E. mulungu</i> Mart.           | C                            | 26,19±1,4 (23,2)               | -                 | -                 |
| <i>E. mulungu</i> Mart.           | CR                           | 23,5±0,7 (20,4)                | -                 | -                 |
| <b>Lythraceae</b>                 |                              |                                |                   |                   |
| <i>L. pacari</i> A.St.-Hil.       | CC                           | 34,56±1,9 (31,9)               | -                 | -                 |
| <i>L. pacari</i> A.St.            | F                            | 100±0 (100)                    | 23,03±1 (20,19)   | -                 |
| <i>L. pacari</i> A.St.            | Fr.acetado CC                | 90,22±1,88 (89,9)              | 6,52±0,56 (3,07)  | -                 |
| <i>L. pacari</i> A.St.            | Fr. CHCl <sub>3</sub> CC     | 3,91±0,73 (0,63)*              | -                 | -                 |
| <b>Olacaceae</b>                  |                              |                                |                   |                   |
| <i>X. americana</i> L.            | F                            | 25,23±0,9 (22,68)              | -                 | -                 |
| <b>Rubiaceae</b>                  |                              |                                |                   |                   |
| <i>G. americana</i> L.            | CF                           | 5,42±0,52 (1,5)*               | -                 | -                 |
| <i>G. americana</i> L.            | S                            | 4,85±0,19 (0,9)*               | -                 | -                 |
| <b>Simaroubaceae</b>              |                              |                                |                   |                   |
| <i>S. mayana</i> Casar            | R                            | 100±0 (100)                    | 24,96±0,9 (22,19) | 13,8±0,94 (10,61) |
| <i>S. mayana</i> Casar            | CR                           | 100±0 (100)                    | 100±0 (100)       | 18,32±0,62 (15,3) |
| <i>S. mayana</i> Casar            | CC                           | 83,3±1,25(82,73)               | 12,65±0,58 (9,42) | 7,23±0,49 (3,8)   |
| <i>S. mayana</i> Casar            | C                            | 100±0 (100)                    | 22,1±0,83 (19,24) | 13,6±0,56 (10,41) |
| <b>Controle</b>                   |                              | 3,29±0,95 (0,0)                |                   |                   |

<sup>a</sup> CF- casca do fruto, S- semente, C – caule, CC- casca do caule, Fr.- fração, FF-fibra do fruto, F-folha, R-raiz, CR-casca da raiz

<sup>b</sup>Os valores representam a média das repetições de cada tratamento ± desvio padrão. Entre parênteses está o valor normalizado pelo controle celular. \* Não difere significativamente do controle <sup>c</sup> -: não testado

**Tabela 2b:** Resultados da citotoxicidade dos extratos de algas pelo teste de exclusão do Azul de Tripán

| Família / Espécie           | Parte utilizada / solvente da extração | Toxicidade (%) <sup>a,b</sup> |                    |                   |
|-----------------------------|--|-------------------------------|--------------------|-------------------|
|                             |  | 100 µg/mL                     | 50 µg/mL           | 10 µg/mL          |
| <b>Dictyotaceae</b>         |  |                               |                    |                   |
| <i>Dictyota cervicornis</i> | Toda a alga / Água                     | 98,41±2,75 (98,35)            | 2,93±0,9 (0,0)*    | -                 |
| <i>Dictyota cervicornis</i> | Toda a alga / EtOH                     | 100±0 (100)                   | 41,11±2,71 (38,91) | 3,61± 0,54 (0,0)* |
| <b>Phaeophyceae</b>         |  |                               |                    |                   |
| <i>Padina boergesenii</i>   | Toda a alga / EtOH                     | 100±0 (100)                   | 3,37± 0,35 (0,0)*  | -                 |
| <b>Sargassaceae</b>         |  |                               |                    |                   |
| <i>Sargassum vulgare</i>    | Toda a alga / EtOH                     | 99,26±0,66 (99,23)            | 52,36±3,96 (50,58) | 3,47±0,65 (0,0)*  |
| <b>Ulvaceae</b>             |  |                               |                    |                   |
| <i>Ulva lactuca</i>         | Toda a alga / Água                     | 12,27±1,81 (9,0)              | -                  | -                 |
| <b>Controle</b>             |  | 3,6±0,57 (0,0)                |                    |                   |

<sup>a</sup>Os valores representam a média das repetições de cada tratamento ± desvio padrão. Entre parênteses está o valor normalizado pelo controle celular. \* Não difere significativamente do controle <sup>b</sup> -: não testado

**Tabela 2c:** Resultados da citotoxicidade das substâncias pelo teste de exclusão do Azul de Tripán

| Classe / substância               | Toxicidade (%) <sup>a,b</sup> |                    |                   |
|-----------------------------------|-------------------------------|--------------------|-------------------|
|                                   | 10 µg/mL                      | 1 µg/mL            | 0,1 µg/mL         |
| <b>Naftoquinonas</b>              |                               |                    |                   |
| Lapachol (8)                      | 16,92±2,7 (14,23)             | 12,53±1,8 (9,7)    | 7,72±1,13 (4,73)  |
| α-Lapachona (9)                   | 75,8±0,88 (75)                | 26,57±0,85 (24,2)  | 6,15±0,88 (3,11)* |
| β-Lapachona (10)                  | 100±0 (100)                   | 100±0 (100)        | 11,17±0,96 (8,29) |
| Nor -β-Lapachona (11)             | 100±0 (100)                   | 96,75±1,26 (96,65) | 5,44± 0,7 (2,38)* |
| <b>Sesquiterpenos</b>             |                               |                    |                   |
| Emotina A (12)                    | 98,6±0,88 (98,55)             | 13,7±1,47 (10,20)  | -                 |
| Emotina B (13)                    | 3,9±0,36 (0,0)*               | -                  | -                 |
| Emotina F (14)                    | 89,55±2,14 (89,12)            | 25,6±0,78 (22,58)  | -                 |
| Emotina D (15)                    | 98,5±1,31 (98,44)             | 13,57± 1 (10,06)   | -                 |
| Emotina G (16)                    | 98,87±1,2 (98,82)             | 15,3±0,62 (11,88)  | -                 |
| Emotina A 2 Desoxi (17)           | 100±0 (100)                   | 23,6±0,88 (20,52)  | -                 |
| Emotina A 1 hidroxí 2 desoxi (18) | 99,62±0,6 (99,60)             | 15,8±0,59 (12,39)  | -                 |
| <b>Antirretroviral</b>            |                               |                    |                   |
| Efavirenz (32)                    | 100±0 (100)                   | 5,97±0,84 (2,16)*  | -                 |
| <b>Controle</b>                   |                               | 3,9±0,61 (0,0)     |                   |

<sup>a</sup>Os valores representam a média das repetições de cada tratamento ± desvio padrão. Entre parênteses está o valor normalizado pelo controle celular \* Não difere significativamente do controle <sup>b</sup> -: não testado

**Tabela 3a:** Resultados da citotoxicidade dos diferentes extratos pelo teste de redução do MTT

| Família / Espécie                               | Parte utilizada | Toxicidade (%) <sup>a b</sup> |            |            |
|---|-----------------|-------------------------------|------------|------------|
|   |                 | 100 µg/mL                     | 10 µg/mL   | 1 µg/mL    |
| <b>Cecropiaceae</b>                             |                 |                               |            |            |
| <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul             | Folha           | 88,45 ±3,6                    | 34,88±2,3  | 25,76±3,14 |
| <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul             | Raiz            | 80,23±2,4                     | 35,66±3,21 | 25,45±2    |
| <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul             | Casca da raiz   | 57,57±2                       | 31,47±2,1  | 13,08±1    |
| <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul             | Caule           | 53,91±3                       | 23,11±2,23 | 20,96±1,08 |
| <b>Clusiaceae</b>                               |                 |                               |            |            |
| <i>R. brasiliensis</i> (Mart.) Planch. & Triana | Caule           | 91,12±3,47                    | 31,36±2,5  | 24,02±1,89 |
| <b>Euphorbiaceae</b>                            |                 |                               |            |            |
| <i>Jatropha curcas</i> L.                       | Raiz            | 31,91±2,05                    | 26,46±0,98 | -          |
| <b>Fabaceae</b>                                 |                 |                               |            |            |
| <i>Erythrina mulungu</i> Mart.                  | Caule           | 4,22±0,68                     | 0,0±0,45   | -          |
| <b>Simaroubaceae</b>                            |                 |                               |            |            |
| <i>Simaba mayana</i> Casar                      | Raiz            | 90,30±4,3                     | 29,44±1,67 | 10,20±1,3  |
| <i>Simaba mayana</i> Casar                      | Casca da raiz   | 93,80±3,21                    | 47,82±2,97 | 26,26±1,2  |
| <i>Simaba mayana</i> Casar                      | Casca do caule  | 89,99±2,08                    | 23,02±0,98 | 8,80±0,88  |
| <i>Simaba mayana</i> Casar                      | Caule           | 97,20±2,14                    | 32,12±3,05 | 25,45±1,21 |
| <b>Controle</b>                                 |                 | 0,0                           |            |            |

<sup>a</sup>Os valores representam a média das repetições de cada tratamento ± desvio padrão. <sup>b</sup> -: não testado

**Tabela 3b:** Resultados da citotoxicidade dos extratos de algas pelo teste de redução do MTT

| Família / Espécie           | Parte utilizada / solvente da extração | Toxicidade (%) |            |            |
|-----------------------------|--|----------------|------------|------------|
|                             |  | 100 µg/mL      | 10 µg/mL   | 1 µg/mL    |
| <b>Dictyotaceae</b>         |  |                |            |            |
| <i>Dictyota cervicornis</i> | Toda a alga / Água                     | 88,32±1,47     | 31±1,58    | 6,70±1,07  |
| <i>Dictyota cervicornis</i> | Toda a alga / EtOH                     | 98±2,83        | 24,90±2,3  | 8,67±1     |
| <b>Phaeophyceae</b>         |  |                |            |            |
| <i>Padina boergesenii</i>   | Toda a alga / EtOH                     | 98,60±3,2      | 22,4±1,7   | 0,0±0,32   |
| <b>Sargassaceae</b>         |  |                |            |            |
| <i>Sargassum vulgare</i>    | Toda a alga / EtOH                     | 89,20±4,07     | 38,56±1,31 | 10,21±0,84 |
| <b>Controle</b>             |  | 0,0            |            |            |

<sup>a</sup>Os valores representam a média das repetições de cada tratamento ± desvio padrão. <sup>b</sup> -: não testado

**Tabela 3c:** Resultados da citotoxicidade das substâncias pelo teste de redução do MTT

| Classe / substância                | Toxicidade (%) |            |           |
|------------------------------------|----------------|------------|-----------|
|                                    | 10 µg/mL       | 1 µg/mL    | 0,1 µg/mL |
| <b>Naftoquinonas</b>               |                |            |           |
| Lapachol (8)                       | 21,09±1,05     | 0,0±0,61   | 1,7±0,82  |
| α-Lapachona (9)                    | 66,16±2,89     | 0,0±0,36   | 4,34±0,74 |
| β-Lapachona (10)                   | 81,98±2,5      | 82,14±3,4  | 15,84±2,8 |
| Nor –β-Lapachona (11)              | 80,24±3,61     | 74,37±2,38 | 6,08±1,3  |
| <b>Sesquiterpenos</b>              |                |            |           |
| Emotina A (12)                     | 47,73±2,1      | 10,27±,84  | 0±0,26    |
| Emotina D (15)                     | 27,38±1,76     | 38,14±1,12 | 3,4±0,89  |
| Emotina G (16)                     | 63±2,3         | 24,10±0,8  | 5±0,98    |
| Emotina A 2 Desoxi (17)            | 46,75±2        | 3,58±0,97  | 0,0±0,45  |
| Emotina A 1 hidroxil 2 desoxi (18) | 62,95±1,76     | 46,79±2,1  | 7,8±0,87  |
| <b>Controle</b>                    | 0,0            |            |           |

<sup>a</sup> Os valores representam a média das repetições de cada tratamento ± desvio padrão.

<sup>b</sup> -: não testado

**PARTE 2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIRRETROVIRAL DE PRODUTOS  
NATURAIS**



## 1. REVISÃO DE LITERATURA

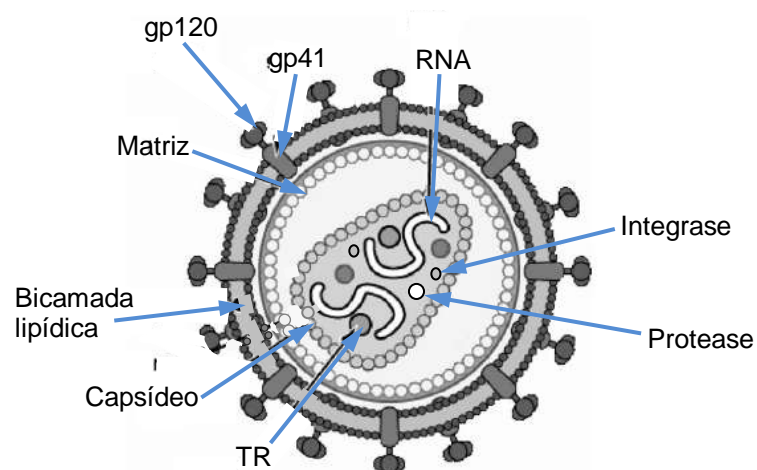
### 1.1 Aspectos gerais do HIV

Os retrovírus são vírus RNA pertencentes à família Retroviridae, que tem como importante característica a presença da enzima transcriptase reversa (TR) que permite que o RNA viral dê origem à dupla fita de DNA pró-viral (CLEMENTS e PAYNE, 1994). Esta família é dividida em três subfamílias que diferem em suas propriedades biológicas: Oncornavirinae, Spumavirinae e Lentivirinae (SONIGO et al., 1985). A subfamília Lentivirinae alberga o gênero *Lentivirus*, que compreende um grupo único de patógenos que afeta grande quantidade de animais, incluindo o homem. O prefixo "lenti" (lt. *lento* = lento) caracteriza a maioria das doenças associadas com as lentiviroses, que em geral tem um longo período assintomático antes do estabelecimento dos sinais clínicos e em geral uma lenta, mas inexorável progressão para a morte (CAMPBELL e ROBINSON, 1998). O mais notório e mundialmente importante *Lentivirus* é o HIV, causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (VAISHNAV e WONG-STAAAL, 1991; CAMPBELL e ROBINSON, 1998). Porém, o gênero *Lentivirus* também alberga os vírus da imunodeficiência símia (SIV), felina (FIV) e bovina (BIV), além dos vírus da anemia infecciosa eqüina, artrite encefalite caprina e o vírus maedi-visna (MVV) (CLEMENTS e PAYNE, 1994).

O HIV é classificado em dois tipos: HIV-1 e HIV-2, que compartilham uma identidade genética de 40-50%. HIV-1 é responsável pela maior parte dos casos de AIDS, enquanto o HIV-2 é menos patogênico e parece prevalecer apenas na África Ocidental (BROOKS et al., 2000; TORO et al., 2007). As cepas de HIV-1 foram divididas em 3 grupos: grupo M (*main* ou principal), grupo O (*outlier*) e grupo N (não M, não O). O grupo M é responsável pela atual pandemia, e é dividido em 9 subtipos (A-D, F-H, J, K) e estes, por sua vez, em subsubtipos e em formas recombinantes circulantes. O grupo O é endêmico em Camarões, onde é responsável por 1-6% dos casos de infecção, enquanto na Europa e nos Estados Unidos tem sido relatado esporadicamente. O grupo N é muito raro, com menos de uma dezena de casos relatados, todos em pessoas procedentes de Camarões. O HIV-2 é composto de 8

genótipos (A-H). Apenas os genótipos A e B têm importância epidemiológica, sendo os genótipos mais prevalentes. Entretanto, a classificação do HIV tem aumentado em complexidade, devido à recombinação genética frequente (TORO et al., 2007).

Os vírions (partículas virais completas) do HIV medem em torno de 100 nm de diâmetro e possuem envelope lipoprotéico ligeiramente esférico (Figura 17), no qual estão inseridas as glicoproteínas virais (gp120 e gp41). Logo abaixo do envelope encontra-se a matriz protéica e o capsídeo cilíndrico que encerra o genoma viral formado por duas fitas simples *sense* de RNA linear; as enzimas transcriptase reversa (TR), protease (PR) e integrase (IN) e as proteínas Vif, Vpr e Nef (BROOKS et al., 2000; SIERRA et al., 2005).

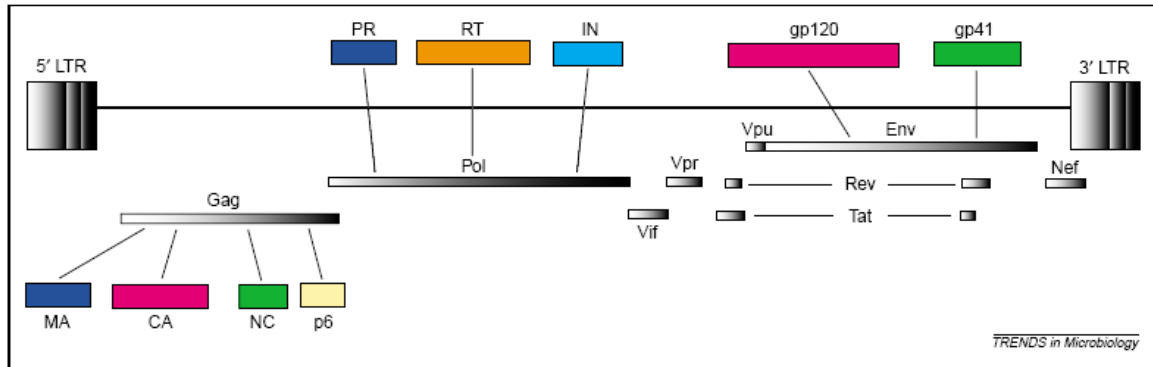


**Figura 17:** Diagrama do HIV. Adaptado de SIERRA et al., 2005

O genoma do HIV é mais complexo que dos retrovírus oncogênicos, contendo alguns genes de replicação adicionais (BROOKS et al., 2000).

O HIV possui os três genes estruturais *gag*, *env* e *pol* comuns aos retrovírus (Figura 18), e ainda, os genes regulatórios *tat*, *rev* e *nef*, e os genes acessórios *vif*, *vpr* e *vpu* (no HIV-1) ou *vpx* (no HIV-2) (FRANKEL e YOUNG, 1998; BROOKS et al., 2000). Os genes estruturais codificam as poliproteínas Gag, Env e Pol, que são subsequentemente clivadas pelas proteases virais em proteínas individuais. As quatro proteínas Gag; MA (matriz, p17), CA (capsídeo, p24), NC (nucleocapsídeo, p7) e p6, e as duas glicoproteínas Env; SU (superfície, gp120) e TM (transmembrana, gp41), são componentes estruturais que formam o capsídeo e o envelope viral (VAISHNAV e WONG-STAAAL, 1991; FRANKEL e YOUNG, 1998).

As três proteínas Pol; PR (protease, p11), TR (transcriptase reversa, p66/p51) e IN (integrase, p32) provêm algumas funções enzimáticas essenciais e também são encapsuladas com a partícula viral (VAISHNAV e WONG-STAAAL, 1991; FRANKEL e YOUNG, 1998).



**Figura 18:** Organização do genoma do HIV. O tamanho dos genes e proteínas codificadas não está em escala. Fonte: FREED, 2004

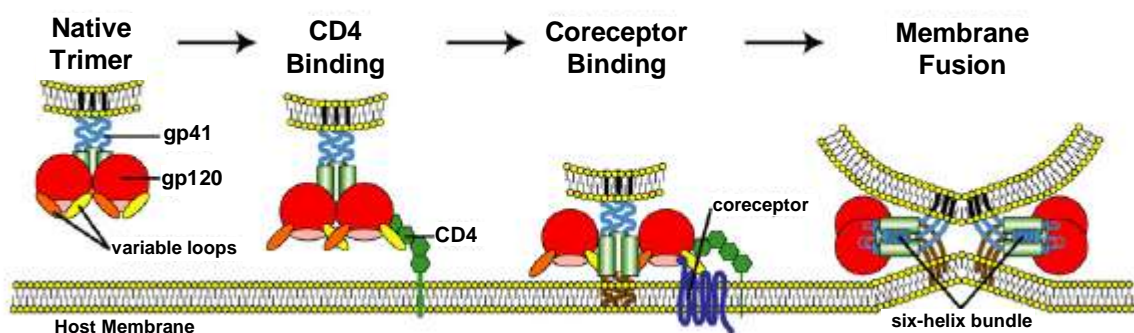
O HIV codifica ainda seis proteínas adicionais, das quais três (Vif, Vpr e Nef) são encontradas na partícula viral. A proteína Vif está associada à infectividade viral e ao controle da produção das partículas virais infecciosas (CLEMENTS e PAYNE, 1994), a Vpr contribui para o transporte do DNA pró-viral para o núcleo da célula infectada e a Nef ajuda a diminuir os níveis celulares de CD4, MHC classe I (ALI et al., 2009) e MHC classe II (FRANKEL e YOUNG, 1998; CHAUDHRY et al., 2009) As proteínas Tat e Rev estão envolvidas com a regulação da expressão gênica (CLEMENTS e PAYNE, 1994; FRANKEL e YOUNG, 1998) e a proteína transmembrana Vpu, diminui a expressão de CD4, MHC classe II e promove a liberação dos novos vírions (HUSSAIN et al, 2008).

## 1.2. Replicação do HIV

A característica mais marcante da infecção por HIV é a depleção seletiva de linfócitos T CD4+, entretanto, este vírus também infecta monócitos, macrófagos, células de Langerhans, entre outras (VAISHNAV e WONG-STAAAL, 1991; PEÇANHA et al, 2002).

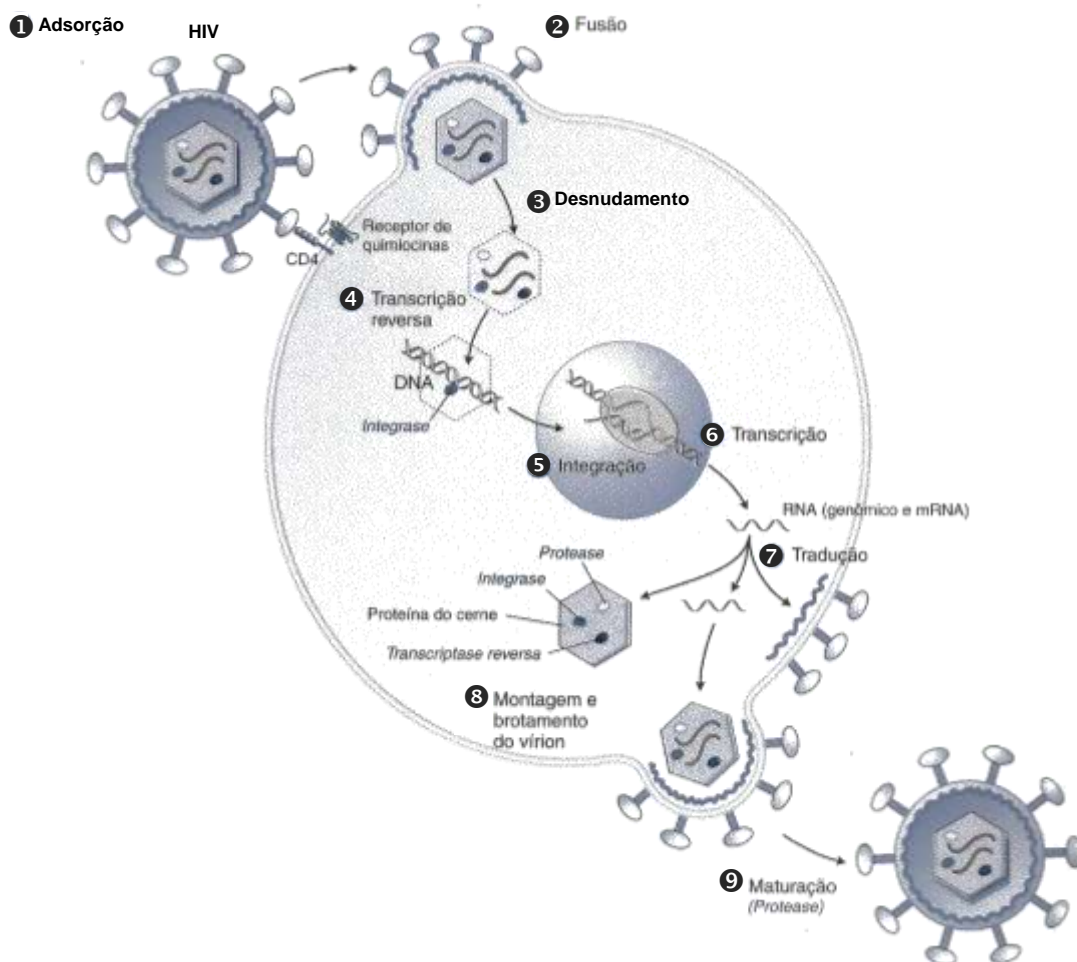
A infecção pelo HIV começa com a etapa de adsorção que compreende a ligação do vírion à superfície da célula alvo (Figura 19). Esta é mediada por uma interação de alta afinidade entre o domínio extracelular da glicoproteína viral gp120 e receptores celulares específicos, sendo o CD4 o principal receptor para HIV-1 e HIV-2. Entretanto, apenas a interação gp120-CD4 não é suficiente para a entrada do HIV na célula. Um grupo de receptores de quimiocinas (pertencentes à família de receptores acoplados à proteína G), CCR5 e CXCR4 têm sido identificados como os principais correceptores *in vivo* para o HIV-1 (SIERRA et al., 2005). Assim, após a ligação da gp120 ao receptor celular CD4, ocorrem alterações conformacionais que facilitam a ligação ao correceptor e subsequente entrada viral (FRANKEL e YANG, 1998; ADAMSON e FREED, 2008). A sequência de aminoácidos de uma região da gp120 determina a ligação preferencial a CCR5, CXCR4 ou a ambos (HUGHES et al., 2008). A entrada do vírus ocorre após fusão do envelope viral com a membrana celular, um processo facilitado pela glicoproteína gp41 (YANG et al., 2001).

A fusão das membranas viral e celular resulta na criação de um poro que conecta o interior do vírion com o citoplasma da célula alvo, facilitando a entrada do capsídeo viral no citoplasma da célula do hospedeiro (YANG et al., 2005; TILTON e DOMS, 2010). Segue-se então a etapa de desnudamento que envolve fatores celulares e as proteínas virais MA, Nef e Vif (SIERRA et al., 2005) e consiste na liberação do conteúdo do capsídeo (RNA genômico e as proteínas MA, TR, IN e Vpr), para o citoplasma (FRANKEL e YANG, 1998).



**Figura 19:** Modelo do processo multi-etapas da entrada do HIV na célula do hospedeiro. Fonte: TILTON e DOMS, 2010.

Uma vez no citoplasma, o genoma viral RNA é retrotranscrito para uma fita dupla de DNA pró-viral, pela TR viral (Figura 20) (SIERRA et al., 2005). Após a transcrição reversa o DNA pró-viral é associado com proteínas virais e celulares em um grande complexo nucleoprotéico de pré-integração (PIC) que é transportado para o núcleo celular através do poro nuclear. Além de importantes fatores celulares, três proteínas do HIV associadas ao PIC (MA, Vpr e IN), desenvolvem papel crucial neste transporte (SUZUKI e CRAIGIE, 2007; CHRIST et al, 2008).



**Figura 20:** Replicação do HIV. Fonte: GOLAN et al., 2008.

A dupla fita de DNA linear do PIC é inserida no cromossomo do hospedeiro pela IN viral (SIERRA et al., 2005, CIUFFI e BUSHMAN, 2006). Depois da integração, ocorrem as primeiras transcrições do DNA pró-viral pela RNA polimerase II celular, produzindo RNAs virais (genômico e mensageiro) (CIUFFI e BUSHMAN, 2006) que são transportados através da membrana do núcleo. No citoplasma, as fitas de RNAm viral são traduzidas produzindo as poliproteínas que darão origem às proteínas virais (SIERRA et al., 2005).

As proteínas Env migram e se inserem na membrana plasmática. As poliproteínas Gag e Gag-Pol também se movem para a membrana celular e começam a montagem do vírion direcionada pela poliproteína Gag. Além disso, enzimas virais, RNA genômico e compostos celulares se associam no nucleocapsídeo imaturo. Mais tarde, este complexo brota através da membrana plasmática produzindo um vírion imaturo (SIERRA et al., 2005).

O brotamento dispara a ativação da PR que autocataliticamente cliva as poliproteínas Gag e Gag-Pol liberando as proteínas estruturais e as enzimas. As proteínas individuais sofrerão futuras interações, de maneira que as proteínas CA e NC formem o nucleocapsídeo cônico e a MA fique associada ao envelope viral (SIERRA et al., 2005). O processamento das proteínas virais pela protease leva à formação das partículas virais maduras e infecciosas (CIUFFI e BUSHMAN, 2006).

### **1.3 Fármacos usados na terapia antirretroviral**

O benefício clínico da terapia antirretroviral é determinado pela magnitude e duração da supressão do RNA do HIV no plasma. O princípio central da terapia consiste em inibir a replicação viral da maneira mais completa e duradoura possível, evitando ao máximo a toxicidade. Isso requer a administração simultânea de múltiplos fármacos. A adesão a esquemas complexos é difícil para muitos pacientes, e a não-adesão ao tratamento constitui uma importante causa de falha terapêutica e morte. Em um estudo de pacientes aos quais foram prescritos inibidores da protease do HIV mais inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa, foi necessária uma adesão ao tratamento de pelo menos 95% para se obter uma resposta ótima (BRUNTON et al., 2006).

O tratamento e a erradicação do HIV são os dois maiores desafios médicos do nosso tempo (DAHL et al., 2010). Entretanto, a terapia antiviral enfrenta três grandes obstáculos: 1) a possível interferência com o metabolismo celular normal, levando a efeitos citotóxicos; 2) a variabilidade genética dos vírus, produzindo mutantes resistentes aos fármacos e 3) a inabilidade dos agentes antivirais para erradicar a infecção viral latente (HURAUX et al., 1990).

Para replicar-se, os vírus incorporam-se aos mecanismos metabólicos da célula hospedeira. Em consequência, existem menos diferenças entre os vírus e seus hospedeiros humanos passíveis de serem explorados no desenvolvimento de fármacos do que aquelas observadas entre bactérias e seres humanos. É também mais difícil desenvolver agentes ativos contra um amplo espectro de vírus do que contra as bactérias. Essa dificuldade advém do fato de que os vírus constituem um grupo heterogêneo de agentes infecciosos, enquanto as bactérias compartilham, em sua maioria, uma estrutura de parede celular comum e mecanismos distintos de transcrição e tradução. Apesar desses obstáculos, todos os vírus codificam proteínas que diferem consideravelmente das proteínas correspondentes humanas. Em princípio, muitas dessas proteínas poderiam atuar como alvos para agentes antivirais. Na prática, entretanto, apenas serviram, até o momento, como alvos úteis para a terapia farmacológica. (GOLAN et al., 2009). No que concerne ao HIV, algumas de suas proteínas já foram purificadas e caracterizadas para facilitar o planejamento de drogas capazes de inibir seletivamente uma enzima-chave, como a transcriptase reversa ou a protease (KATZUNG, 2006).

No caso da AIDS, a descoberta muito rápida de agentes antirretrovirais eficazes foi possível graças a programas de desenvolvimento de fármaco já estabelecidos para outras doenças, incluindo câncer, hipertensão e outras infecções virais. Os laboratórios farmacêuticos já haviam produzido anteriormente numerosos análogos nucleosídicos como agentes antivirais e antineoplásicos potenciais. A capacidade do crescimento do HIV em culturas de células permitiu a triagem desses agentes quanto à sua atividade. Através de um processo intensivo, foram testados milhares de compostos, e os principais compostos promissores foram modificados para potencializar a atividade anti-HIV, minimizar a toxicidade e melhorar a biodisponibilidade (BRUNTON et al., 2006). A seleção de novos agentes antivirais tem como desafio a busca de inibidores específicos das funções virais que sejam eficazes e apresentem um baixo nível de toxicidade.

Teoricamente todas as etapas do ciclo de replicação viral representam alvos para a terapia antirretroviral, Entretanto, atualmente as classes de fármacos usadas para combater o HIV incluem: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN), inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos (ITRNN) e inibidores de protease (IP). Recentemente, foram introduzidos no arsenal terapêutico anti-HIV, um inibidor de integrase (raltegravir) e inibidores da entrada do vírus na célula, como é o caso do inibidor da fusão vírus-célula (enfuvirtida) e do antagonista de CCR5 (maraviroque) (BRASIL, 2008; HUGHES et al., 2008; BRASIL, 2009).

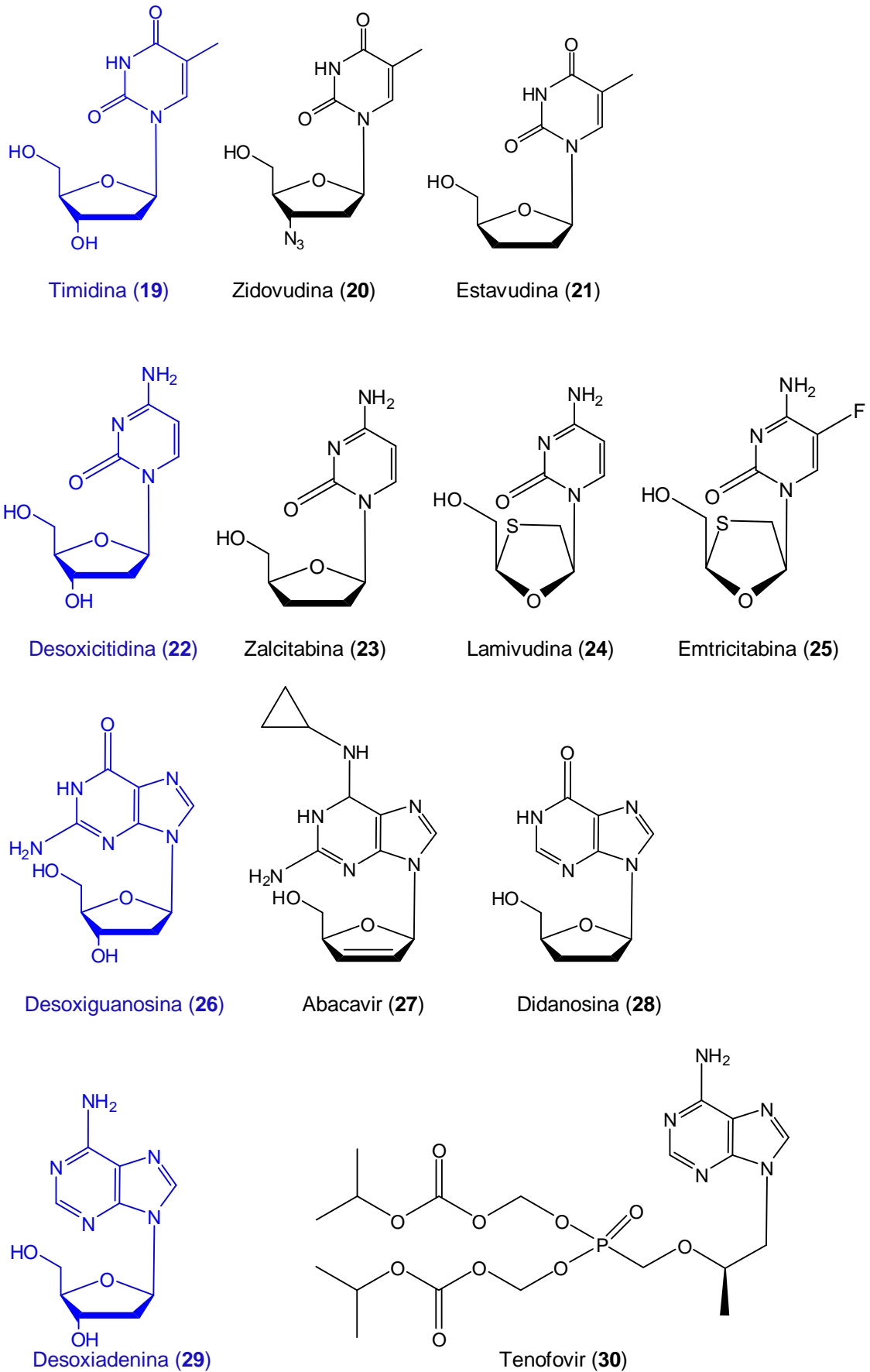
### ***1.3.1 Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo (ITRN)***

Os ITRN são “pró-drogas”, pois após absorção, precisam ser trifosforilados por cinases intracelulares para se tornarem ativos (BRUNTON et al., 2006). Esta dependência da fosforilação celular, em alguns momentos pode prejudicar a ação destes fármacos, pois já foi verificado que em alguns casos de resistência a determinados antirretrovirais o que estava causando a menor eficácia do fármaco era a inadequada fosforilação do mesmo, fazendo com que a substância inativa se acumulasse na célula (TURRIZIANI et al., 2000).

Eles atuam como inibidores competitivos, ou como um substrato alternativo da TR, competindo com os nucleosídeos celulares e diferindo deles apenas por uma modificação na molécula de ribose (Figura 21). Zidovudina (AZT, **20**) e estavudina (d4T, **21**) são análogos da timidina (**19**), zalcitabina (ddC, **23**), lamivudina (3TC, **24**) e emtricitabina (FTC, **25**) são análogos da desoxicidina (**22**), abacavir (ABC, **27**) e didanosina (ddI, **28**) análogos da desoxiguanosina (**26**) e o tenofovir (TDF, **30**) análogo da desoxiadenina (**29**).

Como os ITRN carecem de um grupo 3'-hidroxila, a incorporação ao DNA interrompe o alongamento da cadeia. Como atuam em uma etapa inicial e essencial da replicação do HIV, os agentes dessa classe impedem a infecção aguda das células suscetíveis, mas exercem pouco efeito sobre as células já infectadas pelo HIV (BRUNTON et al., 2006).



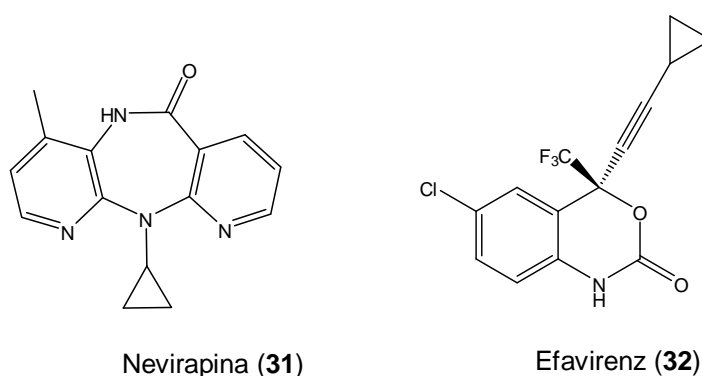


**Figura 21:** Estruturas dos desoxinucleosídeos e dos fármacos ITRN

### 1.3.2 Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Análogos de Nucleosídeo (ITRNN)

Os ITRNN constituem uma classe de compostos sintéticos clinicamente distintos, que bloqueiam a atividade da TR por interação em um sítio diferente do sítio catalítico produzindo uma inibição alostérica da enzima (YANG et al., 2001; PEÇANHA et al., 2002; BRUNTON et al., 2006). Eles se ligam diretamente e não competitivamente à TR (WARNKE et al., 2007). Os ITRNN podem ser considerados um grupo de potentes inibidores da TR, tendo uma considerável diversidade estrutural (Figura 22), mas mostrando certas características comuns em sua ação inibitória (YANG et al., 2001). Esses agentes compartilham não apenas um mecanismo de ação comum, mas também algumas toxicidades e perfis de resistência. Ao contrário dos ITRN, os ITRNN não sofrem fosforilação. Além disso, mostram-se ativos apenas contra o HIV-1, mas não contra o HIV-2. Todos os compostos nessa classe são metabolizados pelo sistema CYP450 e, portanto, estão sujeitos a interações farmacológicas (BRUNTON et al., 2006; HUGHES et al., 2008).

A maior limitação dos ITRNN está no fato de que pequenas mutações no seu sítio de ligação à TR podem produzir altos níveis de resistência, incluindo resistência cruzada entre alguns grupos de ITRNN (HUGHES et al., 2008).

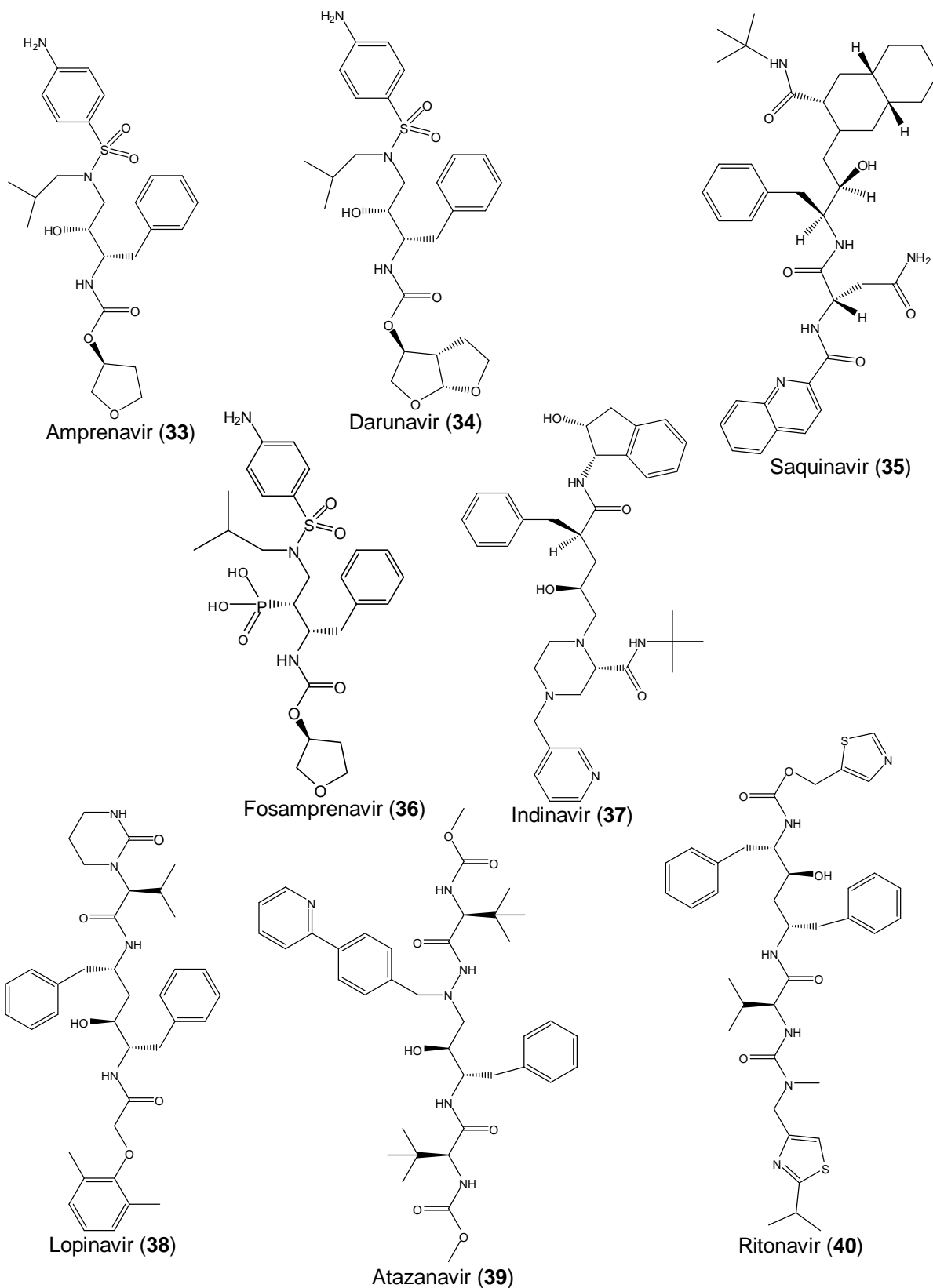


**Figura 22:** Estruturas dos fármacos ITRNN

### 1.3.3 Inibidores da protease

Os inibidores de protease (Figura 23) se assemelham aos substratos da PR do HIV e atuam através de sua ligação reversível com o sítio ativo da PR. Essa ligação

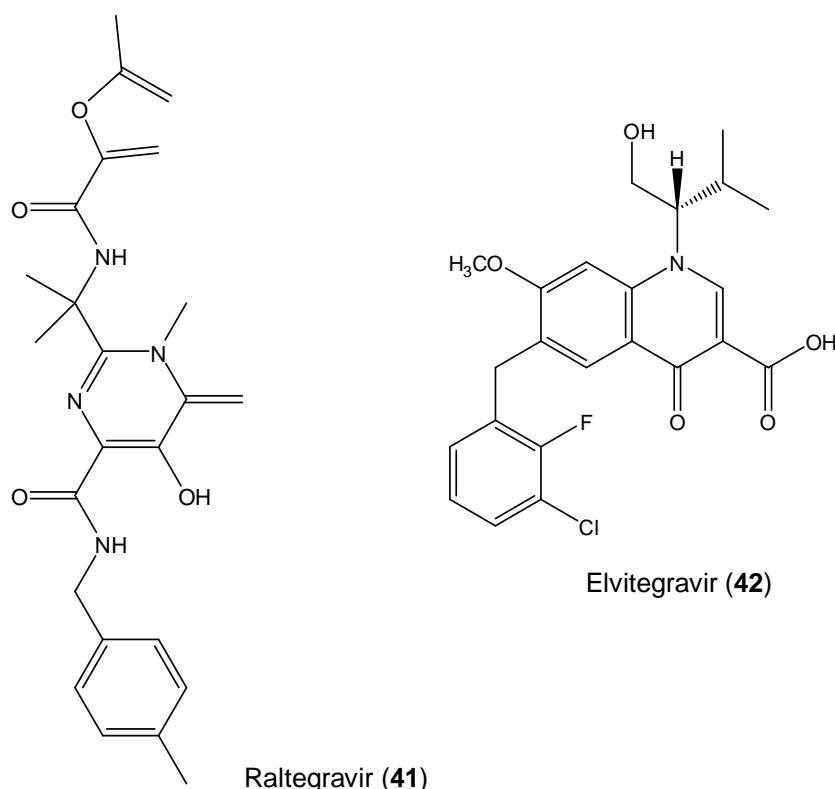
impede a clivagem pela protease dos polipeptídios precursores virais e bloqueia a maturação subsequente dos novos vírus (BRUNTON et al., 2006, HUGHES et al., 2008).



**Figura 23:** Estruturas dos fármacos inibidores de protease

### 1.3.4 Inibidores da Integrase

Desde o descobrimento da enzima integrase como um possível alvo terapêutico, várias substâncias testadas apresentaram atividade inibitória da enzima integrase *in vitro*, porém poucos inibidores passaram para a fase de testes clínicos. O raltegravir (**41**, Figura 24) é atualmente o único fármaco desta classe aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e em uso no Brasil (Tabela 4). Ele inibe a transferência da fita de DNA proviral e previne sua incorporação no DNA da célula hospedeira (ADANSOM e FREED, 2008; HUGHES et al., 2008). Um outro produto inibidor da integrase, o elvitegravir (**42**), já está em fase de testes clínicos (ADANSOM e FREED, 2008).



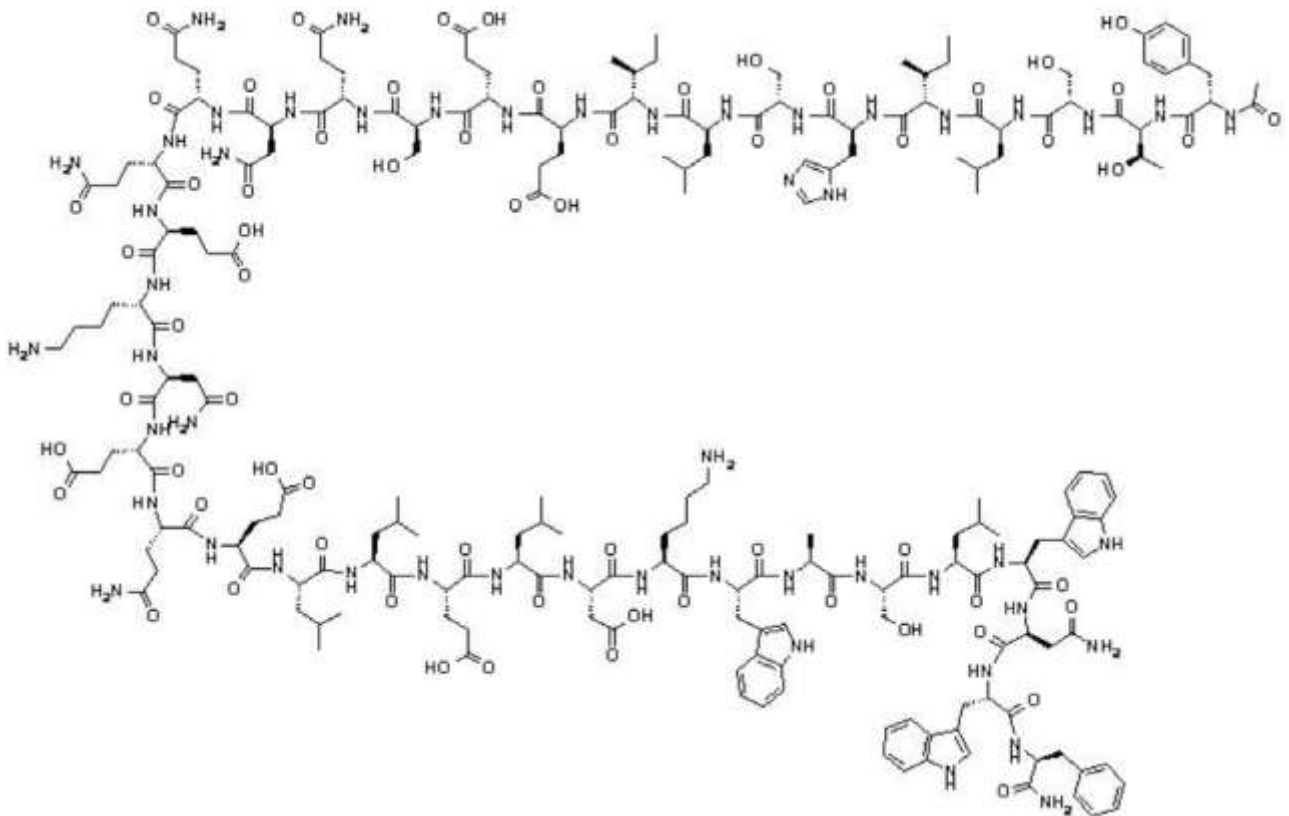
**Figura 24:** Estrutura dos inibidores de integrase raltegravir e do elvitegravir.

### 1.3.5 Inibidores da entrada do vírus na célula

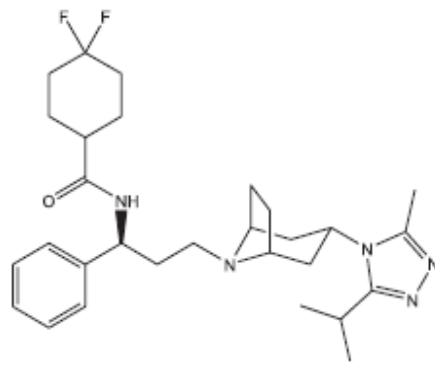
Todos os vírus precisam infectar células para a sua replicação. Por conseguinte, a inibição da etapa inicial de fixação e entrada dos vírus proporciona

uma medida “preventiva” contra a infecção e, assim, pode limitar a disseminação do vírus pelo organismo (GOLAN et al., 2009).

Como a entrada do HIV na célula alvo envolve um mecanismo complexo de multi-etapas, os agentes farmacológicos que interferem neste processo formam um grupo de compostos heterogêneos com mecanismos de ação distintos (TILTON e DOMS, 2010). A enfuvirtida (T-20) (**43**, Figura 25) é um polipeptídeo constituído de 36 aminoácidos que se liga à gp41 inibindo a fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira (CUNICO et al., 2008; HUGHES et al., 2008), enquanto o maraviroque (**44**, Figura 26) se liga ao correceptor celular CCR5 produzindo uma alteração conformacional que impede sua ligação com a gp120 do HIV-1. O uso de inibidores de CCR5 é indicado na infecção inicial com alto conteúdo de CD4. Nos estágios posteriores da doença os vírus utilizam os correceptores CXCR4 (HUGHES et al., 2008).



**Figura 25:** Estrutura da enfuvirtida (**43**). Fonte: CUNICO et al, 2008.



**Figura 26:** Estrutura do maraviroque (44). Fonte: CUNICO et al, 2008.

## 1.4 Terapia Antirretroviral no Brasil

Desde 1996, ano da publicação da Lei 9.313, o Ministério da Saúde vem garantindo o acesso ao tratamento antirretroviral a todas as pessoas que vivem com HIV e que tenham indicação de recebê-lo, conforme as recomendações terapêuticas vigentes no Brasil. Essas recomendações são revistas e atualizadas à medida que novos medicamentos são registrados no país ou que novas evidências demonstrem necessidade de mudanças nas estratégias de terapia antirretroviral. A recente história de ampla utilização da terapia antirretroviral altamente ativa (TARV) em nosso país resultou no reconhecido impacto do programa brasileiro de DST/AIDS: melhora nos indicadores de morbidade, de mortalidade e qualidade de vida dos brasileiros que realizam tratamento para o HIV e AIDS. Por outro lado, contribuiu para o desenvolvimento do perfil crônico-degenerativo assumido pela doença na atualidade. Parte das pessoas que estão em uso de TARV há mais tempo, convivem com efeitos da toxicidade dos medicamentos, como, por exemplo, a lipodistrofia e/ou com variantes virais resistentes ao tratamento.

Atualmente 18 medicamentos estão registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e são utilizados na TARV (Tabela 4). A TARV corrente geralmente inicia com a combinação de três fármacos, sendo dois ITRN associados a um ITRNN ou a um IP. Esta terapia é manejada de acordo com o aparecimento de resistência, toxicidade e co-morbidades (AIDS, 2010).

**Tabela 4:** Relação dos medicamentos antirretrovirais distribuídos no Brasil.

| <b>CLASSE</b>  | <b>MEDICAMENTO</b>   |
|--|--|
| <b>Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo (ITRN)</b>      | Abacavir (ABC, <b>27</b> ) - Importado<br>Didanosina (DDI, <b>28</b> ) - Importado<br>Estavudina (d4T, <b>21</b> ) - Nacional<br>Lamivudina (3TC, <b>24</b> ) - Nacional<br>Zidovudina (AZT, <b>20</b> ) - Nacional<br>Tenofovir (TDF, <b>30</b> ) - Importado<br>Associação AZT +3TC - Nacional   |
| <b>Inibidores da Transcriptase Reversa Não-análogos de nucleosídeo (ITRNN)</b> | Nevirapina (NVP, <b>31</b> ) – Nacional<br>Efavirenz (EFV, <b>32</b> ) - Nacional  |
| <b>Inibidores da Protease (IP)</b>   | Amprenavir (APV, <b>33</b> ) - Importado<br>Darunavir (DRV, <b>34</b> ) – Importado<br>Saquinavir (SQV, <b>35</b> ) - Nacional<br>Fosamprenavir (FPV, <b>36</b> ) - Importado<br>Indinavir (IDV, <b>37</b> )- Nacional<br>Lopinavir/ritonavir (LPV/r) - Importado<br>Atazanavir (ATV, <b>39</b> ) - Importado<br>Ritonavir (RTV, <b>40</b> ) - Importado |
| <b>Inibidores da Integrase</b>   | Raltegravir (RAL, <b>41</b> )- Importado   |
| <b>Inibidores da Fusão</b>   | Enfuvirtida (T-20, <b>43</b> ) - Importado   |

Fonte: AIDS, 2010

## 1.5 Produtos naturais com ação anti-HIV

Existem quatro processos básicos que podem ser utilizados na seleção de plantas a serem testadas numa triagem antiviral: a) escolha randômica de plantas; b) seleção baseada em estudos etnobotânicos e/ou etnofarmacológicos; c) escolha através de dados pré-existentes na literatura e d) abordagem quimiotaxonômica (VLIETINCK et al., 1997).

As plantas se apresentam como uma boa alternativa para a descoberta de novas substâncias, uma vez que estima-se que 25% dos medicamentos comumente utilizados, em diversas enfermidades, contém compostos isolados de plantas (MUKHTAR et al., 2007).

A busca por antivirais vem sendo focalizada em compostos que interfiram em várias partes do ciclo de replicação viral (COS et al, 2004). Desta forma, muitos extratos vegetais têm sido testados em um *screening* antiviral primário em cultivos celulares (AYISI e NYADEDZOR, 2003; MANGANELLI et al, 2005) para verificar uma potencial ação antiviral. Este tipo de teste não é especificamente baseado no mecanismo de ação, mas facilita a identificação de produtos naturais que bloqueiam diferentes etapas do ciclo de replicação dos vírus (YANG et al., 2001).

Os produtos naturais podem ser agrupados de acordo com seus mecanismos inibitórios sobre o HIV. Desta forma, temos extratos vegetais e compostos isolados que atuam na inibição: (1) da penetração do vírus na célula hospedeira (inibição da ligação do vírus à superfície celular e da penetração viral na membrana celular); (2) da transcrição reversa do RNA viral para DNA pró-viral; (3) da integração do DNA pró-viral ao genoma do hospedeiro; (4) do processamento dos polipeptídeos virais pela protease e (5) da montagem do genoma e proteínas virais dentro da partícula viral para a maturação final e liberação das partículas infecciosas virais maduras. Existem também aqueles que ainda não possuem o seu mecanismo de ação completamente elucidado, mas que demonstraram ação antiviral pela inibição dos efeitos citopáticos do HIV.

### **1.5.1 Inibição da entrada do vírus na célula**

A entrada do HIV-1 na célula hospedeira é essencial para que o vírus estabeleça uma infecção produtiva, e desta forma, representa um importante alvo para a prevenção da infecção e subsequente transmissão do HIV-1 (ADAMSON e FREED, 2008). Nesta fase inicial da infecção, as etapas geralmente exploradas para a pesquisa de agentes antivirais são ligação da gp120 do vírus ao receptor CD4 ou aos correceptores celulares (CCR5 e CXCR4) e a penetração viral na membrana celular (DE SOUZA e DE ALMEIDA, 2003; TILTON e DOMS, 2010). A prevenção da fusão do vírus com a membrana da célula hospedeira geralmente se dá pelo

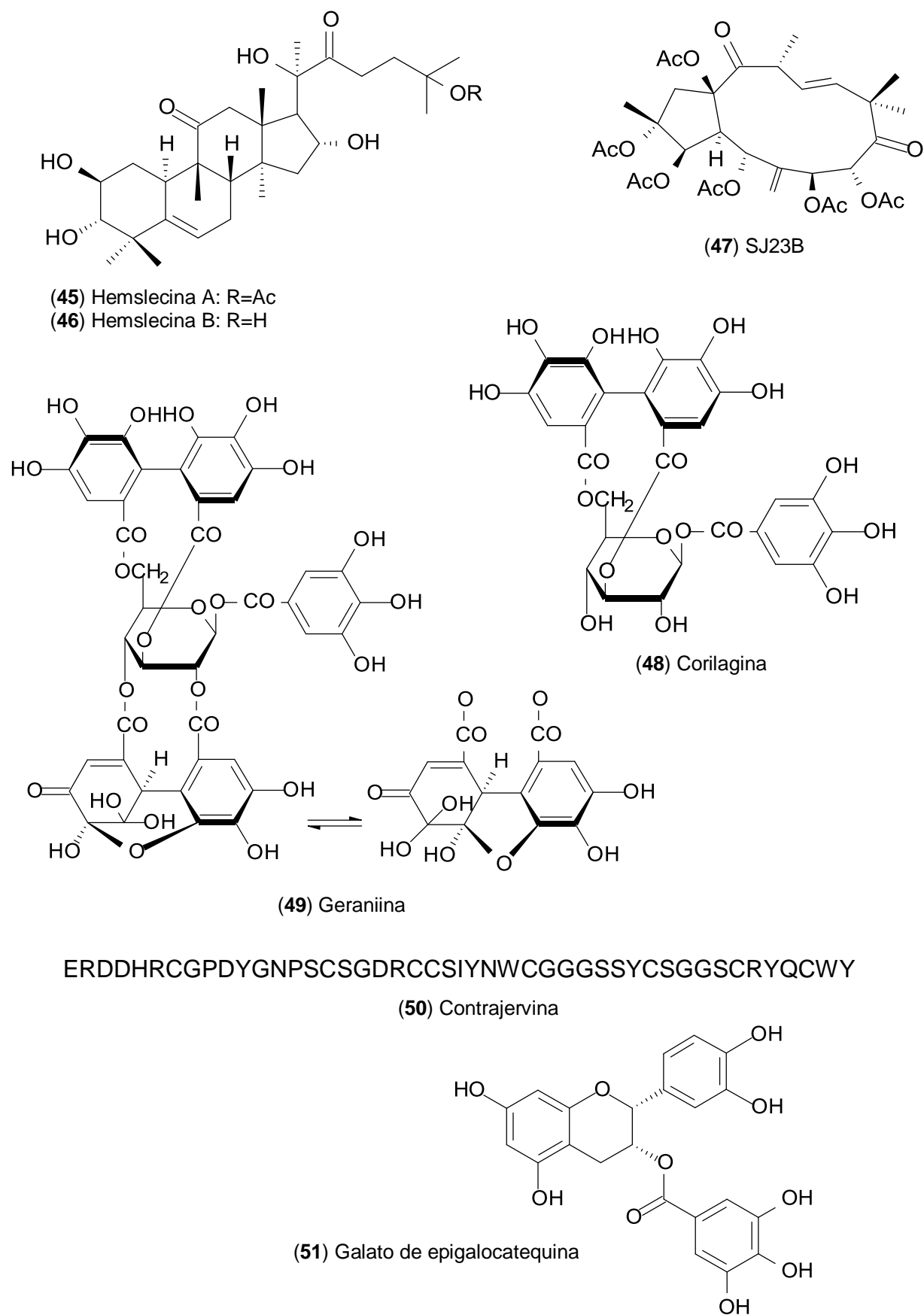


bloqueio da glicoproteína transmembrana viral gp41. O bloqueio da fusão celular, também bloqueia a transmissão célula-célula do vírus HIV (YANG et al., 2001). Outra forma de inibir a penetração do vírus é a internalização dos receptores celulares CD4, CXCR4 e CCR5, como observado com o diterpeno SJ23B (**43**) isolado da *Euphorbia hyberna* (BEDOYA et al., 2009). Várias plantas testadas tem apresentado forte inibição da entrada do HIV na célula (Tabela 5) e algumas possuem substâncias capazes de inibir mais de uma etapa do ciclo viral como é o caso da corilangina (**48**) e da geraniina (**49**) que bloqueiam gp120, TR e IN. O extrato de folhas do *Phyllanthus amarus* apresentou atividade anti-HIV *in vitro* e *in vivo* (NOTKA et al., 2004), o que demonstra o real potencial das plantas medicinais para o combate desta infecção. Na figura 27 podemos observar as estruturas de substâncias com atividade inibitória da entrada do HIV na célula hospedeira.

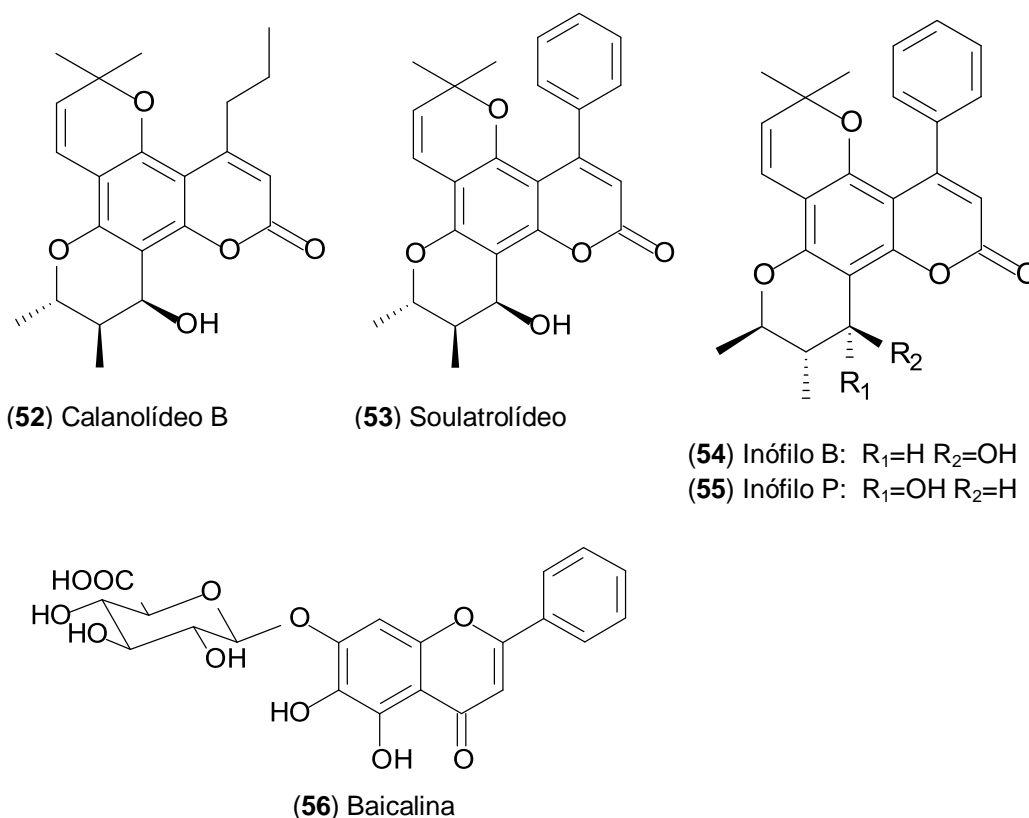
### **1.5.2 Inibição da transcriptase reversa**

A emergência de variantes de HIV resistentes aos ITRN acelerou as pesquisas de outros inibidores efetivos da TR (YANG et al., 2001). Além de vários extratos inibidores da TR, atualmente, dispõe-se de um número de potentes ITRNN isolados de plantas (Tabela 6). Dentre os produtos derivados de plantas podemos destacar os inófilos e calanolídeos que parecem formar uma subclasse de ITRNN ativa contra cepas de HIV-1 com mutação na TR, resistentes à maioria dos outros ITRNN (PATIL et al., 1993). Desta forma, a síntese de derivados de inófilos e calanolídeos pode levar a compostos com alta potência e seletividade.

Além destas substâncias, várias outras isoladas de plantas tem demonstrado ação inibidora da TR do HIV (Tabela 6 e figura 28), como é o caso dos calanolídeos A (**1**) e B (**53**), soulatrolídeo (**54**), geraniina (**49**), corilangina (**48**), inófilo B (**54**) e P (**55**), e baicalina (**56**). Muitas plantas com comprovada ação anti-TR precisam passar por um estudo fitoquímico com vistas à identificação das substâncias envolvidas nesta ação, e para elucidação do mecanismo inibitório.



**Figura 27:** Estruturas de substâncias isoladas de plantas com atividade inibitória da entrada do HIV na célula hospedeira, *in vitro*.



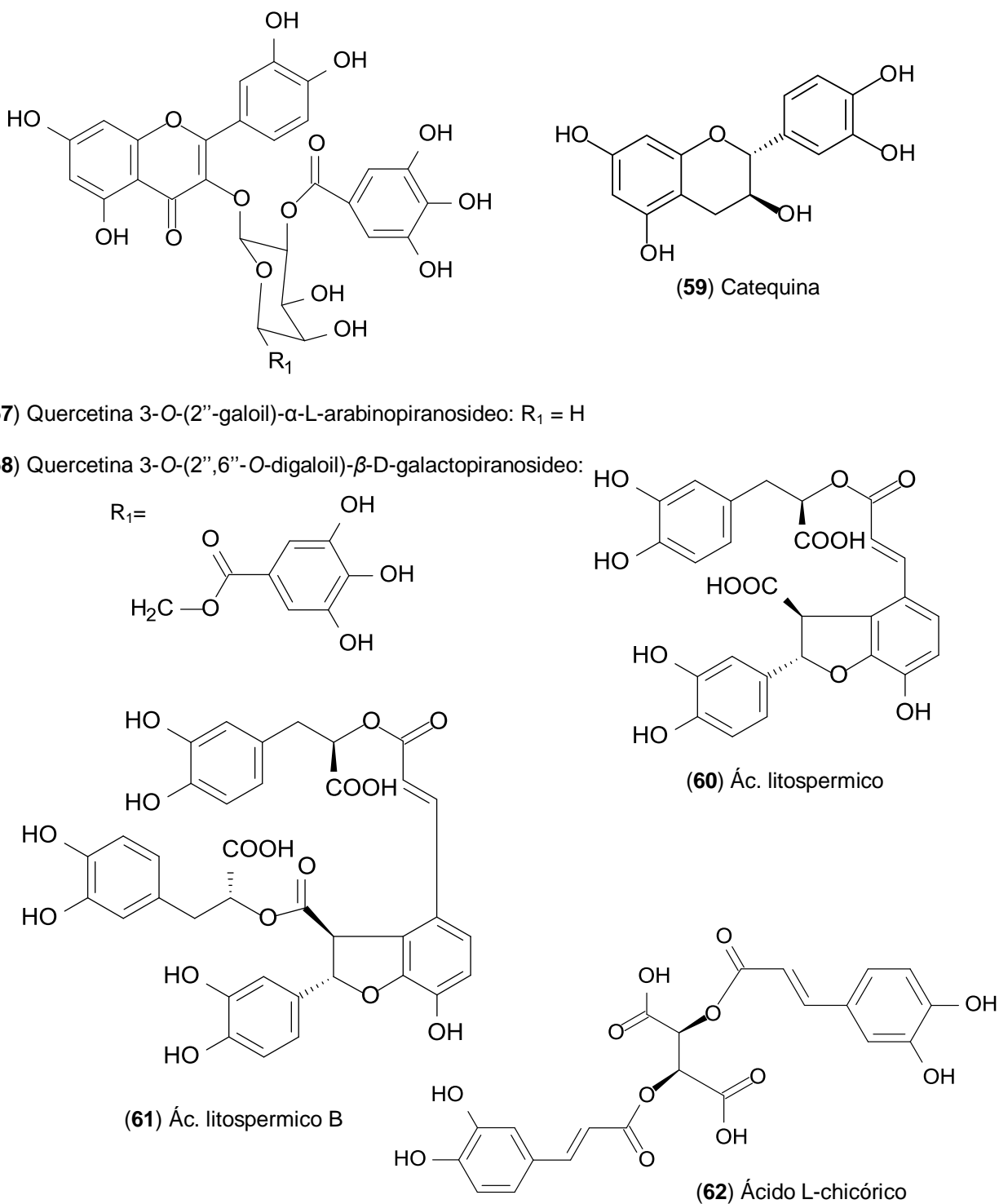
**Figura 28:** Estruturas de substâncias isoladas de plantas com atividade inibitória da TR do HIV *in vitro*.

### 1.5.3 Inibição da integrase

Assim como em outras viroses, o HIV-1 depende de uma integração estável no genoma do hospedeiro para facilitar a replicação do RNA viral e a manutenção do estado infectado (YANG et al., 2001). Mutantes de HIV integrase negativos não produzem partículas virais infecciosas, o que demonstra que a inibição da IN contribui para a inibição da replicação viral. Além disso, não tem sido descrito um homólogo celular da integrase viral (COS et al, 2004).

Compostos de origem natural podem ser muito úteis como protótipos para novos inibidores (DE MELO et al, 2006). Reinke e colaboradores (2004) demonstraram que o ácido *L*-chicórico (L-CA) (62) é um inibidor não-competitivo reversível da IN, *in vitro*, e da integração do HIV *in vivo*. Esta substância é encontrada em plantas como a *Echinacea purpúrea* (GRAY et al, 2001). Além desta, outras plantas são fontes de substâncias inibidoras da IN, algumas das quais agem

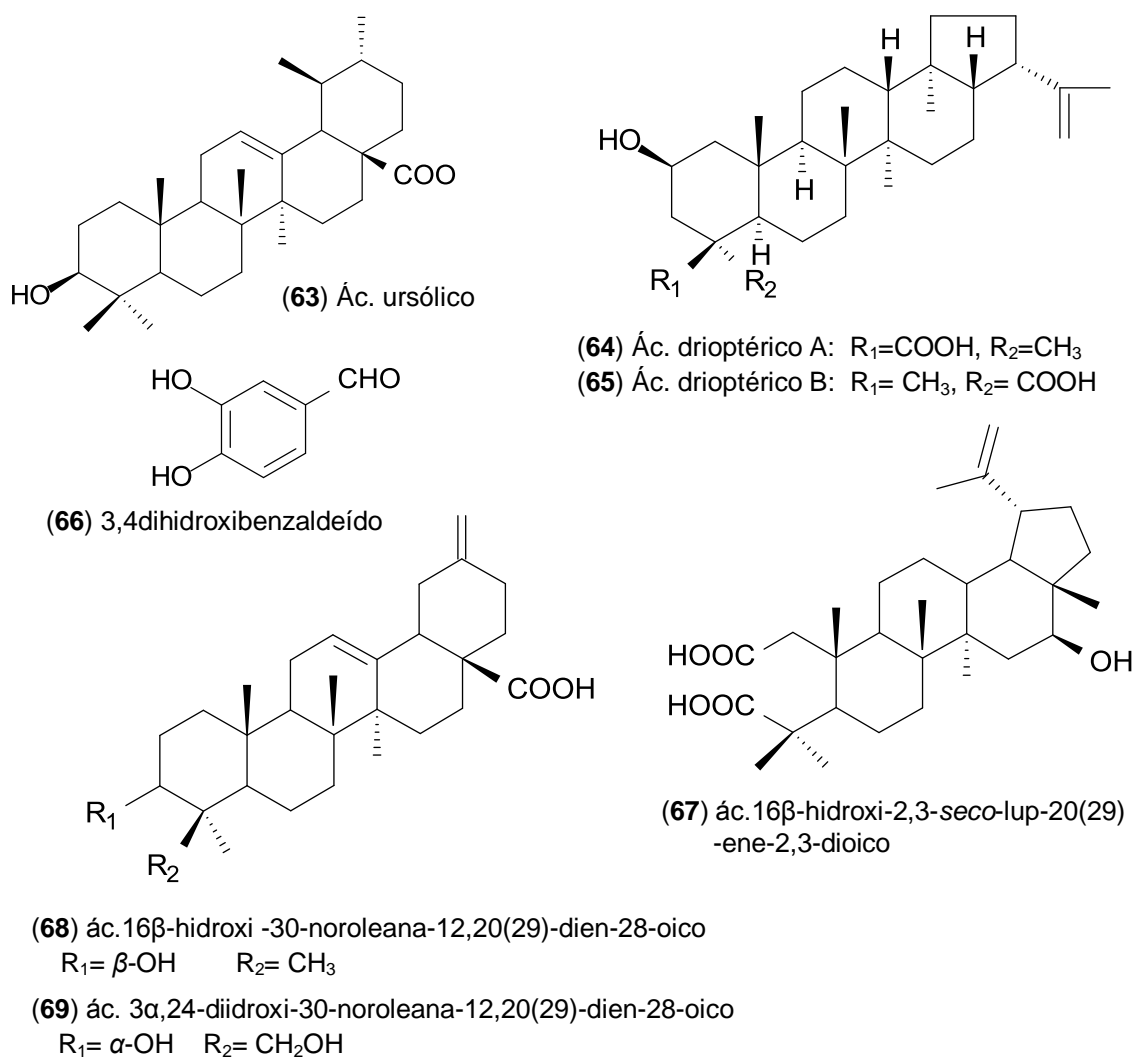
em concentrações micromolares (BESSONG et al., 2005; WANG et al., 2007) (Tabela 7 e figura 29).



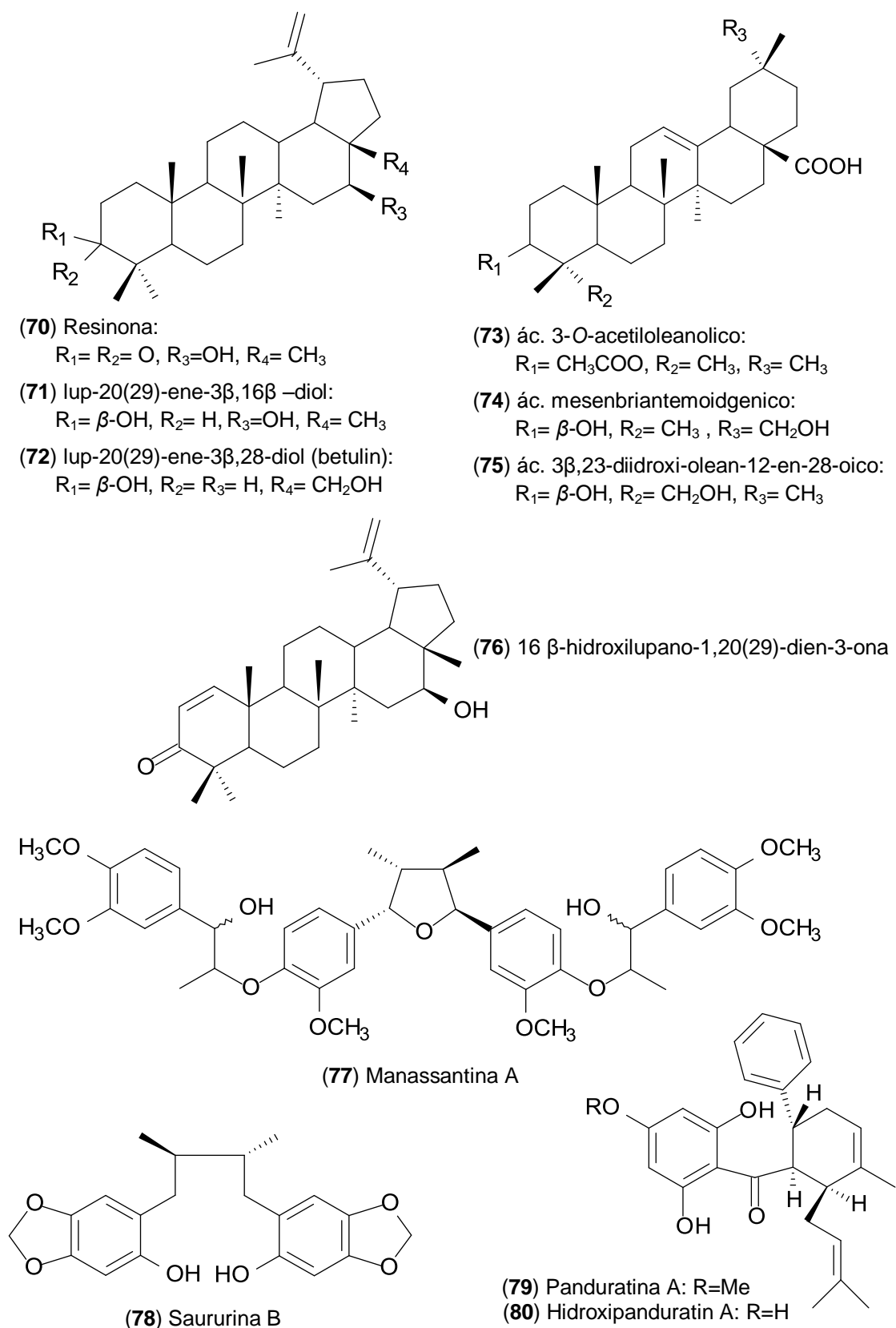
**Figura 29:** Estruturas de substâncias isoladas de plantas com atividade inibitória da IN do HIV *in vitro*.

### 1.5.4 Inibição da protease

A PR do HIV desempenha um papel crítico na produção de partículas virais funcionalmente infecciosas, sendo assim, um alvo terapêutico apropriado para as pesquisas de inibidores do HIV. Neste aspecto, inibidores da PR do HIV são efetivos inibidores da replicação viral e podem ser aplicados nos estágios finais do ciclo de replicação do HIV (YANG et al., 2001). Muitas plantas foram testadas quanto à atividade inibitória da PR do HIV como podemos observar na tabela 8, mas os detalhes do mecanismo de inibição desta enzima, pelos diferentes extratos e substâncias isoladas (Figuras 30 e 31), ainda requerem estudos para a completa elucidação.



**Figura 30:** Estruturas das substâncias 63 a 69 isoladas de plantas com atividade inibitória da PR do HIV *in vitro*.



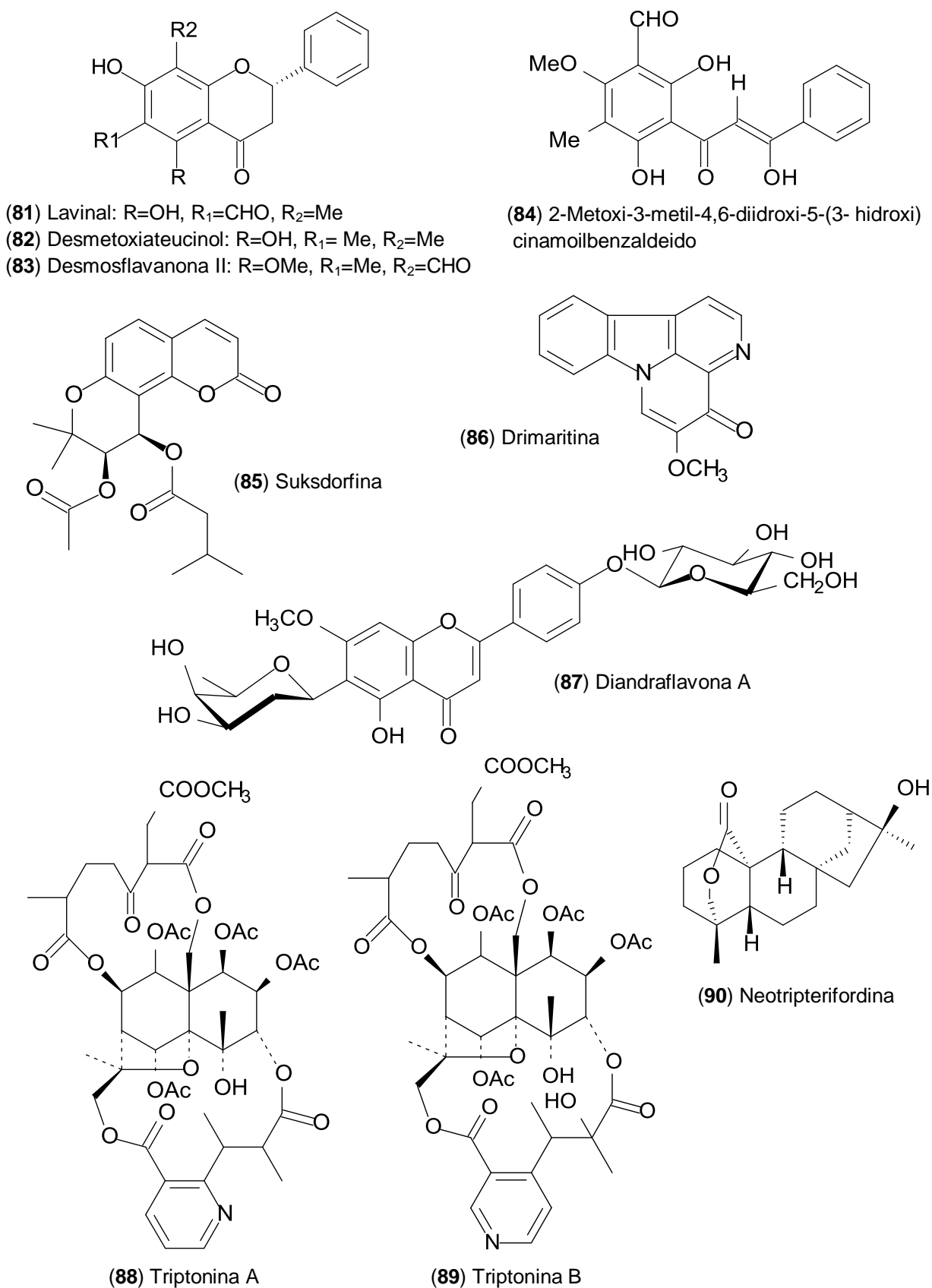
**Figura 31:** Estruturas das substâncias 70 a 80 isoladas de plantas com atividade inibitória da PR do HIV *in vitro*.

### **1.5.5 Outras atividades anti-HIV de produtos naturais**

Várias plantas foram identificadas como possuidoras de potente atividade anti-HIV baseada em testes celulares, mas algumas não possuem o mecanismo de ação estabelecido (OKANO et al., 1996; MATSUSE et al., 1999; PU et al., 2008). Em geral, a avaliação da inibição da replicação do HIV se dá pela pesquisa de efeitos citopáticos, quantificação da p24 e da TR. Bedoya e colaboradores (2001) demonstraram a atividade anti-HIV, *in vitro*, dos extratos aquosos de *Tuberaria lignosa* e *Sanguisorba minor magnolii* utilizando ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT). Estes extratos mostraram efeito inibitório contra a indução de infecção de células MT-2 pelo HIV-1 em concentrações variando de 12,5 a 50 µg/ml e 50 µg/ml, respectivamente.

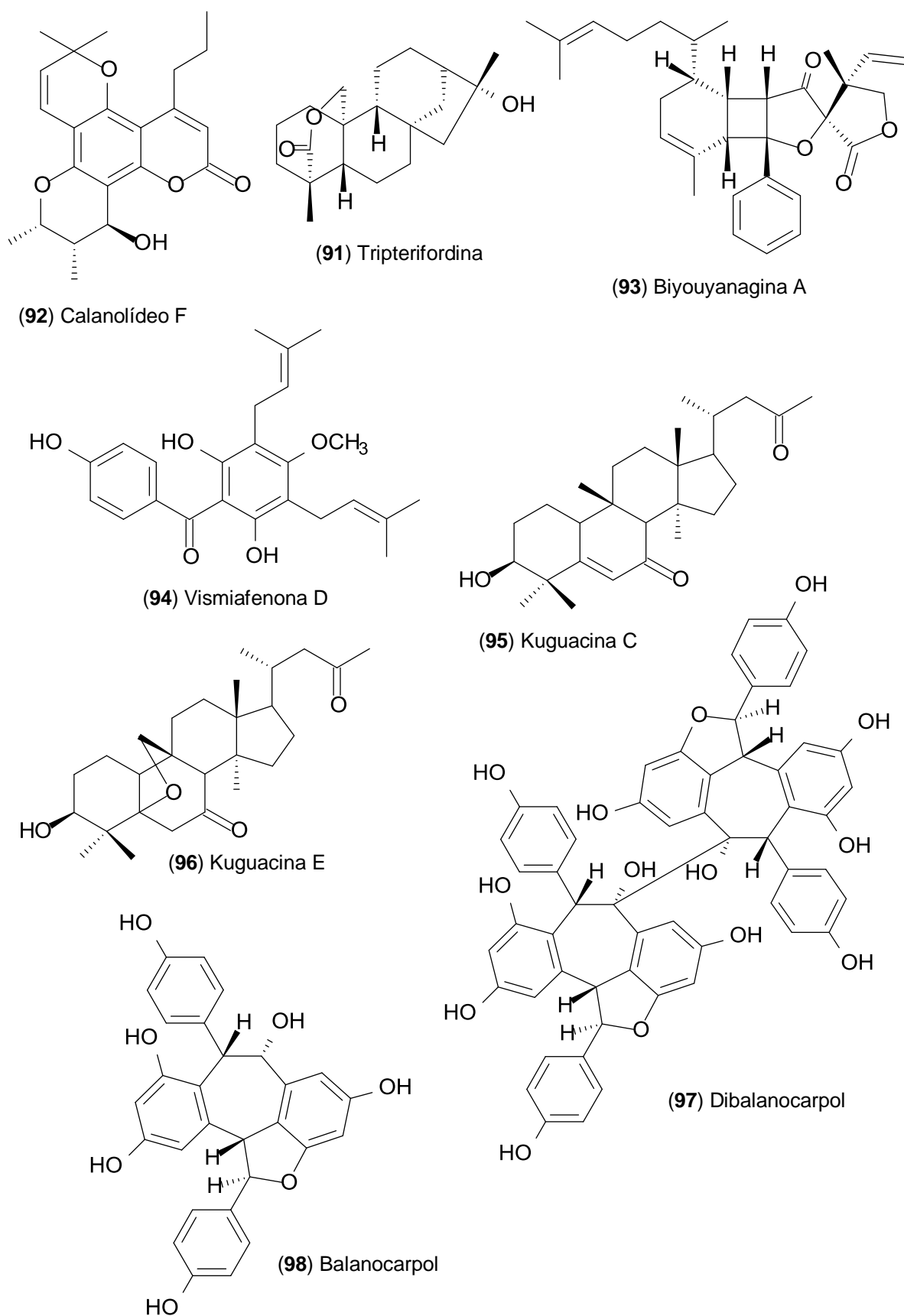
Além da ação típica sobre as principais enzimas do HIV, muitos produtos naturais possuem ação em outras etapas do ciclo viral. Porém, independente do mecanismo de ação pode-se observar como resultado final a inibição da replicação viral (Tabela 9).

Recentes avanços na definição dos mecanismos de ação de inúmeros produtos naturais derivados de plantas têm ressaltado o potencial destes no desenvolvimento de terapias antivirais (AIKEN e CHEN, 2005). Vários produtos naturais estão sendo testados visando uma alternativa na terapia contra o HIV, alguns dos quais já apresentaram comprovada eficácia clínica, atuando inclusive contra cepas resistentes aos antirretrovirais tradicionais. Contudo, faz-se necessário ampliar o leque de alternativas terapêuticas, buscando sempre novos princípios ativos eficientes na terapia antirretroviral, dada a grande mutagenicidade destes vírus. Além disso, como vimos, as plantas são uma grande fonte de substâncias para desenvolvimento de novos medicamentos, devendo sempre ser investigadas.

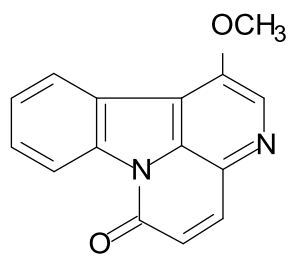


**Figura 32:** Estruturas das substâncias 81 a 90 isoladas de plantas que apresentam atividade inibitória da replicação do HIV em cultivo celular.

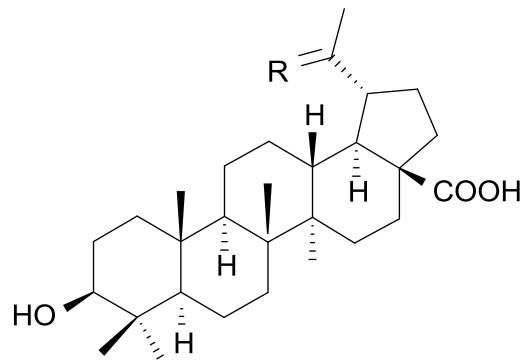




**Figura 33:** Estruturas das substâncias 91 a 98 isoladas de plantas que apresentam atividade inibitória da replicação do HIV em cultivo celular.

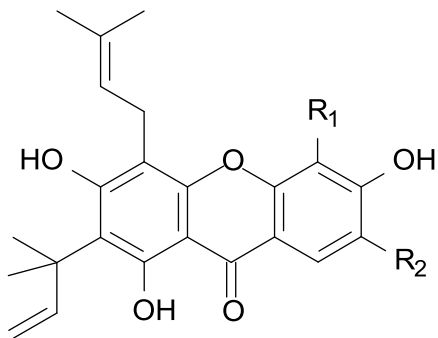


(99) 1-metoxicantinona



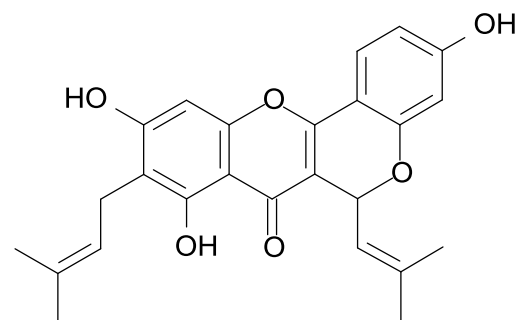
(100) Ác. betulíno: R=CH<sub>2</sub>

(101) Ác. platanico: R=O



(102) Macluraxantona B: R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= OH

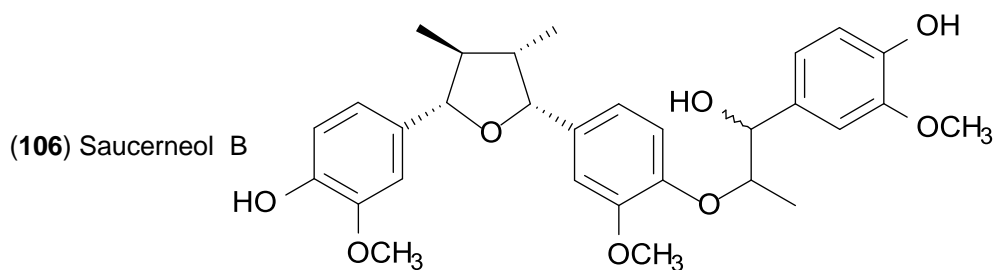
(103) Macluraxantona C: R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub>= H



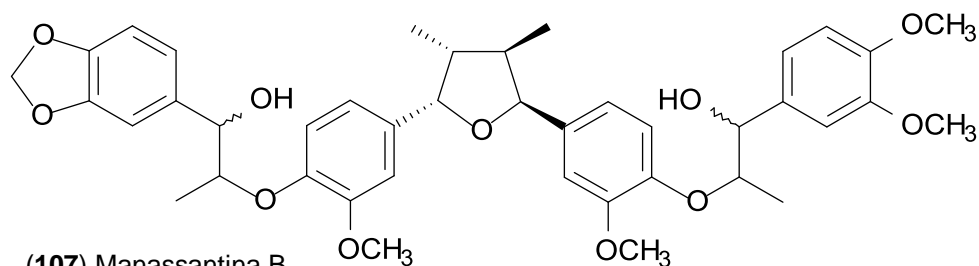
(104) Isociclomulberrina



(105) Palicoureira

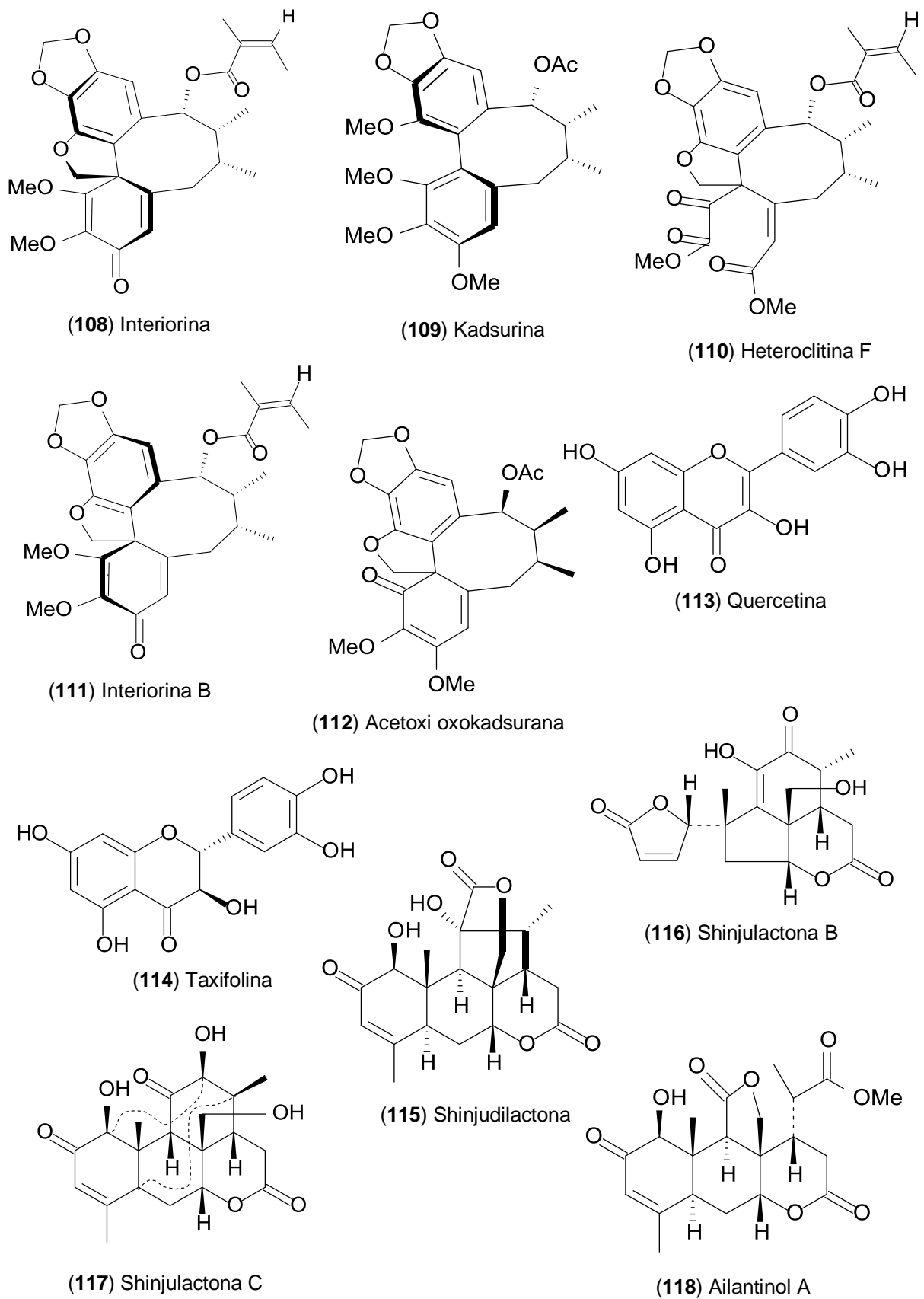


(106) Saucerneol B

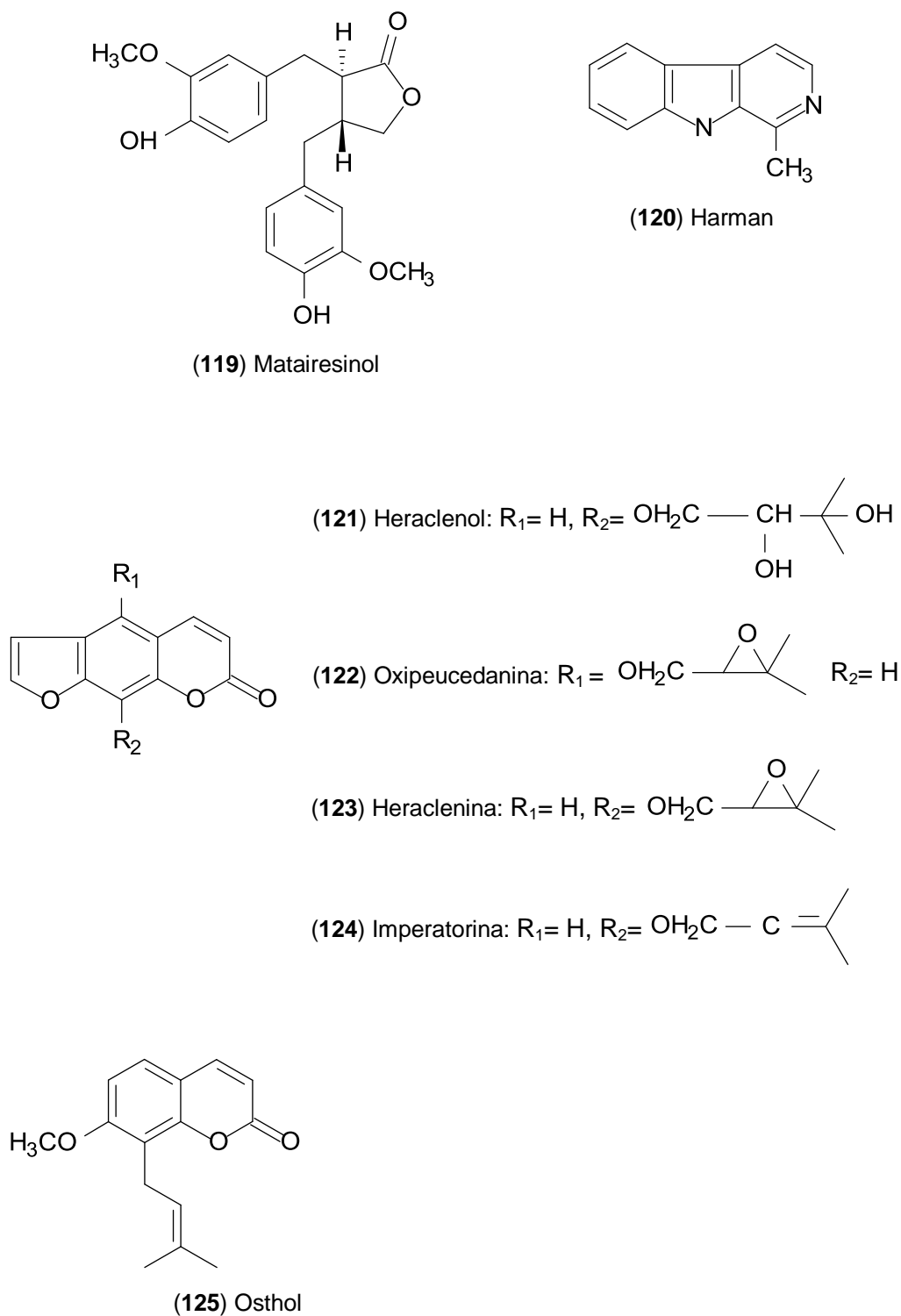


(107) Manassantina B

**Figura 34:** Estruturas das substâncias 99 a 107 isoladas de plantas que apresentam atividade inibitória da replicação do HIV em cultivo celular.



**Figura 35:** Estruturas das substâncias 108 a 118 isoladas de plantas que apresentam atividade inibitória da replicação do HIV em cultivo celular.



**Figura 36:** Estruturas das substâncias 119 a 125 isoladas de plantas que apresentam atividade inibitória da replicação do HIV em cultivo celular.

**Tabela 5:** Plantas e seus constituintes isolados que apresentam atividade inibitória da entrada do HIV na célula.

| Planta testada<br>Família / Espécie   | Parte utilizada                 | Substância isolada  | % de inibição        | Concentração (µg/ml)                                | Referências   |
|---|---------------------------------|---|----------------------|---|---|
| <b>Cistaceae</b><br><i>Tuberaria lignosa</i>  | Toda a planta                   | Fração rica em elagitaninos   | 50                   | 2,33  | BEDOYA et al., 2010   |
| <b>Compositae</b><br><i>Atractylodes japonica</i> <sup>b</sup>  | Raiz                            | -   | 72,8                 | 100   | MIN et al., 2001  |
| <b>Curcubitaceae</b><br><i>Hemsleya jinfushanensis</i><br><i>Hemsleya jinfushanensis</i>  | Tubérculos<br>Tubérculos        | Hemslecina A, <b>45</b> (Triterpenóide)<br>Hemslecina B, <b>46</b> (Triterpenóide)                            | 50<br>50             | 1,76<br>11,95                                       | TIAN et al., 2008<br>TIAN et al., 2008  |
| <b>Euphorbiaceae</b><br><i>Euphorbia hyberna</i> <sup>b</sup><br><i>Phyllanthus amarus</i> <sup>a</sup><br><i>Phyllanthus amarus</i> <sup>a</sup><br><i>Phyllanthus amarus</i> <sup>a</sup> | -<br>Folhas<br>Folhas<br>Folhas | SJ23B, <b>47</b> (Diterpeno)<br>-<br>Corilagina, <b>48</b> (Galotanino)<br>Geraniina, <b>49</b> (Elagitanino) | 50<br>50<br>50<br>50 | 0,076*<br>2,65 ± 0,44<br>0,50 ± 0,27<br>0,48 ± 0,05 | BEDOYA et al., 2009<br>NOTKA et al., 2004<br>NOTKA et al., 2004<br>NOTKA et al., 2004 |
| <b>Moraceae</b><br><i>Dorstenia contrajerva</i> <sup>a,b</sup>  | Folhas                          | Contrajervina, <b>50</b> (Peptídeo)   | 50                   | 0,20*   | BOKESCH et al., 2004  |
| <b>Simaroubaceae</b><br><i>Ailanthus altissima</i> <sup>b</sup>   | Casca do caule                  | -   | 74,9                 | 100   | CHANG et al., 2003  |
| <b>Theaceae</b><br><i>Camellia sinensis</i> <sup>a</sup>  | Folhas                          | Galato de epigalocatequina, <b>51</b> (Catequina)   | 50                   | 4,5*  | NANCE et al., 2009  |

<sup>a</sup> Inibem a ligação CD4-gp120, *in vitro*.

<sup>b</sup> inibem a fusão vírus-célula

\*Concentração em µM

**Tabela 6:** Plantas e seus constituintes isolados que apresentam atividade inibitória da TR do HIV *in vitro*.

| Planta testada<br>Família / Espécie   | Parte utilizada  | Substância isolada | % de inibição <sup>a</sup>       | Concentração (µg/ml)     | Referências  |
|---|--|--------------------|----------------------------------|--------------------------|--|
| <b>Anacardiaceae</b><br><i>Rhus chinensis</i>   | Caule  | -                  | 11,4                             | 100                      | WANG et al., 2006  |
| <b>Acanthaceae</b><br><i>Acanthus ebracteatus</i><br><i>Andrographis paniculata</i><br><i>Justicia gendarussa</i><br><i>Justicia valida</i> | Parte aérea<br>Toda a planta<br>Parte aérea<br>Parte aérea | -<br>-<br>-<br>-   | 57,21<br>87,67<br>90,75<br>68,64 | 200<br>200<br>200<br>200 | WORADULAYAPINIJ et al., 2005<br>WORADULAYAPINIJ et al., 2005<br>WORADULAYAPINIJ et al., 2005<br>WORADULAYAPINIJ et al., 2005 |
| <b>Annonaceae</b><br><i>Xylopi frutescens</i>   | Casca e folhas   | -                  | 50                               | 22                       | MATSUSE et al., 1999   |
| <b>Asphodelaceae</b><br><i>Bulbine alooides</i> (L.) Willd.<br><i>Bulbine alooides</i> (L.) Willd.  | Raiz<br>Raiz   | -<br>-             | ±50<br>±50                       | 200<br>200               | KLOS et al., 2009<br>KLOS et al., 2009   |
| <b>Boraginaceae</b><br><i>Cordia spinescens</i><br><i>Lobostemon trigonus</i>   | Folhas<br>Folhas   | -<br>-             | 50<br>50                         | 6<br>49                  | MATSUSE et al., 1999<br>HARNETT et al., 2005   |

|                                    |                 |   |          |             |                              |
|------------------------------------|-----------------|---|----------|-------------|------------------------------|
| <b>Cannaceae</b>                   |                 |   |          |             |                              |
| <i>Canna indica</i> L.             | Rizoma          | -   | 92,97    | 200         | WORADULAYAPINIJ et al., 2005 |
| <i>Canna indica</i> L.             | Rizoma          | Proteína Cip31                              | 50       | 17,41       | WORADULAYAPINIJ et al., 2005 |
| <i>Canna indica</i> L.             | Rizoma          | Proteína Cip14                              | 50       | 19,25       | WORADULAYAPINIJ et al., 2005 |
| <b>Capparaceae</b>                 |                 |   |          |             |                              |
| <i>Capparis spinosa</i>            | Semente         | Proteína                                    | 50       | 0,23*       | LAM et al., 2009             |
| <b>Celastraceae</b>                |                 |   |          |             |                              |
| <i>Elaeodendron transvaalensis</i> | Raiz            | -   | 50       | 80          | BESSONG et al., 2005         |
| <i>Elaeodendron transvaalensis</i> | Raiz            | -   | 50       | 131         | BESSONG et al., 2005         |
| <b>Clusiaceae</b>                  |                 |   |          |             |                              |
| <i>Calophyllum brasiliense</i>     | Folhas          | Calanolídeo A, <b>1</b> (Dipiranocumarina)  | 81,5±0.9 | 1.000*      | HUERTA-REYES et al., 2004    |
| <i>Calophyllum brasiliense</i>     | Folhas          | Calanolídeo B, <b>52</b> (Dipiranocumarina) | 76,2±2,2 | 1.000*      | HUERTA-REYES et al., 2004    |
| <i>Calophyllum brasiliense</i>     | Folhas          | Soulatrolídeo, <b>53</b> (Dipiranocumarina) | 77,7±1,6 | 1.000*      | HUERTA-REYES et al., 2004    |
| <i>Calophyllum inophyllum</i>      | Folhas e galhos | Inófilo B, <b>54</b> (Dipiranocumarina)     | 50       | 0,038*      | PATIL et al., 1993           |
| <i>Calophyllum inophyllum</i>      | Folhas e galhos | Inófilo P, <b>55</b> (Dipiranocumarina)     | 50       | 0,130*      | PATIL et al., 1993           |
| <b>Combretaceae</b>                |                 |   |          |             |                              |
| <i>Combretum hartmannianum</i>     | Folhas          | -   | 99,7     | 66          | ALI et al., 2002             |
| <i>Combretum molle</i>             | Raiz            | -   | 50       | 37,5        | BESSONG et al., 2005         |
| <i>Combretum molle</i>             | Raiz            | -   | 50       | 9,5         | BESSONG et al., 2005         |
| <i>Terminalia sericea</i>          | Raiz            | -   | 50       | 43          | TSHIKALANGE et al., 2008     |
| <b>Compositae</b>                  |                 |   |          |             |                              |
| <i>Baccharis trinervis</i>         | Partes aéreas   | -   | 50       | 50          | MATSUSE et al., 1999         |
| <i>Calea jamaicensis</i>           | Ramos           | -   | 50       | 15          | MATSUSE et al., 1999         |
| <i>Gynura pseudochina</i>          | Folhas          | -   | 58,05    | 200         | WORADULAYAPINIJ et al., 2005 |
| <b>Convolvulaceae</b>              |                 |   |          |             |                              |
| <i>Argyrea nervosa</i>             | Parte aérea     | -   | 84,00    | 200         | WORADULAYAPINIJ et al., 2005 |
| <i>Ipomoea aquatica</i>            | Toda a planta   | -   | 55,49    | 200         | WORADULAYAPINIJ et al., 2005 |
| <i>Ipomoea cairica</i>             | Toda a planta   | -   | 51,58    | 200         | WORADULAYAPINIJ et al., 2005 |
| <i>Ipomoea cárnea</i>              | Parte aérea     | -   | 98,95    | 200         | WORADULAYAPINIJ et al., 2005 |
| <b>Cornaceae</b>                   |                 |   |          |             |                              |
| <i>Cornus kousa</i>                | Caule e folhas  | -   | 50       | 6,3         | MIN et al., 2001             |
| <b>Euphorbiaceae</b>               |                 |   |          |             |                              |
| <i>Alchornea cordifolia</i>        | Fruto           | -   | 90       | 0,04        | AYISI e NYADEDZOR, 2003      |
| <i>Bridelia micrantha</i> Baill    | Raiz            | -   | 50       | 18,5        | BESSONG et al., 2005         |
| <i>Bridelia micrantha</i> Baill    | Raiz            | -   | 50       | 10,5        | BESSONG et al., 2005         |
| <i>Chamaesyce hyssopifolia</i>     | Toda a planta   | -   | 50       | 8           | MATSUSE et al., 1999         |
| <i>Jatropha curcas</i> L.          | Folhas          | -   | 50       | 50          | MATSUSE et al., 1999         |
| <i>Mallotus japonicus</i>          | Caule           | -   | 50       | 11,9        | MIN et al., 2001             |
| <i>Phyllanthus amarus</i>          | Folhas          | -   | 50       | 8,17 ± 1,73 | NOTKA et al., 2004           |
| <i>Phyllanthus amarus</i>          | Folhas          | Corilagina, <b>48</b> (Galotanino)          | 50       | 6,24 ± 2,11 | NOTKA et al., 2004           |
| <i>Phyllanthus amarus</i>          | Folhas          | Geraniina, <b>49</b> (Elagitanino)          | 50       | 2,53 ± 1,40 | NOTKA et al., 2004           |
| <i>Ricinus communis</i> L.         | Folhas          | -   | 50       | 42,5        | BESSONG et al., 2005         |
| <b>Fabaceae</b>                    |                 |   |          |             |                              |
| <i>Glycine max</i>                 | Sementes        | Proteína                                    | 50       | 0,71        | FANG et al., 2009            |
| <i>Mucuna coriacea</i> Baker       | Raiz            | -   | 50       | 10,5        | BESSONG et al., 2005         |

|                                     |                       |                                   |       |       |                              |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|-------|-------|------------------------------|
| <i>Peltophorum africanum</i>        | Raiz                  | -                                 | 50    | 38,3  | BESSONG et al., 2005         |
| <i>Peltophorum africanum</i>        | Raiz                  | -                                 | 50    | 8     | BESSONG et al., 2005         |
| <i>Peltophorum africanum</i>        | Casca do caule        | -                                 | 50    | 3,5   | BESSONG et al., 2005         |
| <i>Peltophorum africanum</i>        | Raiz e casca do caule | Galotanino                        | 50    | 6*    | BESSONG et al., 2005         |
| <b>Flacourtiaceae</b>               |                       |                                   |       |       |                              |
| <i>Lindackeria laurina</i>          | Folhas                | -                                 | 50    | 19    | MATSUSE et al., 1999         |
| <b>Hypoxidaceae</b>                 |                       |                                   |       |       |                              |
| <i>Hypoxis sobolifera</i>           | Semente               | -                                 | ±84   | 200   | KLOS et al., 2009            |
| <i>Hypoxis sobolifera</i>           | Semente               | -                                 | ±55   | 200   | KLOS et al., 2009            |
| <b>Labiatae</b>                     |                       |                                   |       |       |                              |
| <i>Hyptis lantanifolia</i>          | Partes aéreas         | -                                 | 50    | 7     | MATSUSE et al., 1999         |
| <i>Vitex glabrata</i>               | Ramos                 | -                                 | 98,64 | 200   | WORADULAYAPINIJ et al., 2005 |
| <i>Vitex negundo</i>                | Partes aéreas         | -                                 | 96,70 | 200   | WORADULAYAPINIJ et al., 2005 |
| <i>Vitex rotundifolia</i>           | Partes aéreas         | -                                 | 55,44 | 200   | WORADULAYAPINIJ et al., 2005 |
| <i>Vitex trifolia</i>               | Partes aéreas         | -                                 | 98,06 | 200   | WORADULAYAPINIJ et al., 2005 |
| <b>Lamiaceae</b>                    |                       |                                   |       |       |                              |
| <i>Leonotis leonurus</i> (L.) R.Br. | Folhas                | -                                 | ±60   | 200   | KLOS et al., 2009            |
| <i>Ocimum gratissimum</i>           | Folhas                | -                                 | 90    | 0,114 | AYISI e NYADEDZOR, 2003      |
| <i>Scutellariae radix</i>           | -                     | Baicalina, <b>56</b> (Flavonóide) | 50    | 2     | KITAMURA et al., 1998        |
| <b>Malpighiaceae</b>                |                       |                                   |       |       |                              |
| <i>Tetrapteris macrocarpa</i>       | Partes aéreas         | -                                 | 50    | 8     | MATSUSE et al., 1999         |
| <b>Malvaceae</b>                    |                       |                                   |       |       |                              |
| <i>Pavonia schiedeana</i>           | Partes aéreas         | -                                 | 50    | 16    | MATSUSE et al., 1999         |
| <b>Moraceae</b>                     |                       |                                   |       |       |                              |
| <i>Ficus polita</i>                 | Folhas                | -                                 | 90    | 0,1   | AYISI e NYADEDZOR, 2003      |
| <b>Plumbaginaceae</b>               |                       |                                   |       |       |                              |
| <i>Limonium tetragonum</i>          | Raiz                  | -                                 | 50    | 7,5   | MIN et al., 2001             |
| <b>Rosaceae</b>                     |                       |                                   |       |       |                              |
| <i>Agrimonia pilosa</i>             | Toda a planta         | -                                 | 50    | 8,9   | MIN et al., 2001             |
| <b>Rhamnaceae</b>                   |                       |                                   |       |       |                              |
| <i>Ziziphus mucronata</i> Willd     | Folhas                | -                                 | 50    | 77,5  | BESSONG et al., 2005         |
| <i>Ziziphus mucronata</i> Willd     | Folhas                | -                                 | 50    | 81,5  | BESSONG et al., 2005         |
| <b>Rutaceae</b>                     |                       |                                   |       |       |                              |
| <i>Clausena excavata</i>            | Partes aéreas         | -                                 | 89,15 | 200   | WORADULAYAPINIJ et al., 2005 |
| <i>Murraya koenigii</i>             | Partes aéreas         | -                                 | 82,47 | 200   | WORADULAYAPINIJ et al., 2005 |
| <b>Verbenaceae</b>                  |                       |                                   |       |       |                              |
| <i>Aegiphila anômala</i>            | Folhas                | -                                 | 50    | 24    | MATSUSE et al., 1999         |
| <i>Stachytarpheta jamaicensis</i>   | Toda a planta         | -                                 | 69,28 | 200   | WORADULAYAPINIJ et al., 2005 |

\*Concentração em µM

**Tabela 7:** Plantas e seus constituintes isolados que apresentam atividade inibitória da IN do HIV *in vitro*.

| Planta testada<br>Família / Espécie                | Parte utilizada       | Substância isolada   | % de inibição | Concentração (µg/ml) | Referências            |
|--|-----------------------|--|---------------|----------------------|------------------------|
| <b>Aceraceae</b><br><i>Acer okamotoanum</i> Nakai  | Folhas                | Quercetina-3-O-(2''-galoil)-α-L-arabinopiranosídeo, <b>57</b> (Flavonóide glicosilado)         | 50            | 18,1 ± 1,3           | KIM et al., 1998       |
| <i>Acer okamotoanum</i> Nakai                      | Folhas                | Quercetina-3-O-(2'',6''-O-digaloil)-β-D-galactopiranosídeo, <b>58</b> (Flavonóide glicosilado) | 50            | 24,2 ± 6,6           | KIM et al., 1998       |
| <b>Dioscoreaceae</b><br><i>Dioscorea birmanica</i> | Rizoma                | -  | 50            | 4,5±0,8              | TEWTRAKUL et al., 2006 |
| <i>Dioscorea birmanica</i>                         | Rizoma                | -  | 50            | 4,7±0,4              | TEWTRAKUL et al., 2006 |
| <b>Euphorbiaceae</b><br><i>Phyllanthus amarus</i>  | Folhas                | -  | 50            | 0,48 ± 0,11          | NOTKA et al., 2004     |
| <i>Phyllanthus amarus</i>                          | Folhas                | Corilagina, <b>48</b> (Galotanino)   | 50            | 0,21 ± 0,05          | NOTKA et al., 2004     |
| <i>Phyllanthus amarus</i>                          | Folhas                | Geraniina, <b>49</b> (Elagitanino)   | 50            | 0,16 ± 0,07          | NOTKA et al., 2004     |
| <b>Fabaceae</b><br><i>Peltophorum africanum</i>    | Raiz e casca do caule | Galotanino   | 100           | 100 *                | BESSONG et al., 2005   |
| <i>Peltophorum africanum</i>                       | Raiz e casca do caule | Catequina, <b>59</b> (Flavonóide)  | 65            | 100 *                | BESSONG et al., 2005   |
| <b>Lamiaceae</b><br><i>Salvia miltiorrhiza</i>     | Rizoma                | Ác. litospermico, <b>60</b> (derivado do ac. caféico)  | 50            | 0,83*                | WANG et al., 2007      |
| <i>Salvia miltiorrhiza</i>                         | Rizoma                | Ác. litospermico B, <b>61</b> (derivado do ac. caféico)  | 50            | 0,48*                | WANG et al., 2007      |
| <b>Smilacaceae</b><br><i>Smilax corbularia</i>     | Rizoma                | -  | 50            | 5,4±0,5              | TEWTRAKUL et al., 2006 |
| <i>Smilax corbularia</i>                           | Rizoma                | -  | 50            | 1,9±0,2              | TEWTRAKUL et al., 2006 |
| <i>Smilax glabra</i>                               | Rizoma                | -  | 50            | 8,5±0,8              | TEWTRAKUL et al., 2006 |
| <i>Smilax glabra</i>                               | Rizoma                | -  | 50            | 6,7±0,4              | TEWTRAKUL et al., 2006 |

\*Concentração em µM

**Tabela 8:** Plantas e seus constituintes isolados que apresentam atividade inibitória da PR do HIV, *in vitro*.

| Planta testada<br>Família / Espécie                   | Parte utilizada | Substância isolada                        | % de inibição | Concentração (µg/ml) | Referências          |
|---|-----------------|---|---------------|----------------------|----------------------|
| <b>Annonaceae</b><br><i>Xylopiya frutescens</i>       | Casca           | -   | 50            | 46                   | MATSUSE et al., 1999 |
| <b>Araliaceae</b><br><i>Radix notoginseng</i>         | Raiz            | -   | 78,3 ± 7      | 200                  | LAM et al., 2000     |
| <b>Aspiadaceae</b><br><i>Dryopteris crassirhizoma</i> | Rizoma          | Ácido ursólico, <b>63</b> (Triterpeno)    | 50            | 8,9*                 | LEE et al., 2008     |
| <i>Dryopteris crassirhizoma</i>                       | Rizoma          | Ác. driopterico A, <b>64</b> (Triterpeno) | 50            | 26,5*                | LEE et al., 2008     |
| <i>Dryopteris crassirhizoma</i>                       | Rizoma          | Ác. driopterico B, <b>65</b> (Triterpeno) | 50            | 44,5*                | LEE et al., 2008     |
| <i>Dryopteris crassirhizoma</i>                       | Rizoma          | 3,4 dihidroxibenzaldeído, <b>66</b>       | 50            | 27,5*                | LEE et al., 2008     |
| <b>Asteraceae</b><br><i>Senecio scandens</i>          | Toda a planta   | -   | 83,2 ± 3,5    | 200                  | LAM et al., 2000     |
| <i>Senecio scandens</i>                               | Toda a planta   | -   | 81,6 ± 3,4    | 200                  | LAM et al., 2000     |
| <i>Chrysanthemum moriflorium</i>                      | Capítulo        | -   | 84,6 ± 2,4    | 200                  | LAM et al., 2000     |



|                                   |               |   |            |              |                        |
|-----------------------------------|---------------|---|------------|--------------|------------------------|
| <i>Chrysanthemum morifolium</i>   | Capítulo      | -   | 60,6 ± 4,1 | 200          | LAM et al., 2000       |
| <b>Blechnaceae</b>                |               |   |            |              |                        |
| <i>Woodwardia unigemmata</i>      | Rizoma        | -   | 91,9 ± 6,5 | 200          | LAM et al., 2000       |
| <b>Boraginaceae</b>               |               |   |            |              |                        |
| <i>Cordia spinescens</i>          | Folhas        | -   | 50         | 100          | MATSUSE et al., 1999   |
| <i>Lithospermum erythrorhizon</i> | Semente       | -   | 57,6 ± 1,9 | 200          | LAM et al., 2000       |
| <b>Dioscoreaceae</b>              |               |   |            |              |                        |
| <i>Dioscorea birmanica</i>        | Rizoma        | -   | 50         | 95,0±2,5     | TEWTRAKUL et al., 2006 |
| <i>Dioscorea membranacea</i>      | Rizoma        | -   | 50         | 48,0±1,6     | TEWTRAKUL et al., 2006 |
| <b>Erythroxylaceae</b>            |               |   |            |              |                        |
| <i>Erythroxylum citrifolium</i>   | Tronco        | -   | 50         | 43           | MATSUSE et al., 1999   |
| <b>Euphorbiaceae</b>              |               |   |            |              |                        |
| <i>Phyllanthus amarus</i>         | Folhas        | -   | 50         | 21,80 ± 3,66 | NOTKA et al., 2004     |
| <i>Phyllanthus amarus</i>         | Folhas        | Geraniina, <b>49</b> (Elagitanino)  | 50         | 6,28 ± 2,51  | NOTKA et al., 2004     |
| <b>Fabaceae</b>                   |               |   |            |              |                        |
| <i>Spatholobus suberectus</i>     | Rizoma        | -   | 97,2 ± 3,2 | 200          | LAM et al., 2000       |
| <b>Flacourtiaceae</b>             |               |   |            |              |                        |
| <i>Lindackeria laurina</i>        | Folhas        | -   | 50         | 54           | MATSUSE et al., 1999   |
| <b>Lamiaceae</b>                  |               |   |            |              |                        |
| <i>Prunella vulgaris</i>          | Toda a planta | -   | 93,5 ± 3,2 | 200          | LAM et al., 2000       |
| <i>Scutellaria baicalensis</i>    | Raiz          | -   | 91,1 ± 0,5 | 200          | LAM et al., 2000       |
| <i>Scutellaria baicalensis</i>    | Raiz          | -   | 60,6 ± 1,2 | 200          | LAM et al., 2000       |
| <b>Lardizabalaceae</b>            |               |   |            |              |                        |
| <i>Stauntonia obovatifoliola</i>  | Caule         | ác. 16β-hidroxi-2,3-seco-lup-20(29)-ene-2,3-dioico, <b>67</b> (Triterpenóide)     | 50         | 8,70         | WEI et al., 2008       |
| <i>Stauntonia obovatifoliola</i>  | Caule         | ác. 16β-hidroxi -30-noroleana-12,20(29)-dien-28-oico, <b>68</b> (Triterpenóide)   | 50         | 35,0         | WEI et al., 2008       |
| <i>Stauntonia obovatifoliola</i>  | Caule         | ác. 3α,24-diidroxi-30-noroleana-12,20(29)-dien-28-oico, <b>69</b> (Triterpenóide) | 50         | 40,8         | WEI et al., 2008       |
| <i>Stauntonia obovatifoliola</i>  | Caule         | Resinona, <b>70</b> (Triterpenóide)   | 50         | 29,4         | WEI et al., 2008       |
| <i>Stauntonia obovatifoliola</i>  | Caule         | lup-20(29)-ene-3β,16β -diol, <b>71</b> (Triterpenóide)                            | 50         | 33,0         | WEI et al., 2008       |
| <i>Stauntonia obovatifoliola</i>  | Caule         | lup-20(29)-ene-3β,28-diol, <b>72</b> (betulin) (Triterpenóide)                    | 50         | 53,0         | WEI et al., 2008       |
| <i>Stauntonia obovatifoliola</i>  | Caule         | ác. 3-O-acetiloleanolico, <b>73</b> (Triterpenóide)                               | 50         | 30,0         | WEI et al., 2008       |
| <i>Stauntonia obovatifoliola</i>  | Caule         | ác. mesenbriantemoidgenico, <b>74</b> (Triterpenóide)                             | 50         | 28,0         | WEI et al., 2008       |
| <i>Stauntonia obovatifoliola</i>  | Caule         | ác. 3β,23-diidroxi-olean-12-en-28-oico, <b>75</b> (Triterpenóide)                 | 50         | 36,0         | WEI et al., 2008       |
| <i>Stauntonia obovatifoliola</i>  | Caule         | 16 β-hidroxilupano-1,20(29)-dien-3-one, <b>76</b> (Triterpenóide)                 | 50         | 25,0         | WEI et al., 2008       |
| <b>Lauraceae</b>                  |               |   |            |              |                        |
| <i>Lindera strychnifolia</i>      | Raiz          | -   | 84,1 ± 0,4 | 200          | LAM et al., 2000       |
| <b>Oleaceae</b>                   |               |   |            |              |                        |
| <i>Ligustrum lucidum</i>          | Fruto         | -   | 84,4 ± 7,4 | 200          | LAM et al., 2000       |
| <b>Paeoniaceae</b>                |               |   |            |              |                        |
| <i>Paeonica suffruticosa</i>      | Raiz          | -   | 91,2 ± 1   | 200          | LAM et al., 2000       |
| <b>Ranunculaceae</b>              |               |   |            |              |                        |
| <i>Coptis chinensis</i>           | Rizoma        | -   | 74,6 ± 9,9 | 200          | LAM et al., 2000       |

|  |                    |  |            |                         |  |
|--|--------------------|--|------------|-------------------------|--|
| <b>Rubiaceae</b><br><i>Oldenlandia diffusa</i>   | Toda a planta      | -  | 80,8 ± 1,8 | 200                     | LAM et al., 2000                                     |
| <b>Sapindaceae</b><br><i>Serjania mexicana</i>   | Toda a planta      | -  | 50         | 87                      | MATSUSE et al., 1999                                 |
| <b>Saururaceae</b><br><i>Saururus chinensis</i> Bail<br><i>Saururus chinensis</i> Bail | Rizoma<br>Rizoma   | Manassantina A, <b>77</b> (Lignoide)<br>Saururina B, <b>78</b> (Lignoide)          | 50<br>50   | 38,9*<br>5,60*          | LEE et al., 2010<br>LEE et al., 2010                 |
| <b>Sterculiaceae</b><br><i>Waltheria indica</i> L                                      | Ramos              | -  | 50         | 48                      | MATSUSE et al., 1999                                 |
| <b>Verbenaceae</b><br><i>Aegiphila anômala</i>   | Folhas             | -  | 50         | 87                      | MATSUSE et al., 1999                                 |
| <b>Zingiberaceae</b><br><i>Boesenbergia pandurata</i><br><i>Boesenbergia pandurata</i> | Rizomas<br>Rizomas | Panduratina A, <b>79</b> (Chalcona)<br>Hidroxi-panduratina A, <b>80</b> (Chalcona) | 50<br>50   | 18,7 ± 0,8<br>5,6 ± 0,7 | CHEENPRACHA et al., 2006<br>CHEENPRACHA et al., 2006 |

\*Concentração em µM

**Tabela 9:** Plantas e seus constituintes isolados que apresentam atividade inibitória da replicação do HIV em cultivo celular.

| Planta testada<br>Família / Espécie   | Parte utilizada         | Substância isolada   | % de inibição <sup>a</sup> | Concentração (µg/mL)          | Referências  |
|---|-------------------------|--|----------------------------|-------------------------------|--|
| <b>Amaryllidaceae</b><br><i>Galanthus nivalis</i><br><i>Hippeastrum hybrid</i>                            | Bulbo<br>Bulbo          | Lectina GNA (Proteína)<br>Lectina HHA (Proteína)   | 50<br>50                   | 0,33 ± 0,15<br>0,30 ± 0,1     | BALZARINI et al., 2004<br>BALZARINI et al., 2004                         |
| <b>Anacardiaceae</b><br><i>Rhus chinensis</i><br><i>Rhus chinensis</i><br><i>Rhus chinensis</i>           | Caule<br>Caule<br>Caule | -<br>-<br>-  | 50<br>50<br>50             | 0,7<br>26,9<br>17,4           | WANG et al., 2006<br>WANG et al., 2006<br>WANG et al., 2006              |
| <b>Annonaceae</b><br><i>Desmos</i> spp.<br><i>Desmos</i> spp.<br><i>Desmos</i> spp.<br><i>Desmos</i> spp. | -<br>-<br>-<br>-        | Lavinal, <b>81</b> (Flavanona)<br>Desmetoxiateucinol, <b>82</b> (Flavanona)<br>Desmosflavanona II, <b>83</b> (Flavanona)<br>2-Metoxi-3-metil-4,6-dihidroxi-5-(30-hidroxi)<br>cinamoilbenzaldeído, <b>84</b> (Chalcona) | 50<br>50<br>50<br>50       | 2,30<br>4,97<br>11,0<br>0,022 | WU et al., 2003<br>WU et al., 2003<br>WU et al., 2003<br>WU et al., 2003 |
| <b>Apiaceae</b><br><i>Lomatium suksdorfii</i>   | Fruto                   | Suksdorfina, <b>85</b> (Piranocumarina)  | 50                         | 2,6 ± 2,1*                    | LEE et al., 1994   |
| <b>Asteraceae</b><br><i>Aspilia pluriseta</i><br><i>Tithonia diversifolia</i>                             | Folhas<br>Folhas        | -<br>-   | 50<br>50                   | 16,13<br>0,04                 | COS et al., 2002<br>COS et al., 2002                                     |
| <b>Boraginaceae</b><br><i>Cordia spinescens</i>   | Folhas                  | -  | 50                         | 15,5                          | MATSUSE et al., 1999   |
| <b>Cactaceae</b><br><i>Pereskia bleo</i>  | Toda a planta           | -  | 50                         | 100                           | MATSUSE et al., 1999   |
| <b>Caryophyllaceae</b><br><i>Drymaria diandra</i>   | Toda a planta           | Drimaritina, <b>86</b> (Alcalóide)   | 50                         | 0,699                         | HSIEH et al., 2004   |

|                                   |                 |   |                 |                    |                          |
|-----------------------------------|-----------------|---|-----------------|--------------------|--------------------------|
| <i>Drymaria diandra</i>           | Toda a planta   | Diandraflavona A, <b>87</b> (Flavona)             | 50              | 10                 | HSIEH et al., 2004       |
| <b>Celastraceae</b>               |                 |   |                 |                    |                          |
| <i>Elaeodendron transvaalense</i> | Raiz            | -   | 50              | 0,01 **            | TSHIKALANGE et al., 2008 |
| <i>Tripterygium hypoglaucum</i>   | Casca da Raiz   | Triptonina A, <b>88</b> (Sesquiterpeno)           | 50              | 2,54               | DUAN et al., 2000        |
| <i>Tripterygium hypoglaucum</i>   | Casca da Raiz   | Triptonina B, <b>89</b> (Sesquiterpeno)           | 50              | 0,10               | DUAN et al., 2000        |
| <i>Tripterygium wilfordii</i>     | -               | Neotripterifordina, <b>90</b> (Diterpeno)         | 50              | 0,025*             | YU et al., 2007          |
| <i>Tripterygium wilfordii</i>     | -               | Tripterifordina, <b>91</b> (Diterpeno)            | 50              | 3*                 | YU et al., 2007          |
| <b>Clusiaceae</b>                 |                 |   |                 |                    |                          |
| <i>Calophyllum teysmannii</i>     | Casca do caule  | Calanolídeo F, <b>92</b> (Dipiranocumarina)       | 50              | 2,84 ± 1,35*       | McKEE et al., 1996       |
| <i>Calophyllum inophyllum</i>     | Folhas e galhos | Inófilo B, <b>54</b> (Dipiranocumarina)           | 50 <sup>c</sup> | 1,4*               | PATIL et al., 1993       |
| <i>Calophyllum inophyllum</i>     | Folhas e galhos | Inófilo P, <b>55</b> (Dipiranocumarina)           | 50 <sup>c</sup> | 1,6*               | PATIL et al., 1993       |
| <i>Hypericum chinense L.</i>      | Folhas          | Biyouyanagina A, <b>93</b> (Sesquiterpenóide)     | 50              | 0,798              | TANAKA et al., 2005      |
| <i>Vismia cayennensis</i>         | Folhas          | Vismiafenona D, <b>94</b> (Benzofenona prenilada) | 50              | 11                 | FULLER et al., 1999      |
| <b>Combretaceae</b>               |                 |   |                 |                    |                          |
| <i>Terminalia sericea</i>         | Raiz            | -   | 50              | 0,6**              | TSHIKALANGE et al., 2008 |
| <b>Compositae</b>                 |                 |   |                 |                    |                          |
| <i>Baccharis trinervis</i>        | Partes aéreas   | -   | 50              | 38                 | MATSUSE et al., 1999     |
| <i>Bidens pilosa L.</i>           | Partes aéreas   | -   | 50              | 54                 | MATSUSE et al., 1999     |
| <i>Calea jamaicensis</i>          | Raízes          | -   | 50              | 62                 | MATSUSE et al., 1999     |
| <b>Cucurbitaceae</b>              |                 |   |                 |                    |                          |
| <i>Hemsleya jinfushanensis</i>    | Tubérculos      | Hemslecina A, <b>45</b> (Triterpenóide)           | 50              | 3,09 <sup>a</sup>  | TIAN et al., 2008        |
| <i>Hemsleya jinfushanensis</i>    | Tubérculos      | Hemslecina B, <b>46</b> (Triterpenóide)           | 50              | 3,97 <sup>b</sup>  | TIAN et al., 2008        |
| <i>Hemsleya jinfushanensis</i>    | Tubérculos      | Kuguacina C, <b>95</b> (Cucurbitacina)            | 50              | 2,53 <sup>a</sup>  | TIAN et al., 2008        |
| <i>Hemsleya jinfushanensis</i>    | Tubérculos      | Kuguacina E, <b>96</b> (Cucurbitacina)            | 50              | 18,90 <sup>b</sup> | TIAN et al., 2008        |
| <i>Momordica charantia L.</i>     | Raiz            | -   | 50              | 8,45               | CHEN et al., 2008        |
| <i>Momordica charantia L.</i>     | Raiz            | -   | 50              | 25,62              | CHEN et al., 2008        |
| <b>Dipterocarpaceae</b>           |                 |   |                 |                    |                          |
| <i>Hopea malibato</i> Foxw        | Folhas          | Dibalanocarpol, <b>97</b> (Derivado do estilbeno) | 50              | 46                 | DAI et al., 1998         |
| <i>Hopea malibato</i> Foxw        | Folhas          | Balanocarpol, <b>98</b> (Derivado do estilbeno)   | 50              | 20                 | DAI et al., 1998         |
| <b>Euforbiaceae</b>               |                 |   |                 |                    |                          |
| <i>Alchornea cordifolia</i>       | Sementes        | -   | 50              | 0,02               | AYISI e NYADEDZOR, 2003  |
| <i>Alchornea cordifolia</i>       | Fruto           | -   | 50              | 0,01               | AYISI e NYADEDZOR, 2003  |
| <i>Elaeophorbia drupifera</i>     | Folhas          | -   | 50              | 0,014              | AYISI e NYADEDZOR, 2003  |
| <i>Jatropha curcas L.</i>         | Galhos          | -   | 50              | 24                 | MATSUSE et al., 1999     |
| <i>Jatropha curcas L.</i>         | Folhas          | -   | 50              | 9                  | MATSUSE et al., 1999     |
| <b>Gesneriaceae</b>               |                 |   |                 |                    |                          |
| <i>Drymonia serrulata</i>         | Folhas          | -   | 50              | 130                | MATSUSE et al., 1999     |
| <b>Lamiaceae</b>                  |                 |   |                 |                    |                          |
| <i>Ocimum gratissimum</i>         | Folhas          | -   | 50              | 0,01               | AYISI e NYADEDZOR, 2003  |
| <i>Hyssop officinalis</i>         | Folhas          | Polissacarídeo MAR-10                             | 50              | 5                  | GOLLAPUDI et al., 1995   |
| <b>Leitneriaceae</b>              |                 |   |                 |                    |                          |
| <i>Leitneria floridana</i>        | Partes aéreas   | 1-metoxicantinona <b>99</b> (Alcalóide)           | 50              | 0.256              | XU et al., 2000          |
| <b>Myrtaceae</b>                  |                 |   |                 |                    |                          |
| <i>Syzigium claviflorum</i>       | Folhas          | Ác. betulínico, <b>100</b> (Triterpeno)           | 50              | 1,4*               | FUJIOKA et al., 1994     |
| <i>Syzigium claviflorum</i>       | Folhas          | Ác. platânico, <b>101</b> (Triterpeno)            | 50              | 13*                | FUJIOKA et al., 1994     |

|                                     |                |   |                 |         |                          |
|-------------------------------------|----------------|---|-----------------|---------|--------------------------|
| <b>Moraceae</b>                     |                |   |                 |         |                          |
| <i>Ficus polita</i>                 | Folhas         | -   | 50              | 0,03    | AYISI e NYADEDZOR, 2003  |
| <i>Maclura tinctoria</i> (L.) Steud | Casca          | Macluraxantona B, <b>102</b> (Xantona prenilada)      | 50              | 1-2     | GROWEISS et al., 2000    |
| <i>Maclura tinctoria</i> (L.) Steud | Casca          | Macluraxantona C, <b>103</b> (Xantona prenilada)      | 50              | 1,3-2,2 | GROWEISS et al., 2000    |
| <i>Maclura tinctoria</i> (L.) Steud | Casca          | Isociclomulberrina, <b>104</b> (Flavona isoprenilada) | 50              | 5,5     | GROWEISS et al., 2000    |
| <b>Polygonaceae</b>                 |                |   |                 |         |                          |
| <i>Rumex bequaertii</i>             | Folhas         | -   | 50              | 17,695  | COS et al., 2002         |
| <b>Rubiaceae</b>                    |                |   |                 |         |                          |
| <i>Palicourea condensata</i>        | Casca do caule | Palicoureina, <b>105</b> (Peptídeo)                   | 50              | 1,5*    | BOKESCH et al., 2001     |
| <b>Rutaceae</b>                     |                |   |                 |         |                          |
| <i>Clausena anisata</i>             | Folhas         | -   | 50              | 0,7     | AYISI e NYADEDZOR, 2003  |
| <i>Zanthoxylum davyi</i>            | Raiz           | -   | 50              | 1**     | TSHIKALANGE et al., 2008 |
| <b>Saururaceae</b>                  |                |   |                 |         |                          |
| <i>Saururus chinensis</i> Bail      | Rizoma         | Saucerneol B, <b>106</b> (Lignoide)                   | 100             | 1,0*    | LEE et al., 2010         |
| <i>Saururus chinensis</i> Bail      | Rizoma         | Manassantina A, <b>77</b> (Lignoide)                  | 100             | 1,0*    | LEE et al., 2010         |
| <i>Saururus chinensis</i> Bail      | Rizoma         | Manassantina B, <b>107</b> (Lignoide)                 | 100             | 0,2*    | LEE et al., 2010         |
| <b>Schisandraceae</b>               |                |   |                 |         |                          |
| <i>Kadsura heteroclita</i>          | Caule          | Interiorina, <b>108</b> (Lignana)                     | 50              | 1,6     | PU et al., 2008          |
| <i>Kadsura heteroclita</i>          | Caule          | Kadsurina, <b>109</b> (Lignana)                       | 50              | 17,4    | PU et al., 2008          |
| <i>Kadsura heteroclita</i>          | Caule          | Heteroclitina F, <b>110</b> (Lignana)                 | 50              | 19,9    | PU et al., 2008          |
| <i>Kadsura heteroclita</i>          | Caule          | Interiorina B, <b>111</b> (Lignana)                   | 50              | 1,4     | PU et al., 2008          |
| <i>Kadsura heteroclita</i>          | Caule          | Acetoxi oxokadsurana, <b>112</b> (Lignana)            | 50              | 7,5     | PU et al., 2008          |
| <i>Kadsura heteoclita</i>           | Caule          | Quercetina, <b>113</b> (Flavonol)                     | 50              | 5,3     | PU et al., 2008          |
| <i>Kadsura heteroclita</i>          | Caule          | Taxifolina, <b>114</b> (Flavonolignana)               | 50              | 13,8    | PU et al., 2008          |
| <b>Simaroubaceae</b>                |                |   |                 |         |                          |
| <i>Ailanthus altissima</i>          | -              | Shinjudilactona, <b>115</b> (Quassinóide)             | 50 <sup>b</sup> | 43      | OKANO et al., 1996       |
| <i>Ailanthus altissima</i>          | -              | Shinjulactona B, <b>116</b> (Quassinóide)             | 50 <sup>b</sup> | 28      | OKANO et al., 1996       |
| <i>Ailanthus altissima</i>          | -              | Shinjulactona C, <b>117</b> (Quassinóide)             | 50 <sup>b</sup> | 10,6    | OKANO et al., 1996       |
| <i>Ailanthus altissima</i>          | -              | Ailantinal A, <b>118</b> (Quassinóide)                | 50 <sup>b</sup> | 30      | OKANO et al., 1996       |
| <b>Symplocaceae</b>                 |                |   |                 |         |                          |
| <i>Symplocos setchuensis</i> Brand  | Caule          | Matairesinol, <b>119</b> (Lignana)                    | 50              | 2,0*    | ISHIDA et al., 2001      |
| <i>Symplocos setchuensis</i> Brand  | Caule          | Harman, <b>120</b> (Lignana)                          | 50              | 10,7*   | ISHIDA et al., 2001      |
| <b>Umbelliferae</b>                 |                |   |                 |         |                          |
| <i>Ferula sumbul</i>                | Raiz           | Heraclenol, <b>121</b> (Cumarina)                     | 50              | 0,115   | ZHOU et al., 2000        |
| <i>Ferula sumbul</i>                | Raiz           | Oxipeucedanina, <b>122</b> (Cumarina)                 | 50              | 1,05    | ZHOU et al., 2000        |
| <i>Ferula sumbul</i>                | Raiz           | Heraclenina, <b>123</b> (Cumarina)                    | 50              | 2,37    | ZHOU et al., 2000        |
| <i>Ferula sumbul</i>                | Raiz           | Imperatorina, <b>124</b> (Cumarina)                   | 50              | <0.10   | ZHOU et al., 2000        |
| <i>Ferula sumbul</i>                | Raiz           | Osthol, <b>125</b> (Cumarina)                         | 50              | 0.155   | ZHOU et al., 2000        |
| <b>Verbenaceae</b>                  |                |   |                 |         |                          |
| <i>Cornutia grandifolia</i>         | Tronco         | -   | 50              | 55      | MATSUSE et al., 1999     |

\*Concentração em µM; \*\* Concentração em ng/mL; <sup>a</sup> Inibição da do aparecimento de efeitos citopáticos; <sup>b</sup> Quantificação de p24; <sup>c</sup> Quantificação de TR

## 1.6 Testes de antivirais

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios (CANN, 2005) e não podem se replicar em meios sintéticos de cultura; portanto, são necessárias células vivas como hospedeiras. Três sistemas biológicos podem ser empregados para isolamento e identificação viral: ovo embrionado, animais de laboratório e cultura de células. A partir de 1950, os animais de laboratório e ovo embrionado que eram usados no estudo e cultivo dos vírus foram em parte substituídos por cultura de células que são consideradas mais práticas. Entretanto, alguns vírus como o da influenza, têm sua melhor replicação em ovo embrionado (PEREZ e CURI, 2005).

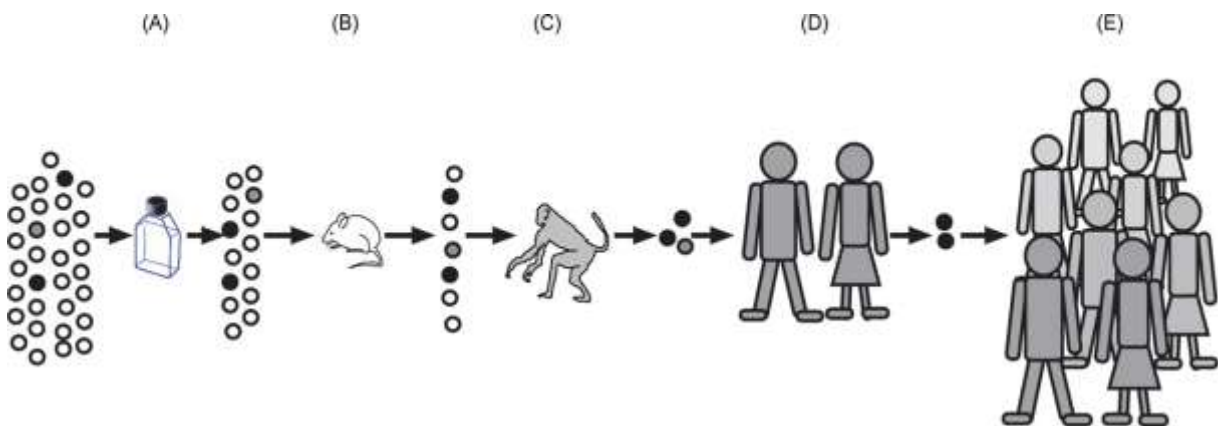
De maneira geral, os ensaios preliminares realizados para pesquisar uma potencial atividade antiviral de produtos naturais utilizam culturas de células e podem ser aplicados com sucesso para a determinação dessa atividade ou da ação virucida de qualquer material.

Os métodos comumente utilizados para a avaliação da atividade antiviral *in vitro* são baseados na diferente habilidade dos vírus de se replicarem em células cultivadas. Alguns vírus podem causar efeito citopático ou formar placas de lise, outros são capazes de realizar funções especializadas ou provocar transformações nas células. A replicação dos vírus em cultura de células pode também ser monitorada pela detecção de determinados elementos virais, tais como DNA ou RNA viral ou polipeptídeos, quando os vírus não produzem efeito citopático nas células. Assim sendo, o teste antiviral selecionado pode ser baseado na inibição do efeito citopático viral, na redução ou inibição da formação de placas de lise, na redução do título viral ou de outras funções virais (VLIETINCK e BERGHE, 1991).

Uma das principais técnicas aplicadas ao diagnóstico da maioria das infecções virais é a demonstração da propagação dos vírus em cultura de células, através da observação de alterações morfofisiológicas apresentadas pela monocamada celular, o chamado efeito citopático (ECP). Essa técnica é aplicável ao diagnóstico de quase todas as viroses de interesse veterinário e possui grande sensibilidade, capaz de detectar quantidades mínimas de vírus, sendo considerado o padrão ouro do diagnóstico viral (VIRGINIO e TEIXEIRA, 2004).

O *screening* anti-HIV primário em cultivos celulares não é especificamente baseado no mecanismo de ação, mas facilita a identificação de produtos naturais que bloqueiam diferentes etapas do ciclo de replicação do HIV (YANG et al., 2001).

A pesquisa de fármacos antivirais envolve vários níveis de análise de eficácia e toxicidade. Os testes *in vitro*, por se tratarem de sistemas de alta capacidade com custo relativamente baixo, devem ser usados como um método de triagem inicial, antes de proceder à experimentação animal e humana, permitindo um *screening* de um grande número de substâncias (Figura 37) (VAN ROMPAY, 2010).



**Figura 37:** Etapas no desenvolvimento de medicamentos antirretrovirais segundo Van Rompay, 2010. Substâncias não efetivas ou tóxicas (círculos abertos), substâncias eficazes (círculos pretos), (A) testes *in vitro*, (B) modelo roedor ou felino, (C) modelo primata não-humano, mais semelhante dos seres humanos, (D) ensaios clínicos humanos, (E) uso generalizado.

### 1.6.1 Modelos animais para teste anti-HIV

A utilização de modelos animais tornou-se uma parte muito importante da avaliação pré-clínica de medicamentos antivirais e, sempre que possível, novas modalidades terapêuticas não devem ser introduzidas nos seres humanos, sem demonstrar eficácia primeiro em um modelo animal apropriado (FIELD e BROWN, 1989; KERN et al, 1995).

Modelos animais de infecção pelo HIV desempenharam um papel importante no desenvolvimento de fármacos antirretrovirais. Embora cada modelo animal tenha suas limitações e nunca imite completamente a infecção pelo HIV dos humanos, um estudo cuidadosamente concebido permite abordagens experimentais que não são viáveis em seres humanos, mas que podem ajudar a entender melhor a patogênese

da doença e fornecer novas informações para estratégias de intervenção (VAN ROMPAY, 2010).

Além do uso *in vivo* de modelos animais para ensaios pré-clínicos de HIV como é o caso do modelo murino, felino e símio (WILLET et al., 1997; AMBROSE et al., 2007, FLETCHER et al, 2008; VAN ROMPAY, 2010) pode-se lançar mão de modelos animais *in vitro* para pesquisa de substâncias anti-HIV (THORMAR et al., 1995; TOBIN et al., 1996; SALVATORI et al., 2001; SALVATORI et al., 2002; THORMAR, 2005). O uso destes modelos animais para testes *in vitro* se justifica pelo fato de que os testes antivirais em larga escala aumentam o risco de exposição humana acidental ao HIV. Assim, o uso de um lentivírus não patogênico para humanos que mostre susceptibilidade aos fármacos *in vitro* semelhante ao HIV, pode ser útil na identificação de algumas substâncias com potencial atividade anti-HIV (SALVATORI et al., 2001).

Alguns trabalhos mostram que estudos com o MVV podem ajudar na pesquisa de novos fármacos contra Lentivirus, incluindo HIV-1 (SALVATORI et al., 2001; SALVATORI et al., 2002; BELLET et al, 2004, THORMAR, 2005).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para pesquisar o potencial antiviral dos produtos naturais foram utilizadas duas metodologias: Inibição da replicação do MVV em cultivo celular e Inibição da TR recombinante do HIV-1. Em ambos os testes os extratos e substâncias isoladas foram utilizados em doses abaixo de 50% de citotoxicidade.

### 2.1. Extratos e substâncias testadas

Foi selecionado, a princípio, um extrato de cada espécie de planta e quando o mesmo mostrava alguma atividade antiviral os outros extratos da mesma espécie eram testados. O efavirenz (**32**) serviu como controle para os testes antivirais.

### 2.2. Amostra viral

Para realização dos testes antivirais foi utilizada uma amostra padrão do vírus Maedi-Visna K1514 originalmente isolada e caracterizada por Sigurdsson e colaboradores (1960) e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Roberto Soares Castro, coordenador do Laboratório de Virose da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Em todos os testes em que foram utilizadas amostras virais todo material passível de ter entrado em contato com partículas virais ficou *overnight* em solução de hipoclorito a 10% antes de ser descartado.

### 2.3. Titulação Viral

Antes de iniciar os testes da potencial atividade antiviral das diferentes substâncias, foi essencial obter inóculos virais com infectividade conhecida. A



infectividade dos vírus pode usualmente ser determinada como dose infectante para 50% da cultura de tecido (TCID<sub>50</sub>).

Este foi determinado em placas de 96 poços (Figura 38) de acordo com metodologia descrita por Callado e colaboradores (1999). A amostra viral foi descongelada e a seguir foram feitas diluições seriadas em MEM sem SFB ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ). Foram adicionados 50  $\mu$ L de MEM com 2% de SFB em cada poço da placa de 96 poços e a seguir 50  $\mu$ L de cada diluição do vírus em quadruplicata. Incubou-se a placa por 1 h em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após este período acrescentou-se 100  $\mu$ L/poço, de uma suspensão celular contendo  $1 \times 10^5$  células/mL. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 14 dias. Após este período, o sobrenadante dos poços foi cuidadosamente aspirado, as monocamadas foram lavadas com 2x com PBS, fixadas com metanol e coradas com cristal violeta a 1%. As placas foram observadas em microscópio invertido para pesquisa de efeito citopático (ECP). Foram contados como positivos todos os poços apresentando sinais de lise celular e pelo menos um sincício com seis núcleos. O título viral foi calculado de acordo com a técnica de Reed e Muench (1938).



**Figura 38:** Placa com titulação do vírus

## 2.4. Teste de inibição da replicação do MVV em cultivo celular

Uma das formas de verificar a atividade antiviral de uma substância é pesquisando a capacidade desta inibir o ECP. Desta forma, para descobrir quais substâncias tinham ação antiviral sobre o MVV foi realizada a pesquisa de inibição

do ECP característico dos retrovírus (sincício e lise) como descrito por Salvatori e colaboradores (2002).

Foram utilizadas microplacas de 96 poços, sendo que em cada poço foram depositados 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de células a uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL de MEM com 10% de SFB. Após 24 horas, quando houve adesão das células e formação da monocamada, o meio de cultivo foi retirado, sendo então adicionado em cada poço 100  $\mu\text{L}$  da suspensão viral na concentração de 10 TCID<sub>50</sub>. As microplacas ficaram incubadas a 37°C, por 1 hora, para que ocorresse a adsorção viral. Após esse período, o meio de cultivo foi substituído por 200  $\mu\text{L}$  de MEM com 2% de SFB e com os extratos em uma concentração previamente determinada pelos testes de citotoxicidade. Foram ainda feitos um controle viral que após adsorção viral recebeu 200  $\mu\text{L}$  de MEM sem extratos e um controle de células que não foram expostas ao vírus, que recebeu 200  $\mu\text{L}$  de MEM sem extratos e sem vírus. Foram utilizados oito poços para cada tratamento. A placa foi incubada a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> por sete dias, ou até aparecerem ECPs em todos os poços do controle viral e nenhum ECP no controle celular. Após este período, o meio foi descartado, a placa foi lavada 2x com PBS, fixada com metanol e corada com cristal violeta a 1%. Procedeu-se então à pesquisa dos ECPs em microscópio invertido. Foram contados os poços com e sem ECP e a % de inibição foi proporcional ao número de poços que não apresentavam ECP, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de poços sem ECP} \times 100}{\text{n}^{\circ} \text{ total de poços}}$$

Vale ressaltar que no início dos experimentos alguns poços receberam MEM com os solventes utilizados para solubilizar os extratos (controle do solvente) a fim de verificar se iriam interferir no aparecimento do ECP.

## 2.5. Teste de inibição da TR do HIV-1

A TR é requerida para a síntese de DNA proviral e usa o RNA genômico viral como um molde para esta síntese. Neste estudo utilizamos um método colorimétrico quantitativo imunoenzimático para determinar a atividade da TR (Reverse Transcriptase Assay, Roche<sup>®</sup>, Germany).

O teste foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante. Utilizamos TR recombinante do HIV-1, diluída em tampão de lise na concentração de 2ng/poço e um tempo de incubação de 2 horas.

Foram adicionados em uma placa de 96 poços, 40µL da solução com nucleotídeos e o *template/primer*, 40µL de tampão de lise com 4ng de TR recombinante do HIV-1 e 40µL de tampão de lise com os extratos a serem testados. Esta placa foi incubada por 2h a 37°C, para que a TR, utilizando o *template/primer*, pudesse produzir DNA proviral, incorporando nucleotídeos marcados com digoxigenina e biotina.

Após a incubação, foram transferidos 60µL desta mistura para cada poço de uma placa tratada com estreptavidina, incubando-se por 1h a 37°C para que a biotina pudesse ligar o DNA proviral sintetizado, à superfície da microplaca revestida com estreptavidina. A seguir, cada poço foi lavado cinco vezes com 250µL de tampão de lavagem e foram adicionados 200µL/poço, da solução de anticorpos anti-digoxigenina conjugados à peroxidase (anti-DIG-POD) na concentração de 200 mU/mL. Incubou-se a placa por 1h a 37°C, a fim de que o anti-DIG-POD se ligasse ao DNA marcado com digoxigenina.

Removeu-se então a solução dos poços e estes foram lavados cinco vezes com 250 µL de tampão de lavagem.

Na etapa final adicionou-se 200µL/poço, do substrato para peroxidase ABTS. A enzima peroxidase cataliza a clivagem do substrato, produzindo um produto de reação colorimétrica. A intensidade da coloração das amostras foi determinada utilizando-se um leitor de microplaca no comprimento de onda de 490nm. A intensidade da coloração, e conseqüentemente a absorvância, está diretamente correlacionada ao nível de atividade da TR na amostra.

A porcentagem de inibição da atividade da TR pelas substâncias isoladas e extratos testados, foi calculada aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição da TR} = 100 - \left\{ \frac{(\text{Média Abs. T} - \text{Média Abs. B}) \times 100}{\text{Média Abs. C} - \text{Média Abs. B}} \right\}$$

Média Abs. = média da absorvância

T= teste

B = branco

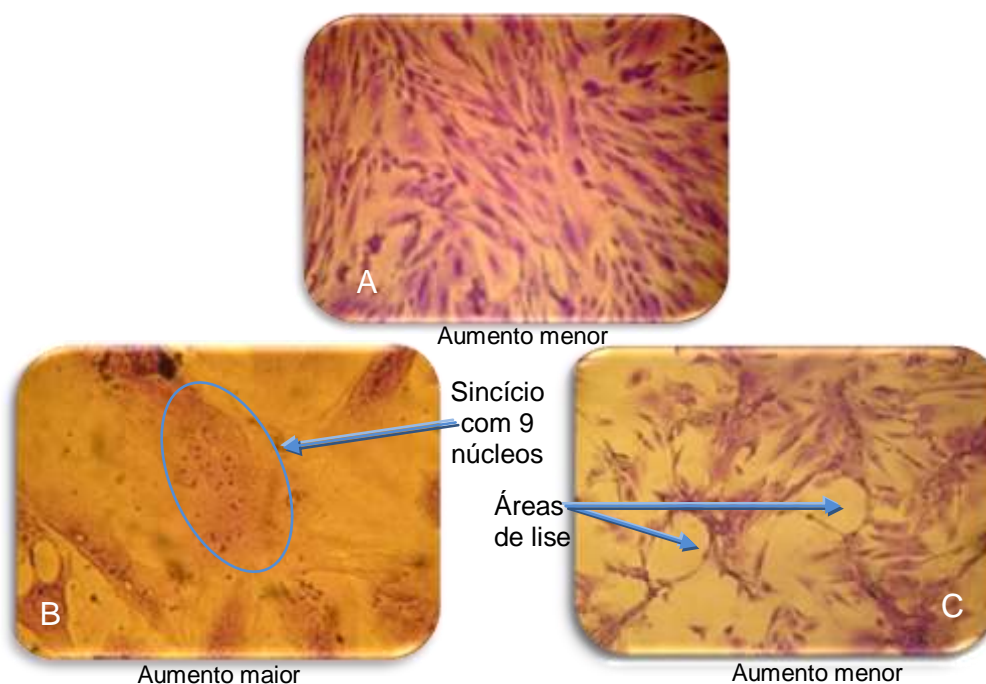
C = controle

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Propagação dos vírus e determinação do título viral

A utilização de linhagens de células epiteliais de córnea para replicação de lentivírus já havia sido descrita para HIV, AEIV (BEUTELSPACHER et al., 2005) e CAEV (OLIVEIRA et al., 2008), o que ajuda a validar a escolha do tipo celular para os experimentos. Além disso, podemos observar na figura 39 que as células que receberam o inóculo viral mostraram ECP característicos de lentivírus; apresentando aparência de “bandeira rasgada” nas áreas de lise, e sincícios com mais de seis núcleos. Isto mostra que as células epiteliais de córnea ovina foram permissíveis à replicação da amostra viral MVV-K1514.

A formação de sincícios parece ser resultado da interação entre as glicoproteínas do envelope viral e receptores presentes na membrana da célula hospedeira. Para formação destes é necessário que as células apresentem receptores específicos, responsáveis pela adsorção viral, e disponibilidade de fatores celulares para transcrição viral (HUSO et al., 1988; LEROUX et al., 1995). Isto confirma a adequação do tipo celular escolhido para replicação do vírus estudado.



**Figura 39:** Células normais do controle (A) e ECPs do MVV (B e C) observados após 7 dias de cultivo de celular.

O título infeccioso da solução-estoque viral determinado de acordo com o item 2.3 da parte 2 deste trabalho foi de  $10^{4,5}$  TCID<sub>50</sub>/mL.

### 3.2. Avaliação da atividade antiviral

O fármaco antiviral ideal é aquele que inibe o vírus sem lesar as células do hospedeiro. Desta forma, na pesquisa de produtos antivirais devemos considerar a toxicidade dos mesmos sobre as células hospedeiras, pois se forem excessivamente tóxicos os mesmos têm seu uso inviável, mesmo que apresentem boa ação antiviral (VLIETINK et al, 1997). Assim, a toxicidade de algumas substâncias limitou a concentração a ser usada nos testes antivirais.

Os testes de citotoxicidade permitiram determinar a concentração máxima de trabalho, de cada extrato e substância isolada, para os testes de atividade antiviral.

Na primeira etapa de triagem antiviral os extratos e substâncias isoladas foram avaliados quanto a sua atividade antiviral pelo método de inibição do efeito citopático do MVV. Levou-se em consideração o aparecimento ou não de ECP na presença dos respectivos extratos e substâncias isoladas. Os resultados foram expressos como porcentagem da inibição viral (%) conforme fórmula do item 2.4 e podem ser observados nas figuras 40 a 42.

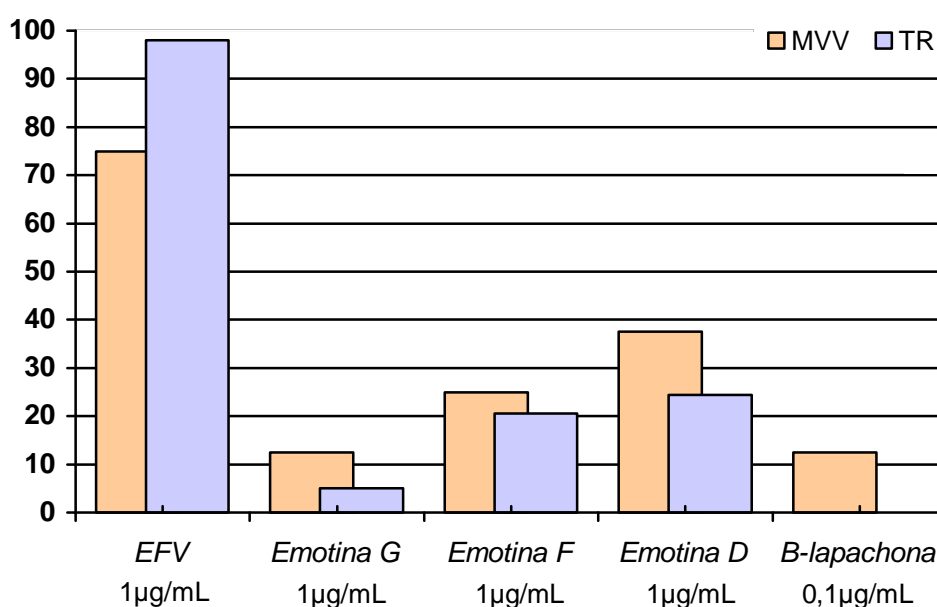
Da mesma forma que para o teste de inibição da TR, inicialmente testou-se um extrato de cada espécie de planta e à partir do indicativo de ação antiviral destes, testou-se outro extrato da mesma planta.

O modelo do MVV é útil na identificação de inibidores da TR uma vez que embora MVV e HIV-1 mostrem uma limitada homologia na seqüência de nucleotídeos, a sua organização genômica é similar, em particular no que diz respeito aos genes *pol* e *env*, que codificam as enzimas essenciais à replicação viral (TR, IN e PR) e as glicoproteínas do envelope (gp41 e gp120), respectivamente. Nos genes *pol* do MVV e HIV-1 há uma substancial homologia na seqüência de nucleotídeos, particularmente no domínio conservado da TR (SONIGO et al., 1985; THORMAR, 2005). A similaridade entre os sítios ativos da TR do MVV e HIV-1 é refletida nas atividades antivirais comparáveis de análogos de nucleosídeos sobre a replicação do

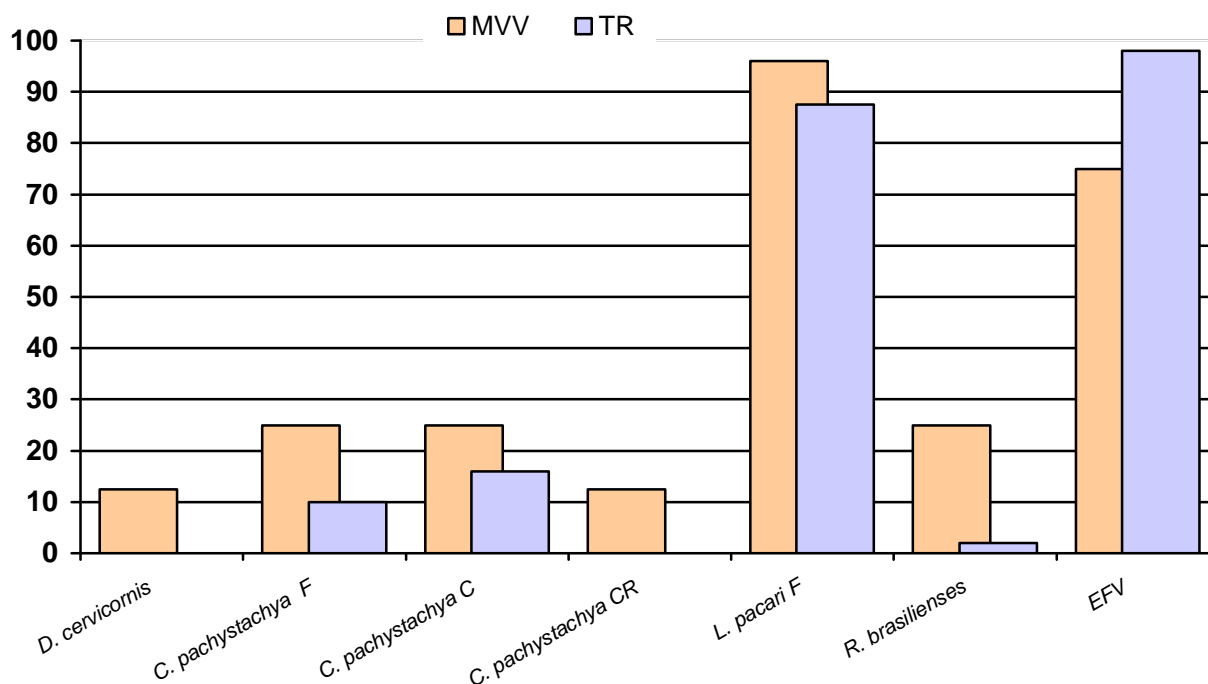
vírus em cultura celular (THORMAR, 2005; SALVATORI, 2001; SALVATORI et al., 2002). Tem sido demonstrado também que, apesar da homologia da seqüência de genômica geral ser inferior a 23%, também há uma conservação estrutural das glicoproteínas transmembrana do HIV-1 e do MVV, o que é essencial para a fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira durante a entrada viral. Isto é outro exemplo da possibilidade de utilizar o MVV como um modelo para o desenvolvimento de drogas anti-HIV-1 (THORMAR, 2005).

Em alguns extratos foi difícil avaliar a atividade antiviral devido à deposição dos mesmos e interferência na leitura dos efeitos citopáticos; sendo os mesmos descartados.

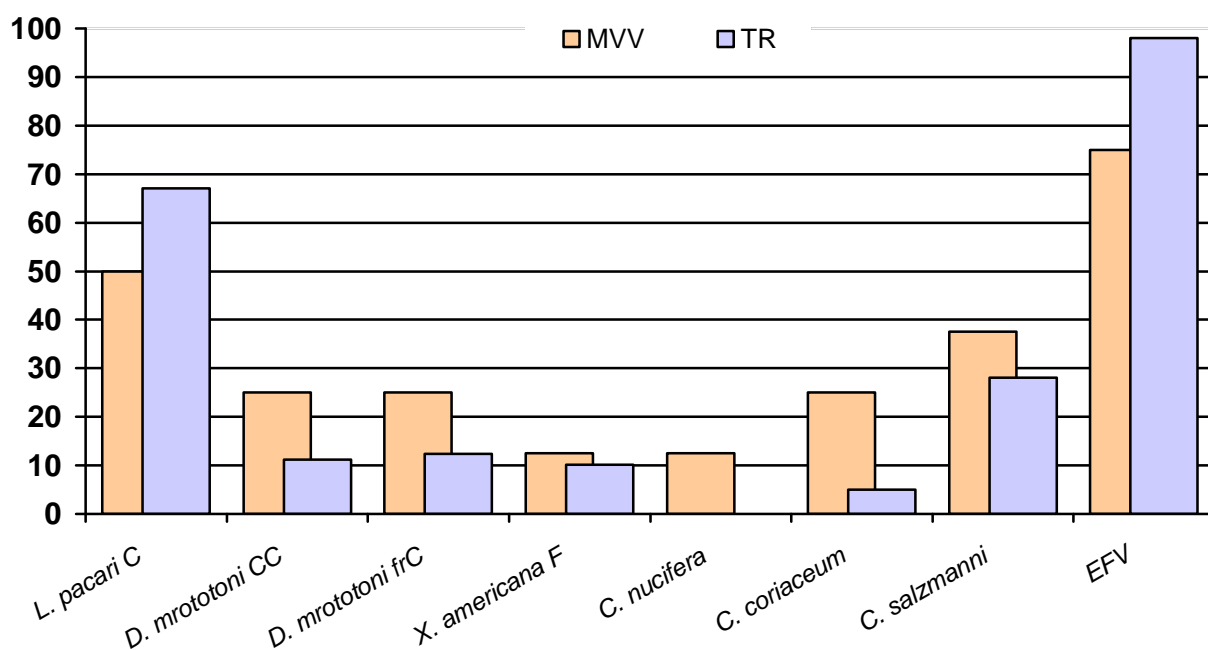
Nem todos os extratos que se mostraram inibidores do MVV apresentaram atividade inibidora da TR (Figuras 40 a 42). Isto pode indicar que as substâncias presentes nestes extratos inibam o vírus por outro mecanismo, merecendo estudos futuros em outros modelos enzimáticos.



**Figura 40:** Inibição do ECP do MVV e da TR do HIV-1 por substâncias puras.



**Figura 41:** Inibição do ECP do MVV e da TR do HIV-1 por extratos a 50 µg/mL e pelo efavirenz a 1 µg/mL. F – folha; C- caule; CR- casca da raiz.



**Figura 42:** Inibição do ECP do MVV e da TR do HIV-1 por extratos a 100 µg/mL e pelo efavirenz a 1 µg/mL. CC- casca do caule; frC- fração clorofórmio; F – folha.



Algumas substâncias ou extratos que não foram testados no MVV foram avaliados quanto à atividade anti-TR quando havia atividade no grupo do extrato ou substância em questão. Isto permitiu que ampliássemos nosso leque de opções. Todos os resultados da pesquisa da TR são apresentados nas tabelas 10a, 10b e 10c. Na figura 43 podemos observar os extratos e as substâncias ativas.

Uma grande barreira na luta contra a AIDS é a mutação do HIV que confere resistência contra os inibidores da TR. Por causa da alta taxa de mutação na TR, o surgimento de novas cepas de HIV resistentes é frequente. No plasma de pacientes têm sido detectados mutantes de HIV-1 resistentes a todos os inibidores de TR, incluindo o ITRNN, efavirenz (WANG et al., 2004). Isto tem acelerado as pesquisas de outros inibidores efetivos da TR (YANG et al., 2001) e reforça a importância dos achados neste trabalho.

Na nossa pesquisa conseguimos encontrar substâncias isoladas e extratos de plantas com forte ação inibidora da TR. Estas substâncias podem ser consideradas ITRNN, uma vez que conseguiram inibir a TR fora do ambiente celular onde não poderiam ser trifosforilados por quinases celulares.

Dentre as substâncias isoladas testadas, os melhores resultados encontrados foram os das emotinas D e F que além de inibirem os ECPs em 37,5 e 25%, apresentaram 24,4 e 20,5% de inibição da TR, respectivamente, na concentração de 1 µg/mL. Apesar desta ser inferior à apresentada pelo controle efavirenz, é um indicativo de atividade anti-HIV deste grupo de substâncias, o que pode levar à pesquisa de outras emotinas. Outros sesquiterpenos isolados de diferentes plantas têm demonstrado ação anti-HIV (ZHANG et al., 2003, ASRES et al., 2005, CHENG et al., 2005).

No grupo das naftoquinonas não encontramos atividade anti-TR, porém pudemos observar uma inibição do ECP, o que pode ser um indicativo de um outro mecanismo de ação antiviral não relacionado à TR. Da Silva e colaboradores (2002) relatam a ação antiviral de naftoquinonas relacionadas ao lapachol, contra Herpes Virus Simples do tipo 2 (HSV-2).

Entre os extratos também houve grande variação na atividade antiviral. Woradulayapiniij e colaboradores (2005) classificaram a ação anti-TR em forte (> 90%), moderada (50 a 90%) e fraca (< 50%) para extratos testados a 200 µg/mL.

O extrato do caule da *Cordia salzmanni* apresentou 28% de inibição da TR a 100 µg/mL. Matsuse e colaboradores (1999) trabalhando com extratos da folha de

outra planta do mesmo gênero (*Cordia spinescens*) também encontraram atividade anti-HIV (inibição de ECP, de PR e de TR).

Extratos de *Ximenia americana* já foram descritos como possuidores de atividade antibacteriana, antifúngica (OMER e ELIMINA, 2003; GEYID et al., 2005) e anti-HIV (ASRES et al., 2001). Na medicina popular uma série de usos terapêuticos foram relatados para várias partes da *X. americana*, sendo utilizadas como anti-séptico, laxante, antitérmico, analgésico, anti-ulcerosa, diurética, e ainda para diminuir o fluxo menstrual, tratar hemorróidas, câncer, reumatismo, infecções orais e sarampo (OMER e ELIMINA, 2003; MEVY et al., 2006). Em nosso trabalho encontramos uma pequena atividade anti-MVV e anti-HIV de 12,5 e 10,2%, respectivamente.

O extrato etanólico e a fração clorofórmio da casca do caule do *D. morototoni* apresentaram pequena inibição anti-HIV, porém tem sido encontradas ações anti-HIV em extratos ou substâncias isoladas de outras plantas desta família (LAM et al., 2000; HO et al., 2007; WEI et al., 2009 ) e foi relatada ação antimalárica do *D. morototoni* (DEHARO et al., 2001)

A *Cecropia pachystachya* Trec. é uma árvore de 5 a 15 metros de altura, originária das zonas tropicais das Américas (UCHÔA et al, 2010). Na medicina tradicional ela é utilizada como diurética, antitérmica, anti-hemorrágica, antiasmática, antihipertensiva, antitussígena e antifécciosa e ainda para o tratamento de feridas (CONSOLINI et al. 2006). Foi demonstrado que os extratos desta planta apresentam atividade antimalárica (UCHÔA et al, 2010) e que outra planta do mesmo gênero (*Cecropia glaziovii*) apresenta atividade inibitória dos herpes virus humanos tipo 1 e 2 (HHV-1, HHV-2) (SILVA et al., 2010).

Neste trabalho a concentração máxima testada foi de 100 µg/mL e encontramos os melhores resultados com os extratos da *L. pacari*. O extrato bruto da casca do caule da *L. pacari* apresentou 67% de inibição da TR a 100 µg/mL e suas frações clorofórmica (a 100 µg/mL) e acetato (a 50 µg/mL) apresentaram inibição de 89 e 95%, respectivamente, o que pode indicar uma concentração da substância ativa. O extrato bruto da folha desta mesma planta apresentou 96% de inibição da TR a 50 µg/mL, muito próximo da inibição do medicamento padrão efavirenz testado a 1 µg/mL (98% de inibição) o que merece um estudo mais aprofundado desta. Por tratar-se de extrato de folhas, é de mais fácil obtenção e é um recurso renovável, pois não necessita destruir a planta para a coleta.

A *Lafoensia pacari*, é uma planta endêmica do cerrado brasileiro, conhecida popularmente como pacarí, dedaleiro ou magava-brava, e tem sido utilizada na medicina popular como cicatrizante, antineoplásico, no combate à gastrite e úlcera, como antidepressivo e como imunoestimulante (CORRÊA e PENNA, 1984; PORTO et al., 2008). Foi relatada atividade seqüestradora de radicais livres, utilizando-se extrato metanólico da casca do caule (SOLON et al, 2000), atividade antibacteriana (DE LIMA et al., 2003; PORFÍRIO et al., 2009), e atividade antiinflamatória (ROGERO et al., 2008).

Dentre os principais compostos químicos da *L. pacari* estão fenóis, taninos, flavonóides, esteróides, triterpenos, quinonas, alcalóides e saponinas (DE LIMA et al., 2003; PORTO et al., 2008). Existem muitos relatos de atividade anti-HIV de flavonóides (KIM et al., 1998; WU et al., 2003; HSIEH et al., 2004; KITAMURA, et al, 2004; BESSONG et al, 2005), taninos (NOTKA et al, 2004; BESSONG et al, 2005), triterpenos (FUJIOKA HSIEH et al., 1994; TIAN et al, 2008; WEI et al., 2008) e alcalóides (XU et al., 2000; HSIEH et al., 2004), o que reforça os resultados encontrados com os extratos da *L. pacari*.

Em alguns artigos pudemos observar que a ação antiviral dos extratos de onde foram isoladas substâncias ativas era menor do que das substâncias isoladas (BESSONG et al., 2005; WORADULAYAPINIJ et al., 2005) o que indica que poderemos encontrar compostos com forte atividade nos extratos de *L. pacari*.

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que temos dois bons candidatos para o combate ao HIV: as substâncias puras do grupo das emotinas e os extratos e frações da *L. pacari*. No primeiro caso, por se tratarem de substâncias puras isoladas, pretendemos fazer algumas modificações das moléculas para tentar potencializar o efeito inibidor da TR do HIV. No caso dos extratos temos um caminho mais longo a percorrer, porém acreditamos que muito promissor, uma vez que a atividade foi muito elevada no extrato bruto quando comparada ao controle efavirenz e tem se mostrado ainda maior nas frações isoladas.

**Tabela 10a:** Resultados da pesquisa de inibição da TR do HIV-1 por extratos de plantas

| Família / Espécie                               | Parte utilizada             | Concentração<br>µg/mL | % de inibição<br>da TR do HIV-1 |
|---|-----------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| <b>Anacardiaceae</b>                            |                             |                       |                                 |
| <i>Spondias purpurea</i> L.                     | Semente                     | 100                   | 0                               |
| <i>Spondias tuberosa</i>                        | Semente                     | 100                   | 0                               |
| <b>Araliaceae</b>                               |                             |                       |                                 |
| <i>D. morototoni</i> Decne. & Planch.           | Casca do caule              | 100                   | 11,2                            |
| <i>D. morototoni</i> Decne. & Planch.           | CC, Fr. CHCl <sub>3</sub>   | 100                   | 12,4                            |
| <b>Arecaceae</b>                                |                             |                       |                                 |
| <i>C. nucifera</i> L. var. Nana Cult. amarela   | Fibra do fruto              | 100                   | 0                               |
| <b>Boraginaceae</b>                             |                             |                       |                                 |
| <i>Cordia salzmanni</i> DC.                     | Caule                       | 100                   | 28,0                            |
| <b>Cecropiaceae</b>                             |                             |                       |                                 |
| <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul             | Folha                       | 50                    | 10,0                            |
| <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul             | Casca da raiz               | 50                    | 0                               |
| <i>Cecropia pachystachya</i> Trécul             | Caule                       | 50                    | 16,0                            |
| <b>Clusiaceae</b>                               |                             |                       |                                 |
| <i>R. brasiliensis</i> (Mart.) Planch. & Triana | Raiz                        | 50                    | 2,0                             |
| <i>R. brasiliensis</i> (Mart.) Planch. & Triana | Caule                       | 50                    | 0                               |
| <b>Euphorbiaceae</b>                            |                             |                       |                                 |
| <i>Jatropha mollissima</i>                      | Casca do caule              | 50                    | 0                               |
| <b>Fabaceae</b>                                 |                             |                       |                                 |
| <i>Camptosema coriaceum</i> Benth.              | Raiz                        | 100                   | 5,0                             |
| <i>Erythrina mulungu</i> Mart.                  | Casca da raiz               | 100                   | 0                               |
| <b>Lythraceae</b>                               |                             |                       |                                 |
| <i>Lafoensia pacari</i> A.St.-Hil.              | Casca do caule              | 100                   | 67,0                            |
| <i>Lafoensia pacari</i> A.St.-Hil.              | Folha                       | 50                    | 96,0                            |
| <i>Lafoensia pacari</i> A.St.-Hil.              | Fr. Acetato da CC           | 50                    | 95,0                            |
| <i>Lafoensia pacari</i> A.St.-Hil.              | Fr. CHCl <sub>3</sub> da CC | 100                   | 89                              |
| <b>Olacaceae</b>                                |                             |                       |                                 |
| <i>Ximenia Americana</i> L.                     | Folha                       | 100                   | 10,2                            |
| <b>Rubiaceae</b>                                |                             |                       |                                 |
| <i>Genipa americana</i> L.                      | Semente                     | 100                   | 0                               |
| <b>Simaroubaceae</b>                            |                             |                       |                                 |
| <i>Simaba mayana</i> Casar                      | Raiz                        | 50                    | 0                               |
| <b>Controle positivo: efavirenz (32)</b>        | -                           | 1                     | 98                              |

Os valores representam a média das repetições de cada tratamento.

**Tabela 10b:** Resultados da pesquisa de inibição da TR do HIV-1 por extratos de algas

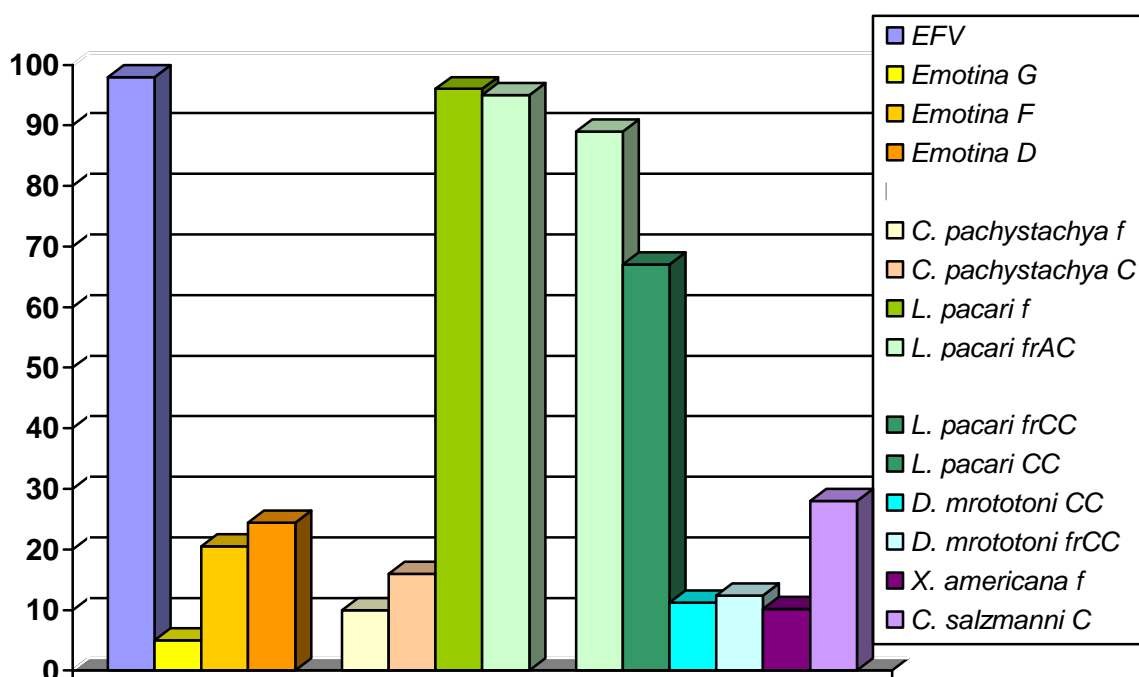
| Família / Espécie                        | Parte utilizada /<br>solvente da extração | Concentração<br>µg/mL | % de inibição da<br>TR do HIV-1 |
|--|---|-----------------------|---------------------------------|
| <b>Dictyotaceae</b>                      |   |                       |                                 |
| <i>Dictyota cervicornis</i>              | Toda a alga / Água                        | 50                    | 0                               |
| <b>Sargassaceae</b>                      |   |                       |                                 |
| <i>Sargassum vulgare</i>                 | Toda a alga / EtOH                        | 10                    | 0                               |
| <b>Ulviceae</b>                          |   |                       |                                 |
| <i>Ulva lactuca</i>                      | Toda a alga / Água                        | 100                   | 0                               |
| <b>Controle positivo: efavirenz (32)</b> | -   | 1                     | 98                              |

Os valores representam a média das repetições de cada tratamento.

**Tabela 10c:** Resultados da pesquisa de inibição da TR do HIV-1 por substâncias puras

| Classe / substância                      | Concentração $\mu\text{g/mL}$ | % de inibição da TR do HIV-1 |
|--|-------------------------------|------------------------------|
| <b>Naftoquinonas</b>                     |                               |                              |
| Lapachol (8)                             | 10                            | 0                            |
| $\alpha$ -Lapachona (9)                  | 1                             | 0                            |
| $\beta$ -Lapachona (10)                  | 0,1                           | 0                            |
| Nor $\beta$ -Lapachona (11)              | 0,1                           | 0                            |
| <b>Sesquiterpenos</b>                    |                               |                              |
| Emotina D (15)                           | 1                             | 24,4                         |
| Emotina A (12)                           | 1                             | 0                            |
| Emotina A 2 Desoxi (17)                  | 1                             | 0                            |
| Emotina F (14)                           | 1                             | 20,5                         |
| Emotina G (16)                           | 1                             | 5                            |
| <b>Controle positivo: efavirenz (32)</b> | 1                             | 98,0                         |

Os valores representam a média das repetições de cada tratamento.



**Figura 43:** Inibição da TR do HIV-1 por extratos e substâncias puras. f – folha; C- caule; frAC – fração acetato da casca do caule; frCC - fração clorofórmio da casca do caule; CC – casca do caule.

## 4. CONCLUSÕES

Com a metodologia aplicada foi possível implementar o cultivo de células epiteliais de córnea e de fibroblastos na Universidade Federal de Alagoas. Isto nos permitiu avaliar a citotoxicidade e a atividade inibitória da replicação do MVV em cultivo celular, por extratos vegetais e substâncias isoladas.

Foi possível ainda pesquisar a atividade inibitória da TR do HIV-1, por extratos vegetais e substâncias isoladas, o que nos permitiu identificar três substâncias puras (Emotinas G, F e D) e 12 extratos, de sete plantas (*Didimopanax morototoni* Decne. & Planch, *Cordia salzmanni* DC., *Cecropia pachystachya* Trécul, *Rheedia brasiliensis* (Mart.) Planch. & Triana, *Lafoensia pacari* A.St.-Hil. e *Ximenia Americana* L.) com atividade inibidora da TR do HIV-1.

## 5. PERSPECTIVAS

Mais do que um projeto isolado o que pretendíamos com este doutorado era estabelecer uma linha de pesquisa que nos trouxesse uma nova vertente de testes biológicos para produtos naturais e/ou sintéticos. Durante a vigência do doutorado aprovamos um projeto no PPSUS 2009 intitulado: “Antirretrovirais de origem vegetal”, o qual nos permitirá dar continuidade à investigação do extrato com maior atividade anti-HIV a fim de identificar a substância ativa responsável por esta ação o que não foi possível em virtude do tempo.

Desta forma, pretendemos agora fortalecer esta linha de pesquisa e ampliar os testes para investigação de novos antirretrovirais uma vez que o Brasil tem uma grande diversidade vegetal e o Laboratório de Pesquisa de Recursos Naturais da UFAL tem experiência no Isolamento e elucidação estrutural de substâncias de origem natural. Assim nossas perspectivas incluem:

- Estabelecer protocolos de congelamento para as linhagens celulares utilizadas e fazer um estoque destas células.
- Ampliar o estoque de vírus e obter um título infeccioso maior para testes futuros.
- Testar as frações dos extratos que mostraram resultados promissores na triagem antiviral, a fim de identificar a substância ativa.
- Testar as substâncias quanto a outros mecanismos inibitórios do HIV, como inibição da protease e integrase
- Otimizar os testes do realizados e aplicar como rotina a sequência de investigação antiviral estabelecida.

Assim, pretendemos contribuir para ampliar a classe dos antirretrovirais ITRNN que atualmente só conta com dois fármacos em uso clínico, o efavirenz e a nevirapina. E ainda contribuir com antivirais que atuem inibindo outras etapas da replicação do HIV.

## 6. REFERÊNCIAS

ADAMSON, C. S.; FREED, E. O. Recent progress in antiretrovirals – lessons from resistance. **Drug Discovery Today**, v.13, p.424-32, 2008.

AIDS, 2010. Tratamento de HIV e AIDS. Disponível em: [www.aids.gov.br](http://www.aids.gov.br) Acessado em 23.03.2010

AIKEN, C.; CHEN, C. H. Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals. **Trends in Molecular Medicine**, v.11, n.1, p.31-6, 2005.

ALI, H.; KÖNIG, G. M.; KHALID, S. A.; WRIGHT, A. D.; KAMINSKY, R. Evaluation of selected Sudanese medicinal plants for their in vitro activity against hemoflagellates, selected bacteria, HIV-1-RT and tyrosine kinase inhibitory, and for cytotoxicity **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, p.219-28, 2002.

ALI, A.; REALEGENO, S.; YANG, O. O.; LEWIS, M. J. Simultaneous assessment of CD4 and MHC-I downregulation by Nef primary isolates in the context of infection. **Journal of Virological Methods**, v.161, p. 297-304, 2009.

AMBROSE, Z.; RAMANI, V. N. K.; BIENIASZ, P. D.; HATZIIIOANNOU, T. HIV/AIDS: in search of an animal model. **TRENDS in Biotechnology**, v.25, n.8, p.333-7, 2007.

AMBROSIO JR, R. **Estudo laboratorial da cicatrização de córneas humanas após debridamento epitelial**. São Paulo, 2004. 137p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

ASRES, K.; BUCAR, F., KARTING, T.; WITROUW, M.; PANNECOUQUE, C.; CLERCQ, E. D. Antiviral activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and type 2 (HIV-2) of ethnobotanically selected Ethiopian medicinal plants. **Phytotherapy Research**, v.15, p.62-9, 2001.



ASRES, K.; SEYOUM, A.; VEERESHAM, C.; BUCAR, F.; GIBBONS, S. Naturally derived anti-HIV agents. **Phytotherapy Research**, v.19, n.7, p.557-81, 2005.

AYISI, N. K.; NYADEDZOR, C. Comparative in vitro effects of AZT and extracts of *Ocimum gratissimum*, *Ficus polita*, *Clausena anisata*, *Alchornea cordifolia*, and *Elaeophorbium drupifera* against HIV-1 and HIV-2 infections. **Antiviral Research**, v.58, p.25-33, 2003.

BAGLEY, D. M.; GARDNER, J. R.; HOLLANDI, G. ; LEWIS, R. W.; REGNIER, J.-F.; STRINGER, D. A.; WALKER, A. P. Skin Irritation: Reference Chemicals Data Bank. **Toxicology in Vitro**, v.10, p.1-6, 1996.

BALZARINI, J.; HATSE, S.; VERMEIRE, K.; PRINCEN, K.; AQUARO, S.; PERNO, C-F.; DE CLERCQ, E.; EGBERINK, H.; VAN DEN MOOTER, G.; PEUMANS, W.; VAN DAMME, E.; SCHOLS, D. Mannose-Specific Plant Lectins from the *Amaryllidaceae* Family Qualify as Efficient Microbicides for Prevention of Human Immunodeficiency Virus Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.3858-70, 2004.

BEDOYA, L. M.; SANCHEZ-PALOMINO, S.; ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; ALCAMI, J. Anti-HIV activity of medicinal plant extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, p.113-6, 2001.

BEDOYA, L. M.; MARQUEZ, N.; MARTINEZ, N.; GUTIERREZ-EISMAN, S.; ALUAREZ, A.; CALZADO, M. A.; ROJAS, J. M.; APPENDINO, G.; MUNOZ, E.; ALCAMI, J. SJ23B, a jatrophone diterpene activates classical PKCs and displays strong activity against HIV in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v.77, p.965-78, 2009.

BEDOYA, L. M.; ABAD, M. J.; SÁNCHEZ-PALOMINO, S.; ALCAMI, J.; BERMEJO, P. Ellagitannins from *Tuberaria lignosa* as entry inhibitors of HIV. **Phytomedicine**, v.17, p.69-74, 2010.

BELLET, V.; DUVAL, R.; DELEBASSÉE, S.; COOK-MOREAU, J.; BOSGIRAUD, C. AZT inhibits *Visna/maedi virus*-induced apoptosis. **Archives of Virology**, v.149, n.3, 2004.

BESSONG, P. O.; OBI, C. L.; ANDRÉOLA, M.; ROJAS, L. B.; POUYSEGU, L.; IGUMBOR, E.; MEYER, J.J. M.; QUIDEAU, S.; LITVAK, S. Evaluation of selected South African medicinal plants for inhibitory properties against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrase. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, p.83-91, 2005.

BEUTELSPACHER, S.C.; ARDJOMAND, N.; TAN, P.H.; PATTON, G.S.; LARKIN, D.F.P.; GEORGE, A.J.T.; McCLURE, M.O. Comparison of HIV-1 and EIAV-based lentiviral vectors in corneal transduction. **Experimental Eye Research**, v.80, p.787–94, 2005.

BOKESCH, H. R.; PANNELL, L. K; COCHRAN, P. K.; SOWDER, R. C.; MCKEE, T. C.; BOYD, M. R. A. A Novel Anti-HIV Macrocyclic Peptide from *Palicourea condensata*. **Journal of Natural Products**, v.64, p.249-50, 2001.

BOKESCH, H. R.; CHARAN, R. D.; MERAGELMAN, K. M.; BEUTLER, J. A.; GARDELLA, R.; O'KEEFE, B. R.; MCKEE, T. C.; MCMAHON, J. B. Isolation and characterization of anti-HIV peptides from *Dorstenia contrajerva* and *Treculia obovoidea*. **FEBS Letters**, v.567, p.287-90, 2004.

BRASIL, 2008. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos Infectados pelo HIV: 2008**. 7 ed, Brasília, Ministério da Saúde, 2008. 244p.

BRASIL, 2009. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Recomendações para Terapia Antirretroviral em Crianças e Adolescentes Infectados pelo HIV**. Brasília, Ministério da Saúde, 2009. 200p.

BRASIL, 2010a. Ministério do Meio Ambiente. Riqueza de espécies. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/sitio/index> Acessado em 22.03.2010.

Brasil, 2010b. Ministério da Saúde. Responsabilidade dos estados pela compra e distribuição de medicamentos. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS69662342PTBRIE.htm> Acessado em 23.03.2010

BRÍGIDA, A. I. S; ROSA, M. F. Determinação do Teor de Taninos na Casca de Coco Verde (*Cocos nucifera*). **Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture**, v.47, p.25-7, 2003.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. **Jawetz, Melnick & Adelberg Microbiologia Médica**. 21 ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2000. 612p.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**, 11.ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2006. 1821p.

CALLADO, A. K. C.; CASTRO, R. S.; NASCIMENTO, S. A.; RODRIGUES, M. I. M. S.; PINTO JR., J. H.; TEIXEIRA, M. F. Caracterização preliminar da infecção de células da membrana sinovial por amostras brasileiras de lentivirus de pequenos ruminantes. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.2, n.3, p.152-9, 1999.

CAMPBELL, R. S. F.; ROBINSON, W. F. Review. The Comparative Pathology of the Lentiviruses. **Journal of Comparative Pathology**, v.119, p.333-95, 1998.

CANN, A. J. **Principles of Molecular Virology**, 4.ed. California, Elsevier Academic Press, 2005. 315p.

CARREL, A. On the permanent life of tissues outside of the organism. **The Journal of Experimental Medicine**, v.15, p.516-28, 1912.

CASTRO-MUÑOZLEDO, F. Corneal epithelial cell cultures as a tool for research, drug screening and testing. **Experimental Eye Research**, v.86, p.459-9, 2008.

- CHANG, Y. S.; WOO, E. R. Korean Medicinal Plants Inhibiting to Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Fusion. **Phytotherapy Research**, v.17, p.426-9, 2003.
- CHAUDHRY, A.; VERGHESE, D. A.; DAS, S. R.; JAMEEL, S.; GEORGE, A.; BAL, V.; MAYOR, S.; RATH, S. HIV-1 Nef Promotes Endocytosis of Cell Surface MHC Class II Molecules via a Constitutive Pathway. **The Journal of Immunology**, v.183, p.2415-24, 2009.
- CHEENPRACHA, S.; KARALAI, C.; PONGLIMANONT, C.; SUBHADHIRASAKUL, S.; TEWTRAKUL, S. Anti-HIV-1 protease activity of compounds from *Boesenbergia pandurata*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, p.1710-4, 2006.
- CHEN, J.; TIAN, R.; QIU, M.; LU, L.; ZHENG, Y.; ZHANG, Z. Trinorcucurbitane and cucurbitane triterpenoids from the roots of *Momordica charantia*. **Phytochemistry**, v.69, p.1043-8, 2008.
- CHENG, M.; LEE, K.; TSAIA, I.; CHEN, I. Two new sesquiterpenoids and anti-HIV principles from the root bark of *Zanthoxylum ailanthoides*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.13, p.5915–20, 2005.
- CHEUNG, P. K., WYNHOVEN, B., HARRIGAN, P. R. 2004: which HIV-1 drug resistance mutations are common in clinical practice? **AIDS Review**, v.6, n. 2, p.107–16, 2004.
- CHRIST, F.; THYS, W.; DE RIJCK, J.; GIJSBERS, R.; ALBANESE, A.; AROSIO, D.; EMILIANI, S.; RAIN, J.; BENAROUS, R.; CERESETO, A.; DEBYSER, Z. Transportin-SR2 Imports HIV into the Nucleus. **Current Biology**, v.18, p.1192-202, 2008.
- CIUFFI, A.; BUSHMAN, F. D. Retroviral DNA integration: HIV and the role of LEDGF/p75. **TRENDS in Genetics**, v.22, n.7 p.388-95, 2006.
- CLEMENTS, J.E.; PAYNE, S.L. Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. **Virus Research**, v.32, p.97-109, 1994.

COFÁN, M.; FERNÁNDEZ-SOLÁ, J. Cultivos celulares: utilidade en investigación biomédica. **Medicina Clínica**, v.98, n.20, p.782-9, 1992.

CONSOLINI, A. E.; RAGONE, M. A.; MIGLIORI, G. N.; CONFORTI, P.; VOLONTE, M. G. Cardiotoxic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (Ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.106, p.90–6, 2006.

CORRÊA, M. P.; PENNA, L. A. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

COS, P.; HERMANS, N.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; SINDAMBIWE, J. B.; WITVROUW, M.; DE CLERCQ, E. ; BERGHE, D. V; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Antiviral activity of Rwandan medicinal plants against human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). **Phytomedicine**, v.9, p.62-8, 2002.

COS, P.; MAES, L.; BERGHE, D. V.; HERMANS, N.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Plant Substances as Anti-HIV Agents Selected According to Their Putative Mechanism of Action. **Journal of Natural Products**, v.67, p.284-93, 2004.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v.106, p.290-302, 2006.

COS, P.; MAES, L.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L. Plant-Derived Leading Compounds for Chemotherapy of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection – An Update (1998 –2007). **Planta Medica**, v.74, p.1323-37, 2008.

CRUZ, A.S.; BARBOSA, M.L.; PINTO, T.J.A. Testes *in vitro* como alternativa aos testes *in vivo* de Draize. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.63, n.1, p.1-9, 2004.

CUNICO, W.; GOMES, C. R. B.; VELLASCO JUNIOR, W. T. HIV – recentes avanços na pesquisa de fármacos. **Química Nova**, v.31, n.8, p.2111-7, 2008.

DAI, J. R.; HALLOK, Y. F.; CARDELLINA, J. H. HIV-Inhibitory and Cytotoxic Oligostilbenes from the Leaves of *Hopea malibato*, **Journal of Natural Products**, v.61, p.351-3, 1998.

DAHL, V.; JOSEFSSON, L.; PALMER, S. HIV reservoirs, latency, and reactivation: Prospects for eradication. **Antiviral Research**, v.85, p. 286–94, 2010.

D'ANGELO, M.; GALUPPO, A. G.; GONÇALVES, R. F. Estudo comparativo da sensibilidade de culturas primárias de células epiteliais de oviduto bovino e murino ao herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69, n.4, p.19-22, 2002.

DA SILVA, A. J. M.; BUARQUE, C. D.; BRITO, F. V.; AURELIAN, L.; MACEDO, L. F.; MALKAS, L. H.; HICKEY, R. J.; LOPES, D. V. S.; NOE L, F.; MURAKAMI, Y. L. B.; SILVA, N. M. V.; MELO, P. A.; CARUSO, R. R. B.; CASTRO, N. G.; COSTA, P. R. R. Synthesis and Preliminary Pharmacological Evaluation of New ( $\pm$ ) 1,4-Naphthoquinones Structurally Related to Lapachol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.10, p.2731–8, 2002.

DA SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p.407-16, 2003.

DE ARAGÃO, P. A.; LEMOS, R. B. P.; AQUINO, M. Z.; MARQUES, H. H. S. Hyperlipidaemia – a Risk Factor for Femoral Head Osteonecrosis (Legg-Calvè-Perthes-Like Disease) in Children With AIDS: Case Report. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.6, p.142-5, 2002.

DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEVO, C.; MUNÓZ, V.; RUIZ, G.; SAUVAIN, M. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, p.91–8, 2001.

DE LIMA, F.A.; D'ANGELO, M.; DE MIRANDA, H.A.; FELBERG, S.; NISHIWAKI-DANTAS, M.C.; DANTAS, P.E.C. Cultivo primário de células epiteliais germinativas do limbo de olhos doadores. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.66, p.269-72, 2003.

DE LIMA, M. R. F.; XIMENES, E. C. P. A.; LUNA, J. S.; SANT'ANA, A. E. G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.3, p.300-6, 2006.

DE MELO, E. B.; BRUNI, A. T.; FERREIRA, M. M. C. Inibidores da HIV-integrase: potencial abordagem farmacológica para tratamento da AIDS. **Química Nova**, v.29, n.3, p.555-62, 2006.

DE OLIVEIRA, A. M.; COSTA, L. F.; DA FONSECA, C. A. A farmáco-psiquiatria e as reações adversas no uso de anti-retrovirais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.31-3, 2006.

DE SOUZA, M. V. N.; DE ALMEIDA, M. V. Drogas anti-VIH: passado, presente e perspectivas futuras. **Química Nova**, v.26, n.3, p.366-72, 2003.

DOUBLE, J. Toxicity testing in the development of anticancer drugs. **The Lancet Oncology**, v.3, p.438-9, 2002.

DUAN, H.; TAKAISHI, Y.; IMAKURA, Y.; JIA, Y.; LI, D.; COSENTINO, M.; LEE, K. H. Sesquiterpene Alkaloids from *Tripterygium hypoglaucom* and *Tripterygium wilfordii*: A New Class of Potent Anti-HIV Agents. **Journal of Natural Products**, v.63, p.357-61, 2000.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, n. 2-3, p.193-236, 2002.

- EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.18, p.1–25, 2010.
- EPSTEIN, B. J.; LITTLE, S. J.; RICHMAN, D. D. Drug-resistance among patients recently infected with HIV. **N. Engl. J. Med.**, v.347, n.6, p.1889-90, 2002.
- EYONG, K. O.; KUMAR, P. S.; KUETE, V.; FOLEFOG, G. N.; NKENGFACK, E. A.; BASKARAN, S. Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18, p.5387–90, 2008.
- FANG, E. F.; WONG, J. H.; NG, T. B. Thermostable Kunitz trypsin inhibitor with cytokine inducing, antitumor and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from Korean large black soybeans. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.109, n.3, p.211–217, 2010.
- FIELD, H. J.; BROWN, G. A. Animal models for antiviral chemotherapy. **Antiviral Research**, v.12, n.4, p.165-80, 1989.
- FLETCHER, N. F.; BRAYDEN, D. J.; BRANKIN, B.; CALLANAN, J. J. Feline immunodeficiency virus infection: A valuable model to study HIV-1 associated encephalitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.123, p.134–7, 2008.
- FONSECA, S. G. C.; BRAGA, R. M. C.; DE SANTANA, D. P. Lapachol - química, farmacologia e métodos de dosagem. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.84, n.1, p. 9-16, 2003.
- FRANKEL, A. D.; YOUNG, J. A. T. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. **Annual Review of Biochemistry**, 67, p.1-25, 1998.
- FREED, E. O. HIV-1 and the host cell: an intimate association. **TRENDS in Microbiology**, v.12, n.4, p.170-7, 2004.



FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, 5.ed, New York, John Wiley & Sons, 2005. 696p.

FUJIOKA, T.; KASHIWADA, Y.; KILKUSKIE, R. E.; COSENTINO, L. M.; BALLAS, L. M.; JIANG, J. B.; JANZEN, W. P.; CHEN, I.S.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-hiv principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-hiv activity of structurally related triterpenoids. **Journal of Natural Products**, v.57, p.243-7, 1994.

FULLER, R. W.; WESTERGAARD, C. K.; COLLINS, J. W.; CARDELLINA II, J. H.; BOYD, M. R. Vismiaphenones D-G, new prenylated benzophenones from *Vismia cayennensis*. **Journal of Natural Products**, v.62, p.67-9, 1999.

GEYID, A.; ABEBE, D.; DEBELLA, A.; MAKONNEN, Z.; ABERRA, F.; TEKA, F.; KEBEDE, T.; URGA, K.; YERSAW, K.; BIZA, T.; MARIAM, B. H.; GUTA, M. Screening of some medicinal plants of Ethiopia for their anti-microbial properties and chemical profiles. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p.421–7, 2005.

GOLAN, D. E.; ARMSTRONG, A. W.; ARMSTRONG, E. J.; TASHJIAN, A. H. **Princípios de Farmacologia: A base fisiopatológica da farmacologia**. 2 ed. Rio de Janeiro, Nova Guanabara, 2009. 952p.

GOLLAPUDI, S.; SHARMA, H. A.; AGGARWAL, S.; BYERS, L. D.; ENSLEY, H. E.; GUPTA, S. Isolation of a previously unidentified polysaccharide (MAR-10) from *Hyssop officinalis* that exhibits strong activity against human immunodeficiency virus type 1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.210, p.145-51, 1995.

GRAY, D. E.; ROBERTS, C. A.; ROTTINGHAUS, G. E.; GARRETT, H. E.; PALLARDY, S. G. Quantification of root chicoric acid in purple coneflower by near infrared reflectance spectroscopy. **Crop Science**, v.41, p.1159-61, 2001.

GROWEISS, A.; CARDELLINA, J. H.; BOYD, M. R. HIV-inhibitory prenylated xanthenes and flavones from *Maclura tinctoria*. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1537-9, 2000.

GULICK, R. M.; MCAULIFFE, V.; HOLDEN-WILTSE, J.; CRUMPACKER, C.; LIEBES, L.; STEIN, D. S.; MEEHAN, P.; HUSSEY, S.; FORCHT, J.; VALENTINE, F. T. Phase I Studies of Hypericin, the Active Compound in St. John's Wort, as an Antiretroviral Agent in HIV-Infected Adults. **Annals of Internal Medicine**, v.130, n.6, p.510-4, 1999.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**, 11.ed. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2006. 1116p.

HARADA, H.; KAMEI, Y. Selective cytotoxicity of marine algae extracts to several human leukemic cell lines. **Cytotechnology**, v. 25, n. 1-3, 1997.

HARNETT, S. M.; OOSTHUIZEN, V.; VAN DE VENTER, M. Anti-HIV activities of organic and aqueous extracts of *Sutherlandia frutescens* and *Lobostemon trigonus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.113-9, 2005.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v.5, n.7, p.294-300, 2000.

HO, J.; CHEN, C.; ROW, L. Oleanane-type triterpenes from the flowers, pith, leaves, and fruit of *Tetrapanax papyriferus*. **Phytochemistry**, v.68, p.631-5, 2007.

HOFFMANN, C.; ROCKSTROH, J. K.; KAMPS, B. S. **HIV Medicine 2007**. 15. ed. Paris, Flying Publisher, 2007. 818p.

HSIEH, P. W.; CHANG, F. R.; LEE, K. H.; HWANG, T. L.; CHANG, S. M.; WU, Y. C. A New Anti-HIV alkaloid, Drymaritin, and a new C-glycoside flavonoid, Diandraflavone, from *Drymaria diandra*. **Journal of Natural Products**, v.67, p.1175, 2004.

HUELSMANN, P. M.; RAUCH, P.; ALLERS, K.; JOHN, M. J.; METZNER, K. J. Inhibition of drug-resistant HIV-1 by RNA interference. **Antiviral Research**, v. 69, p.1–8, 2006.

HUERTA-REYES, M.; BASUALDO, M. C.; ABE, F.; JIMENEZ-ESTRADA, M.; SOLER, C.; REYES-CHILPA, R. HIV-1 Inhibitory Compounds from *Calophyllum brasiliense* Leaves. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.27, p.1471-5, 2004.

HUGHES, A.; BARBER, T.; NELSON, M. New treatment options for HIV salvage patients: An overview of second generation PIs, NNRTIs, integrase inhibitors and CCR5 antagonists. **Journal of Infection**, v.57, p.1-10, 2008.

HURAU, J. M.; INGRAND, D.; AGUT, H. Perspectives in antiviral chemotherapy. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.4, n. 4, p.357 – 72, 1990.

HUSO, D. L.; NARAYAN, O.; HART, G. W. Sialic acids on the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. **Journal of Virology**, v.62, p.1974-80, 1988.

HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD, V. U.; MIANA, G. A.; GREEN, I. R. Lapachol: an overview. **ARKIVOC** , p.145-171, 2007.

HUSSAIN, A.; WESLEY, C.; KHALID, M.; CHAUDHRY, A.; JAMEEL, S. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein interacts with CD74 and modulates major histocompatibility complex class II presentation. **Journal of Virology**, v.82, p. 893-902, 2008.

ISHIDA, J.; WANG, H. K.; OYAMA, M.; COSENTINO, M. L.; HU, C. Q.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents. 46.1 Anti-HIV activity of Harman, an anti-HIV principle from *Symplocos setchuensis*, and its derivatives. **Journal of Natural Products**, v.64, p.958-60, 2001.

JAIME, P. C.; FLORINDO, A. A.; LATORRE, M. R. D. O.; BRASIL, B. G.; DOS SANTOS, E. C. M.; SEGURADO, A. A. C. Prevalência de sobrepeso e obesidade

abdominal em indivíduos portadores de HIV/AIDS, em uso de terapia antiretroviral de alta potência. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.1, p.65-72, 2004.

JOHNSON, C. M.; HANSON, M. N.; ROHRBACH, M. S. Endothelial cell cytotoxicity of cotton bracts tannin and aqueous cotton bracts extract: Tannin is the predominant cytotoxin present in aqueous cotton bracts extract. **Environ Health Perspect**, v.66, p.97-104, 1986.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 9.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2006. 1054p.

KERN, E. R. Role of animal models in selecting antiviral combinations for clinical studies. **Antiviral Research**, v.29, p.57-9, 1995.

KHANA VI, M.; NABA VI, M.; SADATI, N.; ARDEKANI, M. S.; SOHRABIPOUR, J.; NABA VI, S. M. B.; GHAE LI, P.; OSTAD S. N. Cytotoxic activity of some marine brown algae against cancer cell lines. **Biological Research**, v.43, p. 31-7, 2010.

KIM, H. J.; WOO, E. R.; SHIN, C. G. A New Flavonol Glycoside Gallate Ester from *Acer okamotoanum* and Its Inhibitory Activity against Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) Integrase. **Journal of Natural Products**, v.61, p.145-8, 1998.

KITAMURA, K.; HONDA, M.; YOSHIZAKI, H.; YAMAMOTO, S.; NAKANE, H.; FUKUSHIMA, M.; ONO, K.; TOKUNAGA, T. Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production in vitro. **Antiviral Research**, v.37, p.131-40, 1998.

KLOS, M.; VAN DE VENTER, M.; MILNE, P. J.; TRAORE, H. N.; MEYER, D.; OOSTHUIZEN, V. *In vitro* anti-HIV activity of five selected South African medicinal plant extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, p.182-8, 2009.

LAM, T.L.; LAM, M.L.; AU, T.K.; IP, D.T.M.; NG, T.B.; FONG, W.P.; WAN, D.C.C. A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. **Life Sciences**, v.67, p.2889-96, 2000.

LAM, S.-K.; NG, T.-B. A protein with antiproliferative, antifungal and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from caper (*Capparis spinosa*) seeds. **Phytomedicine**, v.16, p.444-50, 2009.

LEE, J. S.; MIYASHIRO, H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M. Two New Triterpenes from the Rhizome of *Dryopteris crassirhizoma*, and Inhibitory Activities of Its Constituents on Human Immunodeficiency Virus-1 Protease. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, n.5, v.56, p.711-4, 2008.

LEE, J. S.; HUH, M. S.; KIM, Y. C.; HATTORI, M.; OTAKE, T. Lignan, sesquilignans and dilignans, novel HIV-1 protease and cytopathic effect inhibitors purified from the rhizomes of *Saururus chinensis*. **Antiviral Research**, v.85, p.425–8, 2010.

LEROUX, C.; CORDIER, G.; MERCIER, I.; CHASTANG, J.; LYON, M.; QUÉRAT, G.; GREENLAND, T.; VIGNE, R.; MORNEX, J. F. Ovine aortic smooth muscle cells allow the replication of visna-maedi virus in vitro. **Archives of Virology**, v.140, p.1-11, 1995.

LEWIS, A. D.; JOHNSON, P. R. Developing animal models for AIDS research - progress and problems. **Trends in Biotechnology**, v.13, n.4, p.142-50, 1995.

LIMA, N. M. F.; DOS SANTOS, A.F.; PORFIRIO, Z.; GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilótica*. **Acta Tropica**, v.83, p.43-7, 2002.

LI, Y.; SUN, X.; LAMONT, J. T.; PARDEE, A. B.; LI, C. J. Selective killing of cancer cells by  $\beta$ -lapachone: Direct checkpoint activation as a strategy against cancer. **PNAS**, v. 100, n. 5, p.2674–8, 2003.

LÜLLMANN, H.; ZIEGLER, A.; MOHR, K.; BIEGER, D. **Color Atlas of Pharmacology**, 2.ed. New York, Thieme, 2000. 386p.

MAGIATIS, P.; PRATSINIS, H.; KALPOUTZAKIS, E.; KONSTANTINIDOU, A.; DAVARIS, P.; SKALTSOUNIS, A. Hydrolyzable tannins, the active constituents of three greek *Cytinus* taxa against several tumor cell lines. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.24, n.6, 707—9, 2001.

MANGANELLI, R.E., ZACCARO, L., TOMEI, P.E. Antiviral activity in vitro of *Urtica dióica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p. 323-7, 2005.

MASTERS, J. R. W. **Animal Cell Culture. A Practical Approach**, 3.ed.London, Oxford University Press, 2000. 315p.

MARGOT, N. A.; WATERS, J. M.; MILLER, M. D. In Vitro Human Immunodeficiency Virus Type 1 Resistance Selections with Combinations of Tenofovir and Emtricitabine or Abacavir and Lamivudine Antimicrob. **Agents Chemotherapy**, v.50, p.4087-95, 2006.

MATHER, J. P.; ROBERTS, P. E. **Introduction to Cell and Tissue Culture Theory and Technique**, New York and London, Plenum Press, 1998. 314p.

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

MAYER, A. M. S.; LEHMANN, V. K. B. Marine Pharmacology in 1999: Antitumor and Cytotoxic Compounds. **Anticancer Research**, v.21, p.2489-500, 2001.

MCKEE, T.C.; FULLER, R.W.; COVINGTON, C.D.; CARDELLINA II, J.H.; GULAKOWSKI, R. J.; KREPPS, B. L.; MCMAHON, J. B.; BOYD, M. R. New pyranocoumarins isolated from *Calophyllum lanigerum* and *Calophyllum teysmannii*. **Journal of Natural Products**, v.59, p.754-8, 1996.

MEVY, J. P.; BESSIERE, J. M.; GREFF, S.; ZOMBRE, G.; VIANO, J. Composition of the volatile oil from the leaves of *Ximenia americana* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.34, p.549-53, 2006.

MIN, B. S.; KIM, Y. H.; TOMIYAMA, M.; NAKAMURA, N.; MIYASHIRO, H.; OTAKE, T.; HATTORI, M. Inhibitory effects of Korean plants on HIV-1 activities. **Phytotherapy Research**, v.15, p.481-6, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010. Departamento de DST, AIDS e hepatites virais. <http://www.aids.gov.br>, acessada em fevereiro 2010.

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

MUKHTAR, M.; ARSHAD, M.; AHMAD, M.; POMERANTZ, R. J.; WIGDAHL, B.; PARVEEN, Z. Antiviral potentials of medicinal plants. **Virus Research**, v.131, p.111-20, 2008.

NANCE, C. L. ; SIWAK, E. B.; SHEARER, W. T. Preclinical development of the green tea catechin, epigallocatechin gallate, as an HIV-1 therapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.123, p.459-65, 2009.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 4.ed. Rio de Janeiro, Editora Sarvier, 2005. 1119p.

NOTKA, F.; MEIER, G.; WAGNER, R. Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication in vitro and ex vivo. **Antiviral Research**, v.64, p.93-102, 2004.

OKANO, M.; FUKAMIYA, N.; TAGAHARA, K.; COSENTINO, M.; LEE, T. T.; MORRIS-NATSCHKE, S.; LEE, K. Anti-HIV activity of quassinoids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.6, n.6, p.701-6, 1996.

OLIVEIRA, M. M. O.; MELO, M. A.; ANDRADE, P. P.; GOMES, S. M.; CAMPOS, A. C.; NASCIMENTO, S. A.; CASTRO, R. S. *Western blot* para o diagnóstico das infecções pelos lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos: um método simples para a produção de antígeno. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.3, p.263-70, 2008.

OMER, M. E. F. A.; ELIMINA, E. I. Antimicrobial activity of *Ximenia americana*. **Fitoterapia** v.74, p.122-6, 2003.

PATIL, A. K.; FREYER, A. J.; EGGLESTON, D. S.; HALTIWANGER, R. C.; BEAN, M. F.; TAYLOR, P. B.; CARANFA, M. J.; BREEN, A. L.; BARTUS, H. R.; JOHNSON, R. K.; HERTZBERG, R. P.; WESTLEY, J. W. The Inophyllums, Novel Inhibitors of HIV- 1 Reverse Transcriptase Isolated from the Malaysian Tree, *Calophyllum inophyllum* Linn. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.36, n.26 p.4131-8, 1993.

PEÇANHA, E. P.; ANTUNES, O. A. C.; TANURI, A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. **Química Nova**, v.25, p.1108-16, 2002.

PERES, C.M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2005. 283p.

PISSINATE, K. **Atividade citotóxica de *Piper nigrum* e *Struthanthus marginatus*. Estudo preliminar da correlação entre a citotoxicidade e hidrofobicidade da piperina e derivados sintéticos**. Rio de Janeiro, 2006. 94p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

PORFÍRIO, Z.; MELO-FILHO, G. C.; ALVINO, V.; LIMA, M. R. F.; SANT´ANA, A. E. G. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.3, p. 785-9, 2009.

PORTO, M. P.; COSTA, E. A.; PAULA, J. R.; PEREIRA, K. C.; CUNHA, K. S. Avaliação tóxico-genética do extrato de *Lafoensia pacari* em células somáticas de



*Drosophila melanogaster*. 54<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Genética, Salvador- BA, p.106, 2008.

PU, J.; YANG, L.; XIAO, W.; LI, R.; LEI, C.; GAO, X.; HUANG, S.; LI, S.; ZHENG, Y.; HUANG, H.; SUN, H. Compounds from *Kadsura heteroclita* and related anti-HIV activity. **Phytochemistry**, v.69, p.1266-72, 2008.

REED, L.; MUENCH, H. A simple method for estimating fifty per points. **American Journal of Hygiene**, v.27, p.413-97, 1938.

REINKE, R. A.; LEE, D. J.; MCDUGALL, B. R.; KING, P. J.; VICTORIA, J.; MAO, Y.; LEI, X.; REINECKE, M. G.; ROBINSON JR, W. E. L-Chicoric acid inhibits human immunodeficiency virus type 1 integration in vivo and is a noncompetitive but reversible inhibitor of HIV-1 integrase in vitro. **Virology**, v.326, p.203-19, 2004.

REN, J.; NICHOLS, C.; BIRD, L.; CHAMBERLAIN, P.; WEAVER, K.; SHORT, S.; STUART, D. I.; STAMMERS, D. K. Structural Mechanisms of Drug Resistance for Mutations at Codons 181 and 188 in HIV-1 Reverse Transcriptase and the Improved Resilience of Second Generation Non-nucleoside Inhibitors. **Journal of Molecular Biology**, v.312, p.795-805, 2001.

SAKLANI, A.; KUTTY, S. K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**, v.13, p.161-71, 2008.

SALVATORI, D.; VINCENZETTI, S.; MAURY, G.; GOSSELIN, G.; GAUBERT, G., VITA, A. Maedi-visna vírus, a model for in vitro testing of potential anti-HIV drugs. **Comparative Immunology, microbiology & infectious Diseases**, v.24, p.113-22, 2001.

SALVATORI, D.; VOLPINI, R.; VINCENZETTI, S.; VITA, A.; COSTANZI, S.; LAMBERTUCCI, C.; CRISTALLI, G.; VITTORI, S. Adenine and deazaadenine nucleoside and deoxynucleoside analogues: inhibition of viral replication of sheep MVV (in vitro model for HIV) and bovine BHV-1. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.10, p.2973-80, 2002.

SÁNCHEZ-DUFFHUES, G.; CALZADO, M. A.; VINUESA, A. G.; CABALLERO, F. J.; ECH-CHAHAD, A.; APPENDINO, G.; KROHN, K.; FIEBICH, B. L.; MUÑOZ, E. Denbinobin, a naturally occurring 1,4-phenanthrenequinone, inhibits HIV-1 replication through an NF-κB-dependent pathway. **Biochemical Pharmacology**, v.76, p.1240-50, 2008.

SIERRA, S.; KUPFER, B.; KAISER, R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication **Journal of Clinical Virology**, v.34, p.233-44, 2005.

SIGURDSSON, B.; THORMAR, H.; PALSSON, P.A. Cultivation of visna virus in tissue culture. **Archives of Virology**, v.10, n.3, p.368-81, 1960.

SILVA, I. T.; COSTA, G. M.; STOCO, P. H.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H.; SIMÕES, C. M. O. In vitro antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in Applied Microbiology**, p.1-6, 14 de maio, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **FARMACOGNOSIA. Da planta ao medicamento**, 6.ed. Porto Alegre, Editora UFRGS, 2007. 1104p.

SOLON, S.; LOPES, L.; DE SOUSA JR, P. T.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, p.173–8, 2000.

SONIGO, P.; ALIZON, M.; STASKUS, K. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: Relationship to the AIDS virus. **Cell**, v.42, p.369-82, 1985.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. In: **Current Protocols in Immunology**. New York: John Wiley & Sons, 1997: A.3B,1–A.3B.2.

SUZUKI, Y.; CRAIGIE, R. The road to chromatin — nuclear entry of retroviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p.187-96, 2007.

TANAKA, N.; OKASAKA, M.; ISHIMARU, Y.; TAKAISHI, Y.; SATO, M.; OKAMOTO, M.; OSHIKAWA, T.; AHMED, S. U.; CONSENTINO, L. M.; LEE, K. H. Biyouyanagin A, an Anti-HIV Agent from *Hypericum chinense* L. var. *salicifolium*. **Organic Letters**, v.7, p.2997-9, 2005.

TEWTRAKUL, S.; ITHARAT, A.; RATTANASUWAN, P. Anti-HIV-1 protease- and HIV-1 integrase activities of Thai medicinal plants known as Hua-Khao-Yen. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p.312-5, 2006.

THORMAR, H.; BALZARINI, J.; DEBYSER, Z.; WITVROUW, M.; DESMYTER, J.; DE CLERCQ, E. Inhibition of visna virus replication and cytopathic effect in sheep choroid plexus cell cultures by selected anti-HIV agents. **Antiviral Research**, v.27, p.49-57, 1995.

THORMAR, H. Maedi-Visna Virus and its Relationship to Human Immunodeficiency Virus. **AIDS Reviews**, v.7, p.233-45, 2005.

TIAN, R. R.; CHEN, J. C.; ZHANG, G. H.; QIU, M. H.; WANG, Y. H.; DU, L.; SHEN, X.; LIU, N. F.; ZHENG, Y. T. Anti-HIV-1 Activities of Hemslecins A and B. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v.6, p.214-8, 2008.

TILTON, J. C.; DOMS, R. W. Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. **Antiviral Research**, v.85, p.91–100, 2010.

TOBIN, G. J.; ENNIS, W. H.; CLANTON, D. J.; GONDA, M. A. Inhibition of bovine immunodeficiency virus by anti-HIV-1 compounds in a cell culture-based assay. **Antiviral Research**, v.33, p.21–31, 1996.

TORO, C.; AMOR, A.; SORIANO, V. Diagnóstico de las infecciones por subtipos no B del VIH-1 y por VIH-2. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 26 Supl 13, p.66-70, 2008.

TSHIKALANGE, T. E.; MEYER, J. J. M.; LALL, N.; MUÑOZ, E.; SANCHO, R.; VAN DE VENTER, M.; OOSTHUIZEN, V. *In vitro* anti-HIV-1 properties of ethnobotanically

selected South African plants used in the treatment of sexually transmitted diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.478-81, 2008.

TURRIZIANI, O.; ANTONELLI, G.; DIANZANI, F. Cellular factors involved in the induction of resistance of HIV to antiretroviral agents. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, p.353-6, 2000.

UCHÔA, V. T.; DE PAULA, R. C.; KRETTLI, L. G.; SANT'ANA, A. E. G.; KRETTLI, A. U. Antimalarial Activity of Compounds and Mixed Fractions of Cecropia pachystachya. **Drug Development Research**, v.71, p.82–91, 2010.

UKELIS, U.; KRAMER, P.; OLEJNICZAK, K.; MUELLER, S.O. Replacement of in vivo acute oral toxicity studies by in vitro cytotoxicity methods: Opportunities, limits and regulatory status. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.51, p.108–18, 2008.

UNAIDS, 2010  
<http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/2008/>, acessada em fevereiro 2010.

VAISHNAV, Y. N.; WONG-STAAAL, F. The biochemistry of AIDS. **Annual Review of Biochemistry**, v.60, p.577-630, 1991.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL<sub>50</sub>”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.93-8, 2006.

VAN ROMPAY, K. K. A. Evaluation of antiretrovirals in animal models of HIV infection. **Antiviral Research**, v.85, p.159–75, 2010.

VIRGINIO, C. G.; TEIXEIRA, M. F. S. Uso de células de linhagem TIGEF para cultivo e produção de lentivírus ovino. **Ciência Animal**, v.14, n.2, p.69-75, 2004.

VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. A. V. Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v.32, p.141-53, 1991.

VLIETINCK, A. J.; DE BRUYNE, T.; VANDEN BERGHE, D.A. Plant substances as antiviral agents. **Current Organic Chemistry**, v.1, n.4, p. 307-344, 1997.

WANG, R.; GU, Q.; YANG, L.; CHEN, J.; LI, S.; ZHENG, Y. Anti-HIV-1 activities of extracts from the medicinal plant *Rhus chinensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p.269-73, 2006.

WANG, X.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, K. H. New Developments in the Chemistry and Biology of the Bioactive Constituents of Tanshen. **Medicinal Research Reviews**, v. 27, n.1, p.133-48, 2007.

WARNKE, D.; BARRETO, J.; TEMESGEN, Z. Antiretroviral Drugs. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 47, p.1570-9, 2007.

WEI, Y.; MA, C.; CHEN, D.; HATTORI, M. Anti-HIV-1 protease triterpenoids from *Stauntonia obovatifoliola* Hayata subsp. *Intermedia*. **Phytochemistry**, v.69, p.1875-9, 2008.

WEI, Y.; MA, C.; HATTORI, M. Anti-HIV protease triterpenoids from the acid hydrolysate of *Panax ginseng*. **Phytochemistry Letters**, v.2, p.63-6, 2009.

WEISENTHAL, L. M.; MARSDEN, J. A. ; DILL, P. L.; MACALUSO, C. K. A Novel Dye Exclusion Method for Testing *in Vitro* Chemosensitivity of Human Tumors 1. **Cancer Research**, v.43, p.749-57, 1983.

WILLET, B. J.; FLYNN, N.; HOSIE, M. J. FIV infection of the domestic cat: an animal models for AIDS. **Immunology Today**, v.18, n.4, p.182-9, 1997.

WILLIAMSON, M. P.; MCCORMICK, T. G.; NANCE, C. L.; SHEARER, W. T. Epigallocatechin gallate, the main polyphenol in green tea, binds to the T-cell

receptor, CD4: Potential for HIV-1 therapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**; v.118, p.1369-74, 2006.

WORADULAYAPINIJ, W.; SOONTHORNCHAREONNON, N.; WIWAT, C. In vitro HIV type 1 reverse transcriptase inhibitory activities of Thai medicinal plants and *Canna indica* L. rhizomes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.101, p.84-9, 2005.

WU, J.; WANG, X.; YI, Y.; LEE, K. Anti-AIDS Agents 54. A Potent Anti-HIV Chalcone and Flavonoids from Genus *Desmos*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.13, p.1813-5, 2003.

XU, Z.; CHANG, F. R.; WANG, H. K.; KASHIWADA, Y.; MCPHAIL, A. T.; BASTOW, K. F.; TACHIBANA, Y.; COSENTINO, M.; LEE, K. H. Anti-HIV agents 451 and antitumor agents 205.2 Two new sesquiterpenes, Leitneridanins A and B, and the cytotoxic and anti-HIV principles from *Leitneria floridana*. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1712-5, 2000.

YANG, S. S.; CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; BADER, J. P. Natural Product-Based Anti-HIV Drug Discovery and Development Facilitated by the NCI Developmental Therapeutics Program. **Journal of Natural Products**, v.64, p.265-77, 2001.

YANG, X.; KURTEVA, S.; REN, X.; LEE, S.; SODROSKI, J. Stoichiometry of envelope glycoprotein trimers in the entry of Human immunodeficiency virus type 1. **Journal of Virology**, v.79, n.19, p.12132-47, 2005.

YU, D.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, K. H. New Developments in Natural Products-Based Anti-AIDS Research. **Medicinal Research Reviews**, v.27, p.108-32, 2007.

ZHANG, H.; TAN, G. T.; HOANG, V. D.; HUNG, N. V.; CUONG, N. M.; SOEJARTO, D. D.; PEZZUTO, J. M.; FONG, H. H. S. Natural anti-HIV agents. Part 3: Litseaverticillols A–H, novel sesquiterpenes from *Litsea verticillata*. **Tetrahedron**, v.59, p.141–8, 2003.

ZHOU, P.; TAKAISHI, Y.; DUAN, H. Coumarins and bicoumarin from *Ferula sumbul*: anti-HIV activity and inhibition of cytokine release. **Phytochemistry**, v.53, p.689-97, 2000.

## 7. GLOSSÁRIO

**Antirretrovirais:** medicamentos usados para tratar infecções causadas por retrovírus como o HIV.

**Citotoxicidade:** toxicidade celular; dano de uma ou mais vias metabólicas, estruturas ou processos intracelulares resultando em perda da função, mas não necessariamente perda da viabilidade.

**Confluência:** quando em uma monocamada de células, todas as células estão em contato com as células à sua volta e recobrem todo o substrato disponível (ex. garrafa de cultura).

**Cultivo primário:** cultivo que começa com órgãos, tecidos ou células retirados diretamente de um organismo e antes do primeiro subcultivo.

**Cultura celular:** crescimento de células *in vitro* separadas do tecido parental.

**Efeito citopático (ECP):** alterações morfológicas provocadas por um vírus nas células onde ele se multiplica. A maioria dos vírus provoca modificações celulares específicas e fáceis de observar ao microscópio.

**Explante:** fragmento de tecido transplantado do seu local original e mantido em um meio artificial.

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

**Linhagem celular:** uma cultura propagada depois do primeiro subcultivo.

**Número de passagem:** o número de vezes em que a cultura foi subcultivada.



**Passagem:** transferência ou subcultivo de células de um frasco de cultivo para outro. Normalmente envolve a subdivisão de uma população de células em proliferação, permitindo a propagação de uma linhagem celular.

**Subconfluência:** menos que confluência; quando o substrato não foi todo coberto.

**Subcultivo:** ver passagem.

**Título:** é o número de partículas virais infecciosas por unidade de volume.

**Tripsinização:** separação de uma população de células em divisão pela ação da enzima tripsina.

**Unidade infecciosa:** é a menor quantidade de vírus que produz algum efeito reconhecível na célula hospedeira.

**Vírião:** partícula viral infecciosa

*Modificado de Fresney, 2005.*