

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE NEUROIMUNOLOGIA**

VALÉRIA GARRIDO MARTINS

**Avaliação da Toxicidade de Substâncias Antivirais
Derivadas de Algas Marinhas e Substâncias Sintéticas em
Camundongos BALB/c**

Orientadoras: Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão
Gerlinde Agate Platais Brasil Teixeira

NITERÓI
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

VALÉRIA GARRIDO MARTINS

Avaliação da Toxicidade de Substâncias Antivirais
Derivadas de Algas Marinhas e Substâncias Sintéticas em
Camundongos BALB/c

Dissertação de mestrado submetida a
Universidade Federal Fluminense como
requisito parcial para obtenção de grau de
mestre em Neuroimunologia.

Orientadoras: Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão
Gerlinde Agate Platais Brasil Teixeira

NITERÓI
2009

M386 Martins, Valéria Garrido

Avaliação da Toxicidade de Substâncias Antivirais Derivadas de Algas Marinhas e Substâncias Sintéticas em Camundongos BALB/c/Valéria Garrido. – Niterói: [s.n.], 2009.
113f.

Dissertação – (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, 2009.

1.Alga marinha. 2. Toxicidade.

3.Antiviral. 4.Camundongo BALB/c. I.Título.

CDD: 589.3

VALÉRIA GARRIDO MARTINS

Avaliação da Toxicidade de Substâncias Antivirais
Derivadas de Algas Marinhas e Substâncias Sintéticas
em Camundongos BALB/c.

Dissertação de mestrado submetida à Universidade
Federal Fluminense como requisito parcial para
obtenção de grau de mestre em Neuroimunologia.

Niterói, 11 de Março de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Valéria Laneuville Teixeira
UFF

Dra. Lídia Maria da Fonte de Amorim
UFF

Dr. Marcelo Alves Pinto
FIOCRUZ-RJ

REVISORA E SUPLENTE

Dra. Elizabeth Giestal de Araujo
UFF

O segredo é não correr atrás das borboletas;
É cuidar do jardim para que elas venham até você.

(Mario Quintana)

Dedico esse trabalho a minha família,
mãe e irmã, e ao mundo.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi adiante graças, a ajuda de muitas pessoas nos meus momentos de dificuldades, tanto pessoais como operacionais. Caso eu tenha esquecido alguém que me perdoe.

- Em primeiro lugar quero agradecer a minha família, principalmente a minha mãe Léa, minha irmã Claudia e minha tia Dulce, que sempre me deram incentivo nessa altura da vida em recomeçar e aprender coisas novas.
- Às minhas orientadoras, Prof^a Izabel Paixão e a Prof^a Gerlinde Teixeira por me aceitarem como sua orientanda e por acreditarem que eu fosse até o final.
- Ao Cosmo e aos Mestres espirituais por me darem a intuição de fazer a coisa certa.
- À equipe do GIG do Departamento de Imunobiologia: Monique Pedruzzi, Sylvia Campos, Patrícia Olaya, Danielle Antunes, Mônica Bisso, Mônica Dalmacio, andréa Patti e Adriana Oliveira e nossa mascote Priscila Santos da Silva, por estarem sempre dispostas a ajudar com a manipulação dos animais, orientarem-me nas apresentações e pelo carinho em compartilhar.
- À Prof^a Valéria L. Teixeira e sua equipe por me ajudarem a adquirir as substâncias e por me darem a atenção sempre que eu precisei.
- À Prof^a Elizabeth Giestel por sua calma e tolerância em compreender as minhas limitações em alguns processos desse programa e da paciência em revisar esse trabalho.
- Ao Irajá Pinheiro dos Santos do Instituto Médico Legal do RJ (IMLAP) que me ajudou no processamento histológico do meu material que foi imprescindível para essa pesquisa.
- A Dra. Ângela Christina Estalote por me orientar nas leituras dos artigos para meu entendimento de uma coisa nova e pela sua amizade.

- Ao Dr. Canaã do Hospital Antonio Pedro pela sua atenção e disponibilizar, no início dos meus testes, de seu laboratório e me instruir sobre alguns métodos.
- A Dra. Denise Finamore e a Dra. Cléire O. Freitas e equipe da Maternidade Escola da UFRJ por me cederem o espaço para uso do equipamento de hematologia, bioquímica para proceder alguns testes.
- A Dra. Andréa Pires (UFF) e Dra. Patrícia Ocampo (FIOCRUZ) por doarem algum tempo em me ajudar na interpretação das lâminas de histologia.
- Ao Prof. Mauricio Verícimo pela sua boa vontade em me ajudar no procedimento final do meu trabalho.
- A Juliana Eymara e a Prof^a. Viveca Giongo e ao grupo pela colaboração nos procedimentos novos para mim.
- As pessoas do meu trabalho por serem compreensivas pelo meu cansaço e pouca produção.
- Aos meus animais de estimação, principalmente, ao meu cão Zargus em se apresentar com seu bom humor fosse a que humor eu estivesse.
- Finalizando, agradeço a Deus por situar o planeta Saturno no meu mapa sendo de grande relevância para a realização de mais essa etapa acadêmica na minha vida.
- Aos Órgãos de Fomento CNPq, CAPES, PROPP e FAPERJ.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	xii
Lista de tabelas.....	xvii
ABREVIATURAS.....	xx
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO LITERÁRIA.....	6
2.1 Estudos antivirais.....	6
2.2 Estudo toxicológico.....	8
2.2.1 Toxicidade.....	8
2.2.2 Toxicologia.....	8
2.3 Produtos Naturais e Sintéticos.....	10
2.3.1 Produtos Naturais.....	10
2.3.2 Produtos Sintéticos.....	15
1.1.1 DMSO.....	16
2.4 – Agentes Virais.....	17
2.4.1 Vírus HIV-1 e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).....	18
2.4.2 Agentes antirretrovirais.....	19
2.4.3 Herpes Simples.....	20
2.4.4 Sinergia viral (HIV-1 e HSV).....	25
2.5 Apoptose.....	26
2.5.1 Receptores de membrana:.....	27
2.5.2 Formação de espécies de oxigênio reativas (EROS).....	28

2.5.3	Família Bcl-2.....	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Específicos.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	Substâncias naturais de algas marinhas e Substâncias sintéticas	32
4.1.1	. Substâncias Naturais	32
4.1.2	Substâncias Sintéticas.	33
4.2	Células (estudos <i>in vitro</i>).....	35
4.2.1	Citotoxicidade Celular	35
4.2.2	Avaliação da atividade anti-HSV-1 (Determinação do EC50).....	36
4.2.3	Avaliação da atividade anti-HIV-1	36
4.3	Animais	36
4.3.1	Camundongos (<i>Mus musculus</i>)	36
4.3.2	Ratos (<i>Rattus norvegicus</i>).....	37
4.3.3	Sangria (Sg).....	38
4.3.4	Análises Bioquímicas.....	38
4.3.5	Técnica Histológica.....	39
4.4	Análise Estatística	41
4.5	Avaliação da Toxicidade Aguda dos Derivados em Camundongos	41
4.5.1	Protocolo I – DMSO (Veículo das substâncias)	42
4.5.2	Protocolo II – Protocolo Experimental	42
4.5.3	Protocolo III – Triol, Citral, Triazol	42
4.5.4	Protocolo IV – Investigação da dosagem limite da letalidade- Triol.....	43
4.5.5	Protocolo V – Triol usando o DMSO a 50% e 60%	43
4.5.6	Protocolo VI – Triazol	43
4.5.7	Protocolo VII – 20 mais a dosagem terapêutica do Triol	44
4.5.8	Protocolo VIII – Dolabellano-1 (DB-1).....	44
4.5.9	Protocolo IX – Tienopiridina	44
4.5.10	Protocolo X – TRIOL 50	45
4.5.11	Protocolo XI – Aciclovir (ACV).....	45
4.5.12	Protocolo XII – Toxicidade subcrônica	45
4.5.13	Síntese dos Protocolos	46
4.6	Avaliação de apoptose por fragmentação do DNA	46

5	RESULTADOS.....	48
5.1	Avaliação da Citotoxicidade e Ensaio da atividade antiviral.....	48
5.2	Avaliação da Toxicidade utilizando animais experimentais: camundongos (C57BL/6 e BALB/c) e ratos (Wistar).....	49
5.2.1	Análises experimentais em Camundongos.....	49
5.2.2	Análise bioquímica sanguínea (sangria zero).....	49
5.2.3	Análise histológica dos animais controle.....	50
5.2.4	PROTOCOLO I – DMSO 20%, 40% E 50%.....	51
5.2.5	PROTOCOLO II – EXPERIMENTAL (TRIOI, Da-1).....	56
5.2.6	PROTOCOLO III – Triol, Citral, Triazol – Análises bioquímicas e histológicas.....	60
5.2.7	PROTOCOLO IV – Triol (15 mg/Kg, 20 mg/Kg, 25 mg/Kg).....	68
5.2.8	PROTOCOLO V – TRIOI DL – (25 mg/Kg diluídas em DMSO 60% e 50%).....	71
5.3	PROTOCOLO VI - TRIAZOL.....	72
5.3.1	Triazol (1) – NHTRIOH e Triazol (2) – NFTRIOH.....	74
5.4	PROTOCOLO VII – TRIOI (20X dose terapêutica) – 50 mg/Kg.....	77
5.5	PROTOCOLO VIII – Dolabellano-1 (DB-1).....	78
5.6	PROTOCOLO IX – Tienopiridina.....	80
5.7	PROTOCOLO X – TRIOI 50.....	82
5.8	PROTOCOLO XI – Aciclovir.....	85
5.9	PROTOCOLO XII – Toxicidade Subcrônica.....	88
5.10	Avaliação de apoptose por fragmentação do DNA.....	95
6	DISCUSSÃO.....	97
7	CONCLUSÃO.....	103
8	PERSPECTIVAS.....	105
9	BIBLIOGRAFIA.....	106
10	ANEXOS.....	111

Lista de figuras

Figura 1- Exemplo de um esquema resumido do ciclo de replicação viral do HIV	7
Figura 2 – Esquema demonstrando os três elementos básicos no complexo sistema que envolve intoxicação	9
Figura 3 – A) Alga <i>Dicyota pfaffii</i> ; B – Estrutura molecular do TRIOL	13
Figura 4 – A - Alga - <i>Dictyota menstrualis</i> ; B- Esquema da alga <i>Dictyota menstrualis</i>	13
Figura 5 – Estrutura molecular A - Da-1; e B - Acetato natural	14
Figura 6 - Localização geográfica onde são encontradas as algas <i>D. pfaffii</i> e <i>D. menstrualis</i> no Brasil	14
Figura 7 – Estrutura molecular do Citral a) α -citral e b) β -citral	15
Figura 8 – Aciclovir	16
Figura 9 – Estrutura e genoma do HIV- a – vírus; b- Genoma	18
Figura 10- a-Eletromicrografia do HSV-1; b- Ciclo do vírus do Herpes simples	21
Figura 11 - Diagrama representativo da estrutura do genoma do HSV-1.....	21
Figura 12 – Mecanismo de ação de drogas antivirais no HSV	25
Figura 13 – Efeito da infecção por HSV/replicação, aquisição e transmissão do HIV-1	26
Figura 14- Vias de ativação de apoptose	27
Figura 15 - Estrutura química da purificação da alga <i>Dictyota pfaffii</i> – Dolabellanotriol	32
Figura 16 – Estrutura química da substância purificada da alga <i>Dictyota menstrualis</i> - Da-1.....	33

Figura 17 – Estrutura química dos três radicais H, F e Br do Triazol sintetizados.....	33
Figura 18 – Estrutura química da substância Citral	34
Figura 19- Estrutura química da substância Aciclovir.....	34
Figura 20 – a - Fígado; b - Rim.....	50
Figura 21- a – Duodeno; b- Trato gastro-intestinal.....	51
Figura 22- Os resultados obtidos da análise do ácido úrico para DMSO 20% e 40%	52
Figura 23- Os resultados obtidos da TGP/ALT para DMSO 20% e 40%	53
Figura 24– Os resultados obtidos das análises de ureia e ácido úrico para o DMSO 50%.....	53
Figura 25- Os resultados obtidos da TGP/ALT para o DMSO 50%	53
Figura 26- Órgãos dos animais administrados com DMSO 1%. a – Fígado; b – Rim	54
Figura 27- Órgãos dos animais administrados com DMSO 20% e 40% - a- Fígado; b – Rim	55
Figura 28- Órgãos dos animais administrados com DMSO 20% - a – Estômago; b – duodeno	55
Figura 29- Órgãos dos animais administrados com DMSO 50%. a – Fígado; b – Rim	55
Figura 30- Fígado- Triol (ip) - a ♀; b ♂	57
Figura 31- Rim– Triol (ip) - a ♀; b ♂	58
Figura 32- Triol (sc) – a ♂ - Fígado; b ♂ - Rim	58
Figura 33– Fígado - Da-1 (ip) – a ♀; b ♂	59
Figura 34– Rim – Da-1 (ip) - a ♀.; b ♂	59
Figura 35– Fígado - Da-1 (sc) ♀♂ – a; b - Rim ♀♂.....	59
Figura 36– Dados da análise de Glicose (BALB/c-Triol).....	61
Figura 37- Na análise da ureia (BALB/c – Triol)	62
Figura 38- Dados da análise de Glicose (C57BL/6-Triol).....	62
Figura 39- Dados da análise de ureia (C57BL/6-Triol).	63
Figura 40- Dados da análise de Glicose (C57BL/6- Citral).....	64
Figura 41- Dados na análise da ureia (C57BL/6-Citral)	64

Figura 42– Dados de análise de Glicose (C57BL/6-Triazol).....	64
Figura 43 – Dados da análise de ureia (C57BL/6-Triazol).....	65
Figura 44 – Órgãos de animais administrados via sc e ip com Triol (15 mg/Kg). a - Fígado; b- Rim	66
Figura 45 – Órgãos de animais administrados via sc com Triazol (15 mg/Kg). a– Fígado; b- Rim.	66
Figura 46 – Órgãos de animais administrados via ip com Triazol (15 mg/Kg). a– Fígado; b – Rim..	67
Figura 47 – Órgãos de animais administrados via sc com Citral (15 mg/Kg). a – Fígado; b – Rim.	67
Figura 48 – Órgãos de animais administrados via ip com Citral (15 mg/Kg). a – Fígado; b – Rim .	68
Figura 49 – Resultados na análise de glicose pelo Triol (20 mg/Kg).....	69
Figura 50 – Resultados nas análises de ureia e ácido úrico do Triol (25 mg/Kg)	70
Figura 51 – Resultados da análise para TGP/ALT do Triol (15 mg/Kg e 20 mg/Kg).....	70
Figura 52- Órgãos de animais administrados via ip pelo Triol (15 mg/Kg, 20 mg/Kg e 25 mg/Kg). a – Fígado-; b- Rim -.....	71
Figura 53- Resultados nas análises do ácido úrico e TGP/ALT (25 mg/Kg) diluído em DMSO 50%.	72
Figura 54- Dados nas análises de ácido úrico e TGP/ATL para o Triazol (1) NHTRIOH e (2) NFTHRIOH com a concentração de 25 mg/K.....	74
Figura 55 – Dados nas análises de ureia e ácido úrico para o Triazol (3)- NBrTRIOH.....	74
Figura 56- Dados na análise da TGP para o Triazol (3)- NBrTRIOH.....	75
Figura 57- Órgãos dos animais administrados com Triazol (1) (25 mg/Kg). a - Fígado; b – Rim....	76
Figura 58 –Órgãos dos animais administrados com Triazol(2) (25 mg/Kg). a – Fígado; b – Rim ..	76
Figura 59 – Órgãos dos animais administrados com Triazol (3) (25 mg/Kg). a – Fígado; b- Rim ...	76
Figura 60 – Órgãos dos animais administrados com Triazol(3) (25 mg/Kg). a – Duodeno; b– Estômago.....	77

Figura 61- Dados das análises de ureia e TGP/ALT para substância Triol (20 X).....	78
Figura 62– Resultados da análise de TGP/ALT na substância DB-1	79
Figura 63– Órgãos dos animais administrados com DB-1(25 mg/Kg). a – Fígado; b- Rim	79
Figura 64 – Órgãos dos animais administrados com DB-1 (25 mg/Kg). a- Duodeno; b- Estômago -	80
Figura 65- Resultado das análises de glicose (a) e ureia (b) com a substância Tienopiridina (25 mg/Kg)	81
Figura 66- Resultados das análises de ácido úrico e TGP/ALT para a substância Tienopiridina (25 mg/Kg).	81
Figura 67 – Órgãos dos animais administrados com Tienopiridina (25 mg/Kg). a- Fígado; b – Rim -.	82
Figura 68 – Órgãos doa animais administrados com Tienopiridina (25 mg/Kg).a – Duodeno; b Estômago.....	82
Figura 69- Dados referente ao peso dos animais	83
Figura 70- Dados das análises da ureia e TGP/ALT pela substância Triol (50 mg/Kg).....	84
Figura 71– Resultados da análise do ácido úrico pela substância Triol (50 mg/Kg).....	84
Figura 72- Órgãos dos animais administrados com Triol (50 mg/Kg). a – Fígado; b – Rim	85
Figura 73- Resultado do peso dos animais antes da administração (AI) e depois da administração (DI) em 10 dias da substância aciclovir	85
Figura 74- Dados das análises de ureia e ácido úrico para o aciclovir (50 mg/Kg).....	87
Figura 75 – Órgãos dos animais administrados com aciclovir (50 mg/Kg). – a – Fígado; b- rim	87
Figura 76 – Órgão dos animais administrados com Aciclovir (50 mg/Kg). a – Estômago.	88
Figura 77- Os dados da média do peso dos animais, machos e fêmeas para o TRIOL na dosagem de 20 mg/Kg.....	89

Figura 78– Os dados da média do peso dos animais, machos e fêmeas, para o Triol na dosagem de 40 mg/Kg.....	89
Figura 79 – Os dados da média do peso dos animais, machos e fêmeas, para o DMSO 1%	90
Figura 80 – Dados da análise hematológica dos ratos Wistar (machos e fêmeas).....	90
Figura 81-- Dados das análises de ureia nos ratos Wistar (machos e fêmeas) para Triol na dosagem de 20 mg/Kg.....	92
Figura 82- Dados das análises de ureia nos ratos Wistar (machos e fêmeas) para Triol na dosagem de 40 mg/Kg.....	93
Figura 83- Dados das análises de ureia nos ratos Wistar (machos e fêmeas) para DMSO 1%.	93
Figura 84- Dados das análises da TGP/ALT nos ratos Wistar (machos e fêmeas) para Triol na dosagem de 20 mg/Kg	93
Figura 85– Dados das análises TGP/ALT para o Triol na dosagem de 40 mg/Kg.....	94
Figura 86– Dados das análises TGP/ALT para DMSO 1%.....	94
Figura 87– Dados das análises das Proteínas Totais nos ratos Wistar (machos e fêmeas) para Triol na dosagem de 20 mg/Kg.....	94
Figura 88 – Dados das análises das Proteínas Totais nos ratos Wistar (machos e fêmeas) para Triol na dosagem de 40 mg/Kg.....	95
Figura 89 – Resultados das análises das Proteínas Totais nos ratos Wistar (machos e fêmeas) para DMSO 1%.....	95
Figura 90– Foto do teste de apoptose por fragmentação de DNA	96
Figura 91– Foto do teste de apoptose por fragmentação de DNA	96

Lista de tabelas

TABELA 1 – Relação das substâncias anti-retrovirais usadas no mercado e seus respectivos alvos para HIV-1	20
TABELA 2 – Valores em URF/ml das cinco diluições do padrão do kit de TGP.....	39
TABELA 3 - DL ₅₀ na concentração de 20 mg/Kg das substâncias Da-1 e Triol	42
TABELA 4 - Três substâncias usadas em duas linhagens de animais divididos em quatro grupos ..	43
TABELA 5 – Protocolos de experimentos com todas as substâncias, linhagens de animais, a concentração do DMSO	46
TABELA 6 – Valores referentes às substâncias pesquisadas no qual foram encontrados CC ₅₀ e o percentual de inibição da replicação dos vírus HIV-1	48
TABELA 7- Valores de referência obtidos pela sangria zero	49
TABELA 8- Valores das médias das concentrações e desvio padrão nos parâmetros de ureia, ácido úrico e TPG/ALT analisadas na substância DMSO em 20%, 40% e 50%.	51
TABELA 9 – Valores estatísticos de significância nos parâmetros de ureia, ácido úrico e TGP/ALT para DMSO 20%, 40% e 50%.	52
TABELA 10– Relação das substâncias DMSO 0,1%, TRIOL, Da-1.....	56
TABELA 11- Resultados das concentrações, desvio padrão e significância (p) de glicose e ureia nos animais (C57BL/6 e BALB/c) administrados pelas substâncias Triol, Citral e Triazol.	61
TABELA 12 – Análises bioquímicas nos soros dos animais administrados pelo Triol nas concentrações 15 mg/Kg, 20 mg/Kg e 25 mg/Kg pela via ip, usando a média ±DP e significância (p) nos parâmetros de glicose e ureia.	68

TABELA 13- Análises bioquímicas nos soros dos animais administrados pelo Triol nas concentrações 15 mg/Kg, 20 mg/Kg e 25 mg/Kg pela via ip, usando a média \pm DP e significância (p) nos parâmetros de ácido úrico e TGP/ALT	69
TABELA 14- Resultados das concentrações pelos parâmetros bioquímicos no soro dos camundongos BALB/c administrados pelo Triol (25 mg/Kg com DMSO 50%).....	71
TABELA 15- Análise da média das concentrações entre as sangrias dos parâmetros utilizados camundongos BALB/c administrados pelos tipos de Triazol (NHTRIOH), Triazol (NFTRIOH) na concentração de 25 mg/Kg, pela via sc.....	72
TABELA 16 – Testes de ureia e ácido urico analisados pela média, desvio padrão e significância (p) das sangrias nos soros de camundongos BALB/c administrado pelo tipo de Triazol (NBrTRIOH) na concentração de 25 mg/Kg pela via sc.	73
TABELA 17- Teste de TGP/ALT analisados pela média, desvio padrão e significância (p) das sangrias nos soros de camundongos BALB/c administrado pelo tipo de Triazol (NBrTRIOH) na concentração de 25 mg/Kg pela via sc.....	73
TABELA 18 – Análises das variações das médias das concentrações das sangrias pela substância Triol (50 mg/Kg) pela via sc nos soros dos camundongos BALB/c para os parâmetros de ureia e TGP/ALT com a significância (p).	77
TABELA 19 – Teste de TGP analisado em soro de camundongos BALB/c administrados pela substância DB-1 (substância derivada da <i>Dictyota paffii</i>) – 25 mg/Kg via sc.....	78
TABELA 20 – Dados das médias, desvio padrão e significância (p), nas análises bioquímicas, glicose e ureia, nas amostras dos camundongos BALB/c administrados pela substância Tienopiridina (25 mg/Kg) pela via sc.	80
TABELA 21 - Dados das médias, desvio padrão e significância (p), nas análises bioquímicas, ácido úrico e TGP/ALT, nas amostras dos camundongos BALB/c administrados pela substância Tienopiridina (25 mg/Kg) pela via sc.	80

TABELA 22 – Dados das médias, desvio padrão e significância (p) das concentrações bioquímicas na ureia e ácido úrico nas amostras administradas pelo Triol (50 mg/Kg) via sc em camundongos BALB/c.....	83
TABELA 23 - Dados das médias, desvio padrão e significância (p) das concentrações bioquímicas pela TGP/ALT nas amostras administradas pelo Triol (50 mg/Kg) via sc em camundongos BALB/c.	83
TABELA 24 – Análises das concentrações pela média, desvio padrão e significância (p) nos soros dos BALB/c administrados pelo aciclovir (50 mg/Kg) pela via sc, mostrando variações significativas para ureia, ácido úrico.....	86
TABELA 25 - Análises da concentração pela média, desvio padrão e significância (p) nos soros dos BALB/c administrados pelo aciclovir (50 mg/Kg) pela via sc, mostrando variações significativas TPG/ALT.	86
TABELA 26 – Resultado da média das concentrações encontradas na análise hematológica das amostras de sangue dos ratos Wistar administra por via oral.	90
TABELA 27 – Dados dos parâmetros de ureia e TGP/ALT mostrando as médias, desvios padrão e significância (p) das concentrações das amostras dos ratos Wistar administradas por via oral.	91
TABELA 28- Dados do parâmetro das Proteínas Totais, mostrando as médias, desvios padrão e significância (p) das concentrações das amostras dos ratos Wistar administradas por via oral.	91

ABREVIATURAS

♀	Femea
♂	Macho
AU	Ácido úrico;
CEPA	Comitê de Ética de Pesquisas com animais
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DB-1	Dolabelano-1
DD	Domínio de morte
DL ₅₀	Dose Letal em 50%
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DR	Dose Resposta
Fc	Fator de calibração
HCl	Ácido Clorídrico
HVEM	Herpesvirus entry mediator
Ip	Intraperitoneal
MOI	Multiplicidade de infecção
MTT	Redução Mitocondrial do sal de titrazolium
NAL	Núcleo de Animais de Laboratório
NGF	Fator de Crescimento Neuronal
PBS	Tampão de fosfato
Sc	Subcutânea
SDS	Duocil Sulfato de Sódio
SFB	Soro fetal bovino
TGP/ALT	Transaminase glutâmico pirúvico/ Alanina Transferase
TR	Transcriptase Reversa
TRIOL	Dolabellanodieno
URF	Unidade de Referência
Vo	via oral

RESUMO

Neste trabalho foram avaliadas três substâncias derivadas de algas marinhas (Dolabelladienotriol (Triol), Da-1, DB-1) e quatro produtos sintéticos (NBr-Triazol, NH-Triazol, Citral, Tienopiridina), com potencial atividade antiviral. Como substâncias controle foram utilizadas o Aciclovir® e o DMSO. Avaliamos sua atividade antiviral para o HIV-1 e HSV-1 *in vitro* e a citotoxicidade das mesmas em experimentos *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios *in vitro*, foram realizados com cultivo de células Vero. Nos ensaios de citotoxicidade e de atividade anti-HIV-1 e anti-HSV-1 foram determinadas as concentrações das substâncias Da-1 triol, triazol e tienopiridina necessárias para inibir 50% da viabilidade celular (CC₅₀) e atividade de inibição da proliferação viral (EC₅₀). A partir destes resultados, foram realizados testes de toxicidade aguda em ensaios pré-clínicos. As substâncias foram administradas por duas vias (ip e sc) em camundongos BALB/c. A determinação da toxicidade foi realizada através da avaliação do comportamento animal, da análise bioquímica sanguínea (glicose, ureia, ácido úrico e TGP/ALT) e histologia do fígado, rim, trato gastrointestinal. Os animais não apresentaram mudanças comportamentais significativas. Dentre os parâmetros bioquímicos a ureia e o TGP/ALT foram os que apresentaram alterações mais significativas após a administração das substâncias pesquisadas (Triol -50 µg/g, Triazol (25 µg/g), aciclovir (50 µg/g) e DMSO de 20%, 40% e 50%). A análise histológica mostrou que os órgãos mais afetados foram o fígado e os rins. Na análise da toxicidade subcrônica foi usada a substância Triol nas dosagens 360 µg/500 µL e 700 µg/500 µL em ratos Wistar por v.o., durante 30 dias. Foram realizadas as mesmas análises bioquímicas feitas nos camundongos. Não houve alteração significativa nos testes, exceto, pela Proteína Total que apresentou uma diminuição transitória nas concentrações sanguíneas. Como forma de entender o possível mecanismo das lesões histológicas avaliamos o grau de apoptose *in vitro* induzido pelo Triol, Triazol, Aciclovir e DMSO. Não foi observada a fragmentação do DNA induzida por nenhuma das substâncias testadas. Através dos experimentos realizados podemos concluir que o nível de toxicidade destas substâncias é baixo, necessitando, porém, de outras avaliações para que possam ser utilizadas de forma terapêutica.

ABSTRACT

This paper evaluates three substances derived from marine algae (Dolabelladienetriol (Triol), Da-1, DB-1) and four synthetic products (NBr-Triazol, NH-Triazol, Citral, Thienopyridine), which have potential antiviral activity. Acyclovir® and DMSO were used as control substances. The cytotoxicity of these products and their antiviral activity to HIV-1 and HSV-1 were analysed *in vitro*. For this the concentrations of Da-1 triol, triazol e tienopiridine capable of inhibiting 50% of the cell viability (CC₅₀) and inhibiting 50% of vial proliferation (EC₅₀) were determined. As of these results *in vivo* pre-clinical acute toxicity tests were undertaken. The different substances were injected through 2 routs (ip,sc) in BALB/c mice. Toxicity was determined by clinical observation of the animals' behavior, blood biochemistry (glucose, urea, uric acid and GTP/ALT) and histological analysis of the liver, kidney and gut. The animals did not present significant alterations in their behavior. Of the biochemical parameters urea and GTP/ALT were the two most altered after the injection of (Triol -50 µg/g, Triazole (25 µg/g), acyclovir (50 µg/g) and DMSO (20%, 40% and 50%) the histological analysis showed that the liver and kidney were the most affected by the substances used. To analyze the sub-chronic toxicity Triol at a dose of 360 µg/500 µL and 700 µg/500 µL were given through the oral rout to Wistar rats during 30 days. The same biochemical analyses were performed as with the mice. No significant alterations were observed with the exception of a transitory decrease of total blood proteins. In order to understand the possible mechanisms of the histological alterations we performed another *in vitro* assay to induce apoptosis due to Triol, Triazole, Acyclovir e DMSO. No DNA fragmentation was observed by any of the tested substances. Through the experimental data we can conclude that the tested substances present low toxicity although it is necessary to perform other evaluations before they can be used as therapeutic drugs.

1 INTRODUÇÃO

A importância de se pesquisar substâncias com atividade antiviral e analisar o nível de citotoxicidade das mesmas, é de grande relevância. O aumento da incidência de várias doenças causadas por vírus e seu impacto sócio-econômico justificam a importância do desenvolvimento de pesquisas por novos agentes antivirais e novas modalidades de quimioterapia antiviral (BEDOYA et al., 2001). Nas últimas décadas, vários grupos têm buscado intensivamente agentes químicos capazes de interferir em diferentes estágios de replicação viral. Assim, a síntese de análogos de moléculas naturais com atividade antiviral, associadas a menor citotoxicidade e menor custo de produção tem sido um dos alvos de pesquisas no mundo inteiro. Sabe-se que o tratamento de diferentes doenças que acometem as pessoas depende da seletividade dos medicamentos que são utilizados e, muitas vezes, a produção destes medicamentos tem um custo muito elevado, impedindo seu uso pela maior parte da população. Assim, cada vez mais, buscam-se modificações estruturais de moléculas com potencial terapêutico visando acesso a substâncias capazes de interferir em alguma etapa do ciclo replicativo viral e, de alguma forma contribuir para o esclarecimento das estratégias utilizadas pelos vírus que resultam na morte da célula hospedeira (FREITAS, 2006). Muitas dessas moléculas são produzidas de forma natural pela flora terrestre e aquática. Nosso país possui uma grande variedade desses recursos o que tem motivado diferentes grupos de pesquisa a estudarem, já há bastante tempo, a utilização desses produtos auxiliando no tratamento de diversas patologias.

Como toda droga apresenta um grau de toxicidade sistêmica, é de fundamental importância analisar o potencial de letalidade ou toxicidade de cada um deles, seguindo normas estabelecidas pela legislação (VALADARES, 2006). A DL₅₀, introduzida em 1927 por Trevan, é um dos testes usados para determinar o nível de toxicidade de uma determinada substância. Esse teste se baseia em encontrar a dose que causa a morte da metade dos animais do grupo experimental. Na década de 70, o teste da DL₅₀ passou a ser amplamente empregado como base de comparação e classificação da toxicidade de substâncias. Tornou-se um pré-requisito para várias agências reguladoras responsáveis pela aprovação de novos fármacos em seus países como a americana *Food and Drugs Administration* (FDA), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil e a Agência Européia para Avaliação de Produtos Medicinais (EMEA), (GOLDIM, 2007).

A Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (Organization for Economic Cooperation and Development; OECD) é um órgão que reúne os governos de vários países comprometidos com a democracia e a economia do mercado mundial, incorporou em 1981, o teste da DL₅₀ em suas diretrizes. Dentre as diretrizes as usadas para toxicidade aguda em dose única possuem especificações registradas para cada via de administração das substâncias denominada de: agudo oral (OECD 401); agudo dermal (OECD 402); agudo por inalação (OECD 403) e métodos alternativos (via oral) (OECD 420, 423, 425) (BOTHAM, 2004)

A diretriz OECD 401 foi substituída em 2000 pelas diretrizes 420, 423 e 425 (toxicidade aguda oral), para enfatizar a necessidade de minimizar o desconforto (sofrimento) dos animais experimentais, servindo para as demais diretrizes mencionadas. Todas essas diretrizes (OECD 401, OECD 402 e OECD 403) têm como procedimento comum o uso de roedores com grupos experimentais de cinco animais todas do mesmo sexo, por dose, com um

período de observação de até 14 dias. A confirmação de que não existem diferenças significativas entre machos e fêmeas na toxicidade aguda oral pela substância testada são realizadas testando apenas uma dose no segundo sexo. A dose limite superior que antes era de 5.000 mg/Kg foi reduzida para 2.000 mg/Kg (BOTHAM, 2004).

As etapas e fases de pesquisas e projetos com novas drogas são coordenadas ou estabelecidas de acordo com diferentes documentos e diretrizes, com a finalidade de preservar a integridade e segurança dos participantes. No Brasil estas fases foram estabelecidas seguindo as Resoluções CNS 01/88 e 251/97, assim como as Boas Práticas Clínicas. Os estudos podem ser classificados em duas etapas: pré-clínica e clínica, sendo a primeira realizada em culturas de células e animais experimentais e a segunda em seres humanos (GOLDIM, 2007).

De acordo com a Resolução CNS 251/97, a pesquisa pré-clínica deve gerar informações que permitam justificar a realização de pesquisas em seres humanos. Os relatos dos estudos experimentais devem especificar o método utilizado, os modelos celulares, teciduais ou animais utilizados, os testes laboratoriais, os dados de farmacocinética e toxicologia. Os resultados pré-clínicos, também chamada de Fase 0 (zero), devem permitir demonstrar a relevância dos achados, as possíveis aplicações terapêuticas e antever alguns dos riscos com o seu uso.

A avaliação toxicológica pré-clínica de uma nova droga pode ser subdividida em quatro estágios, de acordo com o tempo de exposição: toxicidade aguda, de doses repetidas, subcrônica e crônica. A toxicidade aguda da substância pesquisada é avaliada através da administração no animal, de uma dose única ou uma dose fracionada em um período inferior a 24 horas. A toxicidade de doses repetidas é medida em estudos com período mínimo de 14 dias, sendo que a droga deve ser administrada em intervalos regulares. Os estudos de

toxicidade subcrônica ampliam esse período para 30 dias ou mais. Finalmente, no estudo da toxicidade crônica preconiza-se que a administração da droga em intervalos regulares deve ser por um período mínimo de 90 dias. Esses estudos devem ser realizados utilizando a via de administração preconizada para uso em seres humanos (GOLDIM, 2007).

A Resolução CNS 01/88 propôs que, além da via de administração pretendida, deveriam ser realizados estudos com a administração parenteral da droga em modelos animais. A duração dos estudos pré-clínicos de cada medicamento deve estar relacionada ao período previsto para o seu uso terapêutico. As Boas Práticas Clínicas do MERCOSUL estabelecem que quando o período de administração em humanos for de uma dose única, ou em pequeno número, a pesquisa em animais deve ser no mínimo de duas semanas. Quando o período de uso preconizado for de até quatro semanas o estudo deverá ser de três a vinte e seis semanas. Para propostas de uso superiores por quatro semanas a avaliação deverá durar, no mínimo, vinte e seis semanas, sem incluir os estudos de carcinogenicidade (GOLDIM, 2007). Os estudos de toxicidade, de acordo com às Resoluções CNS 01/88 e 251/97, devem gerar informações sobre possíveis efeitos sobre a fertilidade, embriotoxicidade, mutagênese e oncogênese. Uma dificuldade destes estudos é a transposição dos dados obtidos em modelos de pesquisa celular e animal para os seres humanos (GOLDIM, 2007).

A etapa clínica das pesquisas de novas drogas, que é realizada em seres humanos, é subdividida em quatro fases, de acordo com o nível crescente de conhecimento que se tem sobre os efeitos das substâncias em modelos celulares, animais e em seres humanos. Estas fases também se diferenciam pelos objetivos específicos de cada tipo de estudo, pelo tipo de delineamento utilizado e principalmente pelo número e características dos participantes. Estas fases são sucessivas e escalonadas, com níveis crescentes de complexidade e de exposição.

Assim os objetivos específicos nos estudos de Fase 2 (dois) dependem dos resultados obtidos nos estudos de Fase 1 (um) (GOLDIM, 2007).

Esse trabalho teve sua origem num projeto de colaboração entre as Prof^{as} Gerlinda Teixeira e Izabel Paixão (ambas do Instituto de Biologia da UFF) com o grupo da Prof^a. Valéria Teixeira (IB-UFF) que purifica produtos de algas marinhas. Junto a essa pesquisa estão envolvidos professores do Instituto de Química da UFF que sintetizam produtos com possíveis atividades biológicas. Essa parceria, junto com outros institutos está promovendo ótimos resultados em experimentos *in vitro* mostrando atividade antiviral de diversas substâncias para os vírus HIV-1 (AIDS) e HSV-1 (Herpes Simples).

Esse trabalho visa dar sequência ao estudo dessas substâncias com atividade antiviral avaliando a toxicidade dos produtos de algas pardas marinhas e substâncias sintéticas em animais de laboratório (camundongos). Restringimo-nos ao estágio da etapa pré-clínica com relação à toxicidade aguda e subcrônica das substâncias acima citadas. Avaliamos qual o nível de toxicidade de substâncias derivadas de algas pardas com potencial antiviral.

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 Estudos antivirais

O mecanismo de resistência a drogas antivirais ocorre principalmente, através do desenvolvimento de mutações genômicas em regiões que codificam enzimas envolvidas no processo de replicação viral e em sítios específicos do envelope viral responsáveis pela interação vírus-célula. Em consequência do desenvolvimento dessa resistência, a busca de novas substâncias com atividade antiviral tem sido importante na cura das doenças e na qualidade de vida do paciente. O desenvolvimento de novas drogas bioativas necessita de modelos apropriados para a identificação de alvos moleculares que sejam fundamentais no crescimento celular seja *in vitro* ou *in vivo*. Entre os principais alvos intracelulares temos o DNA, RNA, microtúbulos e enzimas (MACIEL et al., 2002). Como exemplo na figura 1 mostra um esquema da atuação das drogas que existem no mercado no ciclo de replicação viral do HIV (SOUZA & ALMEIDA, 2003).

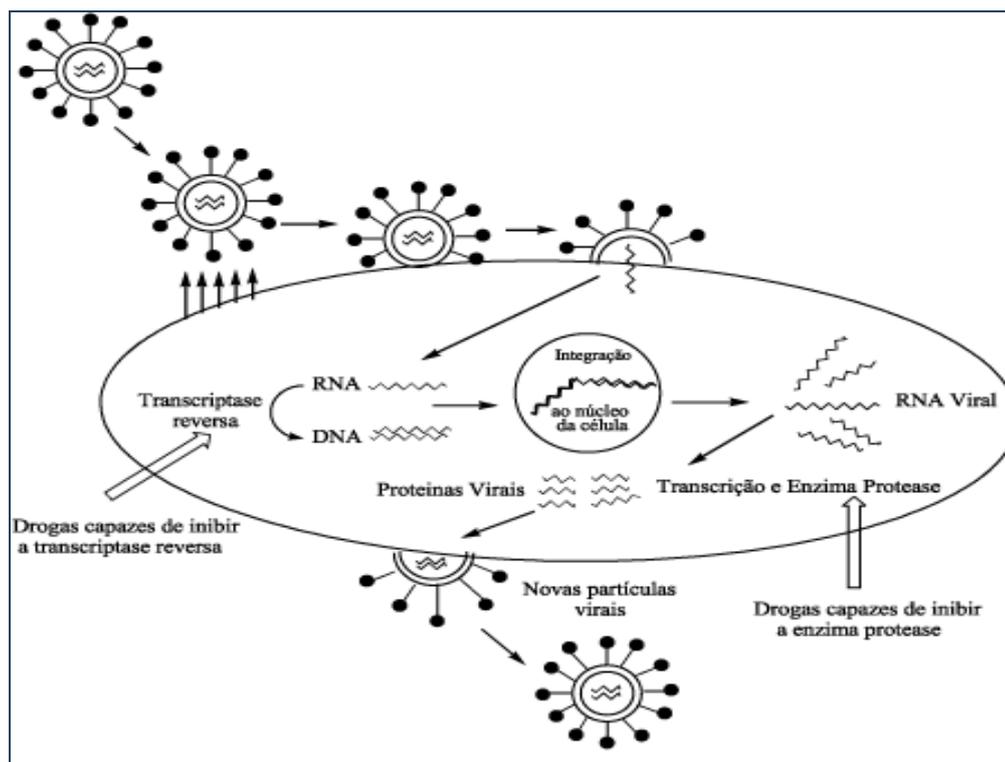


Figura 1- Exemplo de um esquema resumido do ciclo de replicação viral do HIV com as etapas em que atuam os medicamentos disponíveis do mercado (SOUZA & ALMEIDA, 2003)

O AZT (3'-azido-2',3', -didesoxitimidina), sintetizado pela primeira vez por Horwitz em 1964, também conhecido como azidotimidina, foi uma droga apresentada, inicialmente, como uma droga com atividade anticancerígena. Sua atividade antiviral foi descrita pela primeira vez no início da década de 70 e foi o primeiro composto a apresentar atividade anti-HIV (SOUZA & ALMEIDA, 2003).

A evidência de que algas marinhas possuem propriedades antivirais foi demonstrada primeiramente pelo grupo de Gerber em 1958, que observaram que polissacarídeos extraídos de *Gelidium cartilagenium* protegem embriões de galinha contra a infecção do vírus influenza B e vírus da caxumba. Posteriormente, o efeito inibidor de várias espécies de algas para diferentes vírus foi demonstrado. Assim, a síntese de análogos de moléculas naturais tem sido alvo de extenso estudo em todo mundo na busca de novas substâncias com atividade antiviral. (CARLUCCI et al., 1997; DUARTE et al., 2001).

2.2 Estudo toxicológico

2.2.1 Toxicidade

Conceituando toxicidade podemos dizer que é a propriedade potencial que as substâncias químicas possuem, em maior ou menor grau, de instalar um estado patológico em consequência de sua introdução e interação com o organismo (TOCHETO, sd). Ou seja, a **Toxicidade** é a medida relativa do efeito nocivo de uma substância sobre o organismo.

2.2.2 Toxicologia

É a ciência que tem como objeto de estudo o efeito adverso de substâncias químicas e físicas sobre organismos vivos. Toxicologia também tem sido referida como a ciência dos venenos. Tem como principal finalidade de estabelecer a dose segura da substância química em questão que pode interagir com o organismo vivo de modo a prevenir o aparecimento de efeitos colaterais (LEITE & AMORIM, 2006).

A toxicologia é um sistema complexo que se apóia em três elementos básicos:

- (1) A substância química (SQ);
- (2) O sistema biológico (SB) com o qual o SQ irá interagir
- (3) O efeito resultante (ER) que poderá ser adverso/tóxico para o SB (sinais e sintomas).

Cada elemento desse sistema possui alguns fatores de avaliação que informa o grau de toxicidade das substâncias no organismo para no final assegurar o seu uso como agente terapêutico (Figura 2) (LEITE & AMORIM, 2006).

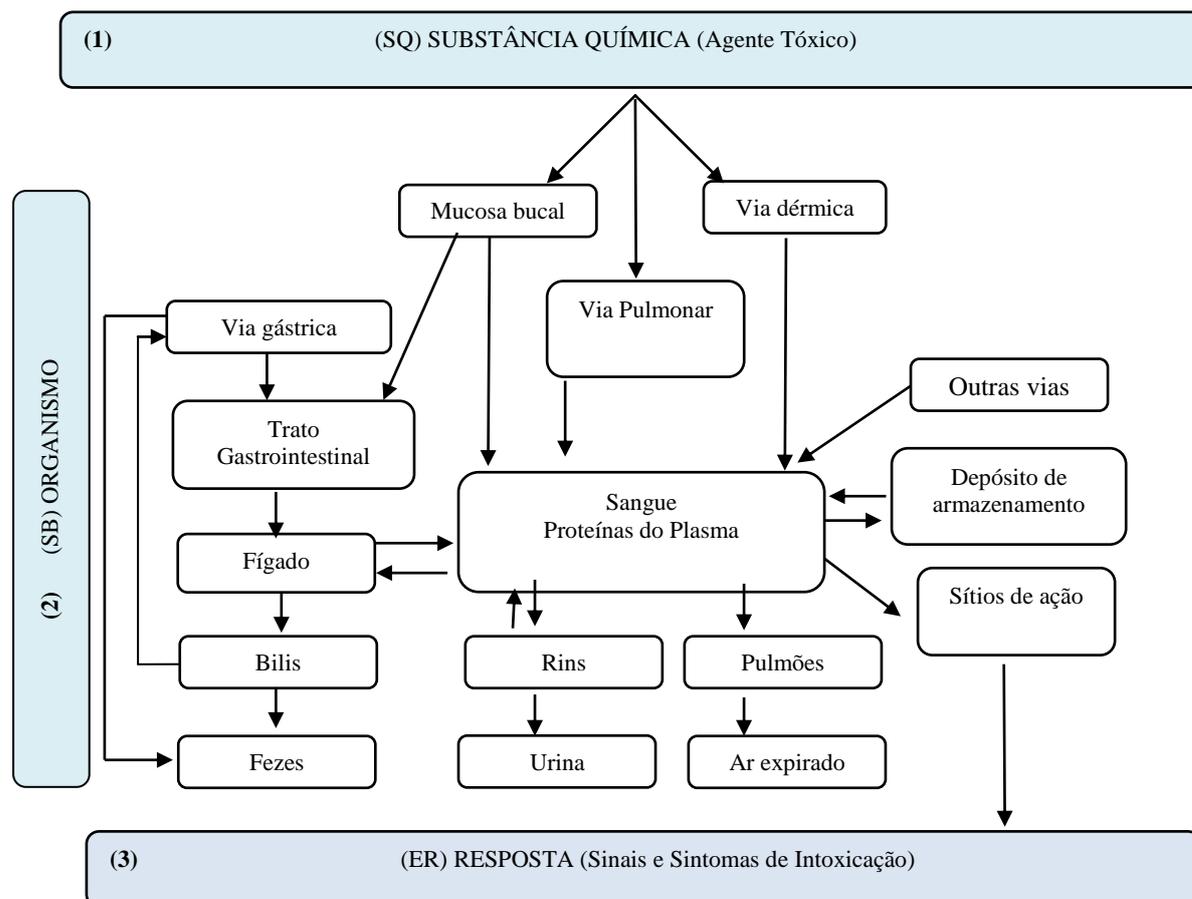


Figura 2 – Esquema demonstrando os três elementos básicos no complexo sistema que envolve intoxicação (TOCHETO, sd).

A compreensão dos componentes ativos presentes em plantas, assim como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacológica e bioquímica. As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos e produtos quando testados podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos. No estudo da atividade biológica de extratos e produtos vegetais é importante a seleção de bioensaios para detecção do efeito específico da substância pesquisada; a toxicidade é um dos ensaios que avalia a interação entre a substância extraída ou purificada e o organismo (MACIEL et al., 2002). A bioquímica sanguínea, o hemograma, além de análises histopatológicas nos órgãos dos animais que foram administrados com os produtos pesquisados são métodos freqüentemente utilizados na avaliação toxicológica (VIDAL et al., 2003; BALIGA et al.,

2004; MARIZ et al., 2006; PAGÁN et al., 2006; MUKINDA & SYCE, 2007; RAMÍREZ et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2007; LAHLOU et al., 2008)

2.3 Produtos Naturais e Sintéticos

2.3.1 Produtos Naturais

Segundo Faulkner, os primeiros registros do uso de organismos marinhos como fonte de produtos químicos pelo homem data de 1600 a.C. quando os fenícios utilizavam a secreção dos moluscos para produzir corantes de roupas (FAULKNER, 1992).

As algas marinhas possuem uma grande diversidade não só no litoral brasileiro como em todo mundo. Pesquisas feitas em alguns países da Ásia e África que consomem diariamente a Espirulina, uma alga azul, mostraram uma baixa incidência de infecção pelo vírus HIV-1(AIDS). Esses trabalhos mostram ainda que estas algas apresentem a propriedade de estimular à resposta imunitária (TEAS et al., 2004).

Algas são organismos capazes de ocupar todos os meios que lhes ofereçam luz e umidade suficientes, temporárias ou permanentes. Quer sejam uni ou pluricelulares, as algas retiram todos os nutrientes que precisam do meio (solução ou umidade), no entanto são organismos fundamentalmente aquáticos. Apesar da simplicidade aparente destes organismos, algumas algas possuem “sistemas” internos que são encontrados nos vegetais superiores (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

As algas podem ser procariontes ou eucariontes e se dividem em três diferentes reinos: Monera, Protista e Plantae. As algas procariontes do reino Monera ou Bacteria são organismos unicelulares com ausência de envoltório nuclear e são autotróficos (produzem seu próprio alimento); habitam vários ambientes desde que haja umidade e atuam como “espécie pioneira”. As algas oxigenam o ambiente em que vivem enquanto fazem a fotossíntese; certas

algas azuis, ao contrário da maioria das plantas, podem empregar nitrogênio da atmosfera na construção de seu protoplasma e desse modo contribuem para a síntese de compostos nitrogenados na água e solos onde vivem (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

As algas eucariontes se dividem entre os reinos Protista e Plantae; os organismos do reino protista são unicelulares (embora existam formas pluricelulares de organização simples), autótrofos ou heterótrofos (dependem de outros seres para se alimentarem), e suas células apresentam envoltório nuclear e organelas membranosas (organismos eucariontes); são organismos de grande simplicidade e constituem o primeiro grupo onde ocorrem mitocôndrias, cloroplastos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi bem desenvolvidos. As algas pertencentes ao reino protista apresentam pigmentos, como as clorofilas, carotenos e xantofilas, organizados em organelas (HARPER et al., 2006).

Muitos organismos marinhos são grandes produtores de metabólitos secundários derivados de unidades isoprênicas, incluindo os monoterpênicos (C_{10}), sesquiterpênicos (C_{15}), diterpênicos (C_{20}), triterpênicos (C_{30}) e os tetraterpênicos (C_{40}). Dentre esses, as algas marinhas estão entre os principais produtores destas substâncias (BLUNT et al., 2006). Dos 15.000 metabólitos secundários de origem marinha, aproximadamente 55% são derivados terpenoídicos. Esta proporção pode ser muito superior em alguns filos, representando até 90% dos metabólitos isolados. As algas marinhas estão entre os principais produtores dos diterpênicos apresentando propriedades antibacterianas, antivirais, antifúngicas entre outras (HARPER et al., 2006).

As algas pardas que pertencem ao Filo Phaeophyta, classe Dictyotacea, ordem Dictyotales, são pluricelulares predominantemente marinhos (mais comuns em mares frios). São as maiores algas existentes, podendo atingir mais de 25 m, vivem flutuando ou fixados em um substrato formando imensas florestas submersas. Nesses organismos são encontrados

os pigmentos fucoxantina, clorofilas A e C e carotenóides e, como substâncias de reserva, óleos e polissacarídeos.

As espécies do gênero *Dictyota* apresentam grande variabilidade morfológica e a sua composição diterpênica tem auxiliado no estabelecimento de seus limites taxonômicos. Assim as espécies têm sido reunidas em grupos, de acordo com a sua capacidade de síntese de diterpenos (DE PAULA et al., 2004).

2.3.1.1 *Dictyota pfaffii* e *Dictyota menstrualis*

A espécie *Dictyota pfaffii* (Figura 3A) encontra-se no Atol das Rocas localizado no Estado do Rio Grande do Norte (Nordeste Brasileiro) (Figura 6). A partir dessa alga foi descrito o isolamento de três diterpenos, com atividade antiviral, denominados, dolabellano 1 a 3. São eles:

- Dolabellano 1 – (1R,2E,4R,6E,8S,10S,11S,12R)-10,18-Diacetóxido-8-hidróxido-2,6-dolabelladieno;
- Dolabellano 2 – (1R,2E,4R,6E,8S,10S,11S,12R)-10-Acetóxido-8,18-dihidróxido-2,6-dolabellandieno;
- Dolabellano 3 (TRIOL) – (1R,2E,4R,6E,8S,10S,11S,12R)-8,10,18-Trihidróxido-2,6-dolabelladiano (Figura 3B) (BARBOSA, PEREIRA et al., 2004).

A espécie *Dictyota menstrualis* (Figura 4 A,B) é encontrada em algumas regiões do litoral do Brasil. No Estado do Rio de Janeiro é encontrada na Ilha Grande, Angra dos Reis, Armação de Búzios, e Cabo Frio (Figura 6), também é encontrada em regiões dos EUA como a Carolina do Norte (VASCONCELOS et al., 2007). No processo de purificação dessa alga é

extraído o produto como característica química o (6R)-6-hidroxicotoma-3,14-dieno-1,17-dial denominado como Da-1 ($C_{20}H_{30}O_3$) (Figura 5).

Ambas as algas descritas acima já foram avaliadas em estudos *in vitro* e apresentaram atividade inibitória para os vírus HIV-1 e HSV-1 (BARBOSA et al., 2004; PEREIRA, 2004).

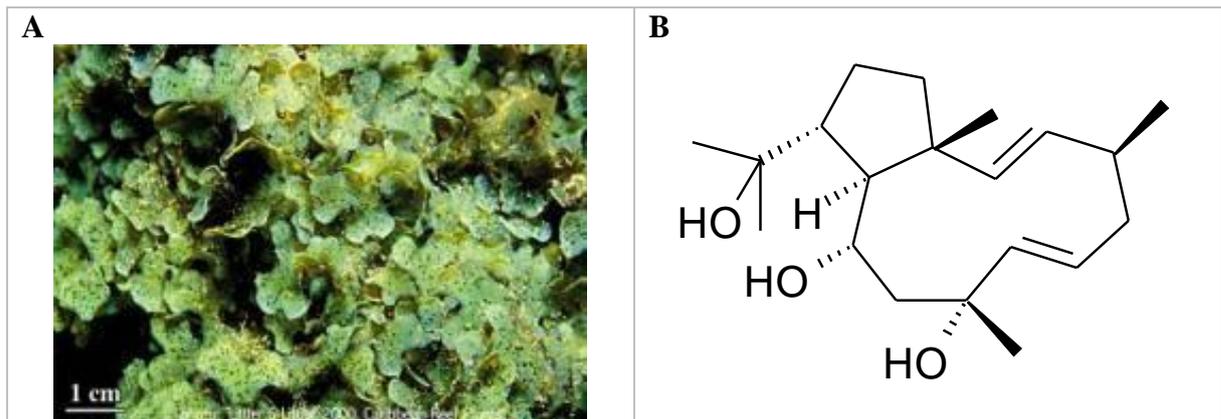


Figura 3 – **A**) Alga *Dicyota paffii* (cybersaude.files.wordpress.com/.../dictyota.jpg); **B** – Estrutura molecular do TRIOL (1R,2E,4R,6E,8S,10S,11S,12R)-8,10,18-Trihidroxido-2,6-dolabelladiano) (cedida pela Prof.^a Valéria L. Teixeira do Dep. Biologia Marinha da UFF).

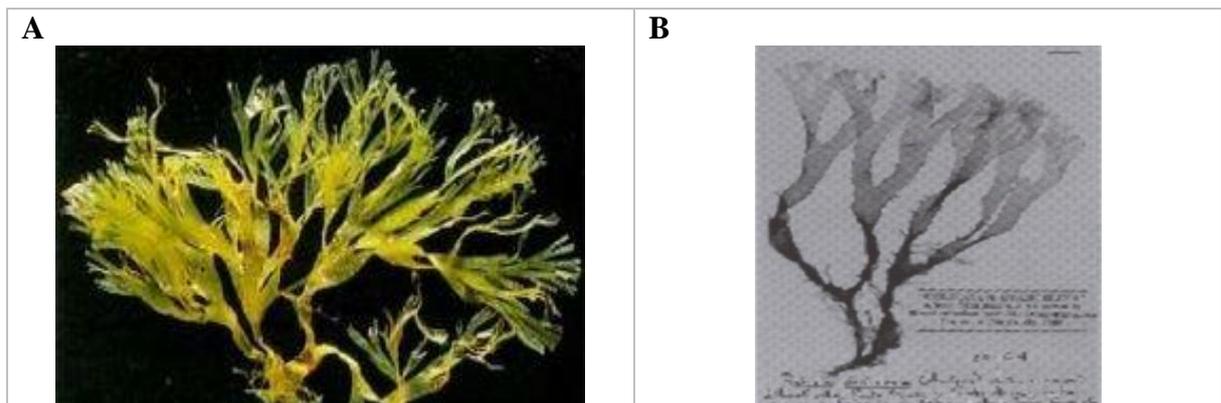


Figura 4 – **A** - Alga - *Dictyota menstrualis* – (www.cdn.info/news/article/a010823.html); **B**- Esquema da alga *Dictyota menstrualis* Díaz-Piferrer 20464 EDIMAR. Talo vegetativo. (www.scielo.org/ve/.../abv/v26n1/art03fig13.jpg)

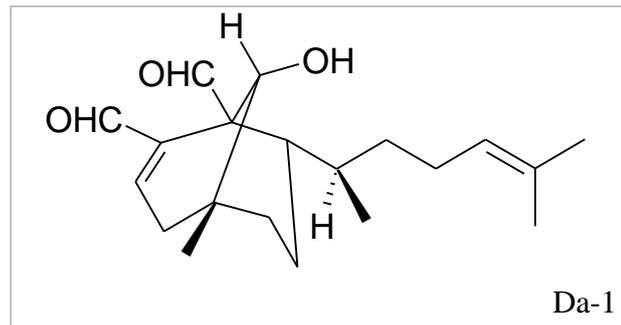


Figura 5 – Estrutura molecular de Da-1 - (6R)-6-hidroxidicotoma-3,14-dieno-1,17-dial (cedida pela Prof^a Valéria L. Teixeira do Dep. De Biologia da UFF).

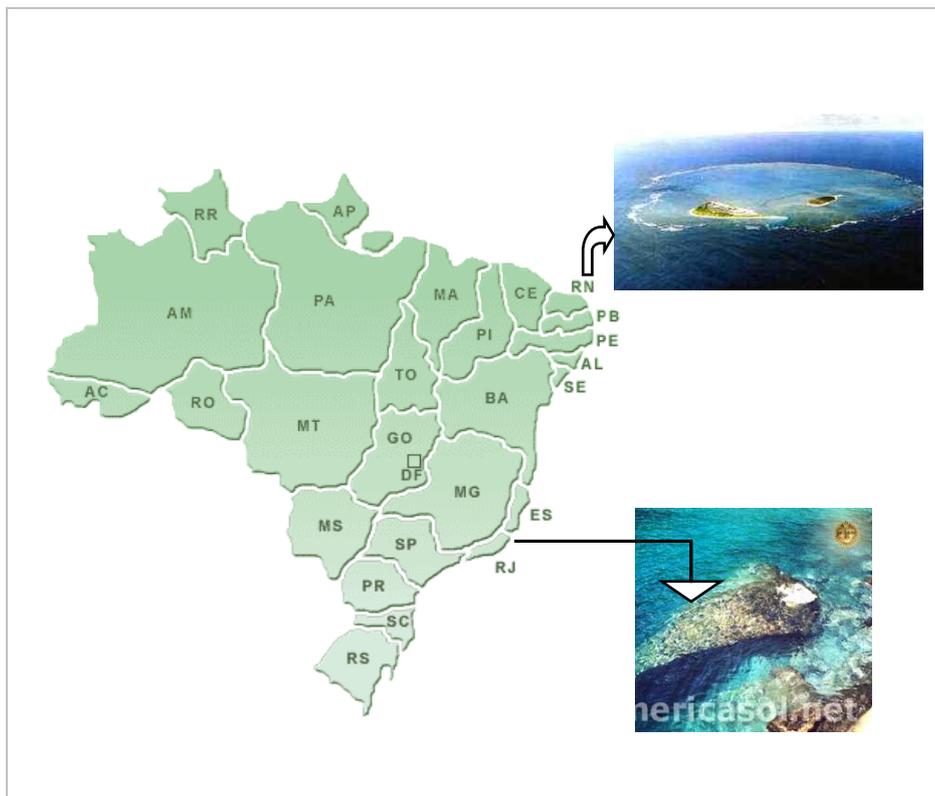


Figura 6 - Localização geográfica onde são encontradas as algas *D. pfaffi* e *D. menstrualis* no Brasil (Figura adaptada por Valéria Garrido. Fontes: www.bnds.gov.br, www.marifillo.org, www.americaso.net)

2.3.1.2 Produto Natural isolado da Planta *Cymbopogon citratus* - Citral

O Citral ($C_{10}H_{16}$) é um produto isolado de um óleo essencial da planta chamada *Cymbopogon citratus*. Foram identificados dois tipos de citral denominados de α - e β -citrals (figura 7). A atividade biológica desse produto foi avaliada resultando numa boa atividade antimicrobiana (ONAWUNMI, 1989). Além disto o citral é muito usado tanto na área de perfumaria como de alimentos.

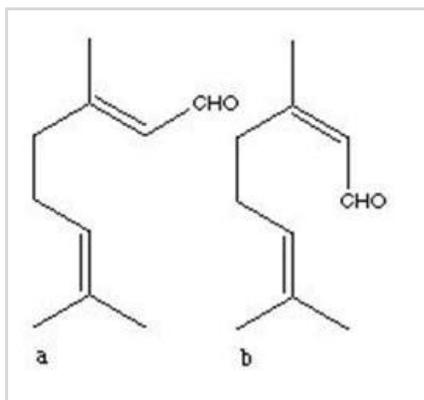


Figura 7 – Estrutura molecular do Citral a) α -citral e b) β -citral (Fonte: <http://www.food-info.net/uk/qa/qa-fi73.htm>)

2.3.2 Produtos Sintéticos

O Triazol é um composto químico heterocíclico sintético com atividade biológica, dividida em três sais principais: 1,2,3-triazol monocíclico, benzotriazóis e 1,2,3-triazol (TOMÉ, 2003).

A Tienopiridina, considerada como uma nova classe de inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa do HIV-1 (NNRTI), deriva da síntese dos derivados 4-anilino-1H-pirazolo[3,4-b]piridina. Vários estudos têm sido realizados a fim de avaliar a relação entre a estrutura molecular e a atividade biológica dessas moléculas e, assim, potencializar sua atividade antiviral. Essas substâncias foram descritas sendo utilizadas como corantes, antiinflamatórios, antitumoral, anticonvulsivante, antibacteriana e antiviral; atuam na prevenção da arteriosclerose, no tratamento da asma, na prevenção do reumatismo e da artrite; apresentam atividade antiprotozoária, entre outras ações terapêuticas (COSTA, 2007).

O aciclovir® é uma purina acicloguanosina, 2-amino-1,9-diidro-9-[(2-hidroxietoxi) metil]-6H-purina-6-ona (Figura 8) (NEWBY & COKE, 1996); é um agente antiviral eficaz contra o vírus Herpes simples (HSV), tipos 1 e 2, e o vírus Varicela zoster (VVZ). Sua toxicidade para células infectadas de mamíferos é baixa. O aciclovir é fosforilado em sua forma ativa após penetrar nas células infectadas pelo herpes. A primeira etapa deste processo

requer a presença da timidinaquinase codificada pelo HSV. O trifosfato do aciclovir age como inibidor e substrato para a DNA-polimerase específica do herpes, impedindo a síntese do DNA viral, sem afetar os processos celulares normais. Estudos de segurança pré-clínica, mutagenicidade *in vitro* e *in vivo*, indicaram que o aciclovir não apresenta risco ao ser humano.

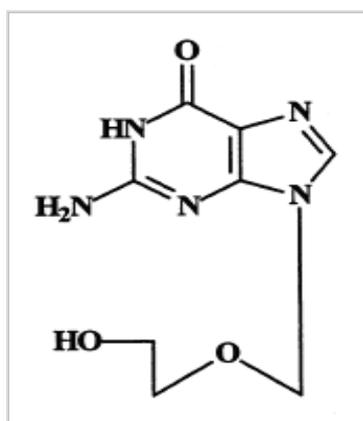


Figura 8 – Aciclovir (NEWBY & COKE, 1996)

1.1.1 DMSO

Entre os anos 1866 e 1867, na Alemanha, o químico de nacionalidade russa Alexander Saytzeff, sintetizou o dimetilsulfóxido (DMSO). A partir da década de quarenta do século XX o DMSO passa a ser utilizado de forma industrial devido sua capacidade solvente, permanecendo como única utilidade até o início de 1960, quando foi introduzido na área da medicina (ALVES, 1998).

O DMSO é um composto químico orgânico de fórmula C_2H_6SO , peso molecular 78 e temperatura de congelamento $18,5^{\circ}C$. A elevada capacidade higroscópica decorre da sua intensa afinidade pelo hidrogênio, formando pontes mais fortes que às formadas entre moléculas de água. Isso faz com que o DMSO puro passe rapidamente a forma hidratada numa concentração entre 66-67% se for deixado exposto ao ar ambiente (ALVES, 1998).

O DMSO é um dos solventes mais versáteis na ciência biológica com uma baixa toxicidade (TSUTOMU et al., 2007). Penetra e difunde através da membrana e tecidos e protege células de mamíferos e bactérias de vários danos durante manobras laboratoriais como, por exemplo, durante o congelamento ou resfriamento. Em altas concentrações e altas temperaturas é, no entanto, um desnaturante protéico. O DMSO, também é usado para cristalizar proteínas, para o estudo do mecanismo enzimático e a estabilidade conformacional da proteína (TSUTOMU et al., 2007).

2.4 – Agentes Virais

Os vírus são partículas biológicas infecciosas que dependem de células para se multiplicarem. A arquitetura de uma partícula viral, chamada vírion, é constituída de um ácido nucléico portador da informação genética sob forma de DNA ou RNA, envolto por uma cápsula protéica e por vezes, de um envelope lipídico. A ligação do vírion à célula resulta na interação específica entre uma molécula da superfície celular, o receptor, e uma proteína da superfície externa da partícula viral, às vezes, chamada de anti-receptor. Receptor e anti-receptor possuem grande afinidade e somente as células com receptor do vírus podem ser infectadas (FLINT et al., 2004). A interação de um vírus com o organismo (infecção viral) pode desencadear diversas respostas, agudas, crônicas ou latentes. Uma vez no organismo a interação do vírus com o sistema imunológico pode ter como consequência a ativação de linfócitos específicos para as diversas proteínas do vírus com estímulo à produção de anticorpos sistêmicos. Estas respostas podem ou não eliminar o vírus do organismo (MARÉCHAL, 2007).

2.4.1 Vírus HIV-1 e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)

A Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (AIDS) foi reconhecida em 1981, como uma entidade clínica nova e ainda hoje é uma doença fatal sem cura. Apresenta alta mortalidade e morbidade na população humana, rica ou pobre e tem como agente etiológico o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), isolado pela primeira vez em 1983. Hoje se sabe que há mais de 40 milhões de pessoas que vivem ainda com o HIV, das quais 17,7 milhões são de mulheres e 2,3 milhões são de crianças. Pela sua importância epidemiológica vem sendo um dos principais alvos de estudos em diversas partes do mundo.

O HIV-1 (*Human immunodeficiency virus type 1*) é um vírus pertencente à família Retroviridae do gênero Lentivirus; possui uma forma esférica com cerca de 110 nm de diâmetro contendo em seu genoma duas fitas de RNA (figura 9 a,b). (CIRNE-SANTOS, 2006).

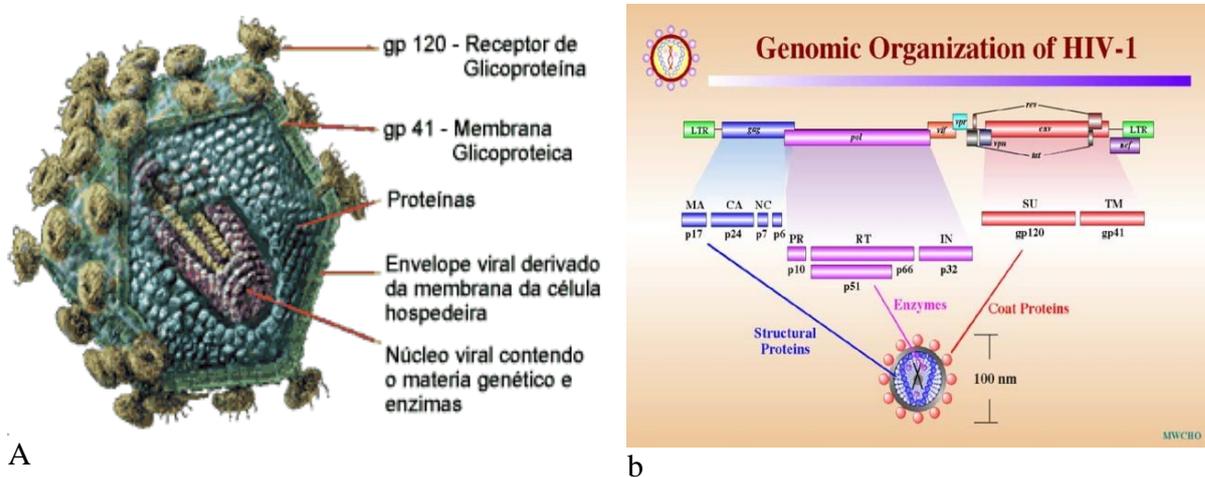


Figura 9 – Estrutura e genoma do HIV- a – vírus (www.vacinashiv.unifesp.br/2008/aids/oque.html); b- Genoma (www.alia.org.br/hiv.asp)

A imunopatogênese do HIV apresenta uma grande variedade de mecanismos que contribuem para a deterioração da função imunitária e da progressão da infecção. A estimulação crônica do sistema imunitário, na medida em que causa ativação imunológica inapropriada e exaustão progressiva da resposta, pode resultar em prejuízos da resposta contra

novos patógenos em indivíduos infectados (STEVENSON, 2003). O HIV-1 se liga e infecta células que apresentam moléculas CD4 na superfície, as quais incluem: uma população de linfócitos T, monócitos/macrófagos, células dendríticas e microglia. A entrada do vírus nestas células é mediada não somente pela interação das glicoproteínas do envelope viral gp120 com a molécula de CD4, mas também com os co-receptores de alfa e beta-quimiocinas, essenciais para o processo de infecção celular. Os vírions foram classificados de acordo com o receptor de quimiocinas que utilizam. Isolados R5 ou R5-trópicos são os que possuem tropismos para os receptores CCR5, os isolados X4 ou X4-trópicos são aqueles que utilizam os CXCR4 e os duplo-trópicos (R5X4 ou R5X4-trópicos) que podem utilizar tanto o CCR5 quanto o CXCR4 (COAKLEY et al., 2005).

2.4.2 Agentes antirretrovirais

Atualmente os medicamentos disponíveis para o tratamento da infecção pelo HIV atuam de forma a inibir passos específicos no ciclo multiplicativo do vírus, inibindo a replicação viral e a infecção de novas células. A terapêutica antirretroviral modificou a história natural dessa doença, permitindo que seja atualmente uma doença crônica, bem controlada, mas para que isso seja possível, é fundamental que o tratamento seja orientado da forma correta.

As enzimas Transcriptase reversa e a protease são alvos da terapêutica anti-retroviral utilizando medicamentos conhecidos como NRTI (inibidores nucleosídeos da TR) e NNRTI (inibidores não-nucleosídeos da TR) no qual, a replicação do vírus é suprimida porque impede a atividade da TR. Os inibidores da protease atingem a enzima atingindo outra via que impede o HIV de ligar e penetrar nas células humanas CD4 (TCD4). Esses medicamentos que inibem a fusão, ainda não estão disponíveis para tratamento em sua totalidade (www.roche.pt/sida).

Na tabela 1, mostra os alvos responsáveis pela replicação viral e os respectivos antirretrovirais usados efetivamente na terapia (SOUZA & ALMEIDA, 2003).

TABELA 1 – Relação das substâncias anti-retrovirais usadas no mercado e seus respectivos alvos para HIV-1

ENZIMAS VIRAIS	DROGAS TERAPEUTICAS
TRANSCRIPTASE REVERSA (NRTI)	AZT (ZIDOVIDINA)
	d4T (STAVUDINA)
	ddC (ZALCITABINA)
	3TC (LAMIVUDINA)
	ddI (DIDADOSINA)
TRANSCRIPTASE REVERSA (NNRTI)	ABC (ABACAVIR)
	TENOFOVIR DIISOPROPIL
	NEVIRAPINA
PROTEASE	EFAVIRENS
	DELARVIDINA
	SAQUINAVIR
	RITONAVIR
	INDINAVIR
	LOPINAVIR, NELFINAVIR AMPRENAVIR

2.4.3 Herpes Simples

O vírus do Herpes simples pertence à família Herpesviridae e a subfamília Alphaherpesvirinae (WAGNER & HEWLETT, 1999). Os vírus Herpes simples tipo 1 e tipo 2 compreendem um extenso grupo de mais de 120 vírus adaptados a várias espécies animais, possuem morfologia similar e a organização genômica comum com 40 genes homólogos agrupados em sete domínios conservados (DE PERRE et al., 2008). O ciclo biológico do Herpes simples constitui um modelo de estudo privilegiado de infecções latentes, especialmente porque pode ser estudado em camundongos de forma experimental.

O vírus infecta células epiteliais, quando a partícula viral se livra da camada exterior, o genoma, envolto por seu capsídeo, se direciona ao axônio até o núcleo do neurônio, localizado no gânglio sensitivo. O vírus entra em latência, seu genoma persiste no núcleo do neurônio sem se integrar ao DNA celular. Quando o neurônio é ativado, o genoma viral se traduz em proteínas e as partículas virais infecciosas são produzidas. Estas deixam o núcleo neuronal,

migram pelo axônio e re-infectam as células epiteliais no local de inoculação primária do vírus (MARÉCHAL, 2007) (figura 10 a,b) Esse vírus induz uma grande variedade de doenças, normalmente benignas, contudo, em doentes imunocomprometidos pode causar mortalidade (Sarcome de Kaposi e outros).

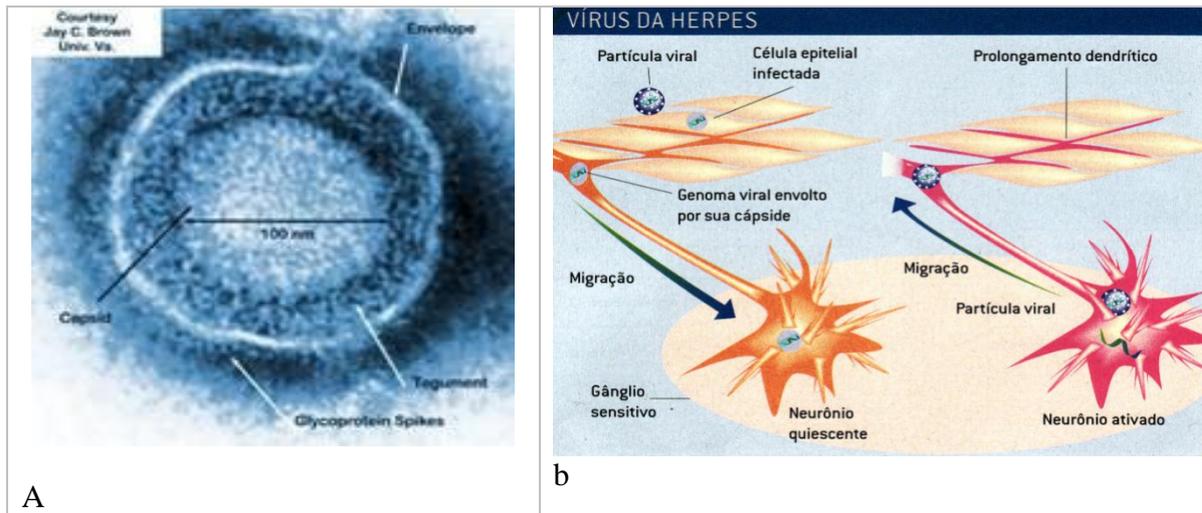


Figura 10- a-Eletromicrografia do HSV-1 (<http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsv2f.html>); b- Ciclo do vírus do Herpes simples (MARÉCHAL, 2007).

Todos os vírus pertencentes a esta família possuem o genoma de DNA de cadeia dupla de grandes dimensões com genoma composto por 80 a 240 kbp contendo entre 60 e 120 genes (figura11). Os diferentes tipos de herpes partilham uma elevada incidência de regiões repetidas invertidas (WAGNER & HEWLETT, 1999; MADIGAN et al., 2000).

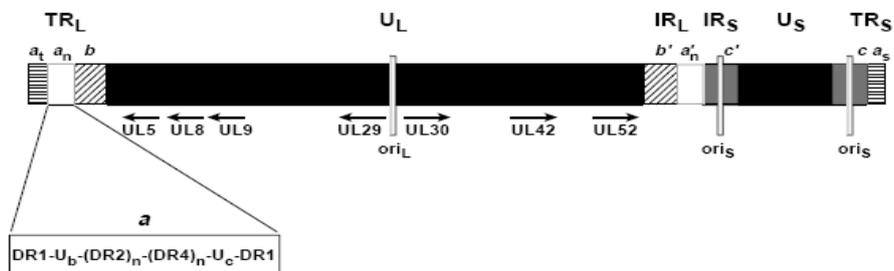


Figura 11 - Diagrama representativo da estrutura do genoma do HSV-1. As posições das repetições *a*, *b* e *c* nas repetições terminais (TRL e TRS) e nas repetições internas (IRL e IRS), e as posições das origens de replicação do DNA (oriL e oriS) estão sendo indicadas. A posição e a direção da transcrição dos sete genes essenciais são indicados pelas setas. A área aumentada mostra a composição da seqüência *a*, consistindo de repetições diretas

(DR) 1, 2 e 3, e dos domínios únicos (U) b e c. Abreviações: U, único; t, terminal; n, número variável de cópias; orientação invertida; L, longo; S, curto Sem escala (BOEHMER & LEHMAN, 1997).

2.4.3.1 Mecanismo da Infecção Viral

A primeira etapa da infecção viral inicia-se no momento em que ocorre a adsorção do HSV-1 na célula hospedeira ocorrendo a interação das glicoproteínas virais gC e gB com proteoglicanos celulares, principalmente com moléculas de heparan sulfato. A partir desta primeira interação, a glicoproteína gD pode interagir com três tipos distintos de receptores secundários, responsáveis pela entrada do vírus na célula hospedeira: o mediador da entrada de herpesvírus (HVEM - herpesvirus entry mediator), um membro da superfamília dos receptores do TNF/NGF, que não possui o domínio de morte (DD) podendo polarizar a resposta de seus ligantes ao processo inflamatório ou de sobrevivência; os receptores da família da Nectina-1 e Nectina-2, membros da superfamília das imunoglobulinas; e moléculas de heparan sulfato modificadas em sítios específicos pela ação da enzima 3 - O - sulfotransferase . A nectina forma homodímeros na membrana plasmática e cada um destes homodímeros podem interagir na porção transmembrana com a mesma isoforma ou isoformas diferentes deste receptor ou com a gD do HSV-1, de forma a permitir a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira.

Após o processo de adsorção e fusão do envelope viral com receptores celulares, o nucleocapsídeo é transportado, via cito esqueleto, em direção ao núcleo da célula hospedeira, onde ocorre a liberação do genoma viral. Algumas glicoproteínas virais, como gM, gK e gI, estão relacionadas com a difusão do HSV-1 pelas junções intercelulares e pela formação de sincício.

Após a sua entrada na célula hospedeira o HSV-1 pode estabelecer latência ou o ciclo lítico, caracterizado pela grande produção de partículas virais com conseqüente lise celular.

Apesar dos fatores que possam estar influenciando a latência ou o ciclo produtivo ainda não serem bem estabelecidos, pesquisas indicam que a presença de Fator de Crescimento do Nervo (NGF) pode induzir a latência em gânglios da raiz dorsal pela indução da transcrição do gene viral LAT (Latency-Associated-Transcript) (COSTA, 2007). Durante o período de latência o HSV-1 associa-se com histonas, formando um DNA episomal. Além disso, a latência ocorre principalmente no sistema nervoso onde há uma maior expressão do fator nuclear OCT-2 em relação à isoforma OCT-1, que é expressa principalmente em outros tecidos. Na maioria dos tecidos a proteína do tegumento viral α -TIF interage preferencialmente com a proteína OCT-1. Esta ligação é estabilizada pelo fator HCF proporcionando a formação do complexo de pré-iniciação junto ao TATA Box do genoma do HSV-1, iniciando a transcrição de genes de fase alfa e conseqüente infecção produtiva. (PRESTON, 2000).

Em algumas situações como estresse, hipertermia, aumento das concentrações citosólicas de AMPc, transplante de órgãos e imunossupressão, o HSV-1 pode ser reativado. Durante a reativação, as partículas virais são transportadas, via transporte anterógrado ao longo dos neurônios sensoriais periféricos, levando à infecção produtiva, podendo causar lesões no tecido muco cutâneo. Em alguns casos, como em pacientes imunocomprometidos e neonatos, as partículas virais podem migrar em direção ao sistema nervoso central, podendo provocar quadros de encefalite e ceratoconjutivite, sendo uma das principais causas de cegueira, causada por lesões na córnea, em todos os países. Além disso, o HSV-1 parece ser um fator importante para disseminação do HIV-1, podendo causar uma série de enfermidades associadas à AIDS (COSTA, 2007).

2.4.3.2 Mecanismo de ação de antivirais para o HSV

O tratamento de escolha, no momento, para o Herpes simples é o aciclovir (ACV) que possui um nucleosídeo análogo da guanosina que é fosforilado três vezes. A primeira fosforilação é completada pela codificação da proteína timidinaquinase que permite ao ACV começar a atividade apenas nas células infectadas pelo vírus. A segunda e a terceira fosforilação pela timidinaquinase celular. O ACV trifosfatado atua pela inibição competitiva da polimerase DNA viral sendo um DNA cadeia terminal (MORFIN & THOUVENOT, 2003).

O aumento do uso do ACV em tratamentos profiláticos e entre pacientes transplantados tem criado uma incidência de infecções resistentes ao ACV, quando isso ocorre outras drogas antivirais com mecanismos diferentes de ação podem ser usadas como o foscarnet e o cidofovir (MORFIN & THOUVENOT, 2003) (Figura 12). Os estudos mutagênicos são necessários para avaliar o papel das mutações no desenvolvimento da resistência às drogas antivirais.

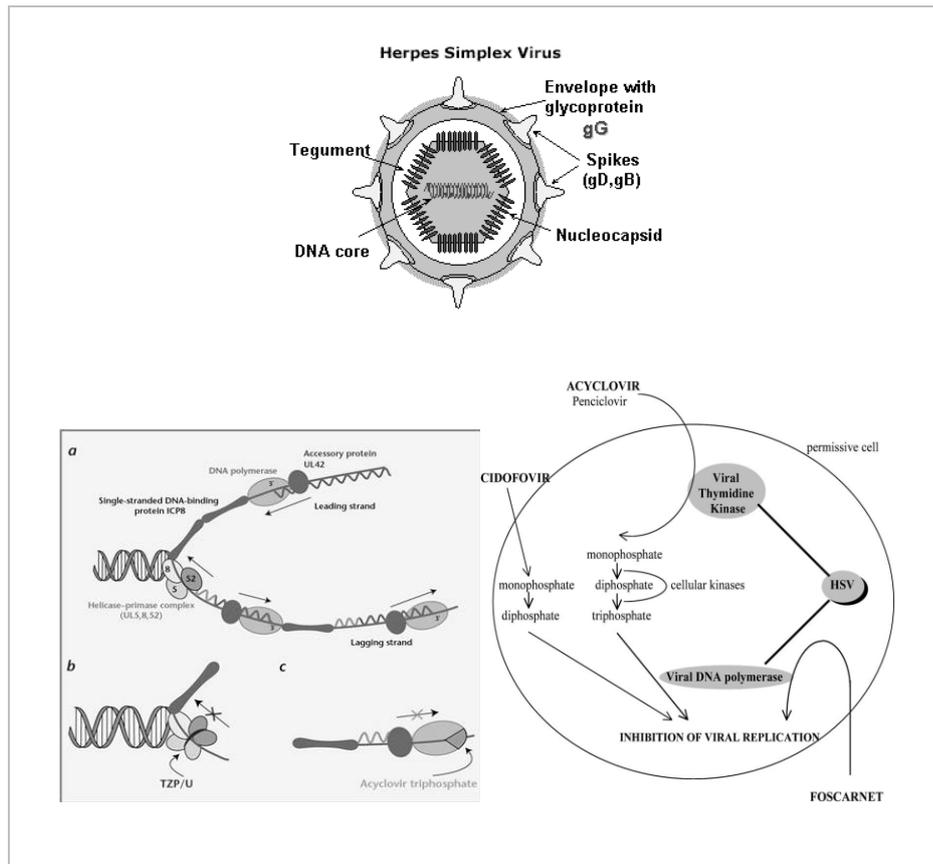


Figura 12 – Mecanismo de ação de drogas antivirais no HSV (MORFIN & THOUVENOT, 2003)

2.4.4 Sinergia viral (HIV-1 e HSV)

O HIV-1 e HSV estão envolvidos em um ciclo vicioso em que o HIV-1 facilita à infecção e a reativação do HSV. Por outro lado, o HSV aumenta a infecção e a replicação do HIV-1 (figura 13). O mecanismo exato dessas interações ainda não é claro. O efeito da tradução das proteínas e a existência de ativação imune associada ao HSV (diretamente ou através de lipossacarídeos) são direções importantes para futuras pesquisas (VAN DE PERRE et al., 2008).

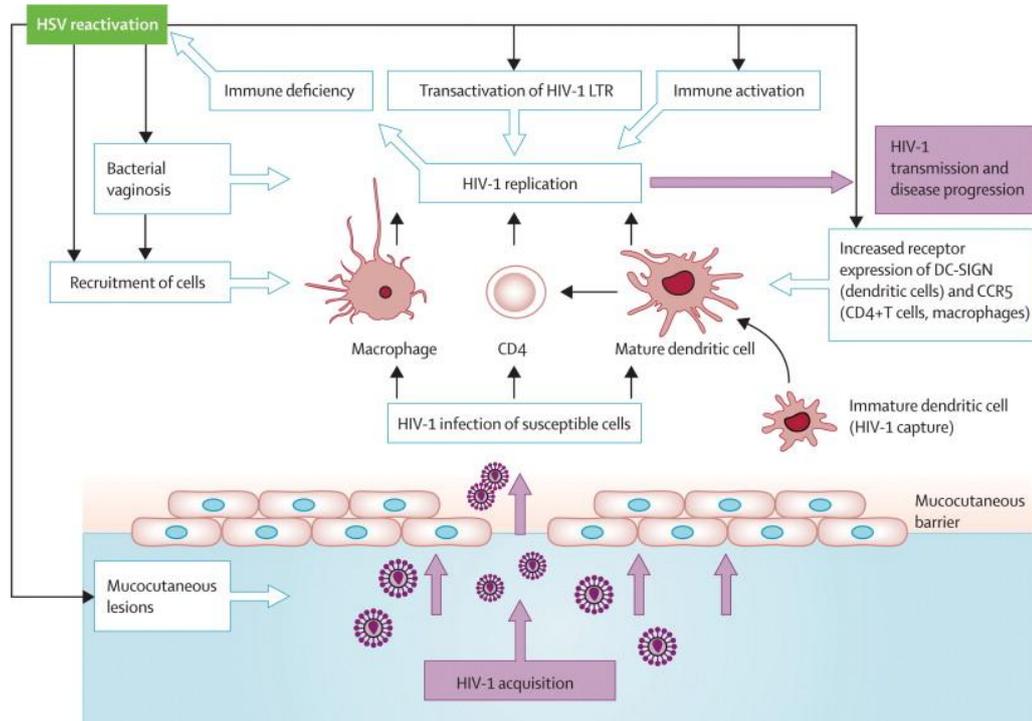


Figura 13 – Efeito da infecção por HSV/replicação, aquisição e transmissão do HIV-1 e na progressão da doença – LTR (long terminal repeat) –(VAN DE PERRE et al., 2008)

2.5 Apoptose

Sabe-se que existem numerosos fatores que afetam a decisão da célula em realizar a parada do ciclo celular ou induzir a apoptose, ambos mediados pelo p53, gene supressor de tumor e que previne o acúmulo de mutações que podem levar ao desenvolvimento de células cancerígenas (LI et al., 2003). Quando a morte celular apresenta todas as características morfológicas e bioquímicas de apoptose, mas foi induzida por um determinado composto ou por um estímulo físico, não constitui um processo programado e sim, uma resposta celular às mudanças ambientais (ANAZETTI & MELO, 2007).

Apoptose ou morte celular programada tem como consequência à retirada controlada de células durante o desenvolvimento normal do organismo. As células apoptóticas sofrem alterações morfológicas caracterizadas que compreendem: a compactação da cromatina nuclear, contração do citoplasma e produção de corpúsculos apoptóticos nos limites da

membrana. São rapidamente fagocitados por células vizinhas como os macrófagos e células parenquimatosas. Difere da necrose pelas mudanças bioquímicas e alterações morfológicas, em geral não desencadeia resposta inflamatória *in vivo* sendo a necrose um processo passivo e (ALBERTS et al., 2004; FERREIRA & ROCHA, 2004). Estima-se que a duração da apoptose *in vivo* seja entre 6 a 24 horas, dependendo do tipo celular. (GAVRIELI et al., 1992). Embora os mecanismos de morte celular programada não sejam completamente entendidos, são propostas três vias, conforme esquema na figura 14.

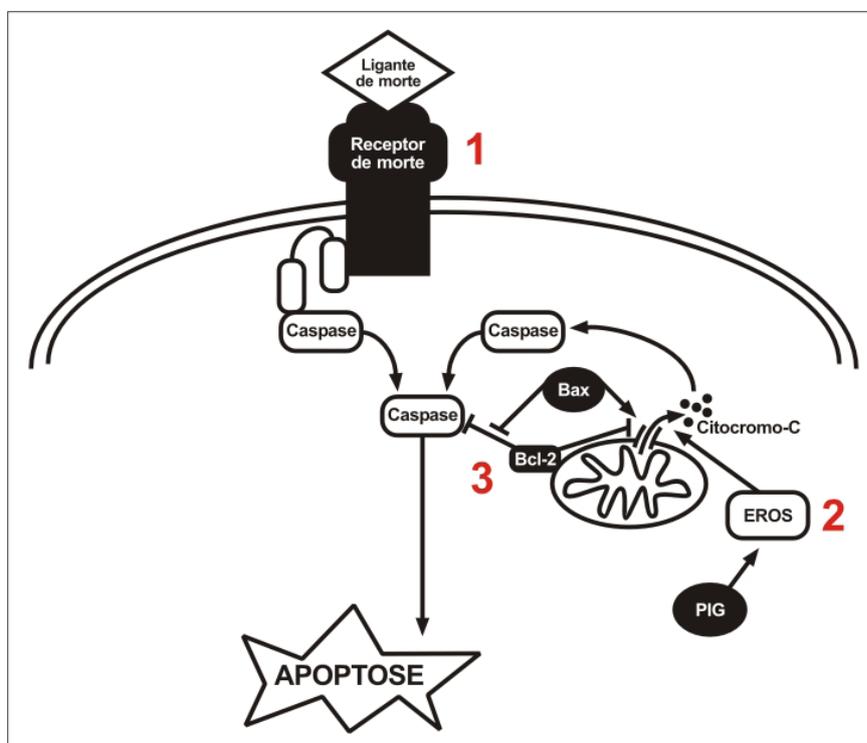


Figura 14- Vias de ativação de apoptose – 1: via de receptores de morte celular, 2: via das espécies de oxigênio reativas, 3: via da família Bcl-2. Reproduzido e adaptado de <http://www.portfolio.mvm.ed.ac.uk>.

2.5.1 Receptores de membrana:

Esta via é iniciada pela ligação do Fas (CD95), receptor presente na membrana celular com seu ligante FasL, resultando na ativação de caspases e morte celular. A super expressão de Fas pode causar apoptose mediada pela super regulação do p53, embora não conhecendo seus mecanismos. Outros exemplos de membros ligantes indutores de morte celular são o TNF e o TRAIL (CHOWDHURY, THARAKAN et al., 2006).

2.5.2 Formação de espécies de oxigênio reativas (EROS)

Uma rota pela qual o p53 sinaliza a mitocôndria e induz a apoptose é pelo aumento dos níveis e espécies de oxigênio reativas (EROS). O p53 estimula os genes que codificam proteínas que catalisam reações óxido-redutoras, e conseqüentemente, geram EROS, os quais promovem a liberação do citocromo-C pela mitocôndria e então, a morte celular.

2.5.3 Família Bcl-2

A família Bcl-2 contém membros tanto pró quanto anti-apoptóticos. Há pelo menos, 16 proteínas da família Bcl-2, que são divididas em três grupos: o primeiro grupo é formado pelas proteínas anti-apoptóticas (exemplo: Bcl-x1 e Bcl-2), já os grupos dois e três são membros pró-apoptóticos (exemplos: Bax e Bik). Estas proteínas permanecem em harmonia, já que uma proteína anti-apoptótica é capaz de formar um heterodímero com sua respectiva proteína pró-apoptótica, indicando que a concentração de cada uma é importante na determinação do sinal predominante que a célula deve receber. Assim, uma célula com maiores níveis de proteínas anti-apoptóticas exibe maior resistência a apoptose, mas se houver predomínio de proteínas Bax, por exemplo, a célula morrerá rapidamente (LAMKANFI et al., 2007).

Todas as proteínas da família Bcl-2 formam canais iônicos na membrana mitocondrial. As proteínas anti-apoptóticas formam canais pequenos e estão usualmente fechadas, enquanto as pró-apoptóticas tendem a formar grandes canais. Com o aumento de proteínas pró-apoptóticas, ocorre a formação mais canais, perda do potencial de membrana da mitocôndria e a liberação do conteúdo de citocromo-C ao citosol. O citocromo-C associa-se a APAF-1 e a pró-caspase 9 para formar a caspase 9 ativada. O complexo enzimático formado é chamado de apoptossoma e, uma vez formado, torna-se inevitável a morte celular (POLSTER & FISKUM, 2004).

Finalizando o mecanismo de apoptose, à participação das caspases, responsáveis pela quebra proteolítica de uma série de proteínas-chaves que resulta nas alterações morfológicas das células em processo de apoptose. As caspases compartilham similaridades em aminoácidos, estrutura e substratos. Até o momento, quatorzes caspases foram identificados e são agrupadas, de acordo com a sequência de homologia, em três subclasses: a subfamília da caspase 1 (caspases 1, 4,5, 11, 12 e 13); a subfamília da caspase 3 (caspases 3, 6, 7, 8 e 10) e a subfamília da caspase 2 (caspases 2 e 9). Pela função, algumas caspases, como as 2, 8 e 9, atuam como proteínas iniciadoras ou sinalizadoras, enquanto outras, como as 3, 6 e 7, atuam como proteínas executoras (CHOWDHURY et al., 2006; LAMKANFI et al., 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

A emergência de cepas virais multiresistentes às drogas disponíveis, bem como a citotoxicidade e toxicidade dessas substâncias, motiva a busca de novas moléculas com atividade antiviral. Sendo assim, o objetivo geral desse trabalho foi determinar o potencial de toxicidade das substâncias com atividade antiviral, extraídas e purificadas das algas pardas marinhas e de substâncias sintéticas do tipo tienopiridina e triazóis, em camundongos BALB/c.

3.2 Específicos

- Demonstrar a citotoxicidade e atividade antiviral dos diterpenos e substâncias sintéticas em experimentos *in vitro*.
- Determinar a avaliação toxicológica aguda na fase pré-clínica da concentração letal, se existir, das substâncias em camundongos BALB/c.
- Avaliar as funções bioquímicas do sangue dos animais antes e depois da aplicação das substâncias pelos parâmetros de glicose, ácido úrico, ureia e TGP/ALT.
- Avaliar na histologia os órgãos dos animais como fígado, rim, intestino delgado e estômago para verificar se há alterações importantes.

- Avaliar na fase toxicológica subcrônica na fase pré-clínica em ratos Wistar pela administração do Triol, as funções bioquímicas do sangue pelos parâmetros: Ácido úrico, ureia, TPG/ALT e Proteínas Totais.
- Avaliar o nível de apoptose em células das substâncias TRIOL E TRIAZOL.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido à CEPA - Comitê de Ética de Pesquisa com Animais, aprovado com protocolo de número 21/08 pela Universidade Federal Fluminense, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (Anexo 1).

4.1 Substâncias naturais de algas marinhas e Substâncias sintéticas

4.1.1 Substâncias Naturais

4.1.1.1 *Dictyota pfaffii*

A partir da alga *Dictyota pfaffii* foram extraídas das substâncias 8,10,18-trihydroxy-2,6-dolabelladienetriol (TRIOL) (figura 15) e 10,18-diacetoxy-8-hydroxy-2,6-dolabelladiene (dolabellane-1 (DB-1) (CIRNE-SANTOS, 2006). As substâncias pesquisadas foram cedidas em forma liofilizada pela Prof^a Valéria L. Teixeira da UFF.

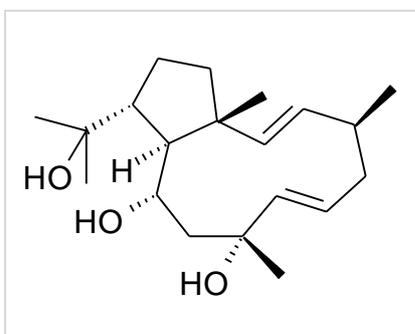


Figura 15 - Estrutura química da purificação da alga *Dictyota pfaffii* – Dolabellanotriol (figura cedida pela Prof.^a Valéria L. Teixeira do Dep. de Biologia Marinha da UFF).

4.1.1.2 *Dictyota menstrualis*

A partir da alga *Dictyota menstrualis* foi extraída da substância (6R)-6-hydroxydichotoma-3,14-diene-1,17-dial (Da-1) (figura 16), o produto foi cedido em forma liofilizada pela Prof^a Valéria L. Teixeira.

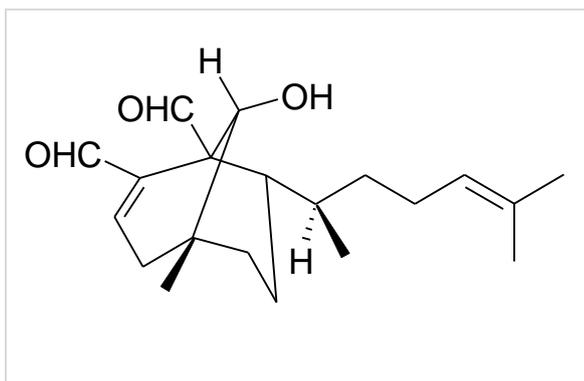


Figura 16 – Estrutura química da substância purificada da alga *Dictyota menstrualis* - Da-1 (Figura cedida pela Prof.^a Valéria L. Teixeira do Dep. de Biologia da UFF).

4.1.2 Substâncias Sintéticas.

4.1.2.1 TRIAZOL

O Triazol foi cedido pelo Instituto de Química da UFF pelo grupo da Prof^a. Anna Cláudia Cunha. Foram fornecidas quatro substâncias diferentes: a) N-H-TRIOH-50 mM; b) N-F-TRIOH – 50 mM; c) N-Br-TRIOH – 50 mM em forma liofilizada (figura 17).

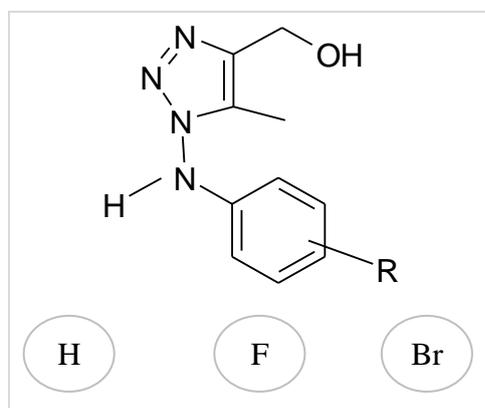


Figura 17 – Estrutura química dos três radicais H, F e Br do Triazol sintetizados (Figura adaptada por Valéria Garrido (COSTA, 2007)).

4.1.2.2 CITRAL

O Citral foi fornecido em forma líquida pelo Departamento de Biologia Marinha da UFF em colaboração com a Prof.^a Valéria L. Teixeira (figura 18).

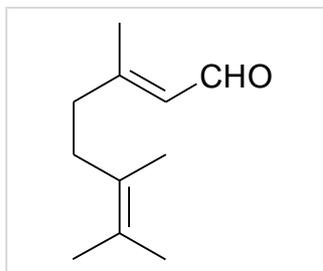


Figura 18 – Estrutura química da substância Citral (Figura editada pela Prof.^a Valéria L. Teixeira do Dep. Biologia Mariana da UFF).

4.1.2.3 ACICLOVIR (ACV)

A substância Aciclovir, (9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanina), um análogo do nucleosídeo purino sintético (figura 19) (NEWBY & COKE, 1996), foi usada como controle biológico de toxicidade *in vivo*. Foi fornecida liofilizada pela Quality Farmácia para fins científicos (cópia do certificado no anexo 2). A concentração utilizada para controle foi de 50 mg/Kg (DE MIRANDA et al., 1981) e solubilizada em DMSO 1%.

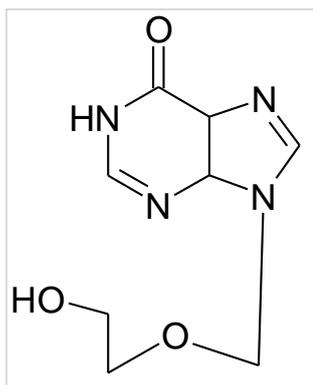


Figura 19- Estrutura química da substância Aciclovir (NEWBY & COKE, 1996)

Diferentes concentrações de cada uma das substâncias acima citadas foram reconstituídas em DMSO 1%. As substâncias pesquisadas foram usadas para definir a Dose Letal 50 (DL₅₀). As substâncias foram administradas para observação *in vivo*, com objetivo de avaliar o nível da toxicidade da substância.

4.1.2.4 DMSO

Substância usada como veículo na reconstituição e diluição em algumas concentrações (0,1%, 1%, 20%, 40% e 50%) de todas as substâncias pesquisadas (Marca Merck (CH₃)₂SO PM= 78,13 - marca MERCK – 99,9%) completando com água destilada.

4.2 Células (estudos *in vitro*)

Foram utilizadas células VERO (fibroblastos de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ e 95% de ar. Para o repique das culturas utilizou-se uma salina PBS contendo tripsina 0,25% (GIBCO).

4.2.1 Citotoxicidade Celular

No ensaio de citotoxicidade foram utilizadas 2×10^4 células/poço em placa de 96 poços, incubadas com as substâncias por 20 horas a 37°C. Posteriormente 10 µL da solução de MTT (Redução Mitocondrial do Sal de Titrazolium) descrito por (MOSMANN, 1983) (5 mg/mL – SIGMA) diluídos em meio de cultura DMEM sem soro, foram acrescentados às culturas tratadas e estas incubadas por um período de 4 horas a 37°C. Após o período total de incubação (24 horas) foram adicionados 100 µL de solução de duodecil sulfato de sódio (SDS-NUCLEAR) 10% e ácido clorídrico (HCl-REAGEN) 0,01 N, e mantido em *overnight* a 37°C. O ensaio avalia a capacidade de células metabolicamente ativas de reduzirem MTT, convertendo os sais amarelos de tetrazolium (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol brometo) a cristais de formazan, de cor púrpura. Após a solubilização dos cristais, a quantificação foi realizada em leitor de microplacas (ANTHOS 2010) a 570 nm. A partir

desse teste determinou-se a concentração da substância necessária para inibir 50% da viabilidade celular denominada CC_{50} .

4.2.2 Avaliação da atividade anti-HSV-1 (Determinação do EC_{50})

Células Vero, mantidas em placas de 24 poços (1×10^5 células/poço), foram infectadas com HSV-1 (cepa AR29) utilizando-se um multiplicidade de infecção (MOI) de 1 ou 5 por 1h a 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 . Após esse período as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos em DMEM contendo 5% de SFB. As células foram lisadas por três ciclos de congelamento e descongelamento 20 h após a infecção. O sobrenadante foi titulado pelo ensaio de inibição do efeito citopático (ABRANTES, 2006).

4.2.3 Avaliação da atividade anti-HIV-1

A análise da atividade antiviral pelo HIV-1 foi baseada na inibição do antígeno viral p24. As células PM-1 (clone de célula T-CD4+) cresceram em placas de 24 poços e infectadas com 2×10^5 partículas virais do isolado BR48 (100 ng do antígeno p24 viral) por 2 horas na ausência de amostras. Depois deste período, o vírus inoculado foi recolocado em um meio de cultura fresca contendo ou não concentrações diferentes das amostras. No sétimo dia pós-infecção, a produção de vírus no sobrenadante de células foi quantificada pelo ensaio de captura de ELISA p24 Gag (CALIFÓRNIA). A atividade anti-HIV-1 das amostras foram expressas em concentração de 50% eficazes (EC_{50}) (PEREIRA, 2004).

4.3 Animais

4.3.1 Camundongos (*Mus musculus*)

Foram utilizados 120 camundongos, machos e fêmeas adultos (dois a seis meses) de duas linhagens, C57BL/6 (macho n=10 e fêmea n= 34) e BALB/c (fêmea n= 76), fornecidos

pelo Núcleo de Animais de Laboratório (NAL) da UFF - RJ. Foram alojados em grupos de três a cinco animais por gaiola de polietileno com tampas de arame medindo 30 x 20 x 13 cm, forrada com maravalha autoclavada, acondicionados em ambiente com exaustão à temperatura ambiente (27-30°C). Os animais foram mantidos com ração comercial, água destilada tratada com 0,1% HCL *ad libitum* fornecida pela própria Universidade. No início dos experimentos os camundongos pesavam entre 15 a 30 g e foram pesados individualmente para verificar a influência das substâncias em relação ao peso. Do protocolo X, todos os animais foram pesados antes da administração (AI) e depois da administração (DI) no final do experimento. Todos os animais foram numerados (marcação pela orelha) de modo que as análises de dados pudessem ser realizadas de forma pareada.

4.3.2 Ratos (*Rattus norvegicus*)

Foram utilizados 20 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar (10 machos e 10 fêmeas) cedidos pelo Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os animais ficaram em quarentena no Instituto VITAL BRASIL para serem adaptados no NAL da UFF. Foram acondicionados em gaiolas no tamanho 48 x 30 x 25 cm com tampas de arames, forrada com maravalha autoclavada, acondicionados em ambiente com exaustão, temperatura ambiente (27-30°C), alimentação básica com ração comercial fornecida pela própria Universidade e água destilada tratada com 0,1% HCl *ad libitum*. Os ratos pesavam entre 214 g a 379 g com idade de dois meses. Todos os animais foram numerados (marcação pela orelha) e pesados individualmente para verificar a influência das substâncias em relação ao peso de modo que, pudessem ser realizadas análises pareadas de dados. Ao final de cada experimento todos os animais foram sacrificados em câmara de CO₂.

4.3.3 Sangria (Sg)

Os animais foram submetidos à punção retro-orbital com anestesia tópica (pomada oftálmica) de composição ciprofloxacino 0,3%. O volume coletado de sangue total dos camundongos foi de 200 µl em três etapas: Sg. 0 (antes da administração da substância), exceto para os animais usados no protocolo II; Sg. 1 (três a cinco dias após a administração) e Sg. 2 (após 10 a 13 dias da administração) em tubos tipo eppendorff de 1,5 mL. Foram coletados 2 mL de sangue dos ratos para a execução do hemograma (tubo com EDTA da VACUETTE® pediátrico – vol. 2 mL) e mais 1,5 mL de sangue total colocados em tubos eppendorff para separação do soro. Após duas horas de repouso as amostras foram centrifugadas em 1.500 rpm a 5° C por 15 minutos. Após o soro e/ou plasma foram mantidos em geladeira por no máximo sete dias para posterior análise bioquímica. O procedimento para extração do soro foi feita para todas as linhagens de roedores utilizados nesse trabalho. O sangue coletado para o hemograma foi enviado para Maternidade Escola de Laranjeiras da UFRJ e analisado no contador de células “PENTRA 60” da Horiba ABX Diagnostics. Nos primeiros protocolos foi coletado, além dos 200 µl já citados, mais 200 µl em 10 µl de Fluoreto de Potássio, cálculo feito proporcional em humanos preconizado pelo fabricante (DOLES).

4.3.4 Análises Bioquímicas

Nas análises bioquímicas dos soros dos animais foram utilizados kits comerciais da marca GOLD ANALISA DIAGNOSTICA. Foram escolhidos quatro parâmetros para avaliar alterações nas amostras que são metabolizados nos principais órgãos que poderiam ser afetados pelas substâncias administradas. Os parâmetros para as dosagens foram: a) Ácido Úrico (AU); b) Ureia (U); c) Glicose (G); d) Transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), também chamada de Alanina aminotransferase (ALT). Referente ao teste de Transaminase, a

metodologia de Reitman-Frankel para a dosagem das transaminases (TGP) não obedece a Lei de Lambert-Beer, isto é, as Unidades RF de TGP ou TGP/mL não são diretamente proporcionais à atividade enzimática. Portanto, não é possível usar o método do fator para cálculo das unidades, sendo obrigatória a preparação da curva de calibração. A curva de calibração é feita de acordo com os pontos obtidos pelas absorbâncias das diluições do padrão do Kit e foram plotadas no programa GraphPad InStat software inc. de acordo com a tabela 2. Os resultados foram determinados pelo programa plotando as absorbâncias achadas na leitura pelo espectrofotômetro. Conversão de Unidades (URF/mL para SI): $U/L = URF/mL \times 0,482$. Os demais parâmetros foram calculados o fator pela concentração do padrão sobre a absorbância do mesmo.

TABELA 2 – Valores em URF/ml das cinco diluições do padrão do kit de TGP para determinar os valores das amostras para depois serem transformadas em U/L.

Tubo N°	1	2	3	4	5
TGP (URF/mL)	Zero	28	57	97	150

Todos os testes foram medidos em absorbância por espectrofotômetro da marca AUSJENA. A análise bioquímica dos ratos foi feita em aparelho de automação “A15” da Biosystems na Maternidade Escola de Laranjeiras da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

4.3.5 Técnica Histológica

Foram retirados de todos os animais quatro órgãos (fígado, rim, estômago e duodeno) para avaliar possíveis lesões teciduais devido à toxicidade das substâncias.

4.3.5.1 Processamento, coloração e montagem do material

Os órgãos foram acondicionados em cassetes próprios para histologia e submergidos durante 24 horas em solução de Formol de Carson 10% (para cada 1000 mL da solução foi

usado 100 mL de Formalina (marca VETEC - Formaldeído P.A. – HCHO – Teor: 36,5 – 38% - PM=30,03; 15 mL de Metanol - Marca ISOFAR- Álcool metílico P.A. – CH₃OH – Teor: 99,8% - PM=32,04; Tampão de Fosfato a 0.5 M (PBS)). Os cassetes foram lavados em água corrente por duas a quatro horas, dependendo do nº de cassetes acondicionados no recipiente para lavagem. O procedimento de desidratação foi realizado em cinco etapas de 50 minutos cada; primeiro em álcool 70% (ÁLCOOL ABSOLUTO P.A. -Etanol – C₂H₆O - marca VETEC, Teor: 99,8%, PM=46,07), seguido em álcool a 95% . Em seguida, as peças foram lavadas 3X em álcool a 100%. Logo após os cassetes foram imersos em xilol a 100% em duas etapas de 50 minutos cada (XILENO P.A. - Xilol – C₈H₁₀ – Marca VETEC, Teor: 98%, PM=106,17), e colocados em banho de parafina (PARAFINA PURIFICADA - Faixa de Fusão – 54 a 56° C – Marca VETEC) mantidos em estufa em temperatura entre 58°C a 62° C em duas etapas de 50 minutos cada. Seguiu-se a inclusão das peças em parafina, formando blocos para corte. O corte dos blocos foi feito em micrótomo histológico com espessura de 3 µm. Esses cortes foram colocados em banho-maria a 37° C estirando a parafina para adesão à lâmina tratada com albumina (lâminas para microscopia com extremidade fosca – 26 X 76 mm e espessura 1 a 1,2 mm – Marca EXACTA). Na etapa da coloração as lâminas foram desparafinizadas através de três imersões de xilol por três minutos cada, seguido do procedimento de hidratação em cinco etapas de 3 minutos cada, imergindo duas vezes em álcool a 100%, seguindo em álcool a 95%, depois em álcool a 70% e finalmente com água destilada. O procedimento para coloração segue a imersão em hematoxilina por 10 minutos, seguindo-se a lavagem em água corrente por 25 minutos. Em seguida lavou-se em álcool a 70% por dois minutos e seguindo a imersão das lâminas em eosina por dois minutos. A desidratação no material foi feita em álcool a 95%; seguido de três imersões de três minutos cada em álcool a 100% e em seguida, três imersões no xilol por três minutos cada. As lâminas foram secas em estufa e posteriormente montadas.

4.3.5.2 Interpretação das lâminas

A leitura e interpretação das lâminas foram efetuadas em colaboração com a Dr^a. Jurandy Susana Patrícia Ocampo Lyra pesquisadora da FIOCRUZ e da Dr^a. Andréa Pires pesquisadora do Departamento da Patologia da UFF. As observações dos tecidos foram feitas em microscopia ótica com câmara digital acoplada, analisando em aumento de 100 X, 200 X e 400 X.

4.4 Análise Estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se os programas Excel para Windows (Microsoft, Seattle, WA) e o GraphPad InStat software inc. Foi usado o teste Student's-t, utilizando um intervalo de confiança de 95% logo, os resultados foram avaliados pela média aritmética \pm DP, sendo que * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram considerados significativos e $p > 0,05$ não é significante.

4.5 Avaliação da Toxicidade Aguda dos Derivados em Camundongos

Para avaliação do nível de toxicidade das substâncias foram elaborados 12 protocolos fazendo a observação do tempo de sobrevivência, aspectos comportamentais durante esse tempo: eriçamento do pêlo, taquicardia, estiramento das patas traseiras (sintoma de dor), apatia e hiperestesia da cauda, análises bioquímicas e análises histológicas. No anexo 3 mostra o esquema do protocolo básico, havendo variação de número de animais, tempo e substância utilizada de protocolo para protocolo.

4.5.1 Protocolo I – DMSO (Veículo das substâncias)

Protocolo para determinar a atividade do DMSO como substância sintética nas concentrações de 20%, 40% e 50%. Foram usados camundongos da linhagem BALB/c (n=15), fêmeas com idade de dois meses.

4.5.2 Protocolo II – Protocolo Experimental

Protocolo para possível determinação da DL. Foram usados camundongos da linhagem C57BL/6 (n=20), fêmeas (n=10) e machos (n=10) com idade de dois meses. O peso dos animais variou entre 14,9 a 19,3 g para as fêmeas e 25 a 30 g para os machos. As concentrações das substâncias Triol e Da-1 administradas nos animais foi 400 µg/200 µl (20 mg/Kg) diluídas em DMSO 0,1% por duas vias: intraperitoneal (ip) ou subcutânea (sc) (Tabela 3). Nesse protocolo não houve nenhum procedimento de sangria somente a retirada dos órgãos para análise histológica.

TABELA 3 - DL₅₀ na concentração de 20 mg/Kg das substâncias Da-1 e Triol sendo administrados 400 µg/200 µL nos animais.

GRUPO	I	II	III	IV	V
 N° Animais e sexo	2 ♂ ^a 2 ♀ ^b				
Substância e via de administração	DMSO 0,1% ip ^c	TRIOL Ip	Da-1 ip	Da-1 sc ^d	TRIOL sc
a ♂	Macho				
b ♀	Fêmea				
c (ip)	intraperitoneal				
d (sc)	Subcutânea				

4.5.3 Protocolo III – Triol, Citral, Triazol

Protocolo para determinação da toxicidade do Triol, Citral, Triazol. Foram usados camundongos da linhagem C57BL/6 (n=18) e BALB/c (n=6), com idade em torno de dois meses (Tabela 4), todas fêmeas. Os animais foram pesados para determinação do cálculo do

volume de substância a ser administrada. Nesse experimento a concentração das substâncias administradas nos animais foi de 15 mg/Kg diluído em DMSO 1% usando duas vias de administração, ip e sc.

TABELA 4 - Três substâncias usadas em duas linhagens de animais divididos em quatro grupos e cada grupo com seis sendo três para cada via (ip) intraperitoneal, (sc) subcutânea usando uma concentração de 15 mg/Kg.

Linhagem	Substância pesquisada	Nº animais por via	
		ip	sc
C57BL/6	TRIAL	3	3
	TRIAZOL	3	3
	CITRAL	3	3
BALB/c	TRIAL	3	3

4.5.4 Protocolo IV – Investigação da dosagem limite da letalidade- Triol

Protocolo para DL do Triol foram usados três grupos de cinco animais da linhagem BALB/c (n=15) que foram administrados com as concentrações de 15 mg/Kg, 20 mg/Kg e 25 mg/Kg da substância TRIOL diluída em DMSO 10% por via ip.

4.5.5 Protocolo V – Triol usando o DMSO a 50% e 60%

Protocolo para determinação da interferência do DMSO no triol. Foram usados 15 animais BALB/c divididos em dois grupos: Grupo I – Foram usados sete animais administrados com Triol a uma concentração de 25 mg/Kg em DMSO 60% via ip; Grupo II – Foram usados oito animais administrados com Triol a uma concentração de 25 mg/Kg em DMSO 50%, exceto no animal oito que foi aplicado somente o DMSO 50%, todos os animais foram administrados pela via ip

4.5.6 Protocolo VI – Triazol

Protocolo para testar diferentes estruturas de triazol. Usamos 12 animais divididos em três grupos de quatro animais cada, usando quatro estruturas moleculares diferentes da

substância TRIAZOL (Triazol 1 –NHTRIOH; Triazol 2- NFTRIOH ; Triazol 3 - NBrTRIOH e Triazol 4- NCICITRIOH) na concentração de 25 mg/Kg. Todas as substâncias foram reconstituídas em DMSO 1%, sendo administrados pela via ip.

4.5.7 Protocolo VII – 20 mais a dosagem terapêutica do Triol

Protocolo com a finalidade de testar a toxicidade do TRIOL – $C_{20}H_{34}O_3$ – PM= 322 mM. Foram usados cinco animais (BALB/c) e administrados uma concentração de 50 mg/Kg em DMSO 50% por via sc. A intenção desse protocolo foi encontrar a DL_{50} . A concentração usada como parâmetro *in vitro* foi 50 μ M (10 μ L) em trabalhos *in vitro* (BARBOSA et al., 2004), usando uma dosagem de 20 vezes mais da dose terapêutica equivalente a 50 mg/Kg.

4.5.8 Protocolo VIII – Dolabellano-1 (DB-1)

Protocolo para testar a substância DB-1 (Dolabellano-1) que corresponde a fração 4 (WIF4) da primeira extração da alga *Dictyota paffii*. O material liofilizado foi reconstituído com 1 mL de DMSO 100%. Foram usados oito animais divididos em dois grupos com quatro animais cada, injetando-se 25 mg/Kg da substância DB-1 diluído em DMSO 1% por via sc.

4.5.9 Protocolo IX – Tienopiridina

Protocolo para testar um derivado do sistema 4 – (3'- nitro-fenilamino) tieno [2,3-b] piridina-5-carbonitrila reconstituída em DMSO 100% numa concentração de 50 mM e estocadas em 4° C, sintetizado no Departamento de Química Orgânica da UFF, cedido pela Prof^a. Alice Bernardino. Foram usados animais BALB/c (n=8). Seis desses animais foram administrados com uma concentração de 25 mg/Kg da substância e dois com DMSO 1% como controle por via sc.

4.5.10 Protocolo X – TRIOL 50

Esse protocolo foi administrada a substância Triol numa concentração de 50 mg/Kg reconstituído em DMSO 1% por via sc em camundongos fêmeas BALB/c (n=6)

4.5.11 Protocolo XI – Aciclovir (ACV)

Esse protocolo foi administrado 50 mg/Kg de aciclovir em DMSO 1% pela via sc em camundongos fêmeas BALB/c (n=5). Produto fornecido liofilizado pela Quality Farmácia para fins científicos (anexo 2). A concentração utilizada para controle foi de 50 mg/Kg (DE MIRANDA, KRASNY et al., 1981) e solubilizada em DMSO 1%.

4.5.12 Protocolo XII – Toxicidade subcrônica

Protocolo para a definição da toxicidade subcrônica. Utilizamos 20 ratos da linhagem Wistar, divididos em quatro grupos de cinco animais (Grupos I e III - machos e II e IV - fêmeas). Os animais foram marcados na orelha com numeração sequencial e pesados quatro vezes (uma vez por semana). Em todos os grupos foram administrados por via oral (vo) 500 µL da substância Triol, exceto os animais de n^{os} 5 (I), 10 (II), 15 (III) e 20 (IV) que foram administrados com DMSO 1% como controle. Aos grupos, I e II foi aplicada uma concentração de 20 mg/Kg e os grupos, III e IV foram aplicados uma concentração de 40 mg/Kg. As aplicações foram feitas durante 30 dias (dia sim, dia não) e no último dia, os animais foram sacrificados e retirados alguns órgãos como fígado, rim, parte do intestino delgado e estômago.

4.5.13 Síntese dos Protocolos

TABELA 5 – Protocolos de experimentos com todas as substâncias, linhagens de animais, a concentração do DMSO diluída junto com a substância, a concentração da substância e a via de administração no animal.

Protocolo	Linhagem	Substância(s)	DMSO	Concentração	Via administração
I –	BALB/C	DMSO	-	20%, 40%, 50%	sc*
II – Experimental	C57BL/6 BALB/c	Triol, Da-1	0,1%	20 mg/Kg	sc e ip**
III	C57BL/6 BALB/c	Triol, Citral, Triazol	1%	15 mg/Kg	sc e ip
IV	BALB/c	Triol	10%	15 / 20 / 25 mg/Kg	ip
V	BALB/c	Triol	50% e 60%	25 mg/Kg	ip
VI	BALB/c	Triazol (três estrut.molecul)	1%	25 mg/Kg	ip
VII	BALB/c	Triol 20X	50%	50 mg/Kg	sc
VIII	BALB/c	DB-1	1%	25 mg/Kg	sc
IX	BALB/c	Tienopiridina	1%	25 mg/Kg	sc
X	BALB/c	Triol 50	1%	50 mg/Kg	sc
XI	BALB/c	ACV***	1%	50 mg/Kg	sc
XII	WISTAR	Triol	1%	20 mg/Kg 40 mg/Kg	vo†

* sc – subcutânea **ip – intraperitoneal ***ACV – aciclovir †vo – via oral

4.6 Avaliação de apoptose por fragmentação do DNA

Foram usadas células Vero, cultivadas em DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B (fungizona). As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. As substâncias usadas foram: Dolabellanotriol (Triol), Triazol (N-Br-; N-H-), ACV e controles (CC, CC/DMSO). As substâncias foram diluídas em Dimetilsulfóxido (DMSO) 100% e estocadas a 4°C nas concentrações de 50 mM. Durante os testes, as substâncias foram diluídas em DMSO com soro.

Para o ensaio de apoptose, células Vero foram mantidas em placas de 24 poços em uma densidade de 1 x 10⁵ células/poço, tratadas na presença ou ausência dos compostos Dolabellanotriol (Triol), Triazol (N-Br-; N-H-), ACV e controles (CC, CC/DMSO), PP (padrão LGC Biotecnologia-100 pb DNA Ladder) na concentração de 50 µM, por 6 h, 12 h e

24 horas de incubação. Após esse período foi adicionado a cada poço 20 μL de tampão de lise e 10 μL de RNase (0,5 mg/mL – GIBCO) e incubados em banho-maria a 50° C/1 hora. Em seguida, foi adicionado 10 μL de proteinase K (0,5 mg/mL - GIBCO em tampão TE) a placa, mantida durante 1 hora em banho-maria a 50° C e finalmente adicionado 8 μL do tampão de amostra e incubada em banho-maria durante 15 minutos a 70°C.

Foi preparado o gel de agarose (BIOAMÉRICA) para eletroforese de DNA, adicionando-se Tampão de TBE 1X com Brometo de etídio (SIGMA), utilizando-se uma voltagem de ~50mV.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da Citotoxicidade e Ensaio da atividade antiviral.

Nos trabalhos *in vitro* envolvendo a análise da atividade antiviral foram usados tanto o HIV-1 como o HSV-1 e os dados obtidos estão descritos na tabela 6. Os resultados mostraram que as substâncias pesquisadas apresentam baixa citotoxicidade nas células VERO e induzem uma resposta inibitória na replicação viral de ambos os vírus. Analisando o efeito sobre o HSV-1, a substância Triazol apresentou menor citotoxicidade que as demais substâncias com o valor de CC_{50} igual a 1030 sendo este valor melhor do que aquele obtido com o Aciclovir. Também em relação ao HIV-1 o Triazol inibiu a replicação viral em 98%, de acordo com as referências citadas na Tabela 6.

TABELA 6 – Valores referentes às substâncias pesquisadas no qual foram encontrados CC_{50} e o percentual de inibição da replicação dos vírus HIV-1 (atividade na Transcriptase Reversa (TR) e HSV-1 em testes *in vitro*).

Substância Utilizada	CC_{50} (μ M)	Inibição (%) 50 μ M		Referência
		HIV-1	HSV-1	
Tieno-Piridina 4-(3 -nitro-fenilamino) tieno[2,3- <i>b</i>]piridina-5-carbonitrila	<300	NR*	99	(COSTA, 2007)
Triazol -m-Br	1030	98	NR	(EYMARA, 2007)
TRIOL	184 \pm 3.4	80	89	(BARBOSA, 2004)
Da-1	>200	40	NR	(PEREIRA, 2004)
Aciclovir	850 \pm 30	30	79 \pm 3.6	(BARBOSA, 2004)
AZT	2520	94	NR	(BARBOSA, 2004)
Citral	NM**	NM	98,8	(SCHNITZLER, 2008)

*NR – Não realizado; ** NM – Não mostrado

5.2 Avaliação da Toxicidade utilizando animais experimentais: camundongos (C57BL/6 e BALB/c) e ratos (Wistar)

5.2.1 Análises experimentais em Camundongos

Os resultados obtidos nesse estudo com animais foram divididos em Sangria Zero (camundongos antes das aplicações das substâncias) e protocolos de I a XII usando as substâncias pesquisadas. Os resultados foram analisados abordando-se os seguintes parâmetros: estado comportamental dos animais após administração das substâncias pesquisadas, análises bioquímicas e análises histopatológicas.

Nos gráficos das análises bioquímicas, as linhas paralelas demonstram os valores de referência calculados pela sangria zero de todos os animais utilizados nos experimentos.

5.2.2 Análise bioquímica sanguínea (sangria zero)

Antes da administração das substâncias foram dosados no soro/plasma dos animais os níveis de: glicose, ureia, ácido úrico e TGP/ALT. Esse procedimento gerou a possibilidade de estabelecer os valores máximos e mínimos de normalidade destes parâmetros bioquímicos entre os animais do nosso biotério. Como todos os animais foram individualmente marcados foi possível um acompanhamento pareado após a administração das substâncias a serem testadas. Nossos resultados estão resumidos na Tabela 7 onde apresentamos os valores médios \pm desvio padrão.

TABELA 7- Valores de referência obtidos pela sangria zero calculado pela média dos valores obtidos do n° de animais (BALB/c) para cada parâmetro para o NAL-UFF.

BALB/c	GLICOSE mg/dL	UREIA mg/dL	ÁCIDO ÚRICO mg/dL	TGP/ALT U/L
N° Animais	31	56	62	70
Média	123 (\pm 21,5)	61 (\pm 18,7)	2,7 (\pm 1,7)	25 (\pm 14,1)

5.2.3 Análise histológica dos animais controle

Nas análises histológicas dos animais controle administradas apenas com o veículo para as substâncias teste (DMSO) e animais não administrados de ambas as linhagens (C57BL/6 e BALB/c), apresentaram-se com aspectos normais nos órgãos observados. Todos os órgãos escolhidos para as análises dos animais administrados com as substâncias experimentais foram comparados com os que foram administrados com DMSO, bem como, com animais normais ou sem manipulação. A análise histológica do fígado apresentou hepatócitos preservados com pouca congestão e sem processo inflamatório (Figura 20 a). Os rins apresentaram glomérulos e túbulos preservados com os núcleos intactos (Figura 20 b). No duodeno, as vilosidades e a junção com a musculatura se mostram preservados (Figura 21 a) e no estomago não se observou nenhuma alteração (Figura 21b).

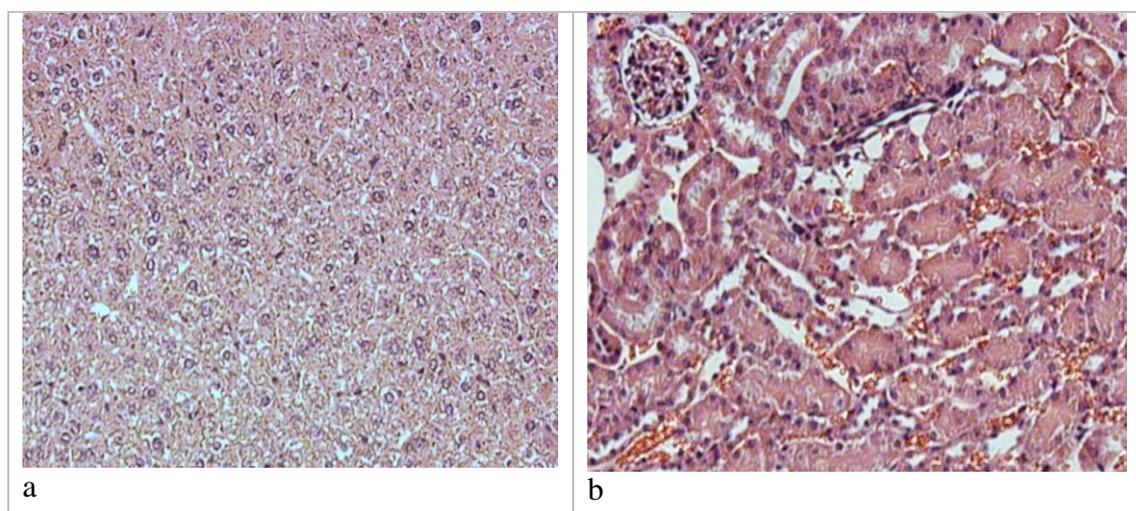


Figura 20 – **a - Fígado** normal mostrando os hepatócitos preservados com pouca congestão e sem processo inflamatório. Aumento 200x; **b - Rim** normal mostrando os glomérulos e túbulos preservados com os núcleos intactos. Pequena congestão. Aumento 200X. H&E.

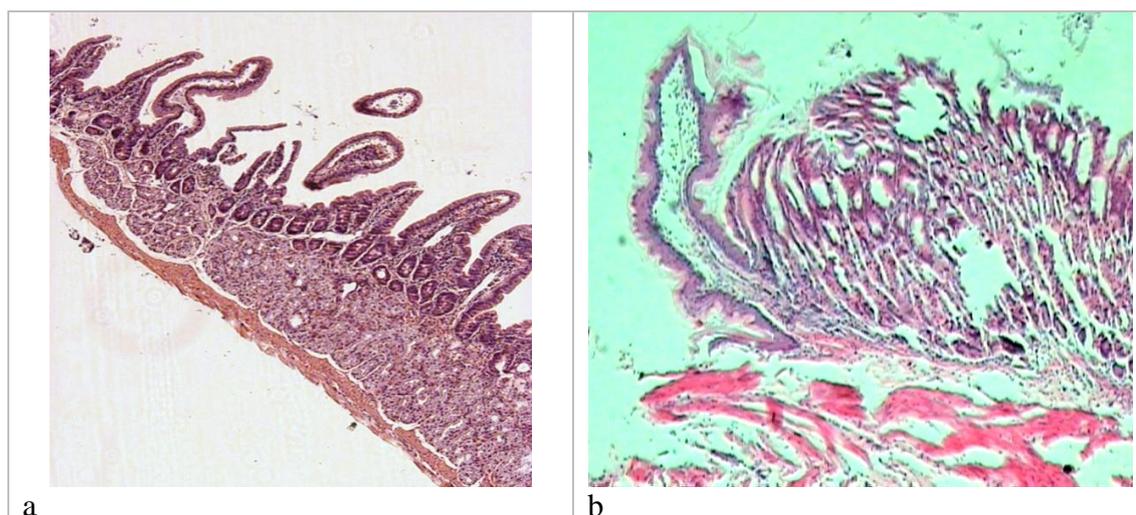


Figura 21- **a** – Duodeno normal. 200X. H&E; **b**- Trato gastro-intestinal-normal. Junção esôfago-gastro. 200 X. H&E.

5.2.4 PROTOCOLO I – DMSO 20%, 40% E 50% - Análise bioquímica sanguínea e histologia.

Foi usada a substância DMSO em concentrações de 20%, 40% e 50% para avaliar possíveis modificações metabólicas do animal, análise de comportamento, testes bioquímicos e histológicos. Na análise de comportamento não houve modificações significativas nem morte dos animais depois de administradas com a substância DMSO nas concentrações citadas. Na Tabela 8, demonstramos os resultados de todos os parâmetros utilizados para esse protocolo.

TABELA 8- Valores das médias das concentrações e desvio padrão nos parâmetros de ureia, ácido úrico e TGP/ALT analisadas na substância DMSO em 20%, 40% e 50%.

Substância	UREIA (mg/dL)			ÁCIDO ÚRICO (mg/dL)			TGP/ALT (U/L)		
	Sg.0	Sg.1	Sg.2	Sg.0	Sg.1	Sg.2	Sg.0	Sg.1	Sg.2
DMSO 20%	NR*	NR	NR	4,6 (±2,3)	1,4 (±0,3)	2,1 (±1,0)	22 (±5,1)	13 (± 1,7)	23 (±7,2)
DMSO 40%	NR	NR	NR	4,6 (±2,9)	2,0 (±0,2)	2,3 (± 0,7)	24 (±8,6)	28 (± 19,8)	19 (± 5,7)
DMSO 50%	63 (±1,6)	48 (±6,3)	87 (±4,3)	2,7 (± 0,6)	2,2 (± 0,4)	1,6 (±0,9)	22 (±7,4)	18 (±6,1)	6 (±2,2)

* NR – não realizada

TABELA 9 – Valores estatísticos de significância nos parâmetros de ureia, ácido úrico e TGP/ALT para DMSO 20%, 40% e 50%.

Substância	UREIA (mg/dL)	ÁCIDO URICO (mg/dL)	TGP/ALT (U/L)
DMSO 20%	*NR	Sg.0-1 (p<0,05) Sg.0-2 (p<0,05)	Sg.0-1 (p<0,05) Sg.1-2 (p<0,05)
DMSO 40%	NR	Sg.0-1 (p<0,05) Sg.0-2 (p<0,05)	**NS
DMSO 50%	Sg.0-1 (p< 0,001) Sg.0-2 (p< 0,001) Sg.1-2 (p< 0,001)	Sg.0-2 (p<0,05)	Sg. 0-2 (p<0,01) Sg.1-2 (p<0,01)
* NR – não realizada		**NS – não significativa (p>0,05)	

Na tabela 9 mostramos os valores estatísticos no parâmetro do ácido úrico para o DMSO 20% e 40% houve uma diminuição nos níveis das concentrações entre as Sg.0 e Sg.1 e Sg.2 de P<0,05 (Figura 22). Para o teste da TGP/ALT no DMSO 20% houve uma diminuição da Sg.0 a 1 de 41% se recuperando na Sg.2 (Figura 23); no DMSO 40% a TGP/ALT sofreu uma diminuição da Sg.1 e 2 de -32% (P<0.05). Pela substância DMSO 50% no teste de ureia houve uma diminuição significativa entre as sangrias 0 e 1 de -24%, havendo recuperação entre as sangrias 1 e 2 de 81% (Figura 24 a). No teste do ácido úrico houve variação significativa entre as sangrias 0 e 2 de -41% (Figura 24 b). Na análise para TGP/ALT diminuição significativa entre as sangrias 0 e 2 de -73% (Figura 25).

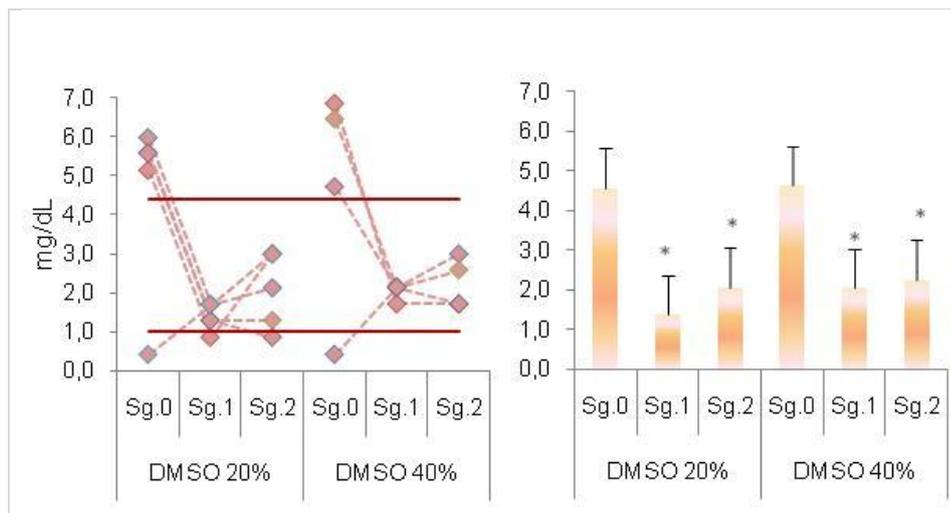


Figura 22- Os resultados obtidos da análise do ácido úrico para DMSO 20% e 40% mostraram que em ambas as concentrações do DMSO houve uma diminuição significativa entre as sangrias Sg.0 e Sg.1 (p<0,05) e para Sg.2 (p<0,05).

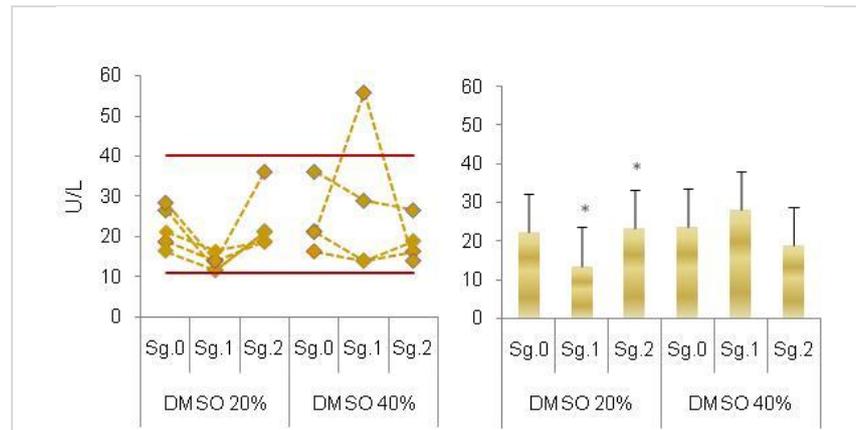


Figura 23- Os resultados obtidos da TGP/ALT para DMSO 20% e 40% mostraram que no DMSO 20% houve uma diminuição significativa entre as Sg.0 e Sg.1 ($p < 0,05$) e um aumento da Sg.1 e Sg.2 ($p < 0,05$) e no DMSO 40% não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

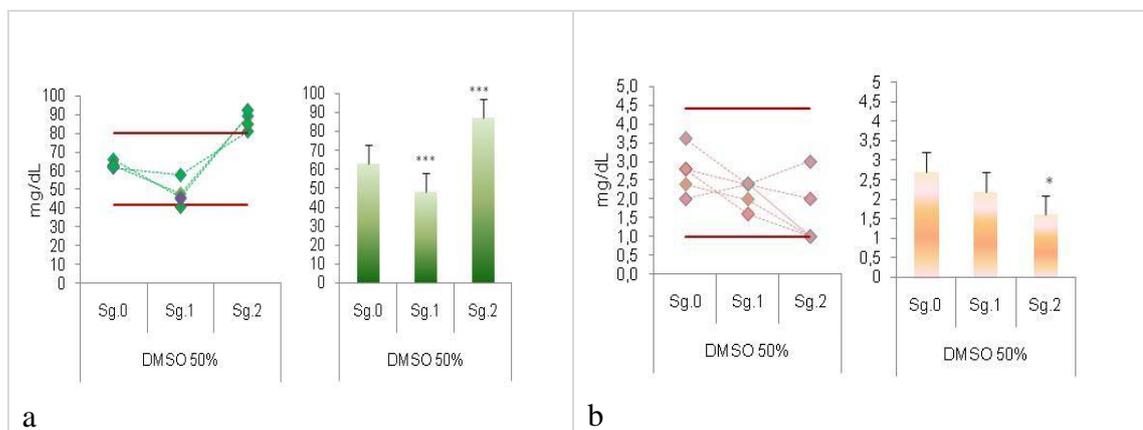


Figura 24- Os resultados obtidos das análises de ureia e ácido úrico para o DMSO 50% mostraram que. **a-** na ureia houve diminuição da Sg.0 e 1 ($p < 0,001$) e um aumento significativo da Sg.1 para Sg.2 ($p < 0,001$); **b-** no ácido úrico houve uma diminuição da Sg.1 para Sg.2 ($p < 0,05$).

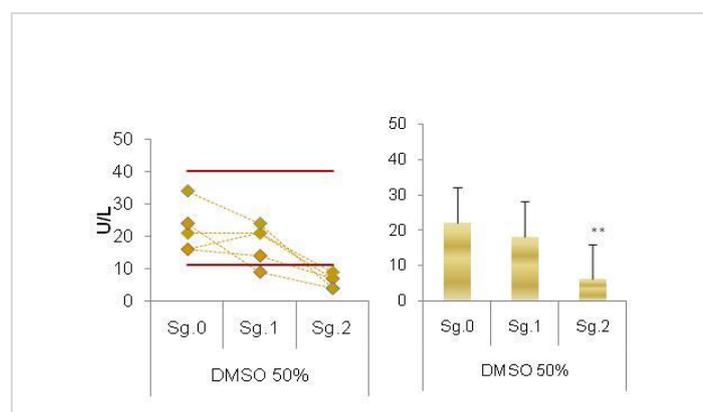


Figura 25- Os resultados obtidos da TGP/ALT para o DMSO 50% mostraram que houve diminuição significativa Sg.1 para 2 ($p < 0,01$).

Na análise histopatológica do duodeno e estômago dos animais administrados com DMSO 1% houve alguma alteração morfológica. No fígado houve presença de edema intracelular nos hepatócitos (figura 26 a) e nos rins apresentou edema, infiltrado inflamatório, hemorragia difusa cortical e medular (Figura 26 b). Porém quando utilizamos DMSO 20% e 40%, observamos congestão vascular, infiltrado inflamatório leve (mononuclear), edema extravascular e proliferação celular aumentada (clusters) no fígado (Figuras 27 a). Nos rins houve presença de congestão vascular, infiltrado inflamatório, edema, mas a celularidade mantida (Figura 27 b). No estômago e duodeno a celularidade ficou mantida (figura 28 a,b). O tratamento com DMSO 50% induziu no fígado o aparecimento de células polimorfonucleares e de células neoplásicas (Figura 29 a) e nos rins os túbulos se encontraram parcialmente alterados, morte celular com os glomérulos mantidos (Figura 29 b).

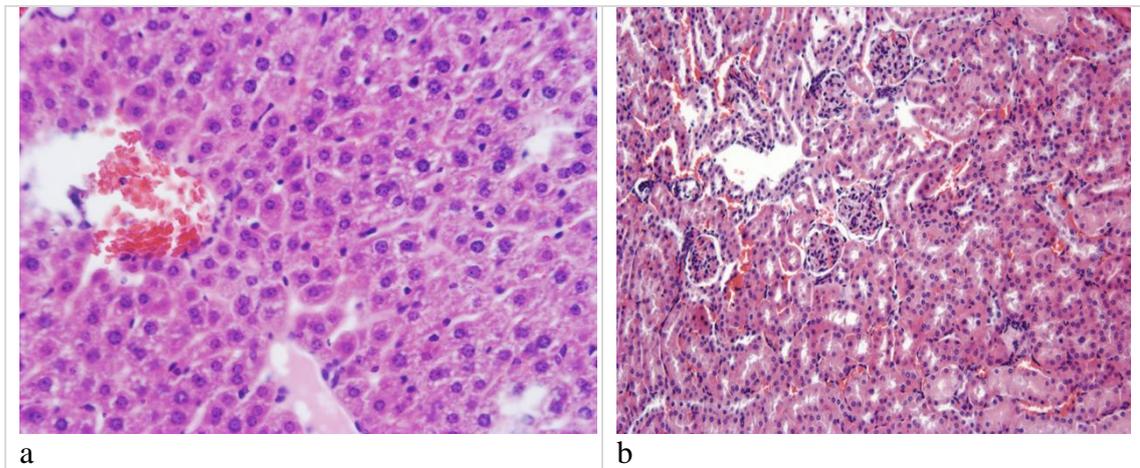


Figura 26- Órgãos dos animais administrados com DMSO 1%. **a – Fígado** - presença de edema intracelular nos hepatócitos. 400X. H&E; **b – Rim** - presença de edema, infiltrado inflamatório leve, hemorragia difusa cortical e medular. 200X. H&E.

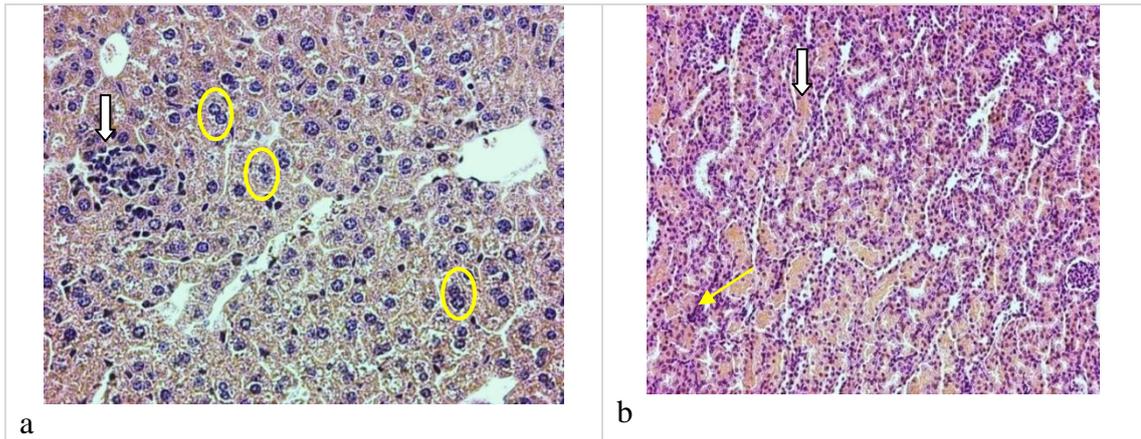


Figura 27- Órgãos dos animais administrados com DMSO 20% e 40% - **a- Fígado** - presença de congestão vascular, infiltrado inflamatório leve (mononuclear (seta branca)), edema extravascular, proliferação celular aumentada (clusters – círculo amarelo) . 200X. H&E; **b – Rim** - presença de congestão vascular (seta branca), infiltrado inflamatório leve (seta amarela), edema extravascular, celularidade mantida. 200X. H&E.

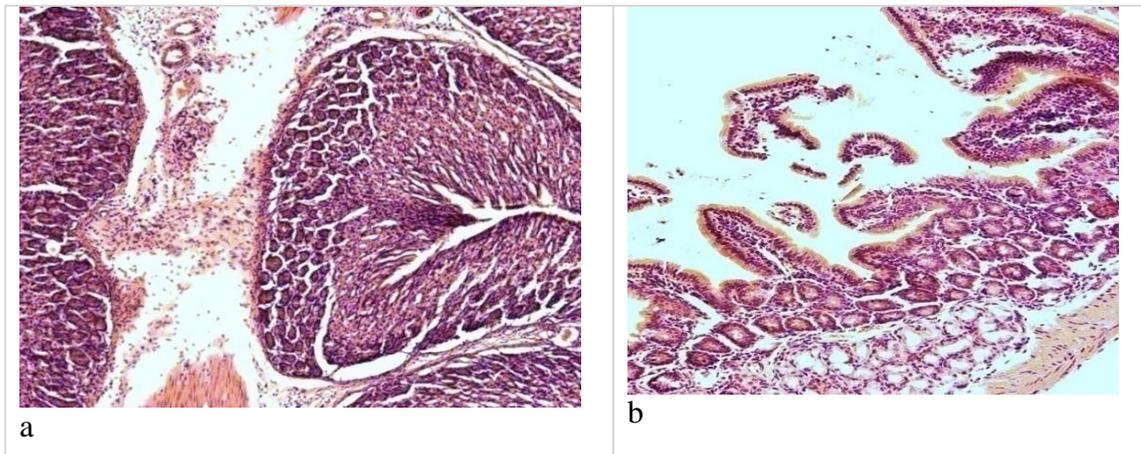


Figura 28- Órgãos dos animais administrados com DMSO 20% - **a – Estômago** - normal. 200X. H&E; **b – duodeno** - celularidade mantida, sem alterações significativas. 200 X. H&E

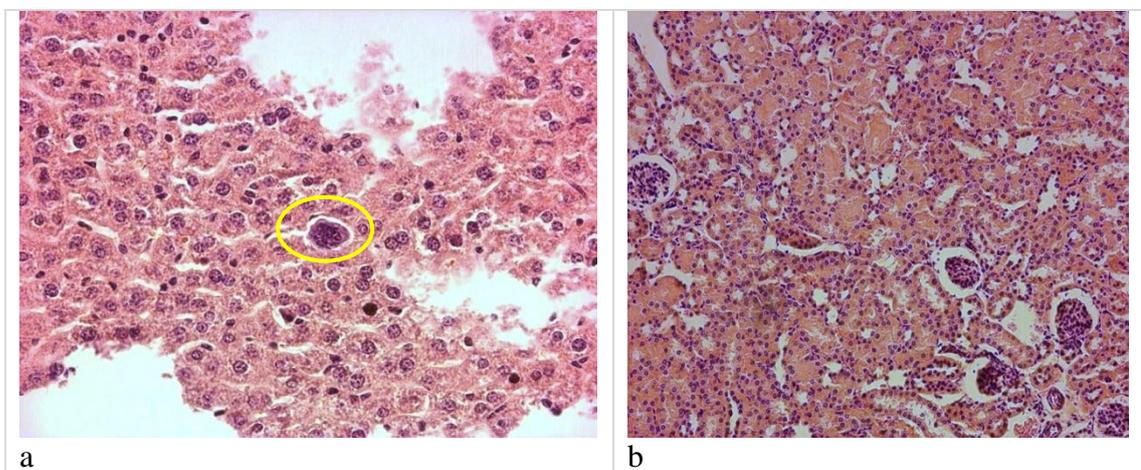


Figura 29- Órgãos dos animais administrados com DMSO 50%. **a – Fígado** - presença de células polimorfonucleares e células atípicas (?) (círculo amarelo). 400 X. H&E; **b – Rim** - presença de túbulos

parcialmente alterados, morte celular, congestão vascular, edema intersticial. Glomérulos mantidos. 400 X. H&E.

5.2.5 PROTOCOLO II – EXPERIMENTAL (TRIOL, Da-1) – Análises comportamentais e histológicas.

Nesse protocolo a avaliação das respostas dos animais às substâncias foi feita somente pelos dados comportamentais e histopatológicos, pois como houve a morte da maioria dos animais, logo depois a administração das substâncias não foi possível fazer a análise bioquímica.

As manifestações citadas nos grupos de animais C57BL/6 foram observadas visualmente e o resultado final foi à morte ou não dos animais administrados. Os animais que foram a óbito apresentaram apatia, pelos eriçados, estiramento das patas e convulsões. A Tabela 10 apresenta grupos com as substâncias administradas e o tempo de sobrevivência. A concentração administrada das substâncias em todos os animais foi à mesma (2 mg/mL). A dosagem mostrou ser letal, mas animais acima de 22 g, exceto os administrados pelo Da-1 via ip, os animais sobreviveram. Supomos que a atuação das substâncias nos animais que foram a óbito foi devido ao baixo peso.

TABELA 10– Relação das substâncias DMSO 0,1%, TRIOL, Da-1, administradas pelas vias ip e sc com o tempo de sobrevivência após a administração (≤ 24 H, ≤ 48 H, 10 dias).

Grupo	Substância	Via de administração	Tempo de sobrevivência
I	0,1% DMSO	ip	10 dias
II	TRIOL	ip	2 ♀ - < 24 H 2 ♂ - 10 dias (sacrifício)
III	Da-1	ip	2 ♀ - ≤ 24 H 2 ♂ - ≤ 24 H
IV	Da-1	sc	2 ♀ - ≤ 48 H 2 ♂ - 10 dias (sacrifício)
V	TRIOL	sc	1 ♀ - < 24 H 1 ♀ - 10 dias (sacrifício) 2 ♂ - 10 dias (sacrifício)

Na administração com o Triol via ip, as fêmeas sobreviveram até 10 horas mostrando alterações importantes tanto no fígado quanto no rim; os machos sobreviveram até o tempo determinado desse experimento, (10 dias) e mostraram alterações semelhantes em ambas as vias utilizadas (sc e ip); A administração com Da-1 induziu uma resposta letal, os animais foram a óbito por volta de 4 horas.

Na análise histopatológica, todos os órgãos estudados foram afetados, tanto em machos quanto em fêmeas. O fígado, um dos órgãos mais afetados para todas as substâncias administradas Triol (ip) (Figuras. 30 a,b), Triol (sc) (Figuras 32a), Da-1 (ip) (Figuras 33 a,b) e Da-1 (sc) (Figuras 35 a) apresentou, infiltrado inflamatório intenso, congestão vascular moderada, edema, degeneração hidrópica. O rim, outro órgão bem comprometido pelas substâncias Triol (ip) (Figuras 31 a,b), Triol (sc) (Figura 32 b), Da-1 (ip) (Figuras 34 a, b) e Da-1 (sc) (Figura 35 b), apresentou destruição celular intensa, edema acentuado intracelular, presença de células hemáticas, infiltrado inflamatório focal, hemorragia intensa no córtex e presença de cilindros hemáticos. No duodeno e estômago, foram observadas algumas alterações importantes principalmente no intestino que mostrou um achatamento importante das vilosidades.

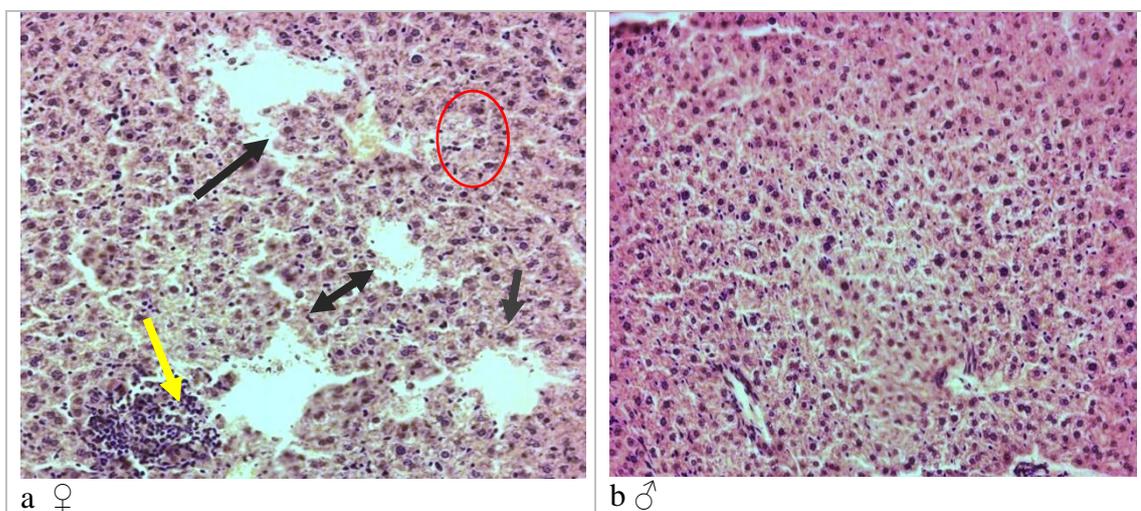


Figura 30- **Fígado- Triol (ip)** - a ♀ –Presença de infiltrado inflamatório intenso tipo focal e difuso (seta amarela), sinais de necrose (setas pretas). Edema intersticial difuso de leve a moderado, degeneração hidrópica dos hepatócitos. A variação de intensidade desses aspectos foi de animal para animal. Congestão vascular

(círculo vermelho) moderado. 200 X. H&E; **b** ♂ – Presença de edema intersticial difuso de leve a moderado, hepatócitos em degeneração hidrópica, alta percentagem de células neoplásicas; infiltrado inflamatório moderados com acúmulos focais. 200 X. H&E .

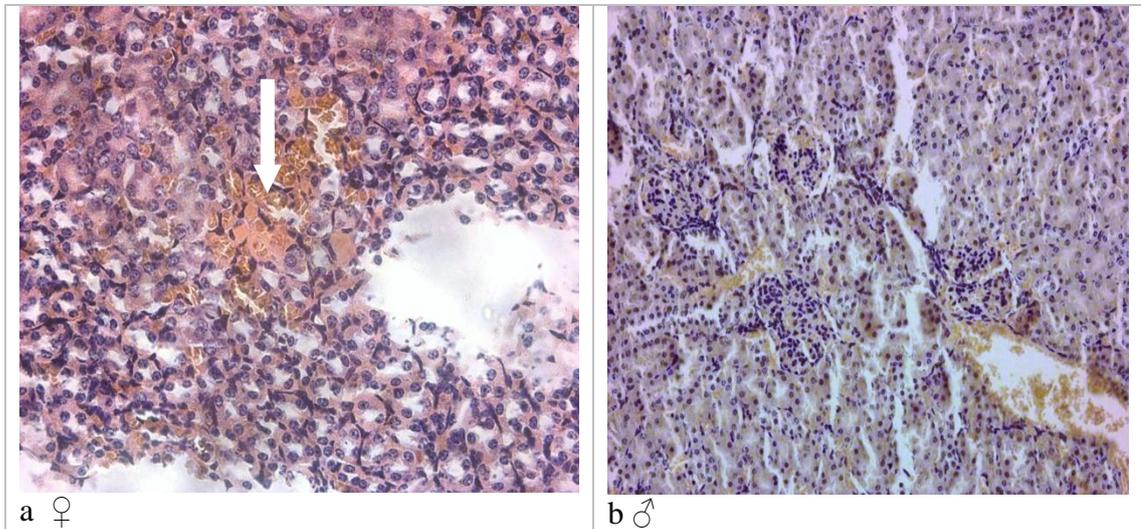


Figura 31- **Rim- Triol (ip)** - **a** ♀ - Presença de destruição celular intensa, edema acentuado intracelular, presença de células hemáticas (seta branca). Aumento 200 X. H&E; **b** ♂ - Presença de edema acentuado, lesão glomerular acentuada, infiltrado inflamatório focal, congestão acentuada, hemorragia glomerular e intersticial. 200 X. H&E.

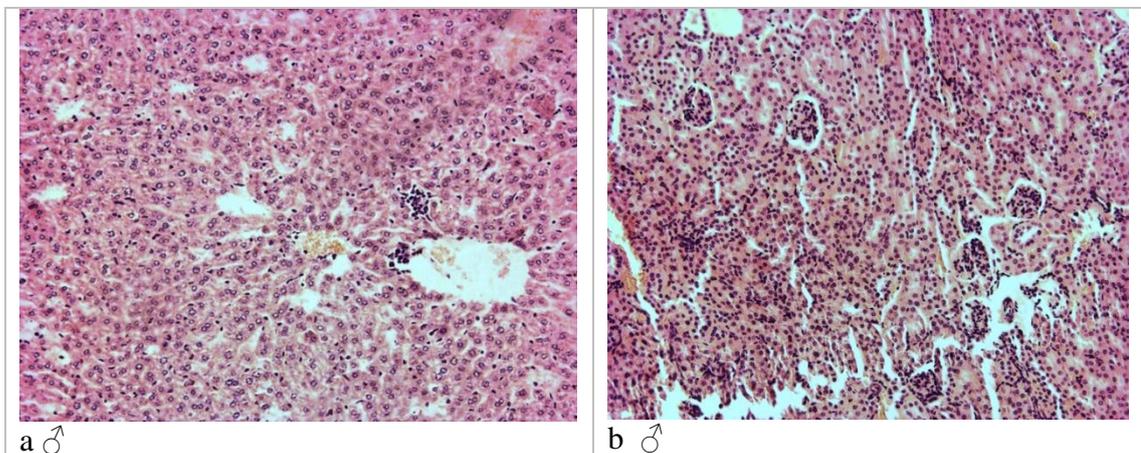


Figura 32- **Triol (sc)** – **a** ♂ - **Fígado** – Presença de focos com congestão vascular intracelular , edema intersticial, lesão celular (necrose) difusa, infiltrado inflamatório agudo e difuso. 200 X. H&E; **b** ♂ - **Rim** – Presença de acúmulos com focos de infiltrado inflamatório acentuado e difuso, glomérulos apresentando em sua maioria edema e, por vezes lise. 200X. H&E.

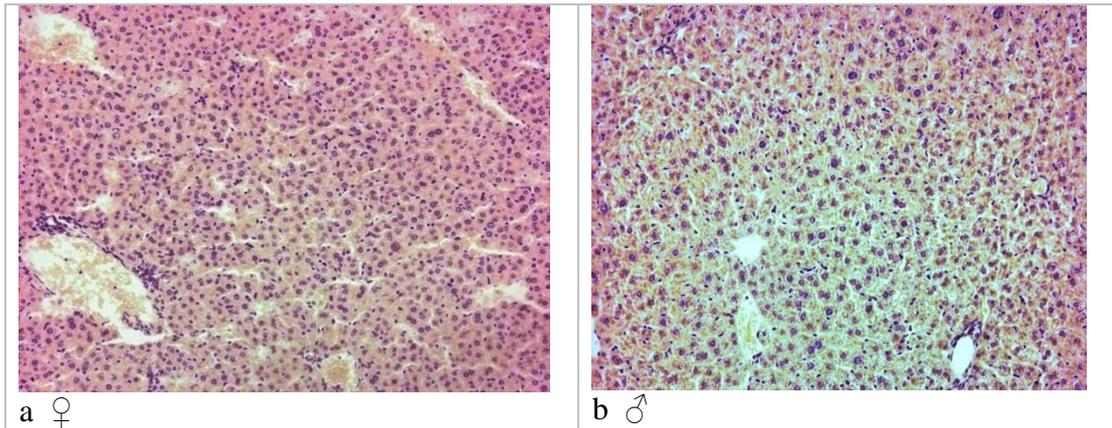


Figura 33– **Fígado - Da-1 (ip)** – **a** ♀ – Presença de hepatócitos levemente edemaciados, infiltrado inflamatório moderado e difuso, acentuada presença de congestão vascular, presença de hemorragia focal, 200 X. H&E; **b** ♂ – Presença congestão vascular acentuada, infiltrado inflamatório moderado (difuso), algumas áreas com hepatócitos com degeneração hidrópica, células edemaciadas de leve a moderado. 200 X. H&E.

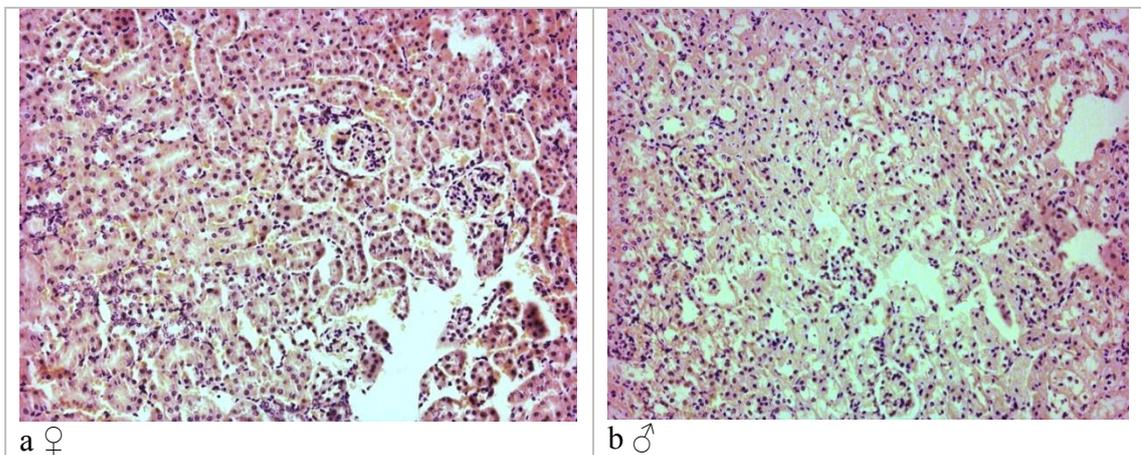


Figura 34– **Rim – Da-1 (ip)** - **a** ♀ – Presença de hemorragia difusa em toda a extensão do parênquima renal, infiltrado inflamatório de leve a moderado, presença de hemorragia intracapsular glomerular. 200X.; **b** ♂ – presença de congestão vascular acentuada na área do córtex e medular, presença de hemorragia intratubular leve, infiltrado inflamatório leve, necrose intensa na área tubular. 200 X. H&E.

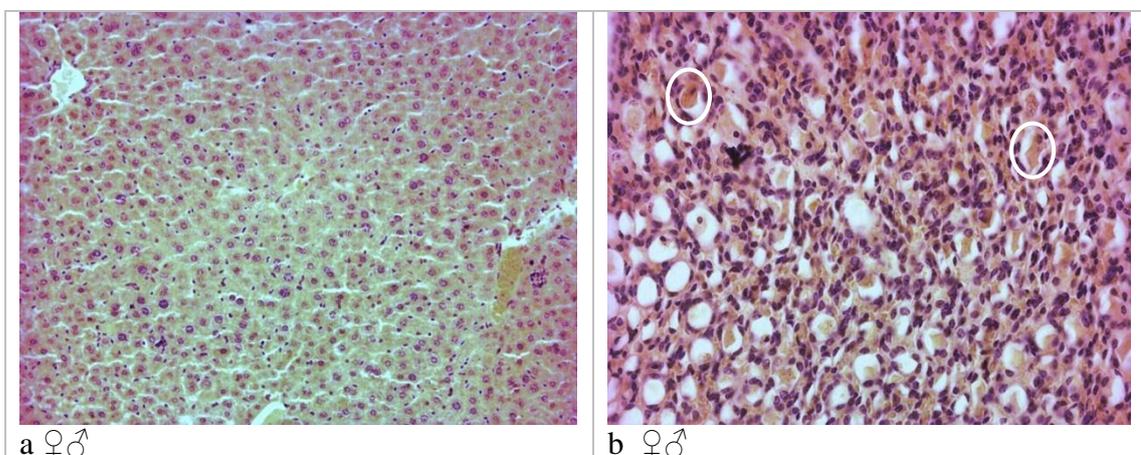


Figura 35– **Fígado - Da-1 (sc)** ♀♂ – **a** – Presença de focos de congestão vascular, infiltrado inflamatório acentuado. 200 X. H&E; **b** - Rim ♀♂ – Presença de hemorragia extensa no córtex, congestão vascular acentuada, infiltrado inflamatório leve a moderado capsular, túbulos proximais e distais, edema acentuado, presença de cilindros hemáticos (círculo em branco). 200 X. H&E.

5.2.6 PROTOCOLO III – Triol, Citral, Triazol – Análises bioquímicas e histológicas

Nesse protocolo foram usados três camundongos (fêmeas) por grupo. Nenhum dos animais faleceu em decorrência do tratamento com 15 mg/Kg das substâncias Triol, Citral e Triazol diluídos em DMSO 1%, não foram observadas mudanças comportamentais.

As análises bioquímicas após a administração de Triol, Citral ou Triazol, nos animais C57BL/6 e BALB/c, pelas vias ip e sc foram nas dosagens de glicose e ureia (Tabela 11). Não houve alteração significativa na dosagem de Glicose (Figuras 36,38, 40 (sc), 42 (sc)) após a administração de qualquer uma das três substâncias entre as sangrias em nenhuma das duas linhagens, exceto pelo TRIOL pela via ip da linhagem C57BL/6 (figura 40 (ip) e 42 (ip)) Sg.0 e 2 de $P < 0,01$ e Sg.1 e 2 de $P < 0,05$. Os animais (BALB/c e C57BL/6) administrados com TRIOL e CITRAL tanto por via ip como por sc não apresentaram alterações significantes nas concentrações de ureia (Figuras 37, 39, 41). A única substância que levou a alteração nas concentrações de ureia foi a administração de 15 mg/Kg TRIAZOL por ambas as vias no camundongo C57BL/6 (Figuras 43), pela via ip houve um decréscimo entre as sg.0 e 1 de -4%, recuperando Sg.1 e 2 de 36%. As concentrações de ureia pela via ip diminuiram da Sg.0 para Sg1 ($p < 0,05$) e um aumento da Sg.1 para Sg.2 ($p < 0,05$); pela via sc às concentrações diminuiram da Sg.0 para Sg.1 ($p < 0,05$).

TABELA 11- Resultados das concentrações, desvio padrão e significância (p) de glicose e ureia nos animais (C57BL/6 e BALB/c) administrados pelas substâncias Triol, Citral e Triazol.

Subst./ Animal		Glicose (mg/dL)				Ureia (mg/dL)			
		Sg.0	Sg.1	Sg.2	p (Sg.0,1,2)	Sg.0	Sg.1	Sg.2	p (Sg.0,1,2)
Triol BALB/c	ip	78 (± 4,2)	93 (± 14,0)	74 (± 4,9)	NS	56 (± 13,1)	69 (± 6,5)	53 (± 2,5)	NS
	sc	77 (±6,0)	97 (18,0)	85 (± 18,0)	NS	57 (±3,0)	58 (± 5,1)	61 (± 10,7)	NS
Triol C57BL/6	ip	85 (± 7,1)	78 (± 10,0)	52 (± 4,7)	0-2<0,05	70 (±12,5)	58 (±9,5)	54 (±2,1)	NS
	sc	70 (± 21,2)	57 (± 12,2)	48 (± 13,2)	NS	52 (±8,7)	70 (±7,9)	70 (±1,5)	0-1<0,05 0-2<0,05
Citral C57BL/6	ip	60 (±1,0)	97 (±13,0)	71 (±26,3)	0-1<0,05	54 (±7,2)	60 (±15,6)	60 (±10,7)	NS
	sc	99 (±10,6)	92 (±13,0)	66 (±9,0)	NS	58 (±11,5)	58 (±3,6)	71 (±14,0)	NS
Triazol C57BL/6	ip	84 (11,0)	81 (±7,1)	52 (±10,4)	NS	83 (±8,6)	56 (±9,0)	74 (±2,3)	0-1<0,05 1-2<0,05
	sc	66 (±23,0)	72 (±18,4)	59 (±24,3)	NS	79 (±8,1)	62 (±3,1)	66 (±4,4)	0-1<0,05 0-2<0,05

* NS – não significante (p>0,05)

TRIOLO – BALB/c

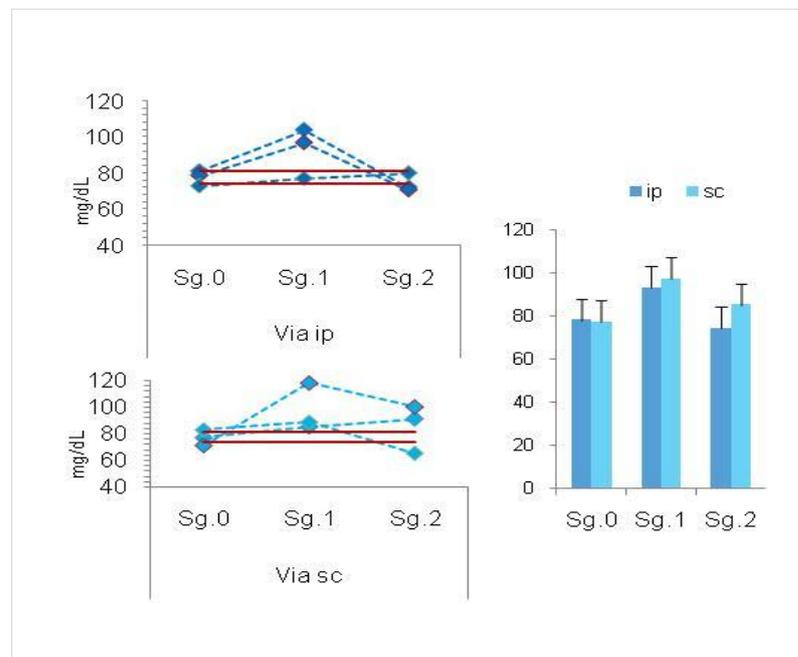


Figura 36– Dados da análise de Glicose (BALB/c-Triol) mostraram a variação das amostras de três animais usados em cada via de administração (ip e sc) das 3 sangrias 0 - 5º e 10º dia. As duas linhas paralelas correspondem aos valores de referência de todo o experimento para glicose no plasma. Não houve diferença significativa nos resultados em ambas as vias (p>0,05).

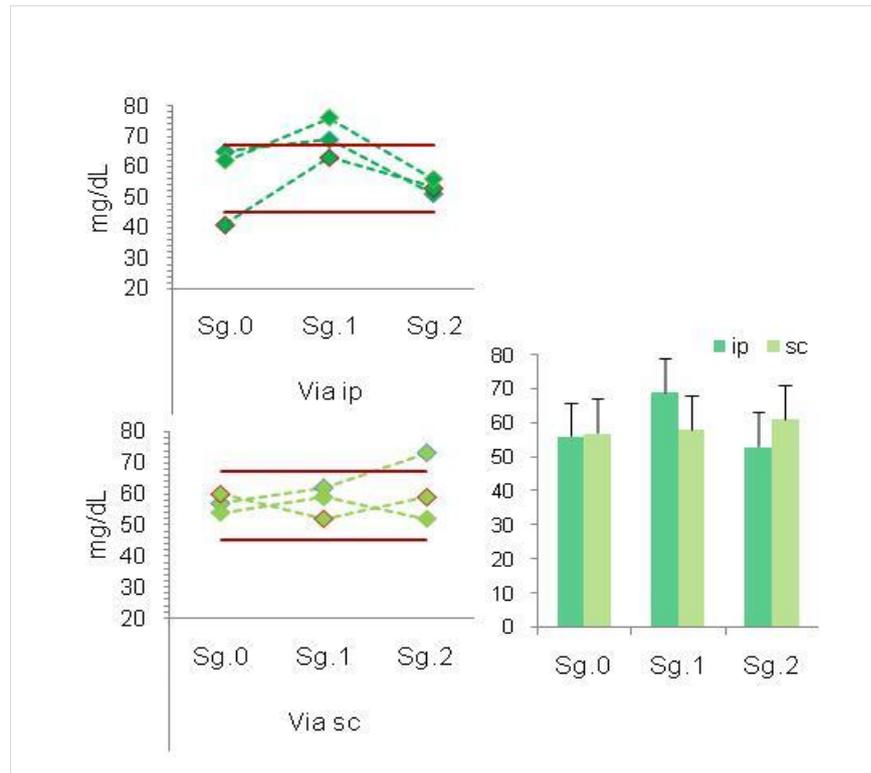


Figura 37- Na análise da ureia (BALB/c – Triol) mostraram a variação das amostras de três animais usados em cada via de administração (ip e sc) das 3 sangrias 0 - 5º e 10º dia. Não houve diferença significativa nos resultados em ambas as vias ($p>0,05$).

TRIOI – C57BL/6

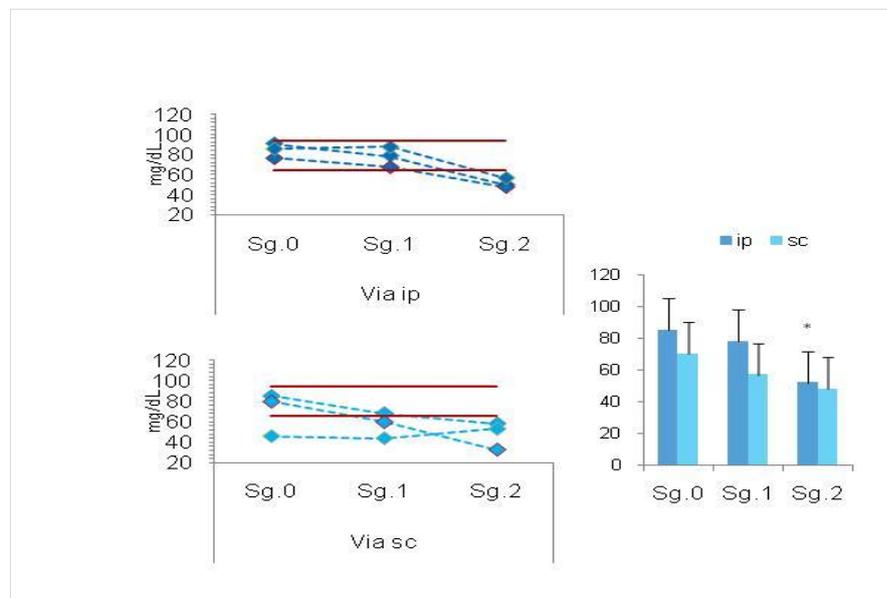


Figura 38- Dados da análise de Glicose (C57BL/6-Triol) mostraram a variação das amostras de três animais usados em cada via de administração (ip e sc) das 3 sangrias 0 - 5º e 10º dia. Na via ip mostra que houve um decréscimo significativo da Sg.0 para Sg.2 ($p<0,05$); na via sc não houve diferença significativa.

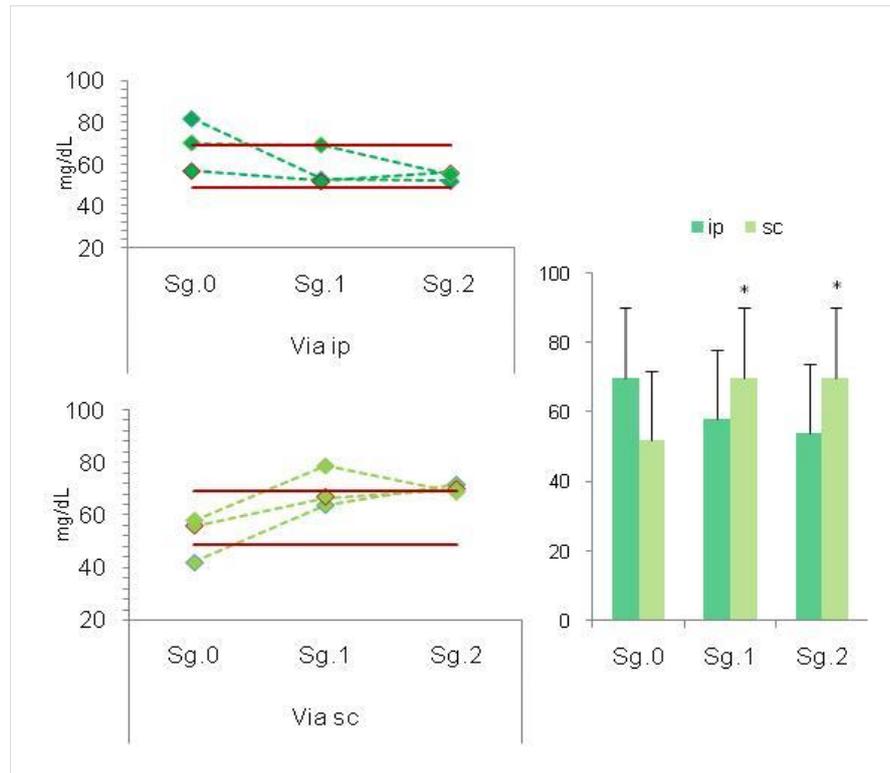


Figura 39- Dados da análise de ureia (C57BL/6-Trio1) na via ip não houve significância, mas na via sc houve um acréscimo da Sg. 0 para Sg.1 e para Sg.2(p<0,05).

CITRAL – C57BL/6

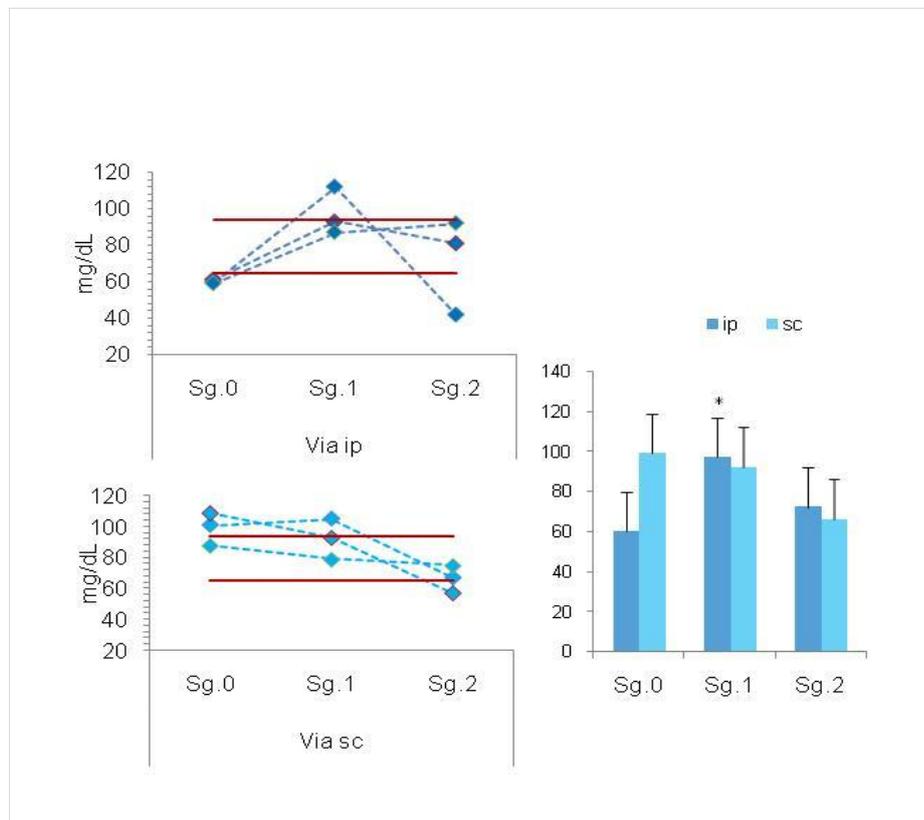


Figura 40- Dados da análise de Glicose (C57BL/6- Citral) mostrou que pela via ip houve um aumento significativo da Sg.0 para 1 ($p < 0,05$) e pela via sc não houve diferença significativa.

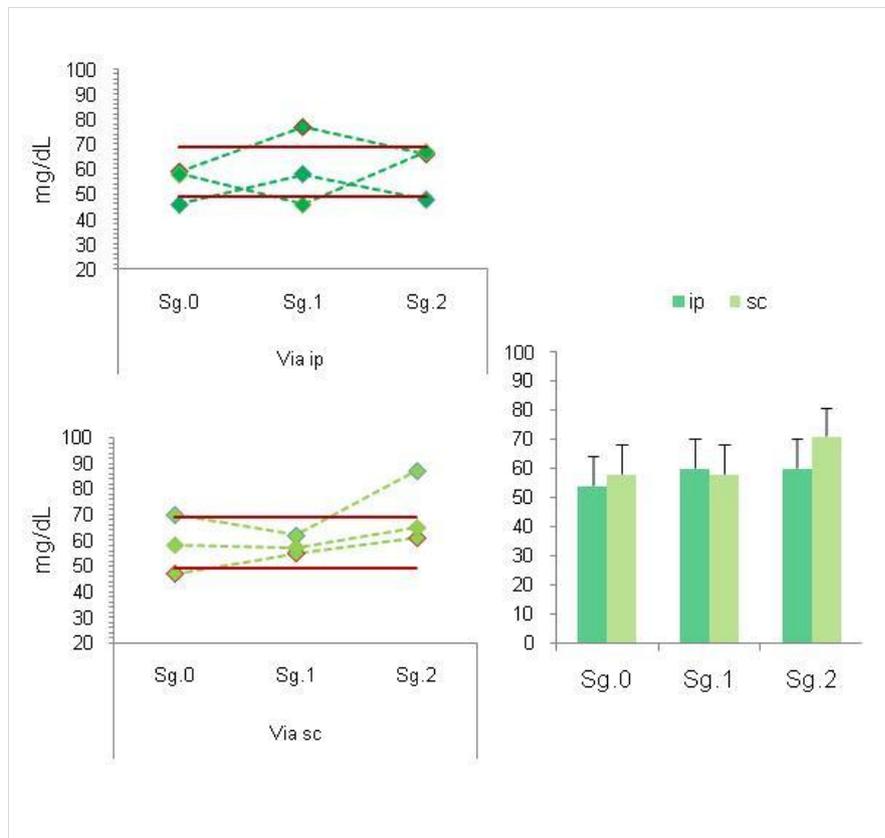


Figura 41- Dados na análise da ureia (C57BL/6-Citral) mostraram que não houve significância em ambas as vias (ip e sc) para esse parâmetro.

TRIAZOL – C57 BL/6

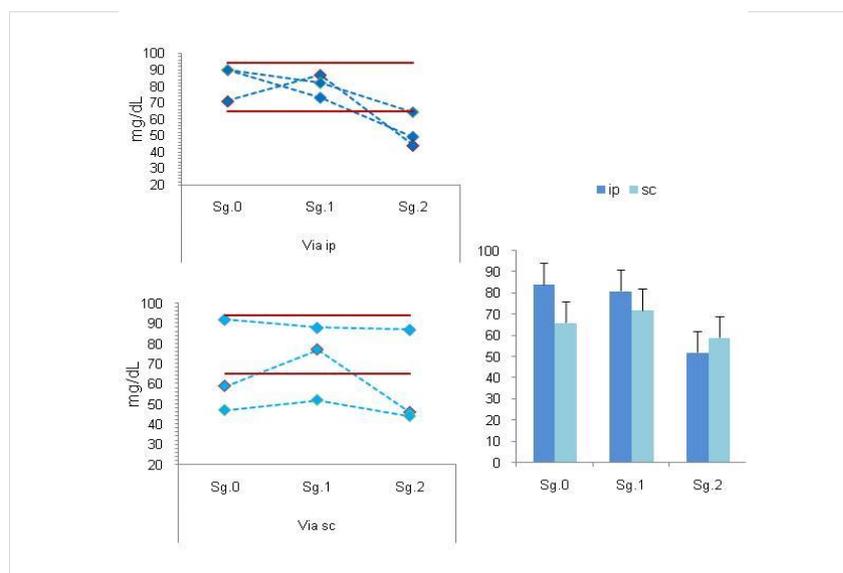


Figura 42- Dados de análise de Glicose (C57BL/6-Triazol) mostrou que em ambas as vias não houve diferença significativa.

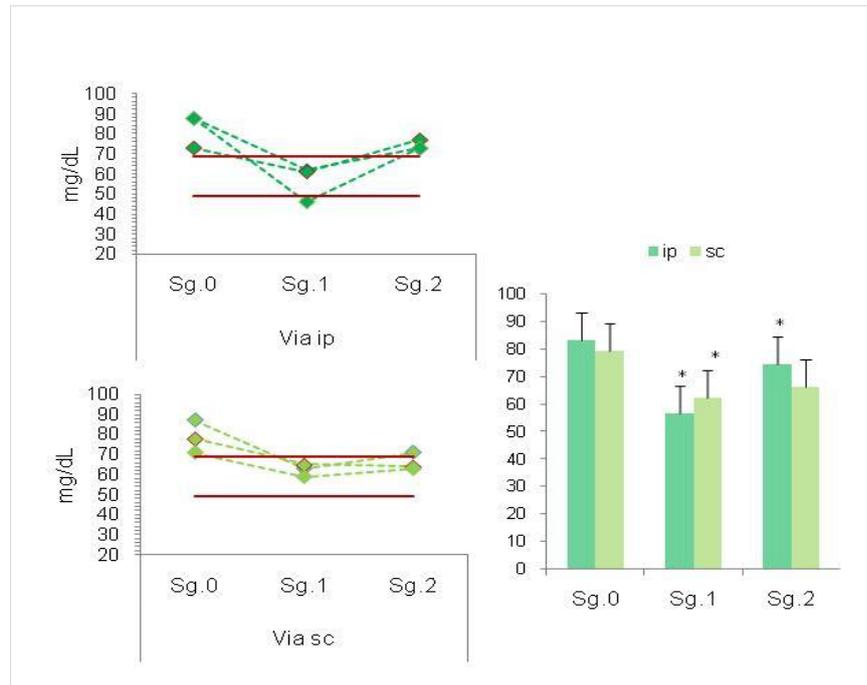


Figura 43 – Dados da análise de ureia (C57BL/6-Triazol) mostraram que pela via ip há um decréscimo significativo da Sg.0 para Sg.1 ($p < 0,05$) e um acréscimo da Sg.1 para Sg.2 ($p < 0,05$) e pela via sc há um decréscimo significativo da Sg.0 para Sg.1 ($p < 0,05$).

A análise histopatológica dos animais administrados com Triol (15 mg/Kg) pelas vias sc e ip, evidenciou leves alterações no fígado, com presença de inúmeras figuras de mitose nos hepatócitos, processo inflamatório leve e presença de células de Kuffler sem alteração morfológica (Figura 44 a). Os rins não apresentaram alterações morfológicas (Figura 44 b).

Os animais administrados com Triazol (15 mg/Kg) via sc, apresentaram no fígado edema, degeneração hidrópica difusa, infiltrado inflamatório acentuado difuso com acúmulos multifocais (Figura 45 a). Nos rins foram apresentadas poucas alterações (Figura 45 b.). Os animais administrados com CITRAL (15 mg/Kg) pelas vias sc e ip no fígado, mostraram alterações na celularidade generalizada (Figura 46 a, 47 a). Os rins apresentaram alterações importantes apresentando presença de edema generalizado, congestão vascular, hemorragia intensa no córtex e medula e infiltrado inflamatório difuso. (Figuras 46 b, 47 b).

TRIOL

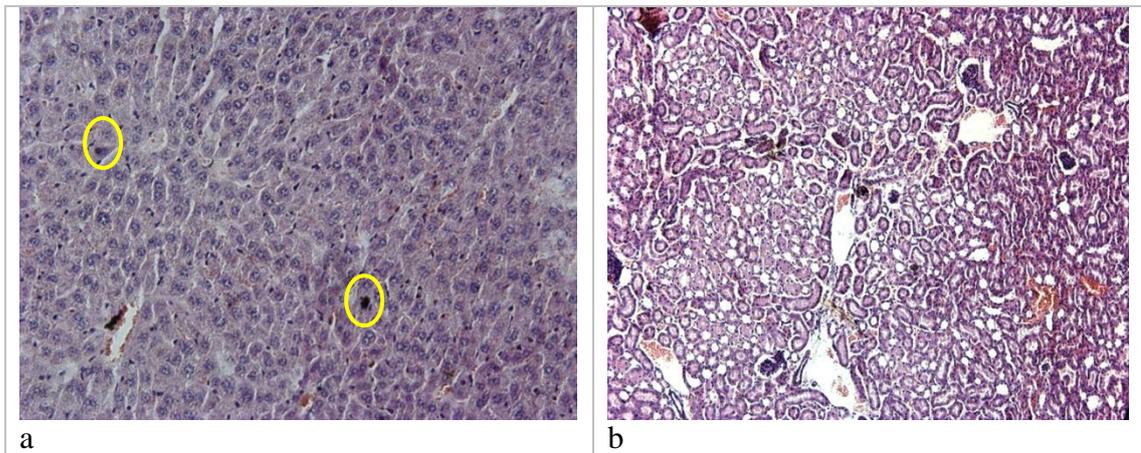


Figura 44 – Órgãos de animais administrados via sc e ip com Triol (15 mg/Kg). **a - Fígado** – Presença de hepatócitos com inúmeras figuras de mitose em todo parênquima, processo inflamatório, células de Kuffler sem alterações morfológicas. 200X ; **b – Rim** – celularidade normal. 100 X. H&E.

TRIAZOL – sc– 15

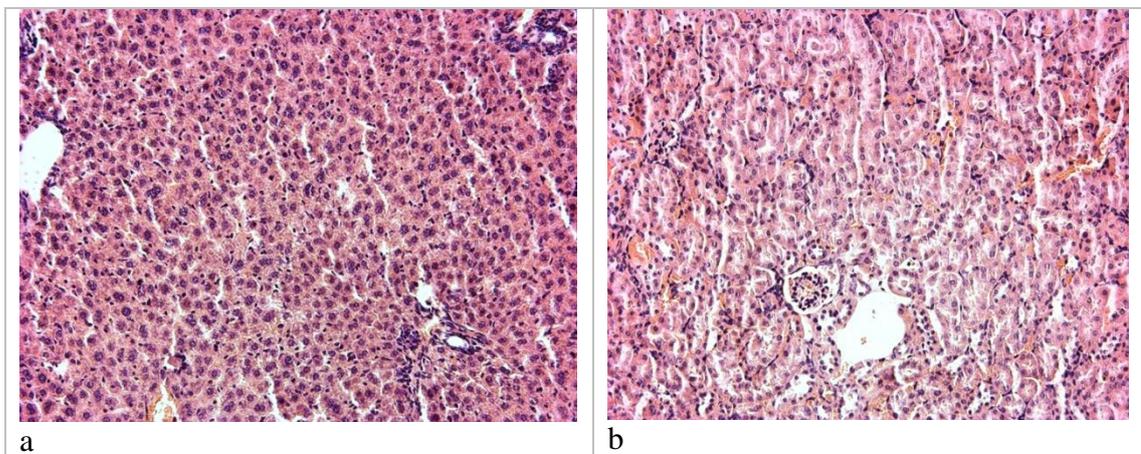


Figura 45 – Órgãos de animais administrados via sc com Triazol (15 mg/Kg). **a- Fígado** - presença de edema intersticial e intracelular com degeneração hidrópica difusa, de intensidade moderada e outras focais acentuadas; congestão vascular importante; infiltrado inflamatório acentuado difuso como acúmulos multifocais, necrose hepatocitaria. 200X; **b- Rim** – Presença de hemorragia intratubular. 200X. H&E.

TRIAZOL – ip

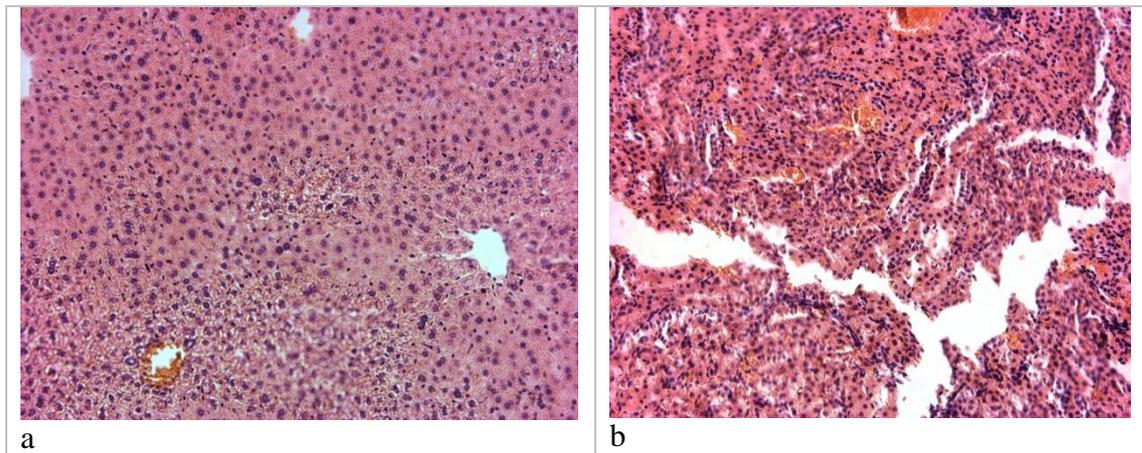


Figura 46 – Órgãos de animais administrados via p com Triazol (15 mg/Kg). **a– Fígado** - presença de edema intersticial de intensidade leve a moderado; presença de inúmeros focos infiltrado inflamatório agudo difuso, hepatócitos com de degeneração hidrópica. 200X; **b – Rim** – Presença de infiltrado inflamatório focal; área hemorrágica que se estende do córtex à medula, edema intersticial de moderado a acentuado. 200 X. H&E.

CITRAL –sc

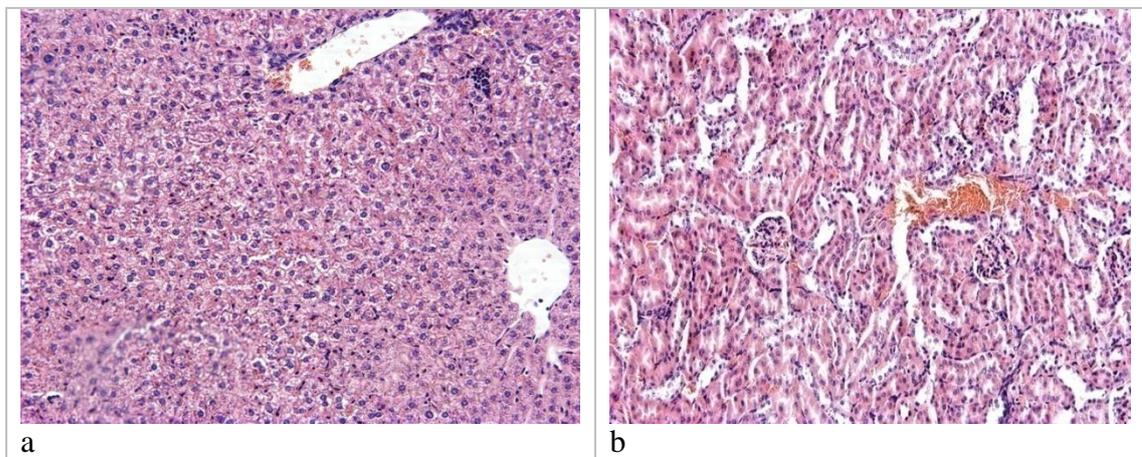


Figura 47 – Órgãos de animais administrados via sc com Citral (15 mg/Kg). **a – Fígado** – Alteração celular generalizada.200X; **b – Rim** – Presença de edema generalizado de leve a moderado, congestão vascular, focos hemorrágicos intersticial intenso intra-glomerular. 200X . H&E.

CITRAL – ip

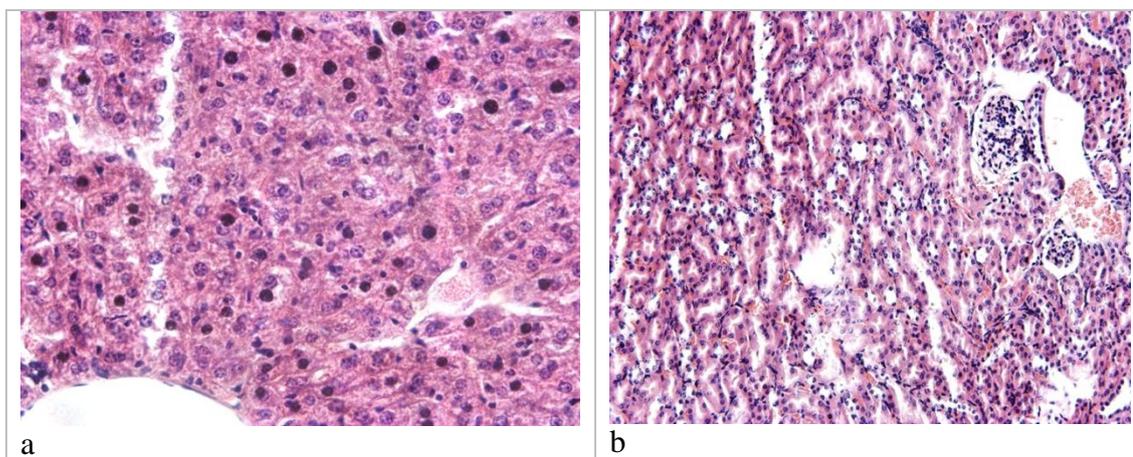


Figura 48 – Órgãos de animais administrados via ip com Citral (15 mg/Kg). **a – Fígado** - Presença de inúmeros hepatócitos com núcleos picnóticos. 400X. H&E.; **b – Rim** - presença de hemorragia intensa focais no córtex e medula, infiltrado inflamatório difuso. 200X. H&E.

5.2.7 PROTOCOLO IV – Triol (15 mg/Kg, 20 mg/Kg, 25 mg/Kg)

Esse protocolo teve como objetivo de determinar a DL. Os animais utilizados (BALB/c) não faleceram pelas doses utilizadas e nem foram observadas mudanças comportamentais. Atraves da bioquímica dos soros dos animais administrados com Triol via ip, nas concentrações de 15 mg/Kg, 20 mg/Kg, 25 mg/Kg, foram analisados os níveis de: glicose, ureia (tabela 12), ácido úrico e TGP/ALT (tabela 13)

TABELA 12 – Análises bioquímicas nos soros dos animais administrados pelo Triol nas concentrações 15 mg/Kg, 20 mg/Kg e 25 mg/Kg pela via ip, usando a média \pm DP e significância (p) nos parâmetros de glicose e ureia.

BALB/c Subst	Glicose (mg/dL)			Ureia (mg/dL)		
	Sg.0	Sg.1	P (Sg.0,1)	Sg.0	Sg.1	P (Sg.0,1)
Triol (15 μ g/g)	*NR	NR	NR	NR	NR	NR
Triol (20 μ g/g)	144 (\pm 14,1)	133 (\pm 12,4)	**NS	NR	NR	NR
Triol (25 μ g/g)	NR	NR	NR	55 (\pm 9,9)	87 (\pm 13,6)	<0,05

* NR – Não realizado ** NS – Não significativo (p>0,05)

TABELA 13- Análises bioquímicas nos soros dos animais administrados pelo Triol nas concentrações 15 mg/Kg, 20 mg/Kg e 25 mg/Kg pela via ip, usando a média \pm DP e significância (p) nos parâmetros de ácido úrico e TGP/ALT

BALB/c Subst	Ác. Úrico (mg/dL)			TGP/ALT (U/L)		
	Sg.0	Sg.1	P (Sg.0,1)	Sg.0	Sg.1	P (Sg.0,1)
Triol (15 μ g/g)	*NR	NR	NR	16 (\pm 1,0)	43 (\pm 13,7)	<0,001
Triol (20 μ g/g)	NR	NR	NR	20 (\pm 3,3)	36 (\pm 5,0)	<0,01
Triol (25 μ g/g)	5,0 (\pm 1,1)	3,7 (\pm 0,8)	**NS	NR	NR	NR

* NR – Não realizado ** NS – Não significativo (p>0,05)

Na dosagem de glicose dos animais administrados pelo Triol (20 mg/Kg). As concentrações de glicose apresentaram valores mínimos de 103 mg/dL e máximos de 147 mg/dL, portanto sem apresentar alterações significativas (Figura 49). A análise da ureia do soro dos animais administrados com Triol (25 mg/Kg) mostrou um aumento significativo entre as sangrias (p<0,05) (figura 50 a). As dosagens de ácido úrico não apresentaram alterações significativas com o tratamento com Triol 25 μ g/mL (Figura 50 b). E finalizando, no teste da enzima TGP/ALT nos soros dos animais administrados pelo Triol (15 mg/Kg e 20 mg/Kg) observamos um aumento na variação entre as sangrias 0 e 1= 55% (Figura 51).

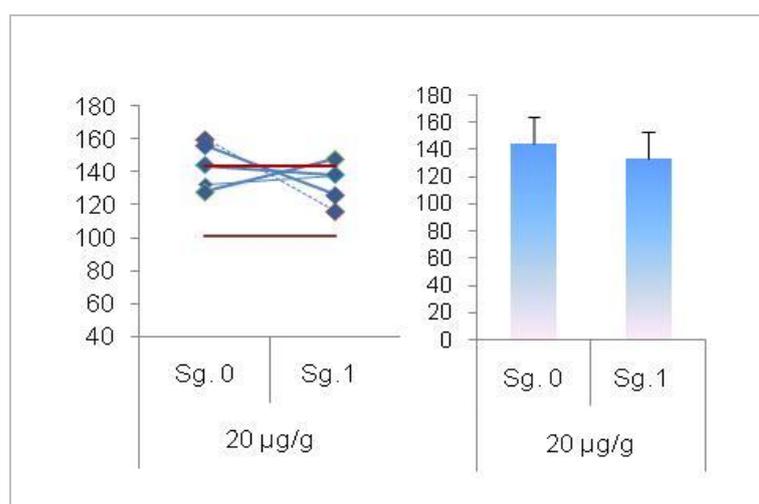


Figura 49 – Resultados na análise de glicose pelo Triol (20 mg/Kg), mostrou nas dosagens das sangrias (Sg.0 e Sg.1 – 5 horas) não houve diferença significativa (p>0,05).

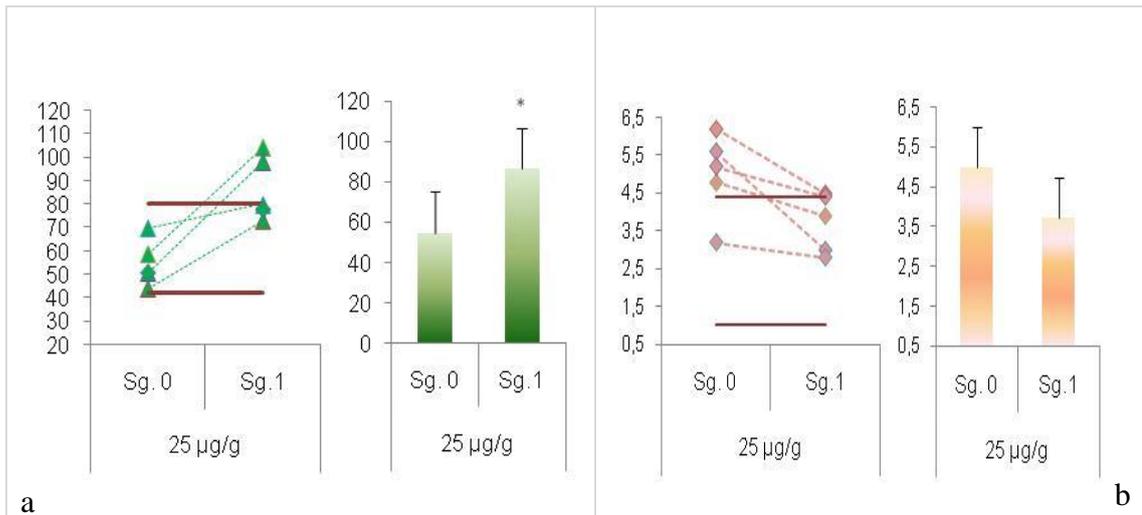


Figura 50 – Resultados nas análises de ureia e ácido úrico do Triol (25 mg/Kg) das Sg.0 e Sg.1(4 dias), via ip. a- na ureia mostrou um acréscimo significativo no resultado entre as sangrias ($p < 0,05$); b- na análise do ácido úrico não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

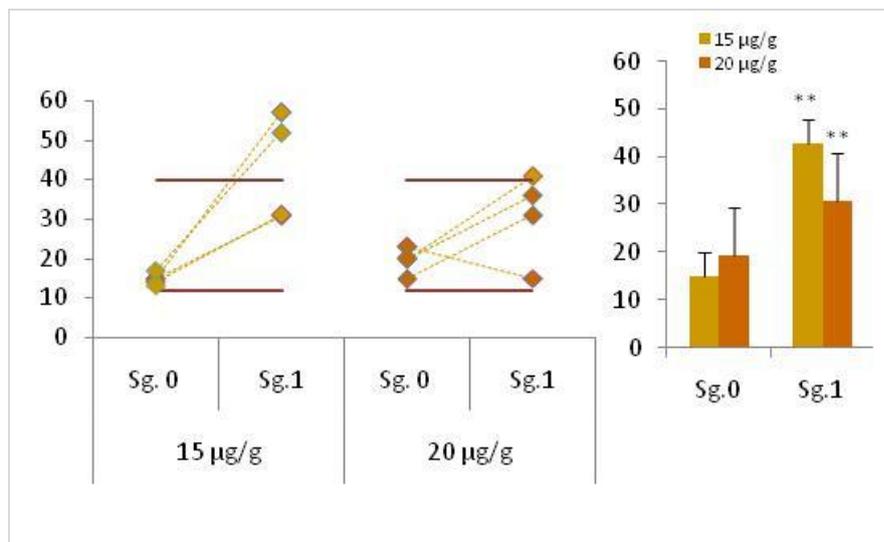


Figura 51 – Resultados da análise para TGP/ALT do Triol (15 mg/Kg e 20 mg/Kg) mostraram para ambas as concentrações um acréscimo significativo nas dosagens das sangrias ($p < 0,01$).

Na análise histopatológica, as alterações apresentadas foram semelhantes em todos os animais administrados com as três concentrações do Triol (15 mg/Kg, 20 mg/Kg e 25 mg/Kg). O fígado apresentou moderada mitose nos hepatócitos, congestão vascular moderada (Figura 52 a). A morfologia dos rins apresentou células hidrópicas (Figura 52 b).

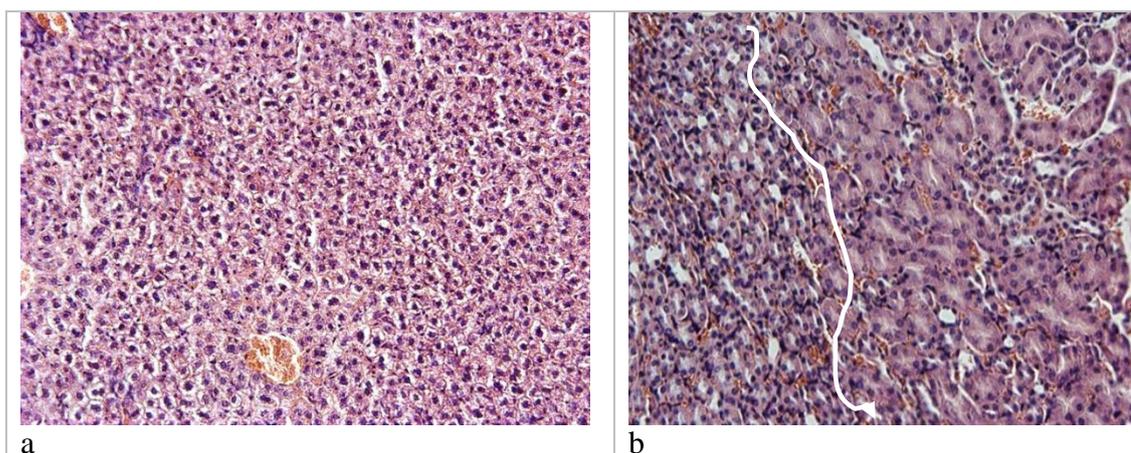


Figura 52- Órgãos de animais administrados via ip pelo Triol (15 mg/Kg, 20 mg/Kg e 25 mg/Kg). **a – Fígado**- presença moderada de mitose nos hepatócitos, congestão vascular moderada. 200X; **b- Rim** - presença de células hidrópicas focais (lado direito da linha branca). 200X. H&E.

5.2.8 PROTOCOLO V – TRIOL DL – (25 mg/Kg diluídas em DMSO 60% e 50%)

Nesse protocolo foi usada a mesma concentração do Triol (25 mg/Kg) diluída em diferentes concentrações (50% e 60%) de DMSO pela via ip. Os animais que foram administrados com a substância diluída no DMSO 60% foram a óbito em quatro horas, mostrando sinais de dor e distúrbios neurológicos. Assim, nem os testes bioquímicos nem os órgãos desses animais foram analisados. Na situação do Triol diluído com DMSO 50% que foi inoculado nos animais BALB/c pela via sc não houve morte dos animais. Desde animais só foram determinados o ácido úrico e a TGP/ALT por análise bioquímica (Tabela 14). Na análise do ácido úrico não houve variação das concentrações entre as sangrias (Figura 53 a). No entanto as concentrações da enzima TGP/ALT entre as sangrias 0 e 1 houve uma variação de – 66% ($p < 0,001$) (Figura 53 b.)

TABELA 14- Resultados das concentrações pelos parâmetros bioquímicos no soro dos camundongos BALB/c administrados pelo Triol (25 mg/Kg com DMSO 50%) pela via ip e a significância (p).

BALB/c Substância	Ác. Úrico (mg/dL)			TGP/ALT (U/L)		
	Sg.0	Sg.1	P (Sg.0,1)	Sg.0	Sg.1	P (Sg.0,1)
Triol (25 µg/g com DMSO 50%)	4,8 (±2,0)	4,1 (±1,5)	*NS	38 (±19,3)	13 (±2,5)	< 0,001

* NS – Não significativo ($p > 0,05$)

TRIOLO EM DMSO 50% - 25 mg/Kg

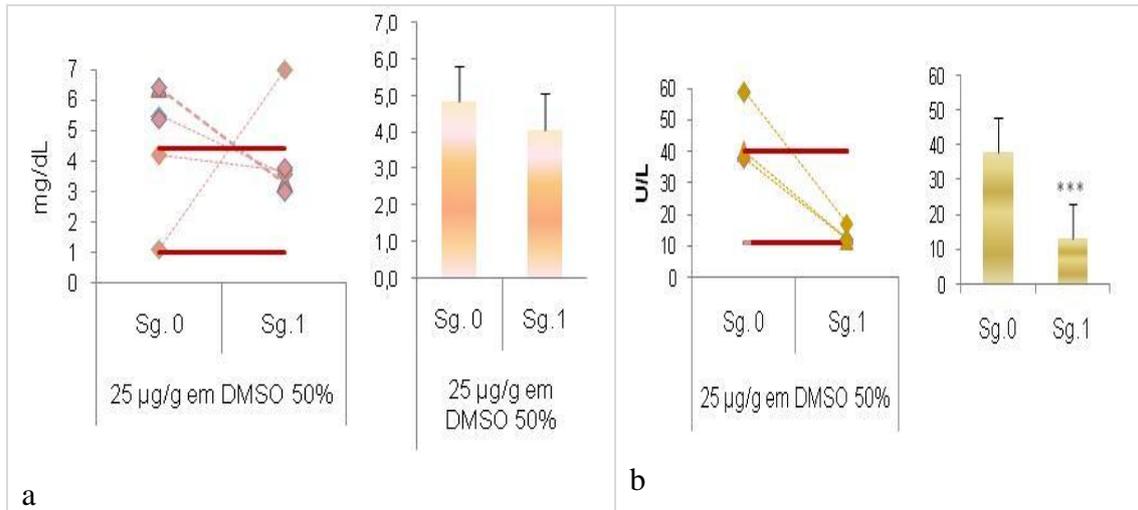


Figura 53- Resultados nas análises do ácido úrico e TGP/ALT (25 mg/Kg) diluído em DMSO 50% mostraram a- No parâmetro do ácido úrico não houve diferença significativa entre as sangrias ($p > 0,05$); b- no parâmetro da TGP houve uma diminuição significativa ($p < 0,001$).

A análise histopatológica não foi determinada nesses animais, pois apresentou muitos artefatos.

5.3 PROTOCOLO VI - TRIAZOL

Nesse protocolo foram testados três tipos de Triazol administrados na concentração de 25 mg/Kg, via sc: Triazol (TZ 1) – NHTRIOH, Triazol (TZ 2) - NFTRIOH, o Triazol (TZ 3) - NBrTRIOH. Nos animais BALB/c não houve morte nem houve modificações comportamentais. Nos soros dos animais administrados com Triazol foram feitas análises bioquímicas de ácido úrico, ureia e TGP/ALT (Tabelas 15, 16 e 17).

TABELA 15- Análise da média das concentrações entre as sangrias dos parâmetros utilizados camundongos BALB/c administrados pelos tipos de Triazol (NHTRIOH), Triazol (NFTRIOH) na concentração de 25 mg/Kg, pela via sc.

BALB/c Substância	Ác. Úrico (mg/dL)			TGP/ALT (U/L)		
	Sg.0	Sg.1	P (Sg.0,1)	Sg.0	Sg.1	P (Sg.0,1)
Triazol 1 NHTRIOH	1,2 (±0,6)	1,2 (±0,5)	*NS	30 (±19,6)	14 (±5,7)	< 0,05
Triazol 2 NFTRIOH	1,1 (±0,5)	0,9 (±0,4)	NS	36 (±25,2)	13 (±1,2)	< 0,05

* NS – Não significativo ($p > 0,05$)

TABELA 16 – Testes de ureia e ácido úrico analisados pela média, desvio padrão e significância (p) das sangrias nos soros de camundongos BALB/c administrado pelo tipo de Triazol (NBrTRIOH) na concentração de 25 mg/Kg pela via sc.

BALB/c Subst	Ureia (mg/dL)				Ác. Úrico (mg/dL)			
	Sg.0	Sg.1	Sg.2	P (Sg.0,1,2)	Sg.0	Sg.1	Sg.2	P (Sg.0,1,2)
Triazol 3 BrTRIOH	57 (± 7,0)	50 (±6,1)	54 (±3,7)	*NS	2,6 (±1,2)	2,0 (±1,4)	2,1 (±1,2)	NS

* NS – Não significativo (p>0,05)

TABELA 17- Teste de TGP/ALT analisados pela média, desvio padrão e significância (p) das sangrias nos soros de camundongos BALB/c administrado pelo tipo de Triazol (NBrTRIOH) na concentração de 25 mg/Kg pela via sc.

BALB/c Subst	TGP/ALT (U/L)			
	Sg.0	Sg.1	Sg.2	P (Sg.0,1,2)
Triazol 3 BrTRIOH	27 (±10,5)	23 (±5,3)	33 (±17,9)	*NS

* NS – Não significativo (p>0,05)

Nos animais administrados com Triazol: N-H-TRIOH E N-F-TRIOH, via sc, não houve alteração nos níveis de ácido úrico entre as sangrias (Sg.0 e Sg.1) (Figura 54 a). Entretanto, as concentrações da TGP/ALT diminuíram entre as sangrias entre 53% e 64% (p<0,05) (figura 54 b). As concentrações de ureia não apresentaram alterações significativas após administração de N-Br-TRIOH (Figura 55 a), assim como para o ácido úrico (Figura 55 b). Os níveis da enzima TGP/ALT, mantiveram-se inalterados (Figura 56).

5.3.1 Triazol (1) – NHTRIOH e Triazol (2) – NFTRIOH

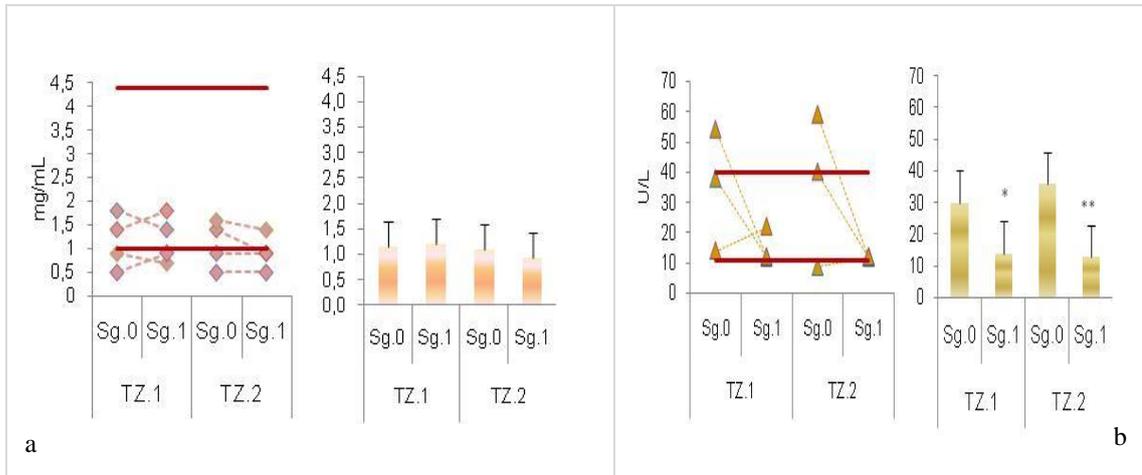


Figura 54- Dados nas análises de ácido úrico e TGP/ATL para o Triazol (1) NHTRIOH e (2) NFTHRIOH com a concentração de 25 mg/K; **a-** no ácido úrico não houve diferença significativa ($p>0,05$); **b-** na TGP para Triazol (1) houve uma significância no desvio padrão ($p<0,05$), no Triazol (2) houve um decréscimo significativo entre as sangrias ($p<0,01$).

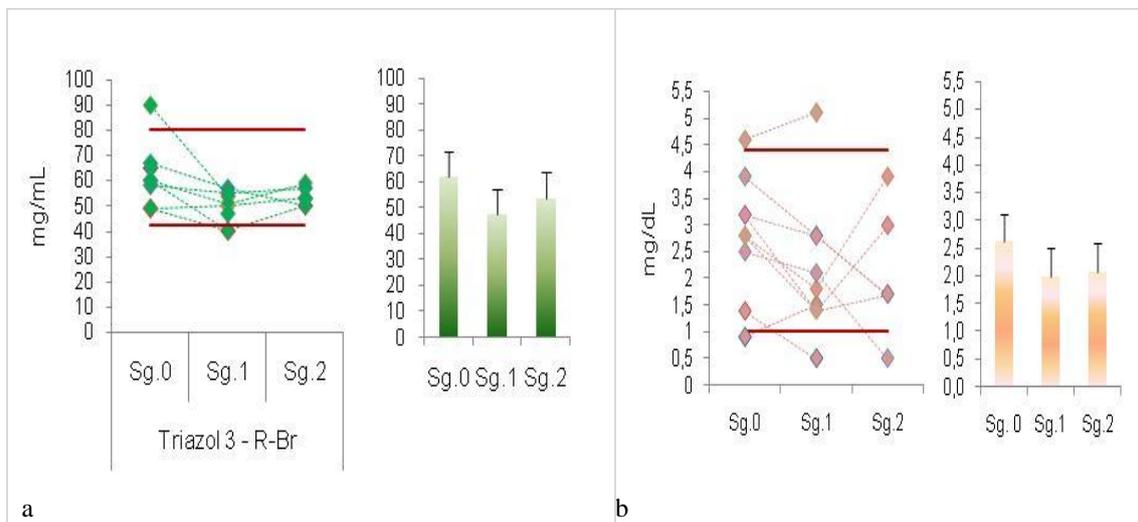


Figura 55 – Dados nas análises de ureia e ácido úrico para o Triazol (3)- NBrTRIOH – a e b – Não houve diferença significativa em ambos os parâmetros ($p>0,05$).

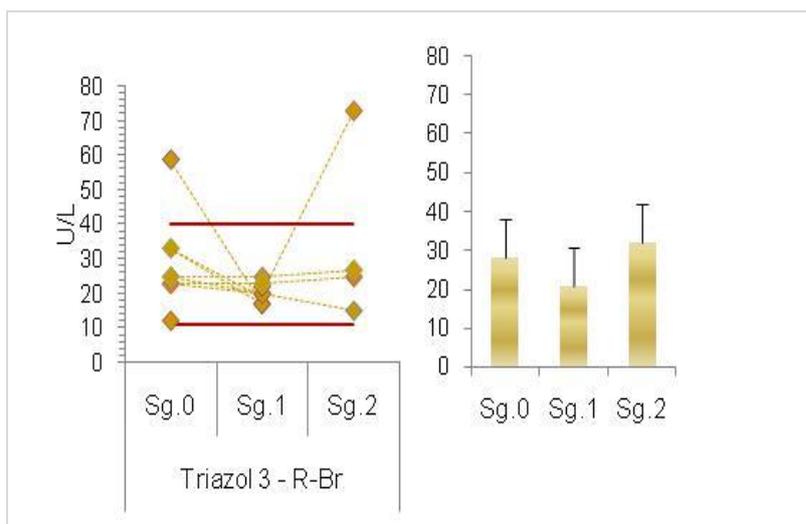


Figura 56- Dados na análise da TGP para o Triazol (3)- NBrTRIOH não houve diferença significativa nas sangrias ($p>0,05$).

As análises histopatológicas nesse protocolo, evidenciaram que os órgãos dos animais administrados pelo Triazol RH via sc (25 mg/Kg), apresentaram algumas alterações. No fígado observamos leves alterações histopatológicas, como discretos focos de hemorragia e infiltrado inflamatório (figura 57 a). Nos rins encontramos hemorragia moderada, focos de edema e congestão vascular (figura 57 b). Os órgãos dos animais administrados com Triazol RF, também apresentaram alterações. O fígado apresentou congestão vascular, edema e focos hemorrágicos (Figura 58 a). Nos rins observamos infiltrado inflamatório agudo (Figura 58 b). A administração de Triazol RBr, induziu no fígado hemorragia intensa (Figura 59 a) e nos rins hemorragia de leve a moderada. Nos glomérulos e na região tubular observamos edema e infiltrado inflamatório (Figura 59 b). O duodeno apresentou edema nas vilosidades (Figura 60 a) e no estômago foi encontrado leve infiltrado inflamatório na mucosa (Figura 60 b).

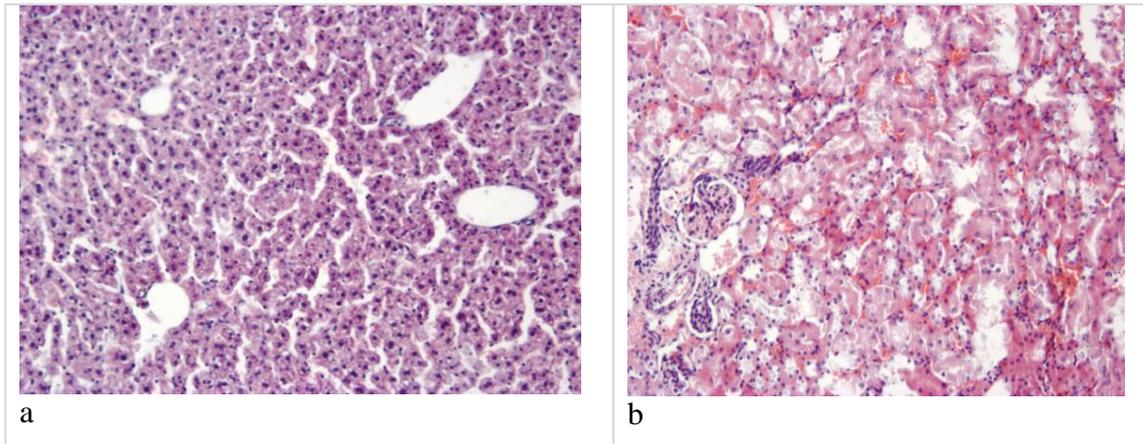


Figura 57- Órgãos dos animais administrados com Triazol (1) (25 mg/Kg). **a - Fígado** - Presença de escassos focos de hepatócitos edemaciados em toda extensão do tecido, discretos focos de hemorragia e infiltrado inflamatório. 200X. H&E. ; **b - Rim**- presença de hemorragia moderada difusa, focos de edema, congestão vascular no córtex e medular. 200X. H&E.

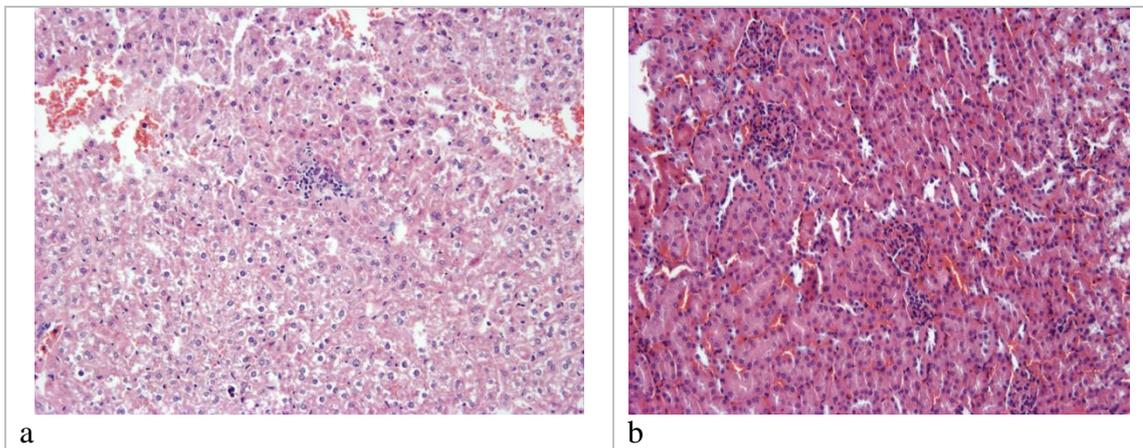


Figura 58 - Órgãos dos animais administrados com Triazol (2) (25 mg/Kg). **a - Fígado** - Presença de congestão vascular difusa, edema hepatocitário, focos hemorrágicos de moderado a acentuado. 200X. H&E; **b - Rim** - presença de infiltrado inflamatório agudo periglomerular. 200 X. H&E.

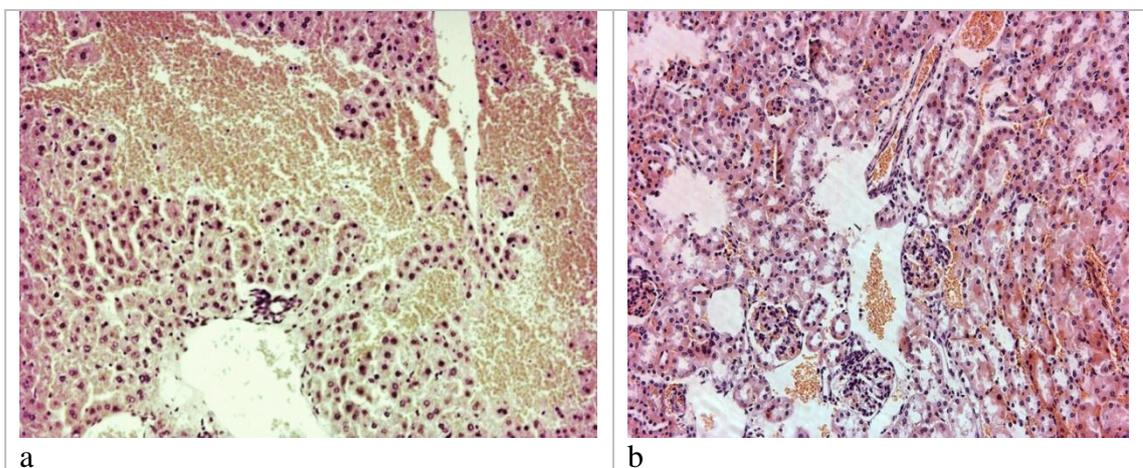


Figura 59 – Órgãos dos animais administrados com Triazol (3) (25 mg/Kg). **a - Fígado** - presença de hemorragia intensa. 200X. H&E; **b- Rim**- presença de hemorragia intersticial de leve a moderada nos glomérulos e na região tubular, predominância na região cortical e medular; edema de leve a moderado, infiltrado inflamatório leve e difuso. 200X. H&E.

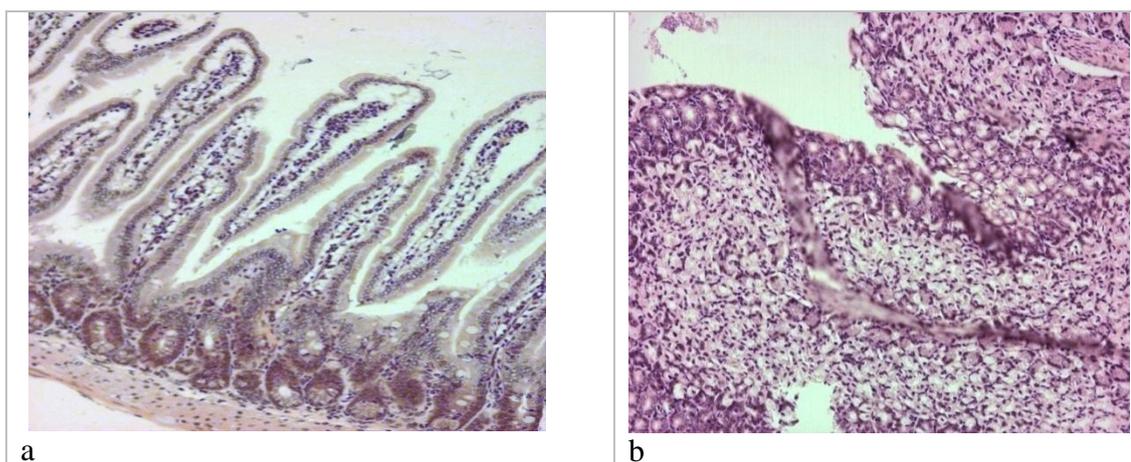


Figura 60 – Órgãos dos animais administrados com Triazol(3) (25 mg/Kg). **a – Duodeno** - presença de edema nas vilosidades.200X; **b– Estômago** - presença de infiltrado inflamatório intersticial leve na mucosa gástrica, sem muitas alterações. 200X. H&E.

5.4 PROTOCOLO VII – TRIOL (20X dose terapêutica) – 50 mg/Kg

Nesse protocolo foi usada a substância TRIOL via sc, com dose calculada 20 vezes a dose usada nos testes *in vitro*. Não houve morte dos animais usados nesse experimento. No soro dos animais administrados pelo Triol via sc foram analisadas bioquimicamente os parâmetros de ureia e TGP/ALT (Tabela 18).

TABELA 18 – Análises das variações das médias das concentrações das sangrias pela substância Triol (50 mg/Kg) pela via sc nos soros dos camundongos BALB/c para os parâmetros de ureia e TGP/ALT com a significância (p).

BALB/c Subst.	Ureia (mg/dL)				TGP/ALT (U/L)			
	Sg.0	Sg.1	Sg.2	P (Sg.0,1,2)	Sg.0	Sg.1	Sg.2	P (Sg.0,1,2)
Triol (50 µg/g)	53 (±8,8)	45 (±6,1)	47 (±7,9)	*NS	23 (±1,9)	58 (±22,8)	49 (±15,6)	0-1<0,01

Os níveis de ureia não apresentaram alterações significativas (Figura 61 a). Na enzima

TGP/ALT (figura 61 b) houve variação entre as sangrias 0 e 1 de 152%.

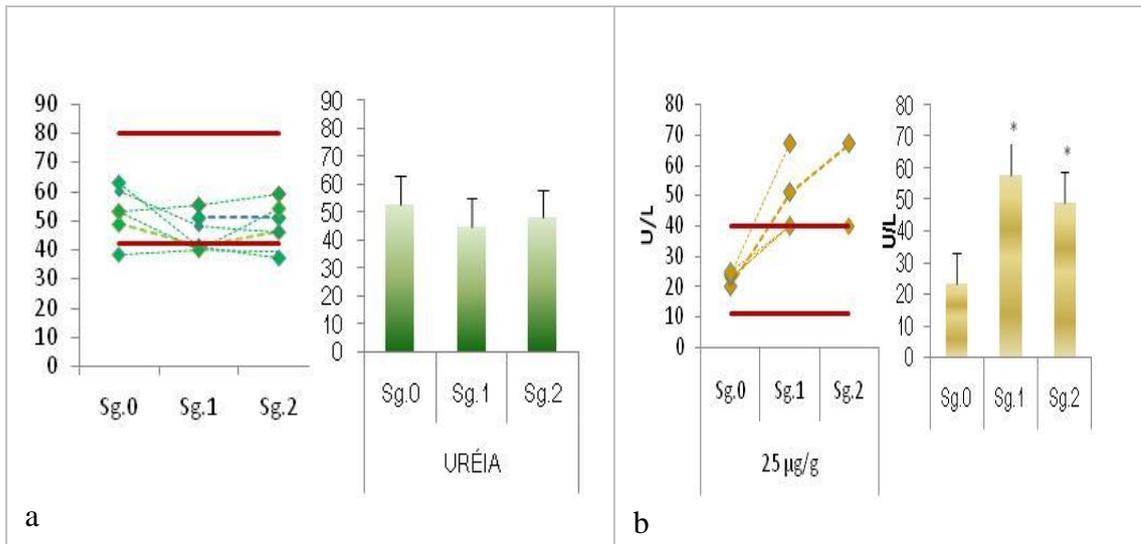


Figura 61- Dados das análises de ureia e TGP/ALT para substância Triol (20 X) mostraram que: a- ureia não houve diferença significativa ($p>0,05$); b- TGP houve aumento significativo da Sg.0 para Sg.1 e para Sg.2 ($p<0,05$).

A análise histopatológica não foi feita por problemas no processamento nos materiais desse protocolo.

5.5 PROTOCOLO VIII – Dolabellano-1 (DB-1)

Nesse experimento foi administrada a substância da primeira extração derivada de alga *Dictyota paffii* a DB-1 (25 mg/Kg) via sc. Os animais (BALB/c) utilizados não foram a óbito. Foi feita análise bioquímica da enzima TGP/ALT (figura 62) e não foi encontrada diferença significativa entre as sangrias (tabela 19).

TABELA 19 – Teste de TGP analisado em soro de camundongos BALB/c administrados pela substância DB-1 (substância derivada da *Dictyota paffii*) – 25 mg/Kg via sc.

BALB/c Subst.	TGP/ALT (U/L)			P (Sg.0,1,2)
	Sg.0	Sg.1	Sg.2	
DB-1 (25 µg/g)	19 (±3,9)	20 (±3,7)	21 (±12,3)	*NS

* NS – Não significativo ($p>0,05$)

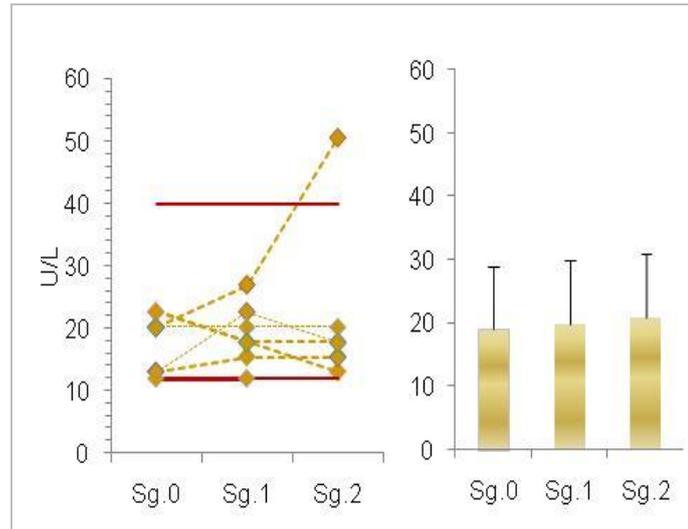


Figura 62– Resultados da análise de TGP/ALT na substância DB-1 mostraram que não houve diferença significativa entre as sangrias ($p > 0,05$).

A análise histopatológica dos tecidos dos animais administrados pelo DB-1 (25 mg/Kg) mostrou no fígado: hemorragia, hepatócitos levemente edemaciados e infiltrados inflamatório (figura 63 a). Nos rins encontramos hemorragia nos glomérulos e túbulos (figura 63 b). No tecido intestinal do duodeno observamos infiltrado inflamatório leve permeando as glândulas e presença de hemácias (Figura 64 a). No estômago evidenciamos vasos congestionados na submucosa, infiltrado inflamatório leve a moderado permeando o epitélio glandular (figura 64 b).

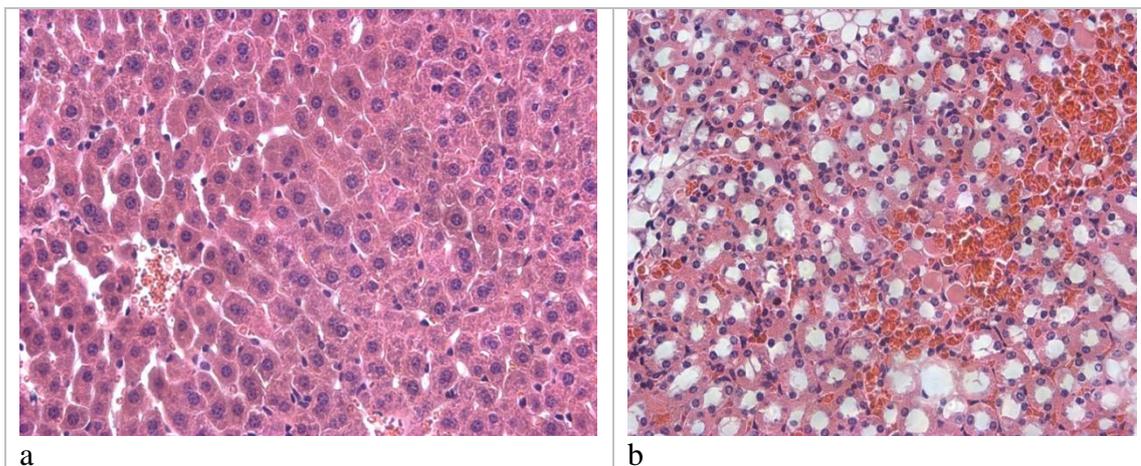


Figura 63– Órgãos dos animais administrados com DB-1(25 mg/Kg). **a – Fígado** – presença de hemorragia parenquimatosa, vasos congestionados, hepatócitos levemente edemaciados, infiltrado inflamatório difuso. 400X. H&E; **b- Rim** - presença de hemorragia nos glomérulos e túbulos hemáticos moderados. 400X. H&E.

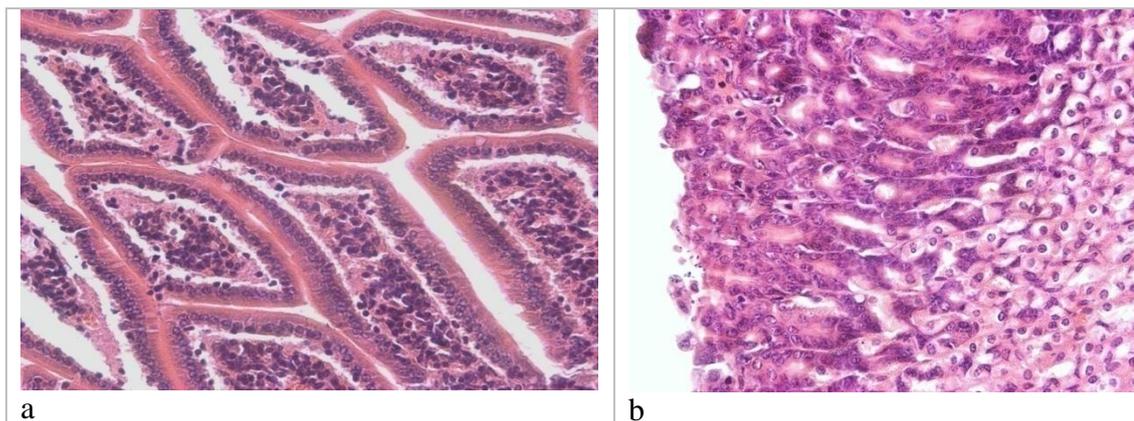


Figura 64 – Órgãos dos animais administrados com DB-1 (25 mg/Kg). **a- Duodeno** - presença de infiltrado inflamatório leve permeando as glândulas, presença de hemácias. 400X. H&E; **b- Estômago** - presença de vasos congestionados na submucosa e hemorragia na mucosa superficial, infiltrado inflamatório leve a moderado permeando o epitélio glandular. 400X. H&E.

5.6 PROTOCOLO IX – Tienopiridina

Nesse protocolo foi administrado nos animais (BALB/c) a substância Tienopiridina (25 mg/Kg) e nenhum dos animais foi a óbito nem apresentou mudança de comportamento. Foram feitos testes bioquímicos de glicose, ureia (tabela 20), ácido úrico e TGP/ALT (tabela 21),

TABELA 20 – Dados das médias, desvio padrão e significância (p), nas análises bioquímicas, glicose e ureia, nas amostras dos camundongos BALB/c administrados pela substância Tienopiridina (25 mg/Kg) pela via sc.

BALB/c Subst.	Glicose (mg/dL)			Ureia (mg/dL)		
	Sg.0	Sg.1	P (Sg. 0,1)	Sg.0	Sg.1	P (Sg. 0,1)
Tienopiridina	106 (±21)	127 (±23)	*NS	54 (±23)	68 (±26)	NS

* NS – Não significativo (p>0,05)

TABELA 21 - Dados das médias, desvio padrão e significância (p), nas análises bioquímicas, ácido úrico e TGP/ALT, nas amostras dos camundongos BALB/c administrados pela substância Tienopiridina (25 mg/Kg) pela via sc.

BALB/c Subst.	Ác. Úrico (mg/dL)			TGP/ALT (U/L)		
	Sg.0	Sg.1	P (Sg. 0,1)	Sg.0	Sg.1	P (Sg. 0,1)
Tienopiridina	3,5 (±2,1)	3,6 (±0,7)	*NS	24 (±18)	57 (±28)	<0,01

* NS – Não significativo (p>0,05)

Na análise de glicose não houve alteração entre as sangrias (Figura 65 a), assim como para o teste de ureia que não apresentou variação significativa (Figura 65 b). Na análise do ácido úrico não houve variação nas concentrações entre as sangrias (Figura 66 a). Na análise da enzima TGP/ALT às concentrações entre as sangrias para essa substância mostrou aumento de 138% ($p < 0,01$) (figura 66 b).

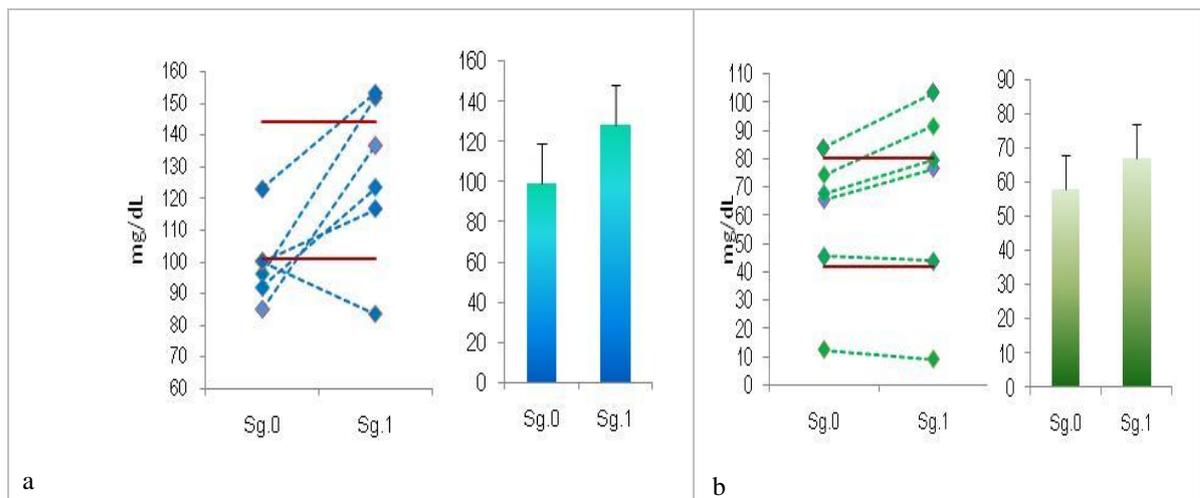


Figura 65- Resultado das análises de glicose (a) e ureia (b) com a substância Tienopiridina (25 mg/Kg) mostraram que não houve diferença significativa em ambos os parâmetros ($p > 0,05$).

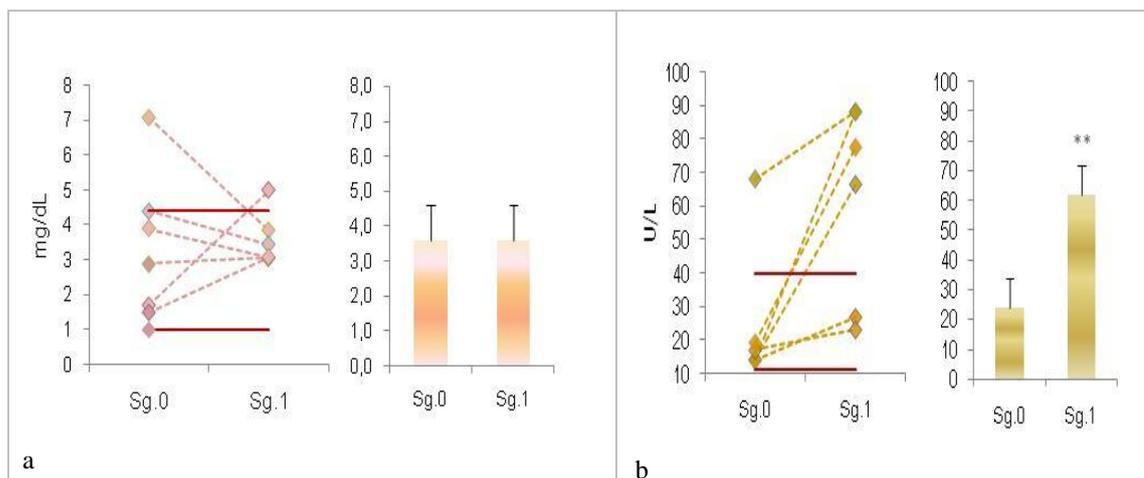


Figura 66- Resultados das análises de ácido úrico e TGP/ALT para a substância Tienopiridina (25 mg/Kg). a - ácido úrico não houve diferença significativa entre as sangrias ($p > 0,05$); b- TGP/ALT houve aumento significativo entre as sangrias ($P < 0,01$).

As análises histopatológicas dos animais administrados pela substância Tienopiridina (25 mg/Kg), evidenciaram no fígado infiltrado inflamatório focal, edema e focos de hemorragia (figura 67 a). Nos rins dos animais observamos hemorragia leve a moderada,

edema intracelular e infiltrado inflamatório (figura 67 b). No tecido do duodeno não encontramos alterações importantes (figura 68 a) e no estômago observamos infiltrado inflamatório difuso (figura 68 b).

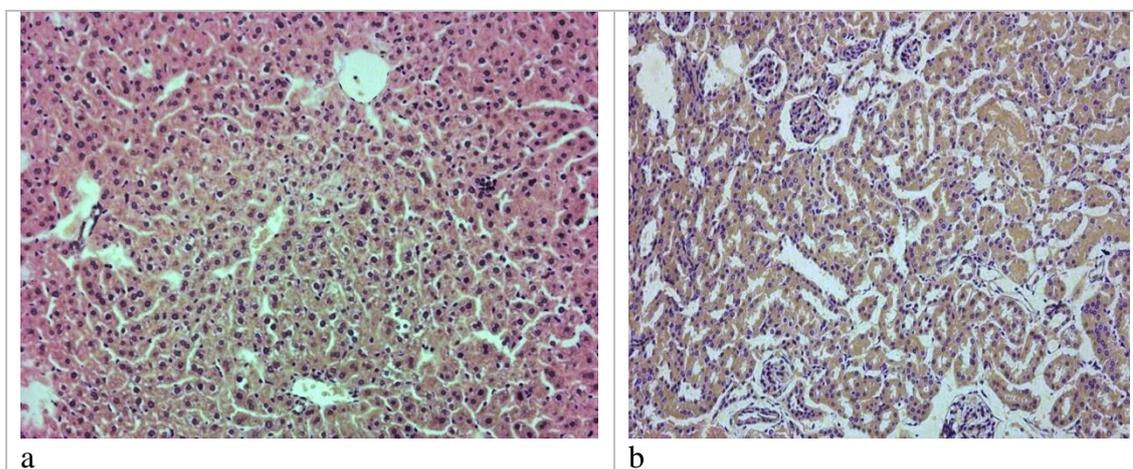


Figura 67 – Órgãos dos animais administrados com Tienopiridina (25 mg/Kg). **a- Fígado** - presença de infiltrado inflamatório focal, edema e focos de hemorragia intersticial. 200X. H&E ; **b – Rim** - Presença de hemorragia leve a moderado na região intersticial cortical e medular, edema intracelular de leve a moderado, infiltrado inflamatório difuso. 200X. H&E.

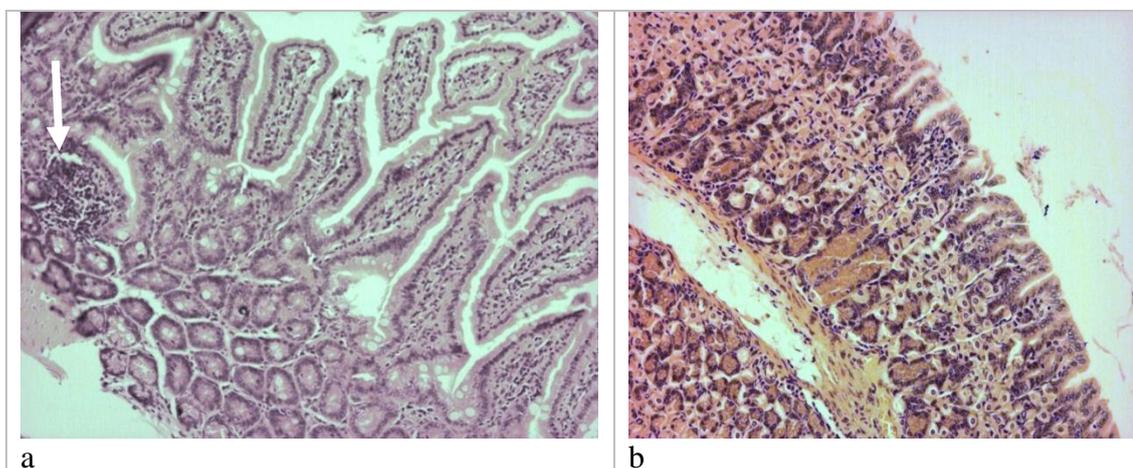


Figura 68 – Órgãos dos animais administrados com Tienopiridina (25 mg/Kg). **a – Duodeno** - presença de placa de Payer (seta branca). 200X ; **b – Estômago** – presença de infiltrado inflamatório difuso com focos de maior acúmulo. 200X. H&E.

5.7 PROTOCOLO X – TRIOL 50

Nesse protocolo foi usada a substância Triol com a dose de 50 mg/Kg pela via sc. Os animais (BALB/c) foram pesados antes da administração (AI) da substância e depois da

administração (DI) no final de oito dias mostrando que não houve diferença significativa na média do peso (figura 69). Não houve mudança de comportamento e nenhum animal foi a óbito.

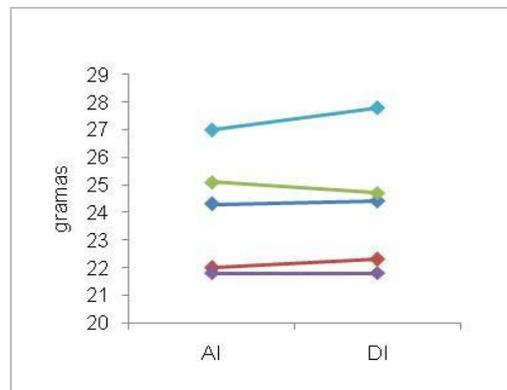


Figura 69- Dados referente ao peso dos animais antes da administração (AI) do Triol (50 mg/Kg), e depois da administração (DI) 8 dias depois da aplicação. Não houve diferença significativa no peso.

Nas análises bioquímicas analisamos ureia, ácido úrico (tabela 22) e TGP/ALT (tabela 23)

TABELA 22 – Dados das médias, desvio padrão e significância (p) das concentrações bioquímicas na ureia e ácido úrico nas amostras administradas pelo Triol (50 mg/Kg) via sc em camundongos BALB/c.

BALB/c Subst.	Ureia (mg/dL)				Ác. Úrico (mg/dL)			
	Sg.0	Sg.1	Sg.2	P (Sg.0,1,2)	Sg.0	Sg.1	Sg.2	P (Sg.0,1,2)
Triol (50 mg/Kg)	38 (±6,8)	46 (±4,6)	37 (±4,5)	0-1<0,05 1-2<0,05	1,5 (±0,4)	0,9 (±0,1)	1,2 (±0,3)	0-1<0,05

* NS – Não significativo (p>0,05)

TABELA 23 - Dados das médias, desvio padrão e significância (p) das concentrações bioquímicas pela TGP/ALT nas amostras administradas pelo Triol (50 mg/Kg) via sc em camundongos BALB/c.

BALB/c Subst.	TGP/ALT (U/L)			
	Sg.0	Sg.1	Sg.2	P (Sg.0,1,2)
Triol (50 mg/Kg)	19 (±8,0)	25 (±5,2)	21 (±13,5)	*NS

* NS – Não significativo (p>0,05)

Nossos resultados mostraram que os níveis de ureia houve um aumento da Sg.0 para Sg.1 ($p<0,05$) e diminuiu nas Sg.1 para Sg.2 ($p<0,05$) (Figura 70 a). Já os níveis de TGP/ALT não houve diferença significativa entre as sangrias (Figura 70 b). Assim como pelo teste do ácido úrico (figura 71).

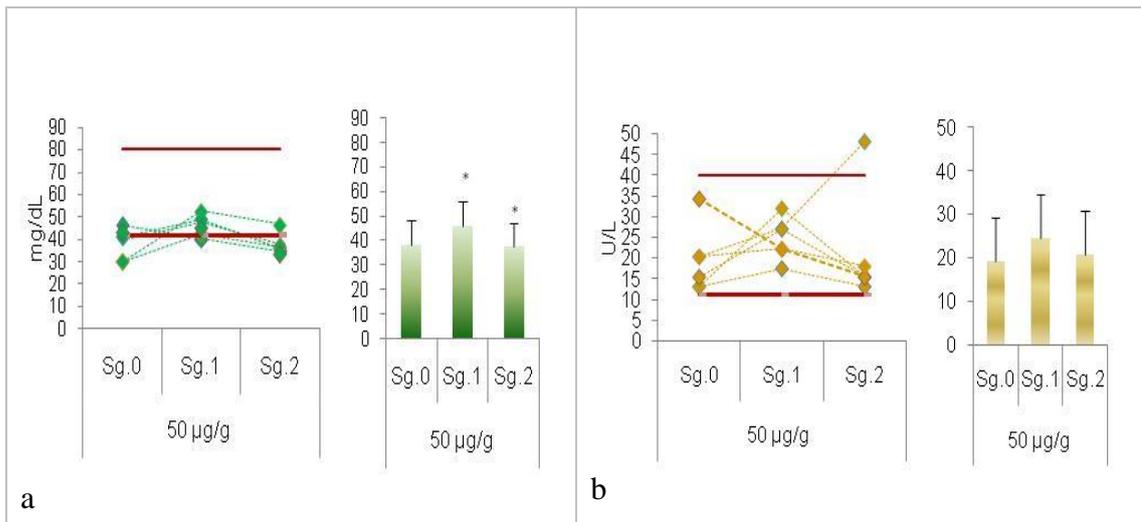


Figura 70- Dados das análises da ureia e TGP/ALT pela substância Triol (50 mg/Kg) mostrando que: **a-** Na ureia mostrou um aumento na Sg.0 a 1 ($p<0,05$) e uma diminuição significativa da Sg. 1 para Sg.2 ($p<0,05$); **b-** na TGP não houve diferença significativa nas sangrias ($p>0,05$).

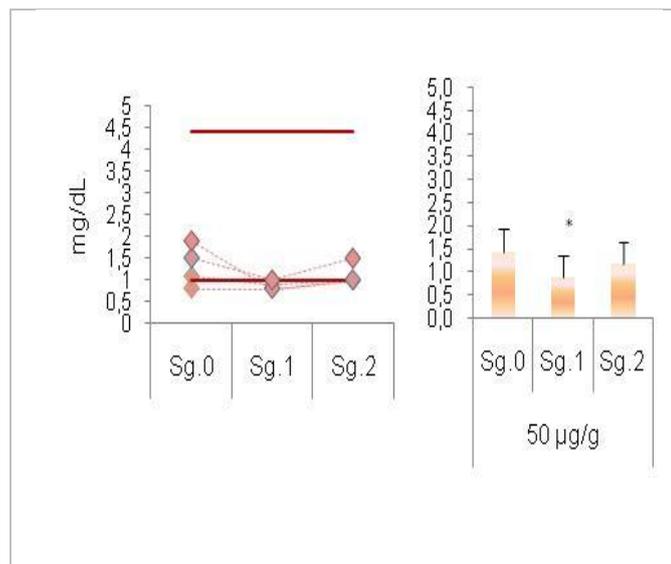


Figura 71- Resultados da análise do ácido úrico pela substância Triol (50 mg/Kg) mostrando que houve diminuição significativo entre as Sg. 0 e 1 ($p<0,05$).

A análise histopatológica dos animais administrados com o Triol (50 mg/Kg) via sc, mostrou que no fígado houve edema nos hepatócitos (figura 72 a) e nos rins ocorreu congestão vascular (figura 72 b).

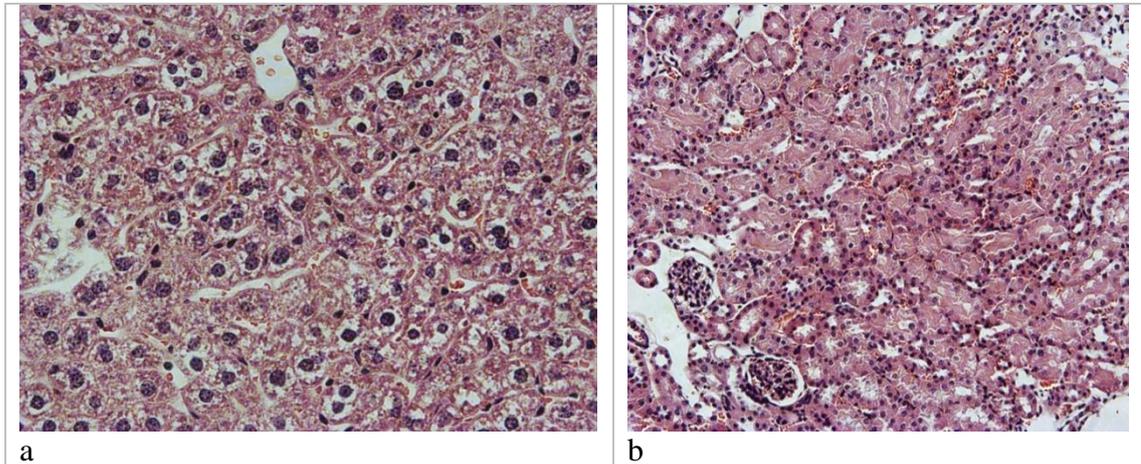


Figura 72- Órgãos dos animais administrados com Triol (50 mg/Kg). **a** – **Fígado** - presença de edema nos hepatócitos. 400X; **b** – **Rim** – congestão vascular intersticial moderada. 200X. H&E.

5.8 PROTOCOLO XI – Aciclovir

Nesse protocolo foi administrado 50 mg/Kg por via sc da substância aciclovir nos animais, sendo que dois deles foram a óbito depois de 6 horas. Os animais foram pesados antes e após a administração (10 dias após), e houve no peso uma alteração significativa, diminuindo em 35% na média do peso (figura 73)

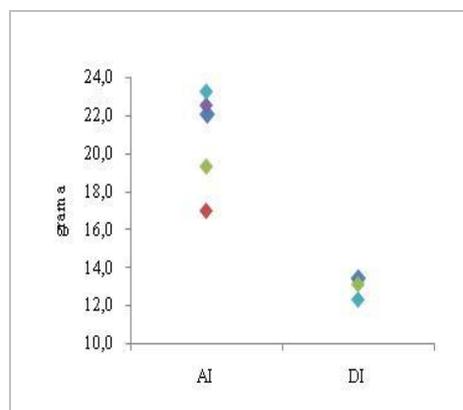


Figura 73- Resultado do peso dos animais antes da administração (AI) e depois da administração (DI) em 10 dias da substância aciclovir, mostrou que houve uma diminuição na média de peso em torno de 35%.

Foram feitas análises bioquímicas para os parâmetros de ureia, ácido úrico (Tabela 24). e TGP/ALT (Tabela 25).

TABELA 24 – Análises das concentrações pela média, desvio padrão e significância (p) nos soros dos BALB/c administrados pelo aciclovir (50 mg/Kg) pela via sc, mostrando variações significativas para ureia, ácido úrico.

Substância (BALB/c)	Ureia (mg/dL)				Ác. Úrico (mg/dL)			
	Sg.0	Sg.1	Sg.2	P (Sg.0,1,2)	Sg.0	Sg.1	Sg.2	P (Sg.0,1,2)
Aciclovir (50 mg/Kg)	63 (±2,3)	43 (±2,6)	81 (±5,7)	0-1 < 0,001 0-2 < 0,01 1-2 < 0,001	2,5 (±0,6)	2,0 (±0,4)	2,3 (±0,6)	*NS

* NS – Não significativo (p>0,05)

TABELA 25 - Análises da concentração pela média, desvio padrão e significância (p) nos soros dos BALB/c administrados pelo aciclovir (50 mg/Kg) pela via sc, mostrando variações significativas TPG/ALT.

Substância (BALB/c)	TGP/ALT (U/L)			
	Sg.0	Sg.1	Sg.2	P (Sg.0,1,2)
Aciclovir (50 mg/Kg)	35 (±28,7)	11 (±4,1)	8 (±1,7)	*NS

* NS – Não significativo (p>0,05)

Na análise da ureia houve variação significativa nas concentrações das sangrias dos animais (Sgs. 0 e 1 de -34%) e (Sgs. 1 e 2 de 156%) mostrando que essa substância altera no metabolismo desse analito (Figura 74 a). Na TPG/ALT os resultados obtidos deram valores muito discrepantes, possivelmente por problemas técnicos no processo da análise. Na análise do ácido úrico não houve variação significativa (figura 74b).

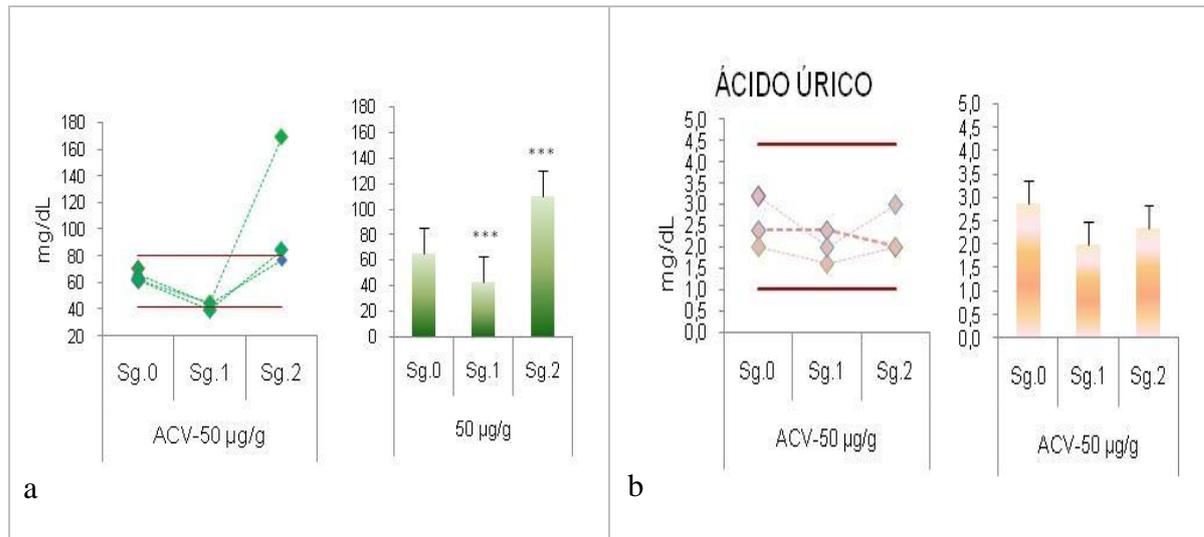


Figura 74- Dados das análises de ureia e ácido úrico para o aciclovir (50 mg/Kg) mostraram que: **a-** na ureia houve diminuição significativa da Sg.0 para Sg.1 ($p<0,001$) e da Sg.1 para Sg.2 ($p<0,001$); **b-** No ácido úrico não houve diferença significativa entre as sangrias ($p>0,05$).

A análise histopatológica dos órgãos dos animais administrados com o aciclovir nos mostrou que no fígado havia focos de infiltrado inflamatório e presença de congestão vascular (figura 75 a). Nos rins encontramos focos de necrose tubular aguda (figura 75 b). No estômago haviam células edemaciadas, e parênquima sem alterações significativas (figura 76).

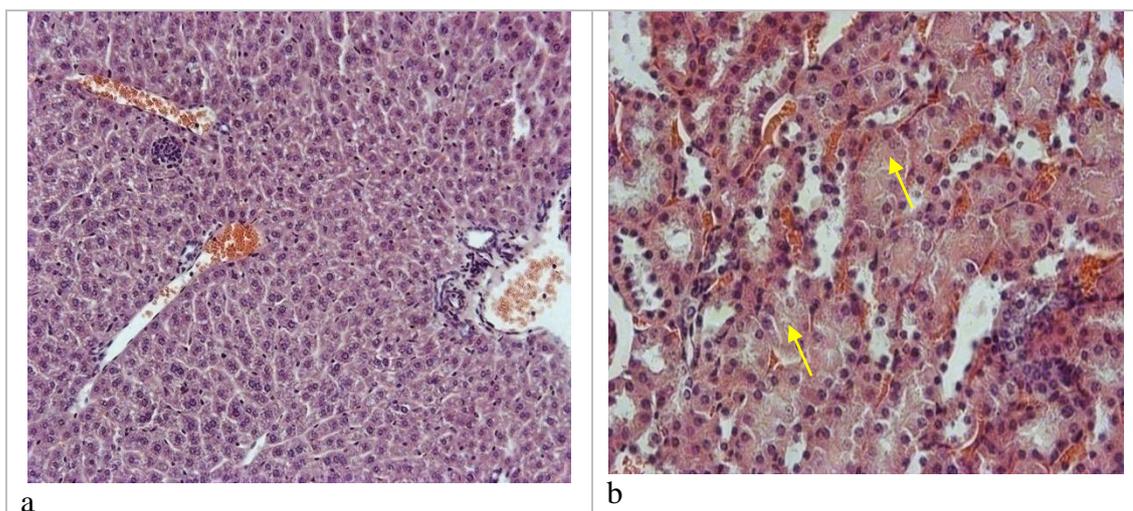


Figura 75 – Órgãos dos animais administrados com aciclovir (50 mg/Kg). – **a** – **Fígado** - Presença de focos de infiltrado inflamatório, presença de congestão vascular. 200X; **b-** **rim** - presença de focos de necrose tubular aguda. 400X. H&E.

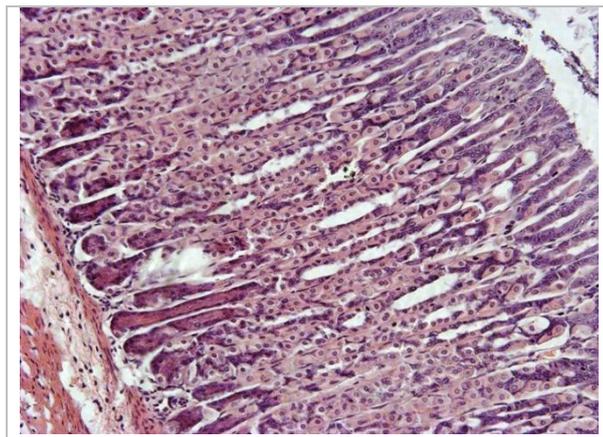


Figura 76 – Órgão dos animais administrados com Aciclovir (50 mg/Kg). **Estômago**- presença de células edemaciadas; parênquima sem alterações significativas. 200X. H&E.

5.9 PROTOCOLO XII – Toxicidade Subcrônica

Para a análise subcrônica foi administrada à substância TRIOL por via oral (vo), dia sim, dia não, em ratos Wistar e avaliados por 30 dias. Os animais foram pesados nas quatro semanas do experimento. Os animais apresentaram poucas modificações comportamentais; as fezes se mostraram amolecidas em alguns animais e duas fêmeas foram a óbito por causa da anestesia, o restante sobreviveu até o momento do sacrifício em que foram retirados alguns órgãos (fígado, rim, duodeno e estômago).

O resultado na análise da média do peso dos animais durante as quatro semanas do experimento mostrou que houve diferença de peso durante a maioria dos grupos e na quarta semana houve recuperação. Os resultados do peso dos animais foram feitos por grupos. O grupo I – Machos (20 mg/Kg), esses animais mostraram perda de peso nas primeiras semanas tendo um aumento de peso na última semana (figura 77 a). No grupo II – Fêmeas (20 mg/Kg - na primeira semana ganharam um pouco de peso, mas perdendo significativamente na última semana (figura 77 b). No grupo III – Machos (40 mg/Kg)- houve um aumento de peso na primeira semana, perdendo significativamente nas duas semanas seguintes e recuperando na última semana (Figura 78 a). O grupo IV – Fêmeas (40 mg/Kg). Esses animais obtiveram o mesmo resultado dos machos administrados com a mesma concentração do Triol (Figura 78

b). O Grupo V – DMSO 1% (controle) houve uma pequena perda de peso na primeira semana se recuperando nas semanas seguintes (Figura 79).

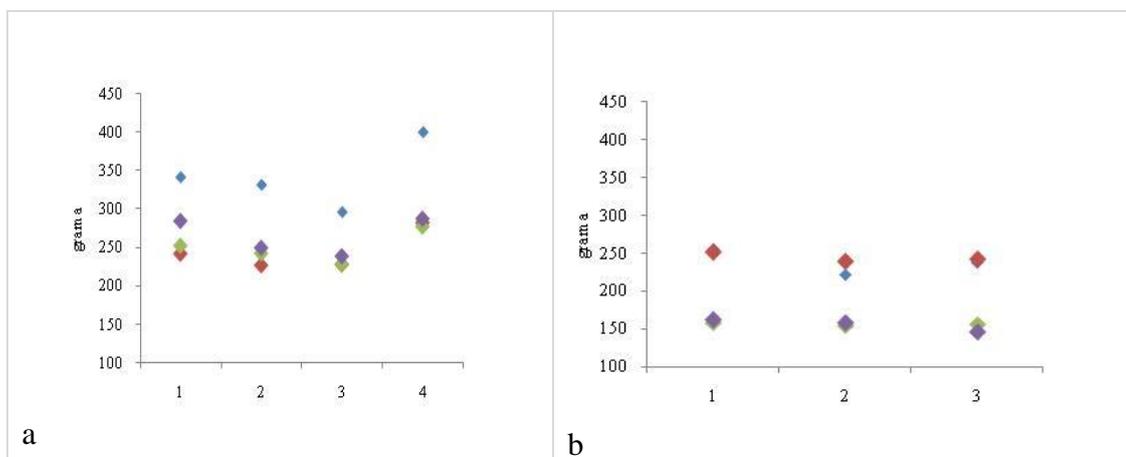


Figura 77- Os dados da média do peso dos animais, machos e fêmeas para o TRIOL na dosagem de 20 mg/Kg que: **a-** os machos sofreram uma perda em torno de 25% do peso inicial se recuperando em torno de 5% na última semana em relação a primeira semana; **b-** as fêmeas ganharam peso em torno de 5% na primeira semana mas perdendo em torno de 35% até a última semana.

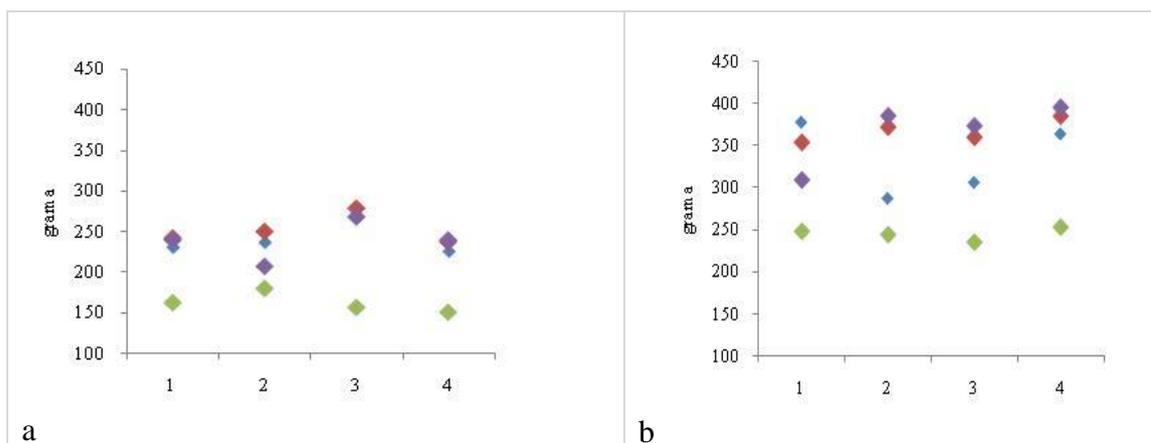


Figura 78– Os dados da média do peso dos animais, machos e fêmeas, para o Triol na dosagem de 40 mg/Kg mostraram que: **a-** os machos sofreram um aumento de peso em torno de 10% na primeira semana, depois havendo perda de 35% se recuperando na última semana; **b-** as fêmeas apresentaram um aumento de 5% na primeira semana sofrendo perda de 35% na terceira semana se recuperando na última semana.

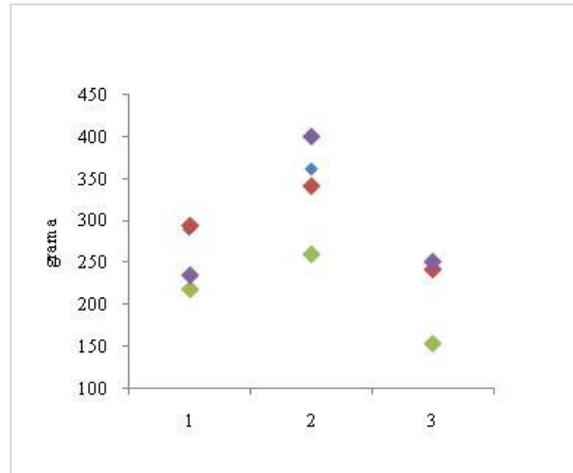


Figura 79 – Os dados da média do peso dos animais, machos e fêmeas, para o DMSO 1% mostraram que ambos os sexos tiveram uma pequena perda de peso na primeira semana se recuperando nas semanas seguintes.

Análise hematológica nos ratos das sangrias das três semanas da fase subcrônica (Tabela 26) Nos hemogramas dos animais, os valores para hematimetria (figura 80 a) e leucometria (figura 80 b) não houve variação significativa durante as quatro semanas.

TABELA 26 – Resultado da média das concentrações encontradas na análise hematológica das amostras de sangue dos ratos Wistar administra por via oral.

Wistar Substância	Hematimetria			Leucometria
	Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	Hto (%)	Hb (g/dL)	Leucócitos $10^3/\text{mm}^3$
Via oral	7.864	44	14,9	7.786
Triol	($\pm 0,5$)	($\pm 0,4$)	($\pm 0,9$)	($\pm 2,0$)

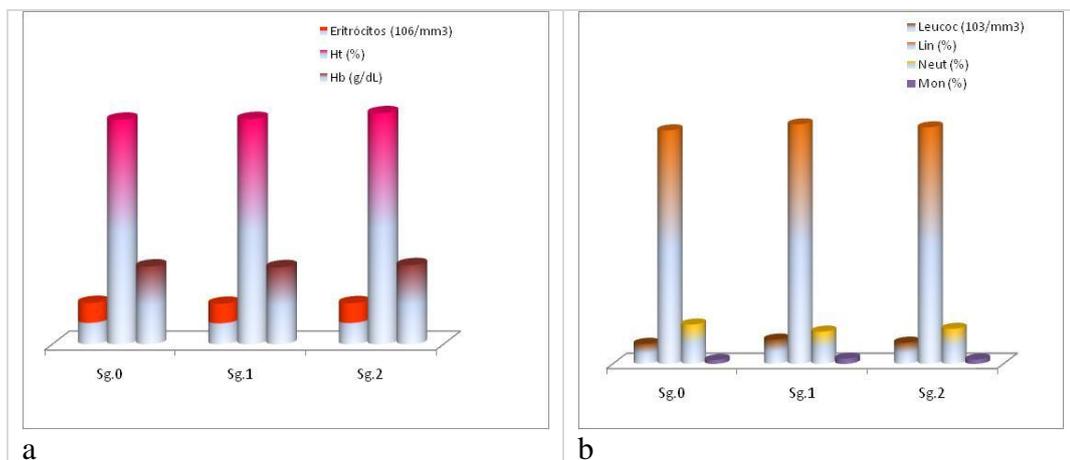


Figura 80 – Dados da análise hematológica dos ratos Wistar (machos e fêmeas) das 3 (três) sangrias durante os 30 dias. a e b - Na hematimetria quanto no leucograma mostraram que não houve alteração significativa ($p > 0,05$) nas sangrias analisadas.

Foram feitas análises bioquímicas nos soros dos animais para ureia, TGP/ALT (tabela 27), e proteínas totais (tabela 28) nos cinco grupos determinados.

TABELA 27 – Dados dos parâmetros de ureia e TGP/ALT mostrando as médias, desvios padrão e significância (p) das concentrações das amostras dos ratos Wistar administradas por via oral.

BALB/c Subst.	Ureia (mg/dL)				TGP/ALT (U/L)			
	Sg.0	Sg.1	Sg.2	P (Sg.0,1,2)	Sg.0	Sg.1	Sg.2	P (Sg.0,1,2)
Dose (500 µL)								
Triol (20 mg/Kg) Machos	52 (±6,5)	65 (±5,4)	32 (±3,4)	0-1<0,05 1-2<0,01	31 (±5,7)	35 (±3,7)	28 (±5,4)	NS
Triol (20 mg/Kg) Fêmeas	58 (±5,9)	60 (±2,4)	35 (±9,9)	0-2<0,05 1-2<0,05	22 (±4,3)	23 (±1,4)	23 (±5,1)	NS
Triol (40 mg/Kg) Machos	46 (±2,7)	52 (±13,5)	28 (±3,7)	*NS	22 (±3,6)	48 (±6,5)	37 (±1,4)	0-1<0,01 1-2<0,05
Triol (40 mg/Kg) Fêmeas	50 (±6,6)	59 (±7,8)	47 (±7,2)	NS	22 (±2,8)	31 (±12,1)	26 (±5,0)	NS
DMSO 1%	46 (±3,6)	60 (±6,5)	36 (±4,2)	0-1<0,05 1-2<0,01	22 (±5,2)	41 (±5,1)	30 (±2,4)	0-1<0,05

*NS – Não significativo (p>0,05)

TABELA 28- Dados do parâmetro das Proteínas Totais, mostrando as médias, desvios padrão e significância (p) das concentrações das amostras dos ratos Wistar administradas por via oral.

BALB/c Subst.	Proteínas Totais (g/dL)			
	Sg.0	Sg.1	Sg.2	P (Sg.0,1,2)
Dose (500 µL)				
Triol (20 mg/Kg) Machos	7,9 (±1,0)	7,3 (±0,1)	4,4 (±0,2)	0-1=NS 1-2<0,001
Triol (20 mg/Kg) Fêmeas	8,0 (±0,8)	7,4 (±0,6)	5,0 (±0,4)	0-1=NS 1-2<0,01
Triol (40 mg/Kg) Machos	7,4 (±0,1)	6,5 (±1,0)	4,4 (±0,1)	0-1=NS 1-2<0,001
Triol (40 mg/Kg) Fêmeas	8,1 (±0,5)	7,4 (±0,1)	4,9 (±0,1)	0-1=NS 1-2<0,001
DMSO 1%	7,2 (±0,5)	6,4 (±2,0)	4,5 (±0,0)	0-1=NS 1-2<0,001

*NS – Não significativo (p>0,05)

As análises bioquímicas para os animais administrados com o Triol (v.o) na dosagem de 20 mg/Kg no teste da ureia houve variação, nos machos e fêmeas, nas concentrações entre as sangrias 0 e 1 de 25%; Sg.0 e 2 de -38%; Sg.1 e 2 de 13% nos machos; Sg. 0 e 1 de 3%, Sg.0 e 2 de -40%, Sg.1 e 2 de -42% nas fêmeas (figura 81 a,b), na dosagem 40 mg/Kg a análise mostrou, nos machos e fêmeas sem variação significativa entre as sangrias (figura 82 a,b). Seguindo o mesmo parâmetro no DMSO 1% houve um aumento significativo pela Sg.1e 0 de 30% diminuindo na última semana (Sg.1 e 2 de -40% - figura 83). Na análise do ácido úrico houve uma diminuição significativa da Sg.0 e 1 (p<0,01) nas dosagens de 20 mg/Kg e

40 mg/Kg e no DMSO 1% (figura 84). No parâmetro da TGP/ALT, tanto nos machos quanto nas fêmeas, pela administração de 360 $\mu\text{g}/500 \mu\text{L}$ não houve variação significativa (figura 85 a,b); pela dose 40 mg/Kg, os machos apresentaram um aumento significativo Sg.0 e 1 de 118% ($p<0,01$) recuperando após a 3ª semana (Sg.1 e 2 de -23% - $P<0,05$ - figura 86 a); nas fêmeas sem variação significativa (figura 86 b). Seguindo o mesmo parâmetro no DMSO 1% houve um aumento significativo de Sg.0 e 1 ($p<0,05$) recuperando na Sg.2 (figura 87). Nos testes das Proteínas Totais, tanto nos machos quanto nas fêmeas, mostraram uma diminuição significativa em ambas as dosagens (20 mg/Kg e 40 mg/Kg) e no DMSO 1% da Sg.1 e 2 entre -30% a -40% ($p<0,001$) (figuras 88 a,b; 89 a,b; 90).

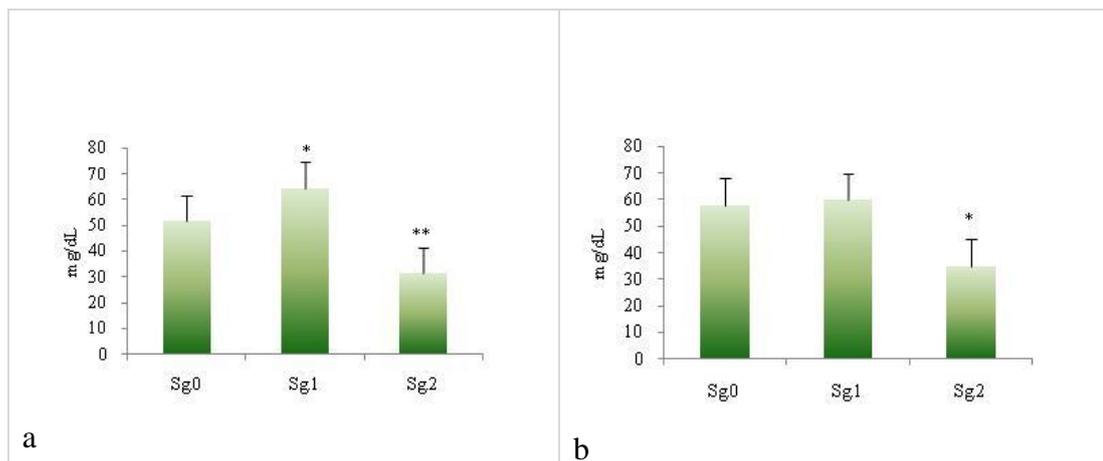


Figura 81-- Dados das análises de ureia nos ratos Wistar (machos e fêmeas) para Triol na dosagem de 20 mg/Kg mostraram: a- os machos houve significância da Sg.0 para Sg.1 ($p<0,05$), Sg.0 para Sg.2 e Sg.1 para Sg.2 ($p<0,01$); b- as fêmeas houve significância da Sg.0 para Sg.2 e Sg.1 e Sg.2 ($p<0,05$) e não houve significância da Sg.0 para Sg.1 ($p>0,05$).

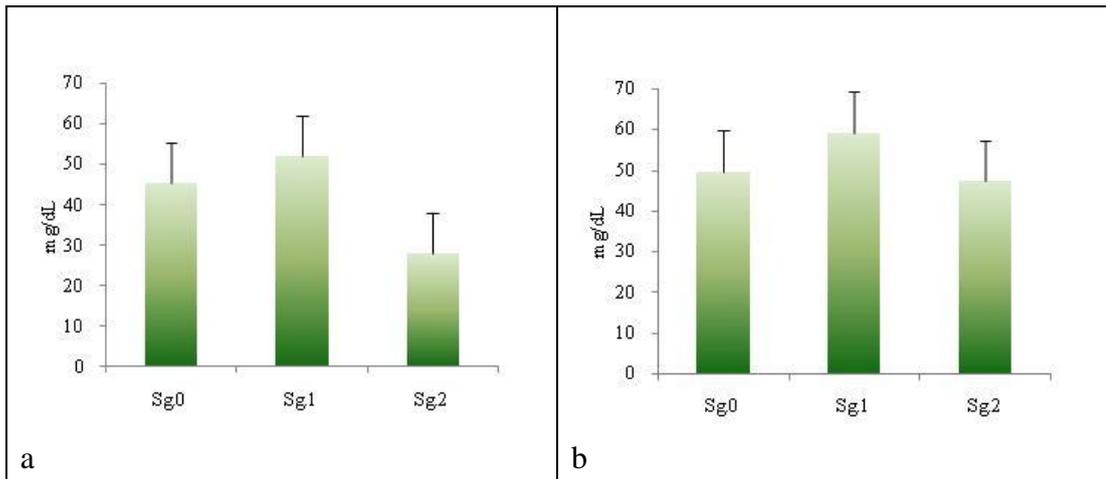


Figura 82- Dados das análises de ureia nos ratos Wistar (machos e fêmeas) para Triol na dosagem de 40 mg/Kg: a e b – Não houve significância entre as sangrias ($p > 0,05$).

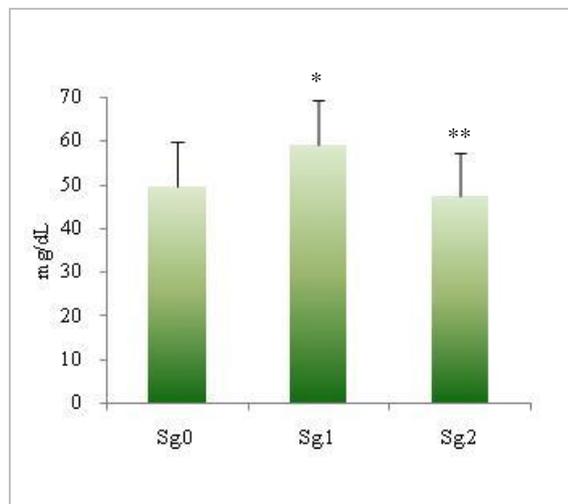


Figura 83- Dados das análises de ureia nos ratos Wistar (machos e fêmeas) para DMSO 1% mostraram que houve aumento significativo da Sg. 0 para Sg.1 ($p < 0,05$) e uma diminuição da Sg. 1 para Sg.2 ($p < 0,01$).

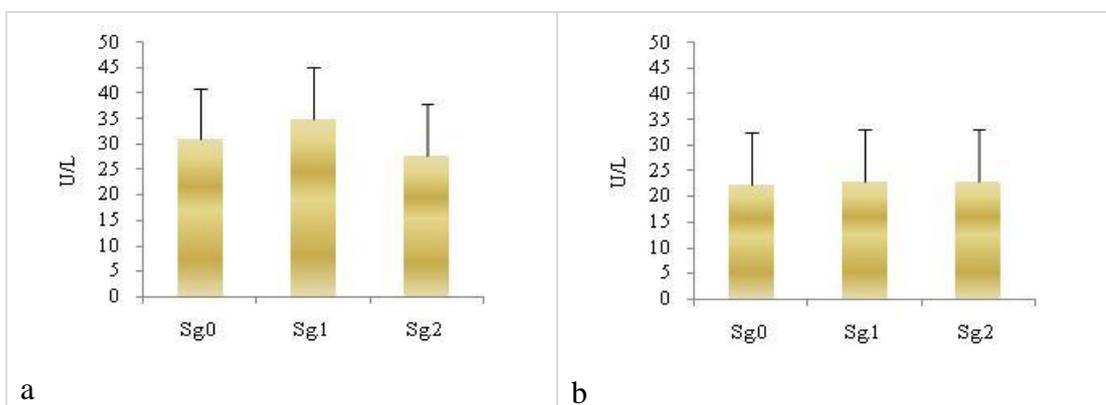


Figura 84- Dados das análises da TGP/ALT nos ratos Wistar (machos e fêmeas) para Triol na dosagem de 20 mg/Kg mostraram que: a e b – nos machos e fêmeas não houve significância nas sangrias ($p > 0,05$).

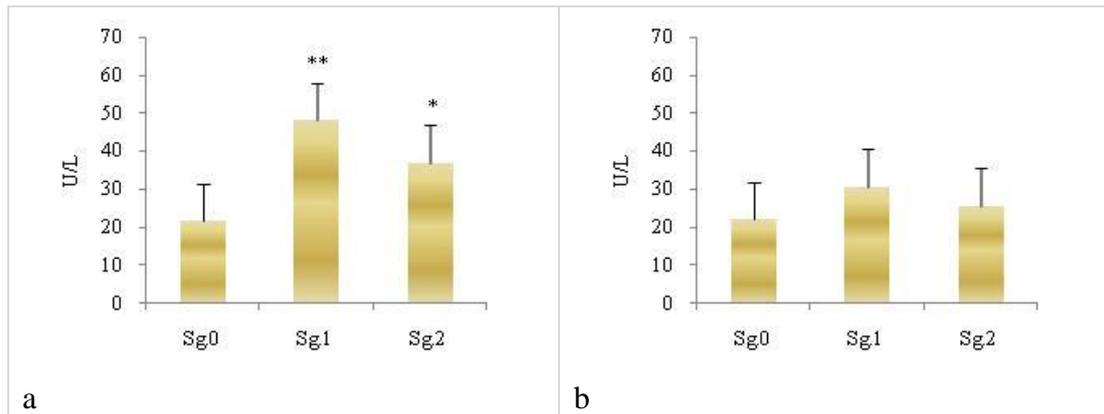


Figura 85– Dados das análises TGP/ALT para o Triol na dosagem de 40 mg/Kg mostraram que: a- os machos tiveram um aumento significativo da Sg.0 para Sg.1 ($p < 0,01$) e Sg.1 para Sg.2 houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$); b- as fêmeas não houve variação significativa ($p > 0,05$)

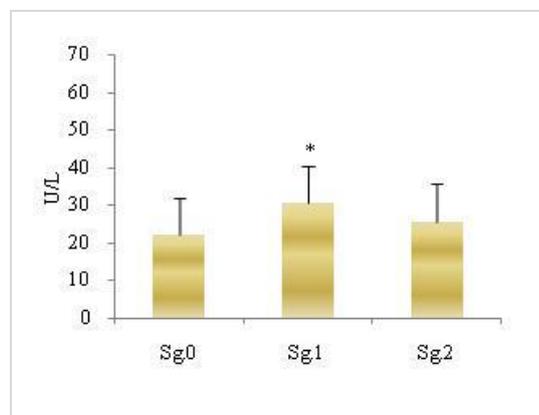


Figura 86– Dados das análises TGP/ALT para DMSO 1% mostram que houve um aumento significativo da Sg.0 para Sg.1 ($p < 0,05$) recuperando a normalidade na Sg.2.

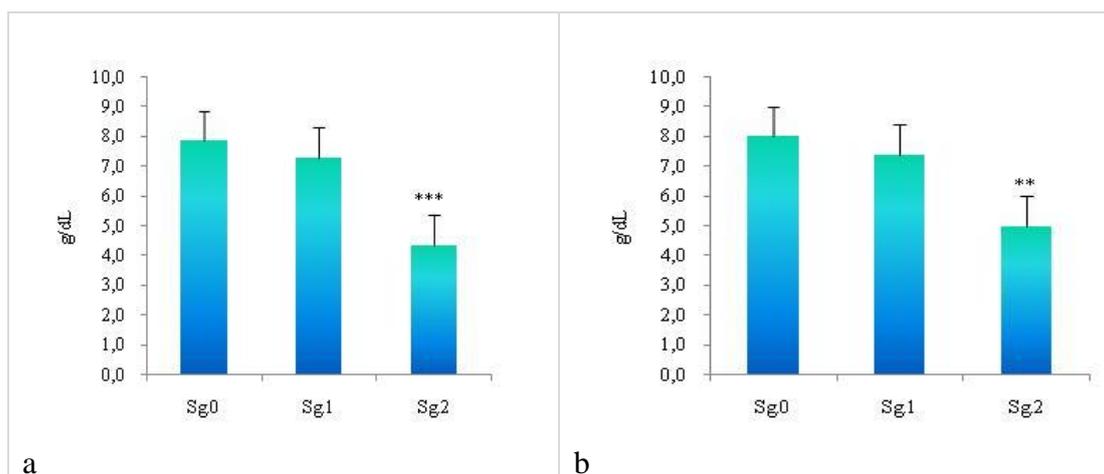


Figura 87– Dados das análises das Proteínas Totais nos ratos Wistar (machos e fêmeas) para Triol na dosagem de 20 mg/Kg: a- nos machos houve uma diminuição significativa na Sg. 0 e 1 para Sg.2 ($p < 0,001$); b- nas fêmeas houve uma diminuição significativa da Sg.0 e 1 para Sg.2 ($p < 0,01$); tanto nos machos quanto nas fêmeas não houve variação significativa da Sg.0 para Sg.1 ($p > 0,05$).

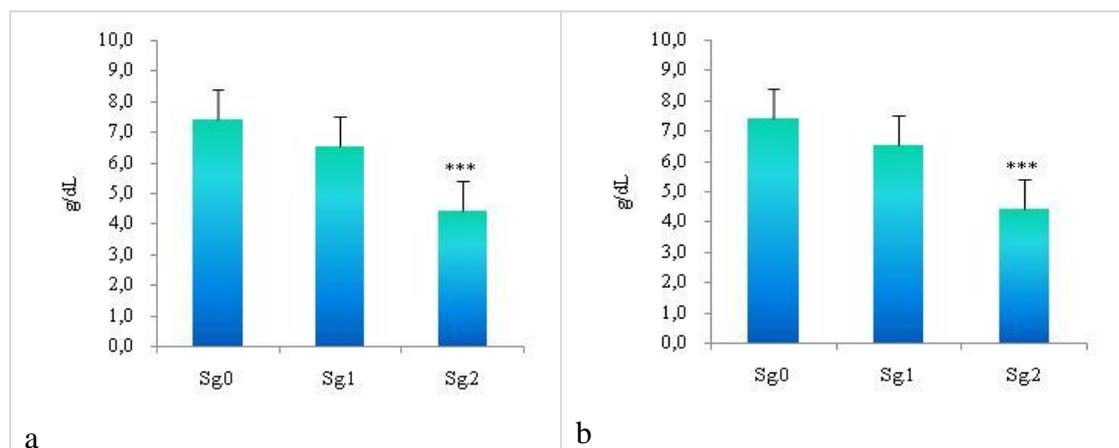


Figura 88 – Dados das análises das Proteínas Totais nos ratos Wistar (machos e fêmeas) para Triol na dosagem de 40 mg/Kg: a- nos machos houve uma diminuição significativa na Sg. 0 e 1 para Sg.2 ($p < 0,001$); b- nas fêmeas houve uma diminuição significativa da Sg.0 e 1 para Sg.2 ($p < 0,01$); tanto nos machos quanto nas fêmeas não houve variação significativa da Sg.0 para Sg.1 ($p > 0,05$).

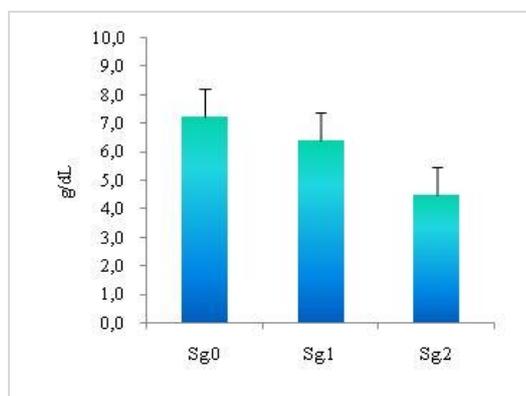


Figura 89 – Resultados das análises das Proteínas Totais nos ratos Wistar (machos e fêmeas) para DMSO 1% mostrou que não houve variação significativa nas sangrias ($p > 0,05$).

5.10 Avaliação de apoptose por fragmentação do DNA

Com objetivo de analisarmos a apoptose por fragmentação de DNA, células VERO foram incubadas com as substâncias Dolabelanotriol, N-Br-Triazol, N-Br-H-Triazol, ACV, CC/DMSO, na concentração de 50 μM , durante 6 horas (figura 90), 12 e 24 horas (Figura 91). Nossos resultados mostram que não houve um padrão característico de degradação do DNA.

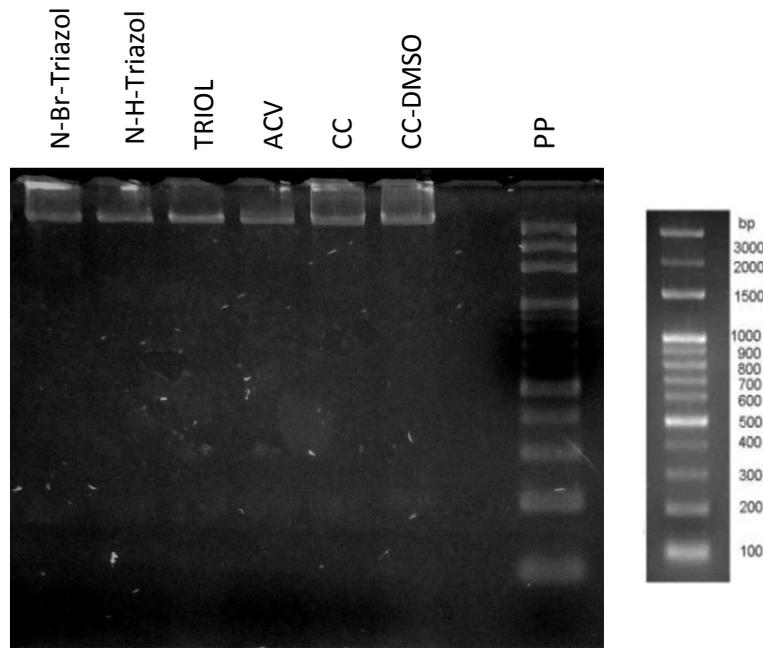


Figura 90– Foto do teste de apoptose por fragmentação de DNA com incubação das substâncias N-Br-Triazol, N-H-Triazol, Dolabellanotriol (Triol), aciclovir e os controles de célula e célula com DMSO por 6 horas com marcador de peso molecular de 100 pares de base.

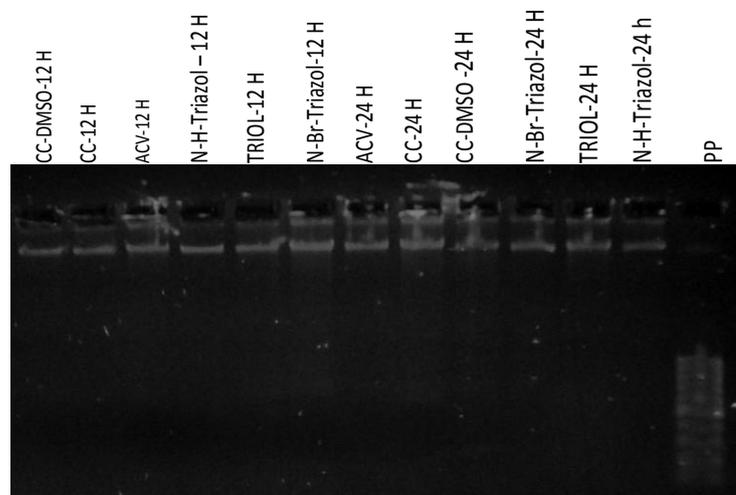


Figura 91– Foto do teste de apoptose por fragmentação de DNA com incubação das substâncias N-Br-Triazol, N-H-Triazol, Dolabellanotriol (Triol), aciclovir e os controles de célula e célula com DMSO por 12 e 24 horas com marcador de peso molecular de 100 pares de base.

6 DISCUSSÃO

Atualmente novas substâncias químicas têm sido sintetizadas e estudadas quanto a sua potencial atividade antiviral. O amplo conhecimento da replicação viral e da interação do vírus com a célula hospedeira tem sido crucial na busca destes novos fármacos. Além do suporte terapêutico promissor, os agentes antivirais têm permitido aos virologistas, entender e explorar a biologia e a bioquímica da infecção viral. A mais moderna e racional abordagem visa identificar estágios do ciclo de replicação que possam servir como alvo para as drogas antivirais. Apesar do sucesso desses fármacos, são poucas as doenças para as quais as drogas antivirais, eficientes, têm sido desenvolvidas. O desenvolvimento de resistência viral às drogas disponíveis para o tratamento das infecções virais tornou-se uma questão importante, contribuindo fortemente para a falha terapêutica. Sendo assim, a caracterização da resistência viral aos fármacos e a busca de novas moléculas com potencial antiviral são de importância fundamental no controle da mortalidade e morbidade de doenças bastantes significativas para a população humana.

Nesse trabalho foram realizados estudos de toxicidade com substâncias obtidas a partir de algas pardas marinhas e substâncias sintéticas com potencial atividade antiviral. A importância de testes que avaliam o nível de toxicidade de substâncias potencialmente terapêuticas está na triagem entre aquelas que futuramente possam ser usadas na terapia antiviral ou precisam ser descartadas logo no início dos estudos, pois o nível farmacológico e

da dose letal estão muito próximos. A atividade biológica de vários diterpenos isolados de algas marinhas para um grande número de microorganismos, incluindo os vírus herpético e o HIV-1 tem sido relatado por diversos grupos (BARBOSA et al., 2004; PEREIRA, 2004).

Nossos resultados, obtidos dos estudos *in vitro* das substâncias derivadas de algas pardas marinhas, *D. menstrualis* e *D. paffii* (Da-1 e Dolabellanotriol (Triol)), mostraram que as substâncias possuem atividade antiviral para o vírus HIV-1 e HSV-1. A substância Triol mostrou uma atividade antiviral mais eficaz para os dois vírus mencionados e, apresentou uma menor citotoxicidade. O Da-1 mostrou menor atividade antiviral e um índice de citotoxicidade *in vitro* maior que o Triol (TABELA 6) (BARBOSA et al., 2004). O aciclovir (DE MIRANDA et al., 1981) foi usado como controle positivo por ser uma das substâncias amplamente utilizadas como medicamento anti-HSV. Os resultados das substâncias sintéticas (Triazol, Tienopiridina) mostraram potencial inibitório relevante e índice de citotoxicidade mais baixo do que os produtos naturais das algas (TABELA 6).

Na primeira avaliação usamos uma dose aleatória e 20 mg/Kg por via ip e sc de Da-1 e Triol. Neste experimento foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6. Nos animais administrados com Da-1 observamos a morte de todos os camundongos (TABELA 3). As análises *in vivo* para Da-1 confirmaram trabalhos anteriores realizados *in vitro*, onde foi demonstrado um nível maior de citotoxicidade quando comparado com os outros produtos naturais derivados das algas pardas (PEREIRA, 2004). As análises histopatológicas mostraram que houve alterações em todos os tecidos estudados, principalmente no fígado e rim, mais fortemente pela via ip do que pela sc. De acordo com dados da literatura, muitas substâncias provenientes de plantas, mostraram toxicidade semelhante principalmente, no fígado e rins (VIDAL et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2007). Nos animais administrados com Triol observamos a morte de 50% dos animais, como todos que foram a óbito tinham

peso inferior a 22 g podemos inferir que a dose letal para esta substância gira em torno de 20 mg/kg via ip.

Na análise *in vivo* de toxicidade aguda, os testes das substâncias derivadas de algas pardas e substâncias sintéticas, mostraram que com as doses administradas das substâncias, Triazol, Citral e Tienopiridina entre 15 mg/Kg e 50 mg/Kg, não foi possível identificar a dose letal. As doses utilizadas por nós estão muito aquém da dose máxima preconizada pela OECD que é de até 2000 mg/Kg de peso. As doses administradas nos animais foram calculadas sobre os valores utilizados em cultura que tiveram atividade antiviral. Estes valores chegaram a 20 vezes as concentrações utilizadas *in vitro*. Embora não chegando a DL_{50} , para a maioria das substâncias, foram observadas nas análises histológicas dos tecidos, em todas as doses utilizadas, alterações tissulares, principalmente no fígado e rins, indicando algum nível de toxicidade.

Com o objetivo de avaliarmos a universalidade da DL mínima encontrada nos camundongos C57BL/6 das substâncias estudadas usamos outra linhagem de camundongos, o BALB/c. Administramos várias doses das substâncias seguindo o seguinte protocolo: Triol (15 mg/Kg, 20 mg/Kg, 25 mg/Kg e mg/Kg), DB-1 (25 mg/Kg) Triazol (15 mg/Kg, mg/Kg, 25 mg/Kg) e Citral (15 mg/Kg, 20 mg/Kg, 25 mg/Kg), Tienopiridina (25 mg/Kg) e o Aciclovir (50 mg/Kg), nesse último foi determinada a dosagem de acordo com de MIRANDA, mostrando que essa concentração, mesmo sendo alta, é absorvível pela via renal dos camundongos (DE MIRANDA et al., 1981). Nossos dados mostraram que não foi possível determinar a DL mínima nesta linhagem e nas doses utilizadas, uma vez que nenhum dos animais administrados com as substâncias experimentais morreu e nem houve alterações significativas no comportamento. Em contrapartida a administração do aciclovir resultou em duas mortes dos cinco animais utilizados.

Nas dosagens da bioquímica sanguínea, os testes de glicose e ácido úrico, não mostraram alterações significativas após a administração das substâncias experimentais. Sabe-se que quando há inibição da excreção de ácido úrico por ação de drogas o nível plasmático se eleva (BISHOP et al., 2000). Experimentos semelhantes de Baliga e colaboradores mostraram que em relação à glicose e ácido úrico às substâncias derivadas de produtos naturais não resultam em modificações desses parâmetros bioquímicos. As substâncias que provocaram índices aumentados das concentrações de ureia foram o Triazol (25 mg/Kg) pela via ip ($p < 0,05$), o Triol pela via sc ($p < 0,05$), o Triazol (N-Br) via sc ($p < 0,05$) e o aciclovir via sc ($p < 0,01$). A substância Triol (50 mg/Kg) resultou num aumento significativo das concentrações da enzima TGP/ALT. Estas alterações sugerem que estas substâncias apresentam toxicidade tanto para a função renal como hepática.

A avaliação histopatológica dos órgãos dos animais experimentais administrados com, Da-1 (15 mg/Kg), Citral (15 mg/Kg), Triol (50 mg/Kg), Triazol (25 mg/Kg), Aciclovir (50 mg/Kg) e DMSO nas concentrações de 20%, 40% e 50%, demonstrou que os órgãos mais afetados foram o fígado e os rins corroborando os valores bioquímicos alterados neste trabalho. Segundo diversos autores, o fígado é um dos órgãos mais afetados por agentes químicos, pois exerce uma importante função na biotransformação de substâncias químicas no organismo (BISHOP et al., 2000; BRASILEIRO FILHO, 2007). Durante este processo podemos observar desde alterações bioquímicas e estruturais adaptativas, até lesões morfológicas, muitas vezes, irreversíveis. Na avaliação do intestino delgado (duodeno) e estômago, com exceção Da-1, que provocou uma diminuição das vilosidades as demais substâncias utilizadas não provocaram alterações histopatológicas significativas. A consequência do achatamento de vilosidades é o comprometimento na absorção intestinal o que pode levar a desnutrição caso se prolongue por muito tempo. Desta forma esta seria uma contraindicação da continuidade de estudos com esta substância nesta dosagem.

Estudos de avaliação toxicológica de substâncias de qualquer procedência demonstram que é comum, principalmente no tecido hepático, haver alteração celular, dependendo da concentração administrada, podendo ser irreversível ou não a recuperação desses órgãos (OMAR et al., 1996; BALIGA et al., 2004; MARIZ et al., 2006; RAUBER et al., 2006; MUKINDA & SYCE, 2007; VASCONCELOS et al., 2007).

Para a avaliação dos resultados da administração da substância Triol, na fase subcrônica, por via oral (vo) utilizamos ratos da linhagem Wistar e, foram administradas doses nas concentrações de 20 mg/Kg e 40 mg/Kg (dose=500 µL), em quatro grupos de animais (machos e fêmeas). Nesse protocolo fizemos análises, hematológicas e bioquímicas, a cada semana por 30 dias. Verificamos que na análise hematológica não houve alteração significativa em nenhum dos grupos. Na análise bioquímica dos testes de TGP/ALT, ureia e proteínas totais, observamos que houve pequenas diferenças no metabolismo entre machos e fêmeas, mas os resultados não foram significativos e não houve alteração importante entre os parâmetros analisados, exceto para as proteínas totais onde houve uma diminuição significativa na última semana do experimento. Durante a observação dos animais a cada semana, vimos que as fezes apresentaram uma textura amolecida nas duas semanas após a administração do Triol, principalmente nas fêmeas. Com relação a outro ponto de avaliação clínica, observamos que, o peso dos animais apresentou perda transitória com sua recuperação em quase todos os grupos na última semana. Segundo alguns trabalhos, sinais de toxicidade sistêmica são definidos a partir da redução na massa corporal dos animais experimentais (RAUBER et al., 2006). Como os nossos animais apresentaram a redução transitória de massa corporal, se faz necessária uma avaliação com intervalos diferenciados e por um período mais longo sugerindo assim a necessidade do estudo da fase crônica destas substâncias.

Apesar da análise histopatológica do fígado e rins mostrar algumas alterações celulares importantes após a administração de Triol, Triazol e Tienopiridina, nas concentrações de até 25 mg/Kg por via sc. Podemos afirmar pelas análises apresentadas que estas substâncias foram as que causaram menos danos toxicológicos nos camundongos BALB/c. Para demonstrar se as alterações histopatológicas observados são irreversíveis, são necessários testes complementares e acompanhar por um período mais longo a observação da recuperação ou não dos órgãos desses animais.

Com objetivo de avaliar se as lesões encontradas nas avaliações histopatológicas de fígado e rim são conseqüentes da fragmentação do DNA induzida pelas substâncias pesquisadas nesse trabalho, iniciamos alguns experimentos preliminares *in vitro*. Usamos as substâncias Triol e dois tipos de Triazol, além do Aciclovir e DMSO 1% para o teste de apoptose. Foram utilizados três tempos distintos de análise 6, 12 e 24 h após o tratamento usando a mesma concentração das substâncias (50 μ M). Nossos resultados mostraram que não houve fragmentação do DNA induzida pelas substâncias utilizadas. Assim podemos inferir que a toxicidade observada neste trabalho se deve a interferência das substâncias utilizadas em outras vias bioquímicas que não as da apoptose.

Os estudos realizados nesse trabalho tiveram a intenção de revelar quais seriam os possíveis efeitos tóxicos das substâncias naturais (TRIOL) e sintéticas (Triazol e a Tienopiridina) com atividade antiviral (anti-HSV-1 e anti-HIV-1) e determinar qual a dose máxima, não tóxica, para uso dessas substâncias. Como os resultados se mostraram promissores, cabe fazer outras investigações usando outros testes necessários para incluir essas substâncias em estudos mais avançados de fase pré-clínica.

7 CONCLUSÃO

- Todas as substâncias estudadas apresentaram baixa citotoxicidade e uma boa atividade antiviral para HIV-1 e HSV-1 (80% a 90%).
- Não nos foi possível encontrar o valor da DL50 em camundongos BALB/c. Os animais não apresentaram mudança comportamental e não evoluíram para o óbito.
- Todas as substâncias estudadas não interferiram nos níveis de glicose e de ácido úrico.
- Os níveis de ureia e a atividade TPG/ALT apresentaram variações significativas quando do tratamento com as substâncias N-Br-Triazol (25 mg/Kg), Triol (50 mg/Kg), Aciclovir (50 mg/Kg) e no DMSO 20%, 40% e 50%.
- A análise histológica evidenciou que os órgãos mais afetados foram o fígado, apresentando alterações nos hepatócitos do tipo: edema, focos de infiltrado inflamatório, hemorragia e aumento de presença de mitose e os rins apresentando hemorragia, congestão vascular e presença de cristais hemáticos. As alterações variaram de leve a acentuada dependendo do tipo e da concentração da substância.
- Os órgãos dos animais que foram administrados com substância Da-1 apresentaram alterações importantes de aparência irreversível.

- A concentração máxima sem alterações significativas após a administração das substâncias estudadas nesse experimento foi estabelecida em 25 mg/Kg.
- Na avaliação subcrônica, os ratos Wistar que receberam Triol (v.o.), apresentaram modificações na textura das fezes (amolecidas) com redução de peso e níveis de Proteínas Totais, sem, no entanto, apresentar variações significativas nos níveis de ureia, ácido úrico, TGP/ALT.
- Não observamos a indução de apoptose, através do método que avalia a fragmentação do DNA, após administração da concentração de 50 μ M de triol e triazol bem como aciclovir e DMSO.

8 PERSPECTIVAS

- ❖ Três manuscritos em preparação;
- ❖ Testes de genotoxicidade (Teste do Cometa);
- ❖ Testes de avaliação de toxicidade da fase crônica;
- ❖ Linfoproliferação;
- ❖ Mitogenicidade;
- ❖ Contagens dos clusters nos hepatócitos;
- ❖ Testes imunohistoquímicas para determinar as células de inflamação.

9 BIBLIOGRAFIA

- ABRANTES, J. (2006). "Estudo da Atividade Anti-HSV-1 de Terpenos Isolados de Algas Pardas Marinhas". Instituto de Biologia. Niterói, Universidade Federal Fluminense. **Mestrado**: 88.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. and WATSON, J. D. (2004). Molecular Biology of the Cell. London, Garland Publishing.
- ALVES, G. E. S. (1998). "Dimetilsulfóxico (DMSO). Considerações Gerais Sobre as Particularidades e Versatilidade." Saúde Equina(6): 6-10.
- ANAZETTI, M C & MELO, P S.(2007). "Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular." Metrocamp Pesquisa, v. 1, n. 1, p. 37-58, jan./jun. 2007.
- BALIGA, M. S., JAGETIA, G. C., ULLOR, J. N., BALIGA, M. P., VENKATESH, P., REDDY, R., RAO, K. V. N. M., BALIGA, B. S., DEVI, S., RAJU, S. K., VEERESH, V., REDDY, T. K. and BAIRY, K. L. (2004). "The Evaluation of the Acute Toxicity and Long Term Safety of Hydroalcoholic Extract of Sapharma (Alstonia Scholaris) in Mice and Rats." Toxicology Letters **151**: 317-326.
- BARBOSA, J. P., PEREIRA, R. C., ABRANTES, J. L., SANTOS, C. C. C., REBELLO, M. A. and FRUGULHETTI, I. C. P. P. (2004). "*In vitro* Antiviral Diterpenes from the Brazilian Brown Alga Dictyota paffii." Planta Medica **70**: 856-860.
- BEDOYA, L. M., SANCHEZ-PALOMINO, S., ABAD, M. J., BERMEJO, P. and ALCAMI, J. (2001). "Anti-HIV Activity of Medicinal Plant Extracts." Journal of Ethnopharmacology **77**(1): 113-116.
- BISHOP, M. L., DUBEN-ENGELKIRIK, J. L. and FODY, E. P. (2000). Clinical Chemistry. Principles, Procedures, Correlations. Philadelphia.
- BLUNT, J., COPP, B., MUNRO, M., NOTHCOTE, P. and PRISEP, M. (2006). "Marine Natural Products." Natural Product Reports **22**: 26-78.
- BOEHMER, P. and LEHMAN, I. (1997). "Herpes Simplex Virus DNA Replication." Annual Review of Biochemistry **66**: 347-384.
- BOTHAM, P. A. (2004). "Acute Systemic Toxicity - Projects for Tiered Testing Strategies." Toxicology in vitro **18**: 227-230.

- BRASILEIRO FILHO, G. (2007). Bogliolo Patologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- CARLUCCI, M. J., SCOLARO, L. A., ERREA, M. I., MATULEWICZ, M. C. and DAMONTE, E. B. (1997). "Antiviral Activity of Natural Sulphated Galactans on Herpes Virus Multiplication in Cell Culture." Planta Medica **6**(5): 429-432.
- CHOWDHURY, I., THARAKAN, B. and BHAT, G. K. (2006). "Current Concepts in Apoptosis: The Physiological Suicide Program Revisited." Cellular & Molecular Biology Letters **11**: 506-525.
- CIRNE-SANTOS, C. C. (2006). Atividade Antirretroviral Do Diterpeno 8,10, 18-Trihidroxy-2, 6-Dolabelladiene (Dolabelladienetriol): Análise dos Efeitos Inibitórios sobre a Enzima Transcriptase Reversa e a Replicação do HIV-1. Microbiologia. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro: 158.
- COAKLEY, E., PETROPOULOS, C. J. and WHITCOMB, J. M. (2005). "Assessing Chemokine Co-Receptor Usage in HIV." Current opinion in infectious diseases **18**: 9-15.
- COSTA, M. N. (2007). Estudo Do Mecanismo De Ação De Derivados Aminoálcoois e de Derivados Do Sistema Tienopiridina na Replicação *in vitro* do Vírus Herpes Simples Tipo 1. Centro de Estudos Gerais. Niterói, Universidade Federal Fluminense: 89.
- DE MIRANDA, P., KRASNY, H. C., PAGE, D. A. and ELION, G. B. (1981). "The Disposition of Acyclovir in Different Species." J Pharmacol Exp Ther **219**(2): 309-15.
- DE PAULA, J. C., BUENO, L. B., YONESINGUE-VALENTIM, Y. and AL, E. (2004). Diterpenos De Alga Parda Marinha Dictyota Sp (Dictyotals, Phaeophyta). XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares., Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química.
- DE PERRE, P. V., SEGONDY, M., FOULONGNE, V., OUEDRAOGO, A., KONATE, I., HURAUX, J.-M., MAYAUD, P. and NAGOT, N. (2008). "Herpes Simplex Virus and HIV-1: Deciphering Viral Synergy." The Lancet infectious diseases **8**: 490-497.
- DUARTE, M. E., CARDOSO, M. A., NOSEDA, M. D. and CEREZO, A. S. (2001). "Structural Studies on Fucoidans from the Brown Seaweed *Sargassum Stenophyllum*." Carbohydrate research **333**(4): 281-293.
- EYMARA, J. (2007). Estudo da Atividade Citotóxica e Antiviral (Anti-HSV-1 E Anti HIV-1) Dos Derivados N-Amino-Triazóis. Niterói.
- FAULKNER, D. (1992). "Marine Natural Products." Natural Product Reports **9**(4): 323-364.
- FERREIRA, C. G. and ROCHA, J. C. (2004). Oncologia Molecular.
- FLINT, S. J., ENQUIST, L. W., SKALKA, A. M. and RACANIELLO, V. R. (2004). Principles of Virology.
- FREITAS, O. S. P. (2006). "Substâncias Bioativas de Organismos Marinhos: Promissores Candidatos Antivirais". Niterói, Universidade Federal Fluminense: 4-6.

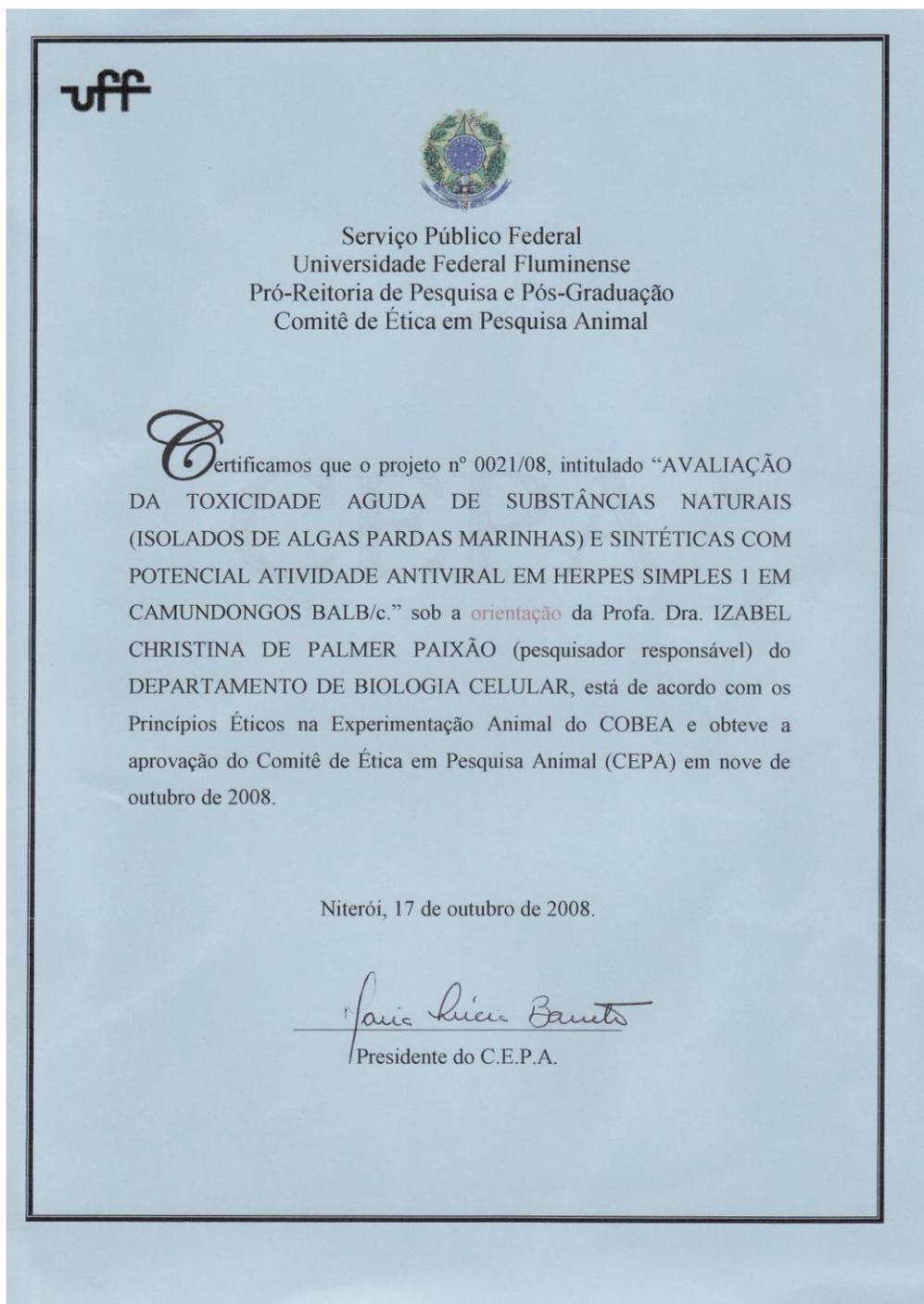
- GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y. and BEN-SASSON, S. A. (1992). "Identification of Programmed Cell Death in Situ Via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation." J Cell Biol **119**(3): 493-501.
- GOLDIM, J. R. (2007). A Avaliação Ética Da Investigação Científica de Novas Drogas: A Importância da Caracterização Adequada das Fases de Pesquisa. Revista HCPA. **27**.
- HARPER, M., BUGNI, T., COOP, B., JAMES, R., LINDSAY, B., RICHARDSON, A., SCHNABEL, P., TASDEMIR, D., VANWAGNER, R., VERBETSKI, S. and IRELAND, C. (2006). Introduction to the Chemical Ecology of Marine Natural Products. Marine Chemical Ecology. J. Mc Clintock and Baker, B. London, CRC Press.
- KLAHLOU, S., ISRAILI, Z. H. and LYOUSSI, B. (2008). "Acute and Chronic Toxicity of a Lyophilised Aqueous Extract of Tanacetum Vulgare Leaves in Rodents." Journal of Ethnopharmacology **117**(221-227).
- LAMKANFI, M., FESTEJENS, N., DECLERCQ, W., BERGHE, V. and VandENABEELE, P. (2007). "Caspases in Cell Survival, Proliferation and Differentiation." Cell Death and Differentiation **14**: 44-55.
- LEITE, E. and AMORIM, L. (2006). Toxicologia Geral. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais: 1-62.
- LI, Y., SUN, X., LAMONT, J. T., PARDEE, A. B. and LI, C. J. (2003). "Selective Killing of Cancer Cells by Beta-Lapachone: Direct Checkpoint Activation as a Strategy against Cancer." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**: 2674-2678.
- MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C. and VEIGA JR, V. F. (2002). "Plantas Mediciniais - a Necessidade de Estudos Multidisciplinares." Química Nova **25**(3): 429-438.
- MADIGAN, M., MARTINKO, J. and PARKER, J. (2000). Brock – Biology of Microorganisms. New Jersey.
- MARÉCHAL, V. (2007). Vírus em Emboscada no Organismo. Scientif American. **28**: 62-67.
- MARIZ, S. R., CERQUEIRA, G. S., ARAÚJO, W. C., DUARTE, J. C., MELO, A. F. M., SANTOS, H. B., OLIVEIRA, K., DINIZ, M. F. F. M. and MEDEIROS, I. A. (2006). "Estudo Toxicológico Agudo do Extrato Etanólico de Partes Aéreas de *Jatropha Gossypifolia* L. Em Ratos." Brazilian Journal of Pharmacognosy **16**(3): 372-378.
- MORFIN, F. & THOUVENOT, D. (2003). "Herpes Simplex Virus Resistance to Antiviral Drugs." Journal of Clinical Virology **26**: 29-37.
- MOSMANN, T. (1983). "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." Journal of Immunological Methods **65**: 55-63.
- MUKINDA, J. T. & SYCE, J. A. (2007). "Acute and Chronic Toxicity of the Aqueous Extract of *Artemisia Afra* in Rodents." Journal of Ethnopharmacology **112**: 138-144.

- NEWBY, C. S. & COKE, M. (1996). "The Preparation, Characterisation and Solubility Characteristics of a Hydrogen-Bonded Complex between Acyclovir and Cytosine." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **15**: 39-47.
- OMAR, R. F., GOURDE, P., SORMEAUX, A., TREMBLAY, M., BEAUCHAMP, D. and BERGERON, M. G. (1996). "*In vivo* Toxicity of Foscarnet and Zidovudine Given Alone or in Combination." Toxicology and Applied Pharmacology **139**: 324-332.
- ONAWUNMI, G. O. (1989). "Evaluation of the Antimicrobial Activity of Citral." Letters in Applied Microbiology **9**: 105-108.
- PAGÁN, O. R., ROWLANDS, A. L. & URBAN, K. R. (2006). "Toxicity and Behavioral Effects of Dimethylsulfoxide in Planaria." Neuroscience Letters **407**: 274-278.
- PEREIRA, H. S., Leao-Ferreira, L.R., Moussatchéc N., Teixeira, V.L., Cavalcanti D.N., Costa L.J., Diazd, R., Frugulhetti, I.C.P.P. (2004). "Antiviral Activity of Diterpenes Isolated from the Brazilian Marine Alga *Dictyota Menstrualis* against Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)." Antiviral Research: 69-76.
- POLSTER, B. M. & FISKUM, G. (2004). "Mitochondrial Mechanisms of Neural Cell Apoptosis." Journal of Neurochemistry **90** (1281-1289).
- PRESTON, C. M. (2000). "Repression of Viral Transcription During Herpes Simplex Virus Latency." The Journal of General Virology **81**: 1-19.
- RAMÍREZ, J. H., PALACIOS, M., TAMAYO, O., JARAMILLO, R. and GUTIÉRREZ, O. (2007). "Acute and Subacute Toxicity of *Salvia Scutellarioides* in Mice and Rats." Journal of Ethnopharmacology **109**(348-353).
- RAUBER, C., MELLO, F. B., MELLO, J. R. B. (2006). "Avaliação Toxicológica Pré-Clínica do Fitoterápico Contendo *Aristolochia Cymbifera*, *Plantago Major*, *Luehea Grandiflora*, *Myrocarpus Frondosus*, *Piptadenia Colubrina* (Cassaú Composto*) Em Ratos Wistar." Acta Scientiae Veterinariae **34**(1): 15-21.
- SOUZA, M. V. N. & ALMEIDA, M. V. (2003). "Drogas Anti-HIV: Passado, Presente E Perspectivas Futuras." Química Nova **26**: 366-372.
- STEVENSON, M. (2003). "HIV-1 Pathogenesis." Nature Medicine **9**: 853-860.
- TEAS, J., HEBERT, J. R., FITTON, J. H. and AL., E. (2004). "Algae-a Poor Man's Haart?" Medical Hypotheses **62**: 507-510.
- TOCHETO, M. (sd). Toxicologia E Segurança De Laboratório. Santa Maria, RS, Universidade Federal de Santa Maria.
- TOMÉ, A. C. (2003). "Science of Synthesis - Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations."
- TSUTOMU, A., YOSHIKO, K. and TIMASHEFF, S. N. (2007). "Protein Precipitation and Denaturation by Dimethyl Sulfoxide." Biophysical Chemistry **131**: 62-70.

- VALADARES, M. C. (2006). "Avaliação De Toxicidade Aguda: Estratégias Após A "Era Do Teste D150"- Acute Toxicity Evaluation: Strategies Post "DI 50 Test Era"." REVISTA ELETRÔNICA DE FARMÁCIA Retrieved 2, 3.
- VASCONCELOS, T. H. C., MODESTO-FILHO, J., DINIZ, M. F. M., SANTOS, H. B., AGUIAR, F. B. and MOREIRA, P. V. L. (2007). "Estudo Toxicológico Pré-Clínico Agudo com o Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae)." Brazilian Journal of Pharmacognosy **17**(4): 583-591.
- VIDAL, A., FALLARERO, A., PEÑA, B. R. and AL., E. (2003). "Studies on the Toxicity of *Punica Granatum* L. (Punicaceae) Whole Fruit Extracts." Journal of Ethnopharmacology **89**: 295-300.
- VIDOTTI, E. C. and ROLLEMBERG, M. C. E. (2004). "Algas: Da Economia Nos Ambientes Aquáticos À Bioremediação E À Química Analítica." Química Nova **27**(1): 139-145.
- WAGNER, E. K. and HEWLETT, M. J. (1999). Basic Virology.

10 ANEXOS

1 - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA PELA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE.



ANEXO 1- Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Animal pela Universidade Federal Fluminense para uso de animais nesse estudo.

2- CERTIFICADO DO FORNECEDOR

Análises/Componentes		Especificações	Resultados das análises
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS			
• Descrição (0)		Pó cristalino branco ou quase branco	Pó cristalino branco.
• Doseamento (substância seca) * (0)		98,5% a 101,0%	99,7%
• Cinzas sulfatadas * (0)		Não mais que 0,1%	0,03%
• Água (Karl Fischer) (0)		Não mais que 6,0%	5,0%
• Substâncias relacionadas * (0)		Conforme	Conforme
• Aparência da solução (0)		A solução é límpida e não é mais corada que a solução de referência Y7.	A solução é límpida e não é mais corada que a solução de referência Y7.
• Densidade aparente (1)		Informativo	0,5 g/mL
IDENTIFICAÇÃO			
• Infravermelho (0)		Positivo	Positivo
SOLUBILIDADE			
• Água (0)		Pouco solúvel	Muito pouco solúvel
• Alcool (0)		Muito pouco solúvel	Insolúvel
• Dimetil sulfoxido (0)		Facilmente solúvel	Solúvel

ARMazenamento: Amaz. Temp. Ambiente, em recipiente fechado protegido da luz e umidade.

* - Análises em acordo com o certificado de análise do fornecedor.
As demais análises foram realizadas no Laboratório de Controle da Qualidade Galena.
Referências: (0) Farmacopéia Britânica, Edição 2002.; (1) Conforme metodologia interna Galena.
Segue anexo o espectro de identificação realizado por INFRAVERMELHO que comprova a identificação deste insumo.

Resultado: (X) **Aprovado** Data da Análise: 23/9/2006 Nr.Ctrl.: 011905-010760G0020/3264

[Assinatura]
Roberto T. Yoshida
Farmacêutico Responsável
CRF-SP: 18.441

[Assinatura]
Bernardo Freitas Paula
Farmacêutico
CRF-RJ 10563 15/11/06

CONTROLE DE QUALIDADE

ORGANOLÓPTICO: _____
- COR: *conforme*
- ODORE: *característico*

RÓTULO/LAUDO: *conforme*

SOLUBILIDADE: _____

DENSIDADE: *0,28 g/ml*

PH: *7*

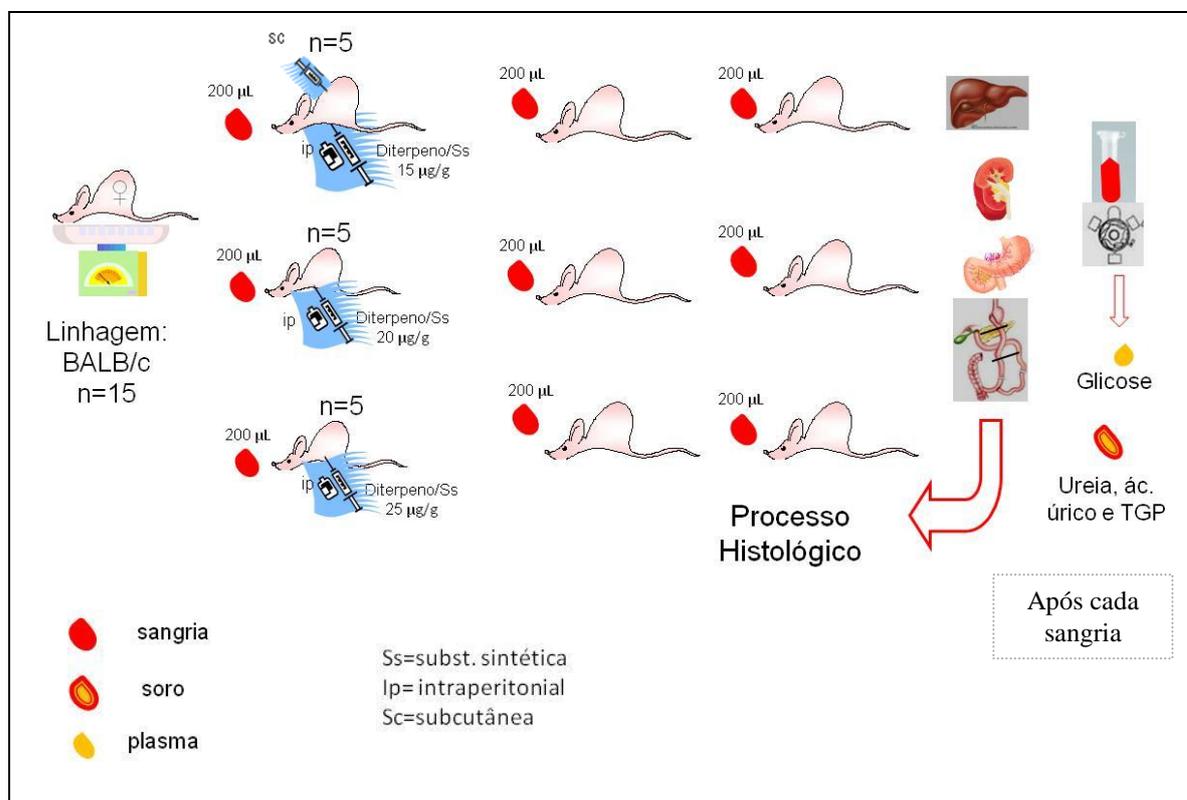
PESO/VOLUME: *1*

ASSINA: *[Assinatura]*

Este produto atende aos requisitos da BPDE e apresenta segurança e pureza de sua qualidade.

ANEXO 2 – Certificado do controle de qualidade da substância Aciclovir liofilizada usada nesse estudo.

3 - PROTOCOLO BÁSICO DE ADMINISTRAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS PESQUISADAS NOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS.



ANEXO 3 – Protocolo Experimental usando camundongos, via de administração, sangria, histologia. (Figura elaborada por Valéria Garrido- UFF).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)