



---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Atividade antiviral de extratos de plantas do  
Cerrado contra herpesvírus

MARINA AIELLO PADILLA

Campinas, 2011



---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Atividade antiviral de extratos de plantas do  
Cerrado contra herpesvírus

Marina Aiello Padilla

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, área de concentração em Clínica Médica, para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, sob orientação da Profa. Dra. Clarice Weis Arns.

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

P134a Padilla, Marina Aiello, 1986-  
Atividade antiviral de extratos de plantas do Cerrado  
contra herpesvírus. / Marina Aiello Padilla. -- Campinas,  
SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Clarice Weis Arns  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Antivirais. 2. Savana. 3. Herpesviridae. 4.  
Alphaherpesvirinae. 5. Produtos Biológicos. I. Arns,  
Clarice Weis. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Antiviral activity of Brazilian Cerrado plants extracts against Herpesvirus

**Palavras-chave em inglês:**

Antiviral agents

Savannah

Herpesviridae

Alphaherpesvirinae

Biological Products

**Área de concentração:** Ciências Básicas

**Titulação:** Mestre em Clínica Médica

**Banca examinadora:**

Clarice Weis Arns [Orientador]

Eduardo Furtado Flores

Viviane Botosso

**Data da defesa:** 08-07-2011

**Programa de Pós-Graduação:** Faculdade de Ciências Médicas

---

## Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

---

Marina Aiello Padilla

---

---

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarice Weis Arns

---

---

### Membros:

---

1. Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Clarice Weis Arns



2. Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Viviane Fongaro Botosso



3. Prof. Dr. Eduardo Furtado Flores



Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 08/07/2011

---

***DEDICATÓRIA***

*À todos os amores da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

---

À Deus, por toda força que me deu nessa jornada e por ter colocado em minha vida pessoas tão especiais.

À minha família linda! Meus pais: Telma e Miguel, meus irmãos: Tiago, Fábio e Rubens, minha avó Terezinha, minhas cunhadas e meus bichinhos. AMO MUITO !!!

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarice, pela oportunidade que me deu, pela força, pela confiança, incentivo, ensinamentos, etc. Muito Obrigada!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabela Simoni, por todo apoio, amizade, conversas e oportunidades que deu.

Aos meus amigos-irmãos Flora, Juliana, João Pedro, Buchalla, Rodrigo, Priscila e aos japas pela amizade, paciência e cumplicidade.

Aos meus amigos do LVA (Lab. De Virologia Animal): Alyne, Bianca, Bruno, Daniel, Geneci, Juliana, Luciana H., Luciana K., Maria Angela, Matheus, Paula, Paulo Anselmo e Sônia. Além da amizade, agradeço pelas ajudas, conversas, pela paciência e pelos momentos de descontração que são sempre muito divertidos.

Aos amigos do Lab. de Bioquímica: Fernanda e Eduardo, além da força e amizade, pelos almoços e boas risadas no bandeirão.

Aos meus anjinhos que olham e cuidam de mim: avô Cadorna, avô Miguel, avó Catharina e Kid.

À secretária Adriana do Curso de pós-graduação em Clínica Médica, por toda a ajuda e competência quando me surgiram dúvidas.

À coordenação do Curso de pós-graduação – Clínica Médica.

À CAPES e FUNCAMP pelo suporte financeiro.

À UNICAMP pela formação científica.

À todos que de alguma forma me ajudaram a ser o que sou hoje: Muito

Obrigada!!!

*“Antes que a luz se apague  
Antes que o Sol se ponha  
Haverá alguém de estar  
Haverá alguém de ficar,  
para que outros venham,  
para que outros fiquem.”*

(Rosenger)



	PÁG.
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xvi
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 – <i>Herpesviridae</i> .....</b>	<b>20</b>
<b>1.2 – <i>Alphaherpesvirinae</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>1.3 – Herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1).....</b>	<b>23</b>
<b>1.4 – Herpesvírus equino tipo 1(EHV-1).....</b>	<b>26</b>
<b>1.5 – Vírus do herpes simplex tipo 1 (HSV-1).....</b>	<b>28</b>
<b>1.6 – Produtos naturais e antivirais.....</b>	<b>31</b>
<b>1.7 – O Cerrado.....</b>	<b>36</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>49</b>
<b>2.1. Objetivos gerais.....</b>	<b>40</b>
<b>2.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>40</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1. – Amostras virais e linhagens celulares.....</b>	<b>42</b>
<b>3.2. – Material Vegetal.....</b>	<b>42</b>
<b>3.3. - Teste de Citotoxicidade.....</b>	<b>43</b>
<b>3.4. – Teste Antiviral.....</b>	<b>44</b>
<b>3.5. – Ensaio Colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT).....</b>	<b>45</b>
<b>3.6. – Cálculo do SI (índice de seletividade).....</b>	<b>46</b>

3.7. – Teste Virucida.....	46
4. RESULTADOS.....	48
5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÕES.....	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---

µg/mL	Microgramas por mililitro
mm	Milímetro
w/v	Peso/volume
g	Gramas
min	Minuto
S	South
W	West
Kb	Quilobases
mg/mL	Miligramas por mililitro
nm	Nanômetro
A	Adenina
BoHV-1	Herpesvírus bovino tipo 1
CC <sub>50</sub>	Concentração do extrato que reduz em 50% o crescimento celular
CMNT	Concentração máxima não tóxica
CPE	Efeito citopático
DA	Doença de Aujeszky
DI	Doses infectantes
DMSO	Dimetilsulfóxido de sódio
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EHV-1	Herpesvírus equino tipo 1
G	Guanina
gE	Glicoproteína E
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HSK	Ceratite herpética estromal

HSV-1	Vírus do herpes simplex tipo 1
HSV-2	Vírus do herpes simplex tipo 2
IBDV	Vírus da doença infecciosa da bursa
IC <sub>50</sub>	Concentração que inibe em 50% o crescimento celular
IIV	Índice de inibição viral
IN-19	Instrução normativa número 19
MAO	Monoamino oxidase
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MDBK	Madin - Darby bovine kidney
MEM	Meio essencial mínimo
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-z-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide]
OIE	Organização Internacional de Saúde Animal
PAP	Proteína antiviral pokeweed
PI%	Porcentagem de inibição
PRV	Pseudorraiva
SDS	Sódio dodecil sulfato
SFB	Soro fetal bovino
SI	Índice de seletividade
SNC	Sistema nervoso central
SuHV-1	Herpesvírus suíno tipo 1
TCID <sub>50</sub>	Doses infectantes para 50% dos cultivos celulares

## **RESUMO**

---

Os herpesvírus são responsáveis por enfermidades importantes em humanos e animais. Em animais, estão associados a doenças que causam grandes perdas econômicas. Em humanos, a gravidade da enfermidade é maior quando os pacientes são imunossuprimidos. Além disso, já existem cepas mutantes resistentes aos medicamentos disponíveis. Visto as dificuldades associadas a prevenção e tratamento das infecções por herpesvírus, a utilização de produtos de plantas como antivirais apresenta-se como alternativa. O Cerrado Brasileiro é um bioma que localiza-se praticamente todo no Brasil e apresenta mais de 10.000 espécies de plantas. Essas plantas podem potencialmente servir de fonte de compostos farmacologicamente ativos. Assim, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a atividade antiviral, atividade virucida e o índice de seletividade (SI) de extratos de plantas do Cerrado contra os herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1), equino tipo 1 (EHV-1) e vírus do herpes simplex tipo 1 (HSV-1). Inicialmente, os extratos liofilizados foram submetidos aos testes de citotoxicidade em células MDBK e Vero para determinar a concentração máxima não tóxica (CMNT). Dos extratos, quatro apresentaram as mesmas CMNT's em ambas as linhagens mas, em geral, os extratos foram mais citotóxicos para células Vero. A seguir, com base na CMNT, foram realizados os testes de atividade antiviral para os vírus HSV-1 e EHV-1 em células Vero, e SuHV-1 em MDBK. Os resultados demonstraram que 50% dos extratos apresentaram atividade contra pelo menos um dos herpesvírus estudados, com destaque para as espécies *Banisteriopsis variabilis*, *Byrsonima intermedia* e *Xylopia aromatica* que foram ativas contra os três

herpesvírus, e o extrato da *Stryphnodendron adstringens*, ativo contra o HSV-1 e SuHV-1. Os extratos que apresentaram atividade antiviral foram então testados quanto a atividade virucida e os resultados submetidos ao cálculo do SI. O extrato foi considerado ativo quando o índice de inibição viral (IIV) foi maior ou igual a 1,5 ou apresentou PI% (porcentagem de inibição) maior ou igual a 97%. Quanto ao SI, foram considerados ativos os extratos que apresentaram valores iguais ou superiores a 4. A atividade virucida foi observada em 75% dos extratos contra pelo menos um dos herpesvírus testados. As espécies que apresentaram os resultados mais promissores foram: *B. variabilis*, *X. aromatica*, *S. adstringens* e *B. intermedia*. Esta última foi então utilizada em testes adicionais com a variação da concentração, e demonstrou atividade antiviral e virucida em concentrações inferiores a CMNT contra os herpesvírus testados. Assim, o presente trabalho demonstra o potencial de plantas do Cerrado como fonte de compostos com atividade antiviral e virucida. Estudos adicionais são necessários para avaliar os mecanismos de ação e os compostos químicos responsáveis pela atividade observada.



## **ABSTRACT**

---

Herpesviruses are responsible for important diseases in humans and animals. In animals, they are associated with economically important diseases worldwide. In humans, they represent serious threats to public health, and the severity of the illness increases in immunocompromised patients. In addition, there are mutant strains that are resistant to available drugs. Because of the difficulties associated with the prevention and treatment of herpesvirus infections, the use of plant products as antivirals can be an alternative. The Brazilian Cerrado is a biome located almost entirely in Brazil has over 10,000 species of plants. These plants can potentially be used as a source of pharmacologically active compounds. Therefore, this study aimed to evaluate the antiviral activity, virucidal activity and the selectivity index (SI) of extracts from Cerrado plants against suid herpesvirus type 1 (SuHV-1) equid type 1 (EHV-1) and herpes simplex virus type 1 (HSV-1). Initially, the lyophilized extracts were tested for cytotoxicity in MDBK and Vero cells to identify the maximum nontoxic concentration (MNTC). Of the extracts, four showed the same MNTC for both cells, but the extracts were generally more toxic to Vero cells. Then, based on the MNTC, antiviral activity tests were performed against HSV-1 and EHV-1 in Vero cells and SuHV-1 in MDBK cells. The results demonstrated that 50% of the extracts showed activity against at least one of the herpesviruses studied. In particular, the extracts from *Banisteriopsis variabilis*, *Byrsonima intermedia* and *Xylopia aromatica*, were active against all of the herpesviruses, and the extract from *Stryphnodendron adstringens* was active against HSV-1 and SuHV-1. The extracts that

showed antiviral activity were also tested for virucidal activity, and the SI was calculated. An extract was considered active when the viral inhibition index (VII) was greater than or equal to 1.5 or showed a PI% (percent inhibition) greater than or equal to 97%. As for the SI, extracts were considered active when the displayed values greater than or equal to four. Virucidal activity was observed in 75% of the extracts against at least one of the herpesviruses tested. The species that showed the most promising results were: *B. variabilis*, *X. aromatica*, *S. adstringens* and *B. intermedia*. Was used for additional testing with varying concentrations, and demonstrated antiviral and virucidal activities at concentrations lower than the MNTC against the herpesviruses tested. Therefore, this study demonstrates the potential of Cerrado as a source of compounds with antiviral and virucidal activities. Additional studies are necessary to evaluate the mechanisms of action and the chemical compounds responsible for the observed activity.

## **1. INTRODUÇÃO**

---

## 1.1 – *Herpesviridae*

A família *Herpesviridae*, da ordem *Herpesvirales*, é uma grande família de vírus de DNA de cadeia dupla linear (Dzabic *et al.*, 2010; Tischer e Osterrieder, 2010), com extensão que varia entre 130-230 kb e codifica mais de 70 produtos (Field *et al.*, 2006). Os vírions dessa família caracterizam-se pela presença de uma nucleoproteína (core), um capsídeo icosaédrico, uma estrutura tegumentar protéica amorfa (tegumento) e um envelope lipoprotéico contendo espículas de glicoproteínas na superfície (Fauquet *et al.*, 2005; Field *et al.*, 2006).

Os herpesvírus são responsáveis por infecções em quase todas as espécies animais como hospedeiros naturais. A família *Herpesviridae* tem como característica marcante a capacidade de estabelecer dois tipos de infecção: a latente e lítica. Na infecção latente, não ocorre expressão gênica significativa do genoma viral devido a interrupção do ciclo replicativo (Paulus *et al.*, 2009). Além disso, durante essa fase não ocorrem sinais clínicos no hospedeiro. A capacidade dos herpesvírus de causar latência duradoura nos hospedeiros, sem causar a doença grave ou mortalidade, possibilita a transmissão viral entre hospedeiros de forma eficaz (Flores *et al.*, 2007). Já a infecção lítica (produtiva) caracteriza-se pela expressão de todos os genes virais, replicação viral, produção de progênie e, conseqüentemente, morte celular (Paulus *et al.*, 2009). Dessa forma, uma vez infectado o hospedeiro torna-se portador do vírus por toda a vida na

forma latente com reativações causadas por situação de estresse que permitem a disseminação, contaminando outros indivíduos (Miranda *et al.*, 2002; Szpara *et al.*, 2010)

Membros dessa família apresentam algumas características comuns entre eles. Além da capacidade de estabelecer latência, codificam muitas enzimas relacionadas à replicação viral, e por fim, a síntese do DNA do vírus e a montagem do capsídeo ocorrem necessariamente no núcleo das células infectadas (Gershburg *et al.*, 2008).

Os herpesvírus afetam tanto a saúde animal como a saúde humana (Cos *et al.*, 2006; Deruelle e Favoreel, 2011). Os herpesvírus em animais ainda levam a doenças e mortalidade causando prejuízos econômicos à pecuária (Siakallis *et al.*, 2009). Mesmo em plantéis vacinados, o seu impacto é particularmente acentuado em países em desenvolvimento (Cos *et al.*, 2006). Já os herpesvírus em humanos interferem na qualidade de vida dos infectados, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Schnitzler *et al.*, 2008) e recém-nascidos, podendo por vezes levar à morte (Brandão *et al.*, 2010). Além disso, um problema grave dos herpesvírus em humanos é o desenvolvimento de resistência viral à drogas disponíveis comercialmente (Ruffa *et al.*, 2004; Okeke *et al.*, 2005).

A família *Herpesviridae* é subdividida em três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* que diferem entre si nas propriedades biológicas, na organização e conteúdo do genoma, quanto ao tipo celular no qual estabelecem latência e na duração do ciclo

replicativo (Fauquet *et al.* 2005; Pomeranz *et al.*, 2005; Field *et al.*, 2006; Pellett e Roizman, 2007; Tischer e Osterrieder, 2010).

Os herpesvírus estudados no presente trabalho pertencem a subfamília *Alphaherpesvirinae*.

## **1.2 – *Alphaherpesvirinae***

Membros da subfamília *Alphaherpesvirinae* apresentam características específicas, como a latência nos gânglios sensoriais e autonômicos, o ciclo replicativo curto e aparecimento do efeito citopático em questão de horas e a ampla gama de hospedeiros (Fauquet *et al.*, 2005; Pomeranz *et al.*, 2005).

Os alfa herpesvírus são divididos em três gêneros: *Simplexvirus*, *Mardivirus* e *Varicellovirus*. O primeiro é responsável por infecções em mamíferos como, por exemplo, o HSV-1 (vírus do herpes simplex tipo 1). Os *Mardivirus* afetam aves e, por fim, os *Varicellovirus* estão associados principalmente a infecções de importância veterinária (Flores *et al.*, 2007; Deruelle e Favoreel, 2011).

Assim como as demais subfamílias da *Herpesviridae*, os vírus da *Alphaherpesvirinae* apresentam: a infecção lítica e a infecção latente (Deruelle e Favoreel, 2011). A primeira ocorre preferencialmente no local de penetração do vírus no hospedeiro, enquanto que a segunda acontece principalmente em neurônios (Flores *et al.*, 2007; Szpara *et al.*, 2010). Após

a infecção primária, o vírus é transportado pela inervação de células neuronais e invade o sistema nervoso central (SNC), estabelecendo o estado de latência (Barreca e O'Hare, 2004; da Silva *et al.*, 2005).

O presente trabalho foi realizado com as espécies do vírus do herpes simplex tipo 1 (HSV-1), do gênero *Simplexvirus*, o herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1) e equino tipo 1 (EHV-1), ambos do gênero *Varicellovirus* (Fauquet *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2007; Pellett e Roizman, 2007).

Nos herpesvírus de modo geral, a imunidade protetora requer resposta humoral e celular (Yancey, 1993). As diversas medidas sanitárias adotadas para os animais envolvem o controle da doença pelo uso de vacinas (Thiry *et al.*, 2005). As inativadas são consideradas seguras embora induzam principalmente imunidade humoral, já as vacinas vivas modificadas, estão associadas a abortos, lesões ovarianas e infertilidade (Yancey, 1993). Em humanos, o problema no tratamento dos herpesvírus está associado ao desenvolvimento de resistência viral a drogas sintéticas disponíveis, além de sua toxicidade (Gilbert *et al.*, 2002; Peng, 2010).

### **1.3 – Herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1)**

A doença de Aujeszky (DA) ou Pseudorraiva (PRV) é um importante obstáculo à exploração e responsável por grandes perdas econômicas na suinocultura em todo o mundo, isso devido ao alto índice de



letalidade em leitões, queda da produtividade e redução do desenvolvimento dos animais em crescimento (Groff *et al.*, 2005; Fonseca Jr. *et al.*, 2010).

O Brasil possui aproximadamente 35 milhões de suínos (Santana e Oliveira, 2005). As granjas registradas com diagnóstico da infecção perdem a certificação para a venda de reprodutores e de material genético, como sêmen e embriões, baseados na Instrução Normativa Número 19 (IN-19) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Além disso, a PRV está listada como notificação compulsória no Código Zoosanitário da OIE (Organização Internacional de Saúde Animal) (Ciacci-Zanella *et al.*, 2008).

O agente etiológico da doença de Aujeszky (DA) é o herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1) (Groff *et al.*, 2005), que possui apenas um sorotipo mas apresenta quatro diferentes genótipos. No Brasil são encontrados os genótipos I e II, que estão distribuídos mundialmente. Os genótipos III e IV são restritos à Dinamarca e Tailândia. A etiologia da doença foi determinada no início do século XX e a primeira notificação no Brasil foi em 1932 (da Silva *et al.*, 2005; Fonseca Jr. *et al.*, 2010).

O SuHV-1, assim como demais vírus da família *Herpesviridae*, possui genoma de DNA fita dupla. O genoma apresenta aproximadamente 150 kb (Nauwynck *et al.*, 2007) que codifica 70 proteínas. São frequentemente utilizados como modelo para o estudo da biologia dos herpesvírus em geral (Pomeranz *et al.*, 2005; Sui *et al.*, 2010).

Os hospedeiros primários do SuHV-1 são os suínos domésticos e silvestres, embora o vírus possa infectar outras espécies de mamíferos domésticos, como gatos, cães e bovinos. Nestes animais, o SuHV-1 pode causar em infecções fatais, já que são hospedeiros acidentais (Flores *et al.*, 2007; Fonseca Jr. *et al.*, 2010). Os sinais clínicos da infecção nos hospedeiros naturais variam de acordo com fatores epidemiológicos, como endemicidade e suscetibilidade dos indivíduos. A ocorrência do SuHV-1 em áreas endêmicas está associada a manifestações reprodutivas. A introdução do vírus em rebanhos livres resulta em sinais clínicos característicos, que variam de acordo com a faixa etária, assim como a mortalidade. Em animais jovens, há sinais de comprometimento neurológico e respiratório, com taxas de mortalidade aproximando-se dos 100%. Animais adultos apresentam febre, taxas variáveis de aborto, reabsorção fetal, dificuldade respiratória e eventualmente vômitos. A mortalidade nessa faixa etária é geralmente baixa (Groff *et al.*, 2005). Entretanto os animais considerados portadores podem excretar o vírus periodicamente e são importantes na manutenção da doença na forma endêmica (da Silva *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2007).

Alguns surtos já foram descritos no Brasil, nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gerais e São Paulo (de Souza *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2005). Uma das maneiras de controlar a DA é a identificação dos animais portadores do vírus, através da realização de inquéritos sorológicos. Nos casos de soropositividade, são adotadas medidas para eliminar os animais (da Silva *et al.*, 2005). A vacina mais

utilizada é a que contém vírus atenuados deletados para a glicoproteína gE (do envelope). Entretanto, a reativação dos vírus latentes pode provocar novas transmissões nos plantéis e, além disso, javalis e suínos selvagens ainda representam uma forma de reservatório da PRV (Nauwynck *et al.*, 2007).

#### **1.4 – Herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1)**

O aborto herpético equino é responsável por grandes impactos econômicos (Moreira *et al.*, 1998), principalmente quando ocorrem abortos epizooticos (Diel *et al.*, 2006; Pena *et al.*, 2006). No Brasil, a soroprevalência da infecção pode chegar a 84,7% no Rio Grande do Sul (Cunha *et al.*, 2002; Diel *et al.*, 2006) e 57,3% em São Paulo (Moreira *et al.*, 1998).

O Brasil possui o terceiro maior rebanho de equinos do mundo (Diel *et al.*, 2006), assim, a prevenção e o controle de infecções em equinos é de necessidade comercial e social. A equideocultura é um importante segmento do agronegócio brasileiro, visto que os equinos são animais domésticos e de companhia (Diel *et al.*, 2006), sendo amplamente utilizados em diversos setores ligados ao lazer, cultura, esporte e ecoturismo (Field *et al.*, 2006).

O agente etiológico do aborto herpético equino é o herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) que possui DNA fita dupla (150Kb) contendo 76

genes (Marconi *et al.*, 2010). A infecção pelo EHV-1 é muito comum no Japão, Austrália, Estados Unidos e Europa. No Brasil, a ocorrência foi descrita pela primeira vez em 1964 (Cunha *et al.*, 2002).

As infecções pelo EHV-1 estão associadas a abortos, mortalidade perinatal, doença respiratória e doença neurológica (Allen, 2002; Pena *et al.*, 2006). O aborto e a doença neonatal podem ocorrer em qualquer fase da gestação, mas na maioria das vezes, de 20 a 40%, ocorrem no final (Cunha *et al.*, 2002). Os fetos podem se infectar no útero, levando a morte ainda na gestação, ou, nascem muito fracos e morrem depois (Reed e Toribio, 2004). Em potros recém-nascidos, infectados durante o primeiro ano de vida, manifesta-se a doença febril e aguda que também pode levar à morte, mas devido à infecções secundárias (Cunha *et al.*, 2002). As infecções clínicas ou subclínicas do trato respiratório não apresentam sinais característicos e são similares aos sinais clínicos causados pela influenza, como febre aguda, secreção nasal e tosse (Pena *et al.*, 2006). Por fim, a infecção pelo EHV-1 pode acarretar ainda em doença neurológica em equinos com qualquer idade, e é precedida por febre e doença respiratória superior durante duas semanas antes do início dos sinais neurológicos (Cunha *et al.*, 2002; Reed e Toribio, 2004) que variam desde uma leve ataxia até o decúbito completo com paralisia dos membros (Patel e Heldens, 2005).

Algumas cepas do EHV-1 variam na sua patogenicidade, principalmente com relação à capacidade de causar abortos ou sinais clínicos neurológicos (Pusterla *et al.*, 2009). Atualmente foram descritas

diferenças moleculares em cepas neuropatogênicas e não-neuropatogênicas em uma região do genoma que esta diretamente relacionada com a habilidade de causar doença neurológica nos animais infectados. (Fritsche e Borchers, 2010).

Estão disponíveis comercialmente vacinas vivas modificadas e inativadas, entretanto a eficácia delas contra os problemas causados pelo EHV-1 é discutível (Garré *et al.*, 2007; Lunn *et al.*, 2009). A indução de imunidade protetora contra o EHV-1 ainda é um grande desafio, pois as vacinas disponíveis nem sempre protegem totalmente e, mesmo entre animais vacinados, pode haver a disseminação sistêmica dos vírus (Patel e Heldens, 2005). As medidas adotadas visam a prevenção e redução da probabilidade de surtos, pelo isolamento dos animais que podem ou estão infectados, de fêmeas prenhas e reduzir possíveis estresses responsáveis pela reativação do vírus (Moreira *et al.*, 1998; Lunn *et al.*, 2009).

### **1.5 – Vírus do herpes simplex tipo 1 (HSV-1)**

As lesões causadas pelo HSV-1 foram descritas pela primeira vez por Hipócrates (460/377 a.C.), e em 1968 foram classificados dois tipos de herpes do gênero *Simplexvirus* devido a diferenças antigênicas e biológicas: herpes simplex tipo 1 e tipo 2 (Lazarini *et al.*, 2006). O primeiro é responsável por doenças principalmente na mucosa oral e estabelece latência nos gânglios do nervo trigêmio, enquanto que o HSV-2 é o

principal causador do herpes genital e estabelece infecção latente nos gânglios sacrais. Entretanto, o HSV-1 também pode ser responsável por infecções genitais, assim como o HSV-2 pode ser encontrado em infecções orofaciais (Khan *et al.*, 2005; Azwa e Barton, 2009).

O herpes labial é uma infecção muito comum no mundo todo, com 45% a 98% da população mundial sendo soropositiva (Xiang *et al.*, 2008). A taxa de soroprevalência chega a 39% na infância e aumenta na idade adulta (Conrady *et al.*, 2010). Além disso, a prevalência do HSV-1 varia com a idade, raça, localização geográfica e status socioeconômico (Miranda *et al.*, 2002). No Brasil, a prevalência de anticorpos para HSV-1 chega a 67,2% (Clemens e Farhat, 2010).

O agente etiológico do herpes labial é o HSV-1. Os vírions apresentam DNA fita dupla, com tamanho de 152 kb e possui 71 genes (Conrady *et al.*, 2010; Placek e Berger, 2010). Deles, 36 codificam pelo menos 84 polipeptídeos diferentes responsáveis por proteínas que contribuem para a replicação do vírus (Xiang *et al.*, 2008; Conrady *et al.*, 2010). Os 35 genes restantes codificam proteínas que não são essenciais para a replicação do vírus em cultivo celular (Flores *et al.*, 2007).

O HSV-1 está associado principalmente a recorrentes infecções na face, boca e lábios (Reggiori *et al.*, 2008), mas com menor frequência, pode também causar infecções genitais (Azwa e Barton, 2009). A maioria dos problemas causados pelo HSV-1 são autolimitadas, com presença de feridas e vesículas na região orofacial (Alché *et al.*, 2002). Entretanto, podem ser

um grande problema em pacientes imunocomprometidos, incluindo recém-nascidos (Harden *et al.*, 2009), pacientes HIV positivos ou que são submetidos a tratamento imunossupressor, podendo causar graves doenças sistêmicas e risco de vida (Akhtar e Shukla, 2009). Além disso, o HSV-1 também está associado a diversas doenças oculares como a ceratite herpética estromal (HSK) que pode causar cegueira (Brandão *et al.*, 2010). Os casos de herpes genital causado pela infecção por HSV-1 são menos severos e tem menor frequência de recorrências sintomáticas quando comparado ao HSV-2 (principal causador do herpes genital) (Azwa e Barton, 2009). O herpes humano estabelece infecção latente em neurônios sensoriais e causam lesões recorrentes perto ou no local da infecção primária (Bloom *et al.*, 2010).

A transmissão do HSV-1 ocorre por contato direto da mucosa ou pele com algum tipo de abrasão com secreções que apresentam partículas virais. Após a entrada do vírus, ele é transportado ao longo dos neurônios sensoriais até o gânglio trigêmeo, onde estabelece infecções latentes por toda vida do hospedeiro (Brady e Bernstein, 2004), podendo ser reativado por estresse, físico ou emocional (Akhtar e Shukla, 2009).

O uso de análogos de nucleosídeos como o Aciclovir, podem aliviar os sintomas e reduzir a duração da excreção viral, mas não previne as recorrências (Ruffa *et al.*, 2004). Contudo, a utilização desses antivirais sintéticos levou ao surgimento de cepas mutantes resistentes aos fármacos (Gebre-Marian *et al.*, 2006) e mesmo com a dose habitual recomendada para

o uso parenteral ou tópico, foram relatados efeitos colaterais, tais como neurotoxicidade e disfunção renal (Mancini *et al.*, 2009). Além disso, ainda existem estudos sobre a utilização de laser, mas este também não elimina o vírus, apenas minimiza o desconforto do infectado e seus efeitos temporariamente (Reggiori *et al.*, 2008).

## **1.6 – Produtos Naturais e Antivirais**

As plantas medicinais são recursos naturais que correspondem as mais antigas armas empregadas no tratamento de enfermidades humanas e de animais, pois funcionam como fonte de novas substâncias ativas utilizadas frequentemente no tratamento de várias doenças, entre elas as causadas por vírus (Oliveira *et al.*, 2005; Michelin *et al.*, 2008).

A pesquisa de substâncias derivadas de plantas está baseada no potencial dos metabólitos secundários como fonte de produtos naturais (Michelin *et al.*, 2008), principalmente nas florestas brasileiras que possuem grande biodiversidade sendo que poucas espécies de plantas já foram estudadas deixando uma vasta fonte de produtos naturais potencialmente úteis e grande número de espécies vegetais que são química e farmacologicamente desconhecidas (Simoni, 2003).

As plantas produzem a maioria dos compostos essenciais à sua sobrevivência e desenvolvimento pelo metabolismo primário (Lourenço, 2003). Além desses, produzem uma grande variedade de metabólitos



secundários, porém em pouca quantidade, os quais são os principais responsáveis pelas atividades farmacológicas (Cos *et al.*, 2006). Esses compostos biologicamente ativos apresentam uma ampla diversidade química de estruturas e tamanhos, sendo distribuídos e encontrados por todo o reino vegetal (Acamovic e Brooker, 2005). A maioria deles, tais como alcalóides, terpenóides, antocianinas, esteróides, flavonóides, quinonas, saponinas e ligninas (Chiang *et al.*, 2002) possuem aplicações comerciais como fármacos, corantes, aroma, entre outros (Lourenço, 2003).

O uso de produtos naturais como matéria prima para a síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos, tem sido amplamente relatado há séculos. A própria evolução dos conceitos de planta medicinal e medicamento fitoterápico traduz esse desenvolvimento, que levou a uma abordagem interdisciplinar no estudo de vegetais como fornecedores de matérias primas de interesse terapêutico (Simões *et al.* 2010).

Até meados do século XX, os medicamentos de origem vegetal eram a base da terapia medicamentosa e o desenvolvimento da síntese química introduziu novas drogas na terapêutica. A investigação de plantas medicinais utilizadas na etnofarmacologia resultou em avanços terapêuticos e atualmente cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética (Clark, 1996), 25% deles são provenientes de plantas, isolados diretamente ou produzidos por semi-síntese, a partir de um precursor vegetal (Araújo *et al.*, 2009) e os 25% restantes são provenientes de outras fontes de produtos naturais (Sousa *et al.*, 2008 ).

A quimioterapia antiviral deve ter um caminho mais racional utilizando substâncias naturais provenientes de plantas com valor medicinal e que já são empregadas para tratamento de infecções na farmacopéia popular (Simoni, 2003; Agra *et al.*, 2008).

A descoberta de compostos antivirais pode ser comparada a revolução ocorrida na época do desenvolvimento dos antibióticos e anuncia uma nova era na medicina atual (Simoni, 2003).

Ainda que centenas de plantas que tenham potencial como agentes antivirais estejam sendo estudadas, existem inúmeras plantas medicinais potencialmente úteis esperando para serem avaliadas e exploradas na aplicação terapêutica contra diversas famílias virais (Esimoni *et al.*, 2005; Brandão *et al.*, 2008).

O aumento do conhecimento a respeito dos eventos moleculares e bioquímicos da replicação viral em muito contribuiu para o surgimento de novos compostos antivirais (Cos *et al.*, 2006, Hazuda *et al.*, 2009). Alguns destes exemplos se encontram em pesquisas que conduziram à descoberta de vários compostos ativos, como por exemplo, aqueles que inibem enzimas-chave envolvidas na replicação do DNA dos vírus herpéticos e aqueles que inibem proteinases do vírus HIV (Roberts *et al.*, 1990; Greco *et al.*, 2007; Billaud *et al.*, 2009).

O antiviral ideal deve interromper seletivamente alguma etapa específica e essencial do ciclo de replicação, sem afetar de forma significativa o metabolismo da célula hospedeira (Butera, 2000). Dessa forma,

os compostos farmacologicamente ativos devem complementar a imunidade celular e a resposta humoral (Simoni, 2003).

Produtos fitoquímicos ativos que apresentam potencial atividade antiviral contra herpesvírus têm sido descritos em grande número na literatura como os alcalóides, proteínas, saponinas, flavonóides, entre muitos outros (Khan *et al.*, 2005; Naithani *et al.*, 2010). Por exemplo, foi descrito significativo efeito inibidor *in vitro* na replicação do HSV-1 de flavonóides isolados de folhas e caule de *V.album* ssp. *album* (Loranthaceae) (Orhan *et al.*, 2010), bem como a quercetina, encontrada em muitas plantas como a *Hypericum cordatum*, é também um composto flavonóide que apresenta atividade antiviral (Dourado e Ladeira, 2008).

Além disso, pode-se citar outros exemplos, como óleos essenciais isolados da planta *Santolina insularis* capazes de inibir a dispersão do HSV célula-célula (De Logu *et al.*, 2000), compostos isolados de ervas como a *Psychotia serpens* e *Limonium sinense* capazes de inibir o HSV em várias etapas de sua replicação (Kuo *et al.*, 2001; Kuo *et al.*, 2002), extratos isolados de plantas da Tailândia que apresentaram efeito seletivo sobre o HSV-1 (Lipipun *et al.*, 2003) e substâncias isoladas da erva chinesa *Polygonatum cytonema*, as quais apresentaram atividade anti-HSV-2 em cultura celular (Liu *et al.*, 2004).

Outros experimentos descrevem a proteína denominada PAP (pokeweed antiviral protein) proveniente do fracionamento dos extratos de *Phytolacca americana*. Essa proteína não apresenta reações adversas e

apresentou ação antiviral contra HIV-1. Além disso, os autores relataram que o tratamento de sêmen de coelhos com a proteína PAP foi eficaz contra o HIV-1, sem causar diminuição da motilidade dos espermatozóides e sem ser tóxico ao trato genital masculino e feminino. O mesmo foi observado em experimentos com sêmen humano, proporcionando grande otimismo para utilização da PAP em reprodução assistida de homens portadores do vírus HIV-1. Tais experimentos demonstraram a importância da utilização de antivirais não só para o tratamento de infecções virais já instaladas, mas também para evitar a transmissão do vírus, até mesmo em inseminação artificial tanto humana como em animais (D’Cruz *et al.*, 2001 a,b).

No estudo de antivirais o ensaio mais empregado é o de triagem, no qual é avaliada a atividade de extratos de plantas (Wu *et al.*, 2011) e, por fim, são selecionados os extratos que apresentam resultados promissores (Cos *et al.*, 2006). Além disso, a triagem permite a realização de ensaios com um grande número de extratos a serem analisados (Khan *et al.*, 2005, Simoni *et al.*, 2007; Brandão *et al.*, 2010).

Os testes antivirais devem, especialmente os de triagem, empregar uma metodologia que apresente relativa simplicidade, mas com procedimento confiável, e gerar informações úteis sobre um extrato escolhido, a fim de realizar estudos mais elaborados (Simoni *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2005; Cos *et al.*, 2006).

Esses ensaios foram realizados *in vitro*, isso porque geralmente são testes mais rápidos e menos onerosos (Cos *et al.*, 2006; Brandão *et*

*al.*,2010). Além disso, os testes *in vitro* possibilitam realizar experimentos controles, utilizando as mesmas células de modo a eliminar as variações experimentais (Rogerio *et al.*, 2003). Outra vantagem dos estudos *in vitro* é analisar com mais facilidade efeitos muito importantes quando se pretende estudar mais profundamente os mecanismos de ação de extratos ou de princípios ativos de origem vegetal (Cechinel Filho e Yunes, 1998; Simoni, 2003).

Visto as dificuldades relacionadas as infecções causadas pelos herpesvírus de maneira geral, o estudo de diferentes espécies de plantas que apresentam atividade antiviral é de suma importância, além de ser um caminho promissor (Balbino *et al.*, 2010; Simões *et al.*, 2010).

## **1.7 - Cerrado**

O Brasil é considerado como um dos países de maior biodiversidade do mundo com cerca de 10% de toda a biota terrestre (Mittermeier *et al.*, 1997). Além do tamanho, o isolamento geográfico e a grande variação de ecossistemas podem ser as razões que explicam tal diversidade, e um exemplo dessa riqueza é o cerrado (Chattopadhyay *et al.*, 2009).

O cerrado tem despertado, nos últimos anos, grande interesse nas pesquisas científicas (Simoni *et al.*,2007). Isso se deve ao fato da vegetação de cerrado ser uma das maiores floras vegetais do mundo e cobrir 2 milhões

de km<sup>2</sup> (Durigan *et al.*, 2004; Junior *et al.*, 2009), cerca de 23% da superfície do Brasil (Melo e Silva *et al.*, 2009) , além disso, o cerrado é um tipo de vegetação confinado ao Brasil, com apenas algumas extensões que alcançam a Bolívia e o Paraguai (Neto e Moraes, 2003). O cerrado trata-se de uma vegetação savânica muito antiga e altamente diversificada, com um número estimado de 10.000 espécies de plantas superiores (Junior *et al.*, 2009).

A Savana brasileira, como também é conhecido, é o segundo maior e mais importante bioma do Brasil (Alves *et al.*, 2000; de Mesquita *et al.*, 2005). Fica localizado basicamente no planalto central e as espécies vegetais dessa região são pouco conhecidas, entretanto, sabe-se que o Cerrado possui uma grande diversidade taxonômica, ou seja, possui uma ampla diversidade química a ser explorada (Neto e Moraes, 2003). Além disso, as plantas nativas do Cerrado são muito utilizadas pela população local para o tratamento de diversas doenças infecciosas (Alves *et al.*, 2000).

O clima do cerrado é sazonal com experiências de uma estação seca pronunciada. Além disso, os solos são ácidos, pobres em nutrientes e apresentam altos níveis de saturação de alumínio. O cerrado também sofre frequentes incêndios que consomem principalmente a camada de solo gramado (Silberbauer, 2006). Tais estresses estimulam a produção dos metabólitos secundários, já que esses são produzidos e utilizados pela planta como forma de adequação da espécie vegetal ao seu meio. (Simões *et al.*, 2010).

Identificar espécies medicinais nativas desse bioma brasileiro se tornou, nos últimos anos, uma importante tarefa da pesquisa científica (Durigan *et al.*, 2004). Resultados promissores foram descritos para o tratamento de diversos problemas de saúde pública. Das espécies que foram testadas, foi encontrada atividade antiplasmódio (de Mesquita *et al.*, 2007), antiviral (Simoni *et al.*, 2007; Brandão *et al.*, 2010), anti-ulcerogênica, antibacteriana, antifúngica (Junior *et al.*, 2009), antioxidante, leishmanicida (Paula-Junior *et al.*, 2006), entre outras, todas de extratos provenientes de plantas típicas do Cerrado (Flausino-Jr. *et al.*, 2009; Pavan *et al.*, 2009).

Devido a grande riqueza de compostos farmacologicamente ativos e as atividades encontradas envolvendo as espécies nativas da região, o Cerrado pode ser considerado uma fonte importante de compostos químicos (Neto e Moraes, 2003; de Mesquita *et al.*, 2009; Pavan *et al.*, 2009) que podem vir a ser utilizados no tratamento e prevenção de doenças virais, principalmente aquelas causadas pelo herpesvírus.

## **2. OBJETIVOS**

---



## **2.1 - Objetivos Gerais**

Triagem *in vitro* de extratos obtidos de espécies vegetais do Cerrado que apresentem potencial atividade antiviral sobre dois patógenos de interesse veterinário e um humano: herpesvírus de suíno tipo 1 (SuHV-1), herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) e vírus do herpes simplex tipo 1 (HSV-1), respectivamente.

## **2.2 – Objetivos específicos**

- Avaliar a citotoxicidade dos extratos nas linhagens celulares: Vero e MDBK
- Realizar triagem dos extratos que apresentam atividade antiviral contra o herpesvírus suíno tipo 1, herpesvírus equino tipo 1 e vírus do herpes simplex tipo 1
- Avaliar a atividade virucida dos extratos que foram ativos
- Calcular o índice de seletividade dos extratos ativos
- Testar a atividade antiviral e virucida em diferentes concentrações do extrato que apresentar resultado mais promissor

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **3.1 - Amostras virais e linhagens celulares**

Os vírus utilizados foram: herpesvírus equino (EHV-1), cepa A4/72 (Moreira *et al.*, 1998), vírus do herpes simplex tipo 1 (HSV-1), cepa KOS (Silva *et al.*, 2010) e o herpesvírus suíno (SuHV-1), cepa NP (Nova Prata) (Fonseca *et al.*, 2010).

As linhagens celulares utilizadas foram a Vero (African green monkey – ATCC CCL 81) e a MDBK (Madin - Darby bovine kidney – ATCC CCL 22) (Hay *et al.*, 1994). A primeira foi utilizada para a inoculação do vírus EHV-1 e HSV-1, já linhagem MDBK foi utilizada para a replicação do SuHV-1. As linhagens celulares foram mantidas a 37°C em ambiente de CO<sub>2</sub> a 5% em meio essencial mínimo (MEM), acrescidos de 10% de soro fetal bovino (SFB) (Fernandes e Simoni, 1995).

### **3.2 - Material vegetal**

As plantas utilizadas no presente trabalho foram descritas anteriormente por Simoni *et al.* (2007) e coletadas em Mogi-Guaçu na Fazenda Campininha, São Paulo, Brasil (22°18'S e 47 °20'W). As espécies foram identificadas pelo botânico Dr. Eduardo Luis Martins Catharino através de comparações com exsicatas presentes no herbário do Instituto de Botânica, São Paulo. As seguintes espécies foram utilizadas: *Banisteriopsis variabilis* B. Gates, *Byrsonima intermedia* A. Juss., *Campomanesia*

*xanthocarpa* O. Berg, *Casearia sylvestris* Sw., *Cissus erosa* Rich., *Copaifera langsdorffii* Desf., *Erythroxylum deciduum* A. St.-Hil., *Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera, *Lacistema hasslerianum* Chodat, *Lithrea molleoides* (Vell.) Engl., *Ocotea pulchella* (Nees) Mez, *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, *Styrax ferrugineus* Nees & Mart., *Trigonía eriosperma* (Lam.) Fromm & J. Vera S., *Trigonía nivea* Cambess., *Xylopia aromática* (Lam.) Mart.

Os extratos foram preparados anteriormente por Simoni *et al.* (2007), a partir de folhas secas trituradas em água destilada, filtrados e liofilizados. No momento do uso, foram dissolvidos em partes iguais de água deionizada estéril e meio essencial mínimo (MEM) sem soro em uma concentração de 4.000 µg/mL, 5.000 µg/mL.

### **3.3 - Teste de citotoxicidade**

O ensaio foi realizado com as duas linhagens celulares, Vero e MDBK, em microplacas de 96 orifícios com 30.000 células em cada orifício. Após 24 horas de incubação a 37°C em ambiente de CO<sub>2</sub> a 5%, o meio foi descartado e as células foram expostas a concentrações decrescentes na base 2 dos extratos. Em seguida, as microplacas foram incubadas novamente durante pelo menos 72 horas. Foram realizadas leituras diárias das microplacas. A concentração dos extratos que não induziu alterações detectáveis ao microscópio de luz foi considerada a

concentração máxima não tóxica (CMNT) do extrato. Foram usadas como controle monocamadas de células incubadas apenas com MEM sem soro.

### **3.4 - Teste antiviral**

Foram utilizadas microplacas com 96 orifícios com 30.000 células em cada orifício. Os testes com as amostras virais de EHV-1 e HSV-1 foram realizados em células Vero. A linhagem celular MDBK foi utilizada para os testes com SuHV-1. As microplacas com as células em suspensão foram incubadas por 24 horas a 37°C em ambiente de CO<sub>2</sub> para a formação de monocamada celular. Com o passar das 24 horas, o meio sobrenadante foi descartado e em cada orifício foi colocado 100µl de extrato na CMNT obtida no teste de citotoxicidade. Como controle, foi utilizada monocamada celular incubada apenas com MEM sem soro. As microplacas foram incubadas por 1 hora a 37°C em ambiente de CO<sub>2</sub>, em seguida foi adicionado 50 µl de suspensão viral em diluições logarítmicas na base 10, exceto no controle, e novamente incubadas na estufa. Foram feitas leituras diárias em microscópio de luz para a observação do efeito citopático (EPC), até 72 horas após a realização do ensaio. O título viral foi calculado pelo método de Reed e Muench (1938) e expresso como dose infectante para 50% dos cultivos celulares (TCID<sub>50</sub>). A avaliação da atividade antiviral foi calculada pela diferença entre o título do tratado, ou seja, células infectadas e tratadas com extrato (T), pelo título do controle, apenas células infectadas

(C). O resultado foi expresso pelo índice de inibição viral ( $IIV = \log T - \log C$ ). Os extratos foram considerados ativos quando o IIV foi maior ou igual a 1,5. Além disso, também foi realizado a porcentagem de inibição ( $PI\% = [1 - (\text{antilog}T / \text{antilog}C)] \times 100$ ) e foram considerados ativos os extratos que apresentaram  $PI\%$  maior ou igual a 97% (Nishimura *et al.*, 1997).

### **3.5 - Ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT)**

Para o procedimento deste ensaio, células Vero e MDBK foram mantidas em placas de 96 orifícios. Em metade dos orifícios, as células foram mantidas em contato com os extratos em diferentes concentrações e amostra viral na concentração de 100DI (Doses infectantes) e na outra metade, somente células e extrato. Além disso, alguns orifícios foram utilizados como controle. A microplaca foi para a estufa por 72h a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, adicionou-se MTT a 5mg/mL. Após 4h de incubação a 37°C adicionou-se 100 µL da solução de 10% de SDS, 0,01N de HCl e após 24h os orifícios foram analisados em leitor de ELISA a 540nm. Os resultados foram analisados comparando a absorbância dos orifícios tratados com os controles celulares, por análise de regressão (Mosmann, 1983). Os valores obtidos foram representativos de uma média de três experimentos realizados.

### 3.6 – Cálculo do SI (índice de seletividade)

A partir da análise dos resultados obtidos no teste com MTT foi possível encontrar os valores de  $CC_{50\%}$ , que corresponde a concentração do extrato que reduz em 50% o crescimento celular, e  $IC_{50\%}$ , concentração do extrato capaz de inibir em 50% a replicação viral. Com esses valores é possível determinar o índice de seletividade ( $SI = CC_{50\%}/IC_{50\%}$ ), que expressa o índice de segurança da substância testada e, dessa forma possibilita a realização de estudos posteriores mais detalhados tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (Coen e Richman 2007; Dezengrini *et al.*, 2009). Os valores de SI acima de 4 são considerados positivos e quanto maior é esse valor, mais promissor é considerado o extrato (Amoros *et al.*, 1992).

### 3.7 - Teste virucida

O teste virucida é realizado para identificar se o extrato tem ação direta na partícula viral, ou seja, avalia se a ação do extrato ocorre antes da infecção viral das células hospedeiras (Schuhmacher *et al.*, 2003). Para isso são misturados amostras virais e extratos antes da incubação em monocamada celular.

Novamente foram utilizadas microplacas de 96 orifícios, com camada celular, e os ensaios foram realizados em ambas as linhagens celulares. Nesse ensaio, partes iguais de suspensão viral, diluídas de  $10^{-1}$  a

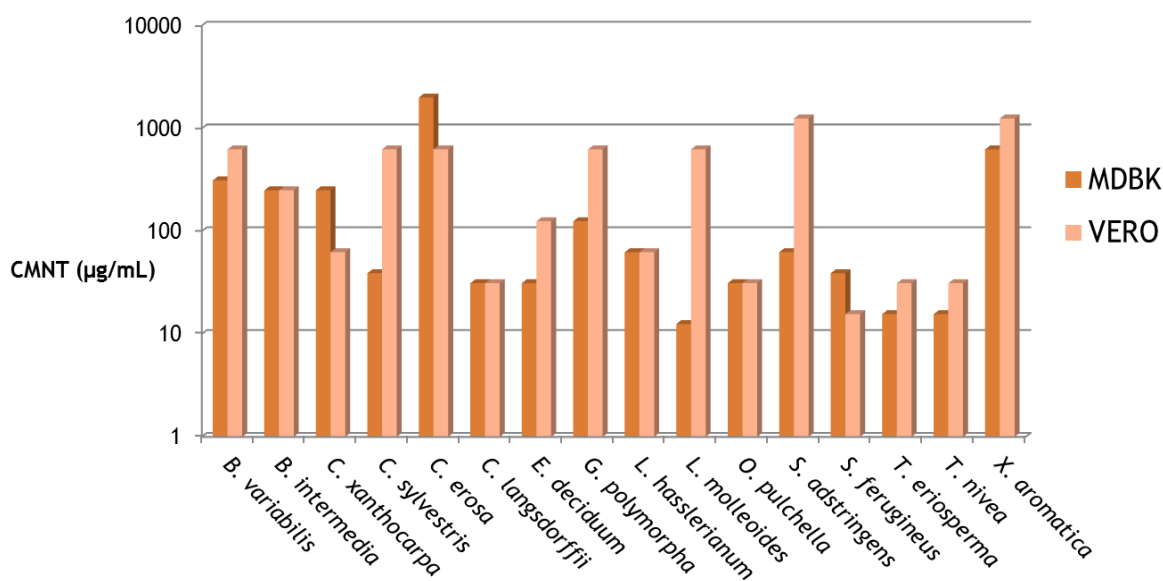
$10^{-8}$  em MEM sem soro, foram misturadas a extratos na CMNT, e incubadas durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  em ambiente de  $\text{CO}_2$ . Após o término de incubação das misturas (extrato + amostra viral e MEM + amostra viral), foi retirado da microplaca o meio sobrenadante e adicionado as misturas: amostra viral e extrato (tratado) e amostra viral e MEM sem soro (controle). Em seguida as microplacas foram incubadas por no mínimo 72 horas e foram realizadas leituras diárias para observação de ECP. O título viral, o IIV e o PI% foram calculados como descrito no “Teste antiviral”.



## **4. RESULTADOS**

---

O teste de citotoxicidade foi realizado para identificar a concentração máxima não tóxica (CMNT) dos extratos nas linhagens celulares utilizadas no presente trabalho, MDBK e Vero. Na Fig.1 estão representados, em escala logarítmica, os resultados desses ensaios.



**Figura 1:** Concentrações máximas não tóxicas (CMNT) dos extratos nas linhagens celulares MDBK e Vero

CMNT: Concentração máxima não tóxica

Os extratos menos citotóxicos para as células Vero foram das espécies *S. adstringens* e *X. aromática*, com CMNT de 1250µg/mL. Já na linhagem MDBK, a espécie cujo extrato foi menos citotóxico foi da espécie *C. erosa*, com CMNT de 2000µg/mL.

Os extratos mais citotóxicos foram das espécies *L. molleoides*, para as células MDBK, com CMNT de 12,5 µg/mL, e *S. ferrugineus* para as

células Vero, com CMNT de 15,6 µg/mL. Os demais extratos, em células Vero, apresentaram CMNT entre 31,2µg/mL e 625µg/mL, e para as células MDBK, as concentrações variaram de 15,6µg/mL a 625µg/mL.

Dos dezesseis extratos testados, nove deles, apresentaram CMNT maior em Vero, e somente três foram menos citotóxicos em MDBK. Os quatro extratos restantes apresentaram a mesma CMNT em ambas as linhagens. Dessa forma, a maioria dos extratos apresentou maior citotoxicidade, ou seja, menor CMNT, em células MDBK. Logo, a linhagem celular Vero foi mais resistente que a MDBK à presença desses extratos.

Com a determinação das CMNT dos extratos, iniciaram-se os testes antivirais. Esses ensaios mostraram se os extratos inibem, de alguma forma, a replicação viral.

A Tab.1 corresponde aos resultados obtidos na atividade antiviral dos extratos, nas suas respectivas CMNT's, frente o SuHV-1, EHV-1 e HSV-1. Foram consideradas ativos os extratos que apresentaram o valor do índice de inibição viral (IIV) maior ou igual a 1,5 e a porcentagem de inibição (PI%) maior ou igual a 97%.

**Tabela 1:** Triagem antiviral dos extratos frente o SuHV-1, EHV-1 e HSV-1

IIV: Índice de inibição viral; PI%: Porcentagem de inibição; SuHV-1: Herpesvírus suíno tipo 1; EHV-1: Herpesvírus equino tipo 1; HSV-1: vírus do herpes simplex tipo 1

Espécies Vegetais	SuHV-1		EHV-1		HSV-1	
	IIV	PI(%)	IIV	PI (%)	IIV	PI(%)
1) <i>Banisteriopsis variabilis</i>	<b>3,24</b>	<b>99</b>	<b>3,75</b>	<b>99</b>	<b>2,25</b>	<b>99</b>
2) <i>Byrsonima intermedia</i>	<b>5,45</b>	<b>99</b>	<b>4,87</b>	<b>99</b>	<b>3,25</b>	<b>99</b>
3) <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	<b>2,0</b>	<b>99</b>	0,62	76	0	0
4) <i>Casearia sylvestris</i>	0	0	0,76	83	0	0
5) <i>Cissus erosa</i>	<b>1,74</b>	<b>99</b>	0	0	0	0
6) <i>Copaifera langsdorffii</i>	0	0	0	0	0	0
7) <i>Erythroxylum deciduum</i>	1,16	93	0,26	45	1,0	90
8) <i>Gochnatia polymorpha</i>	0	0	0	0	0,25	44
9) <i>Lacistema hasslerianum</i>	<b>2,0</b>	<b>99</b>	0,26	45	0,5	68
10) <i>Lithrea molleoides</i>	0	0	0,25	44	0,5	68
11) <i>Ocotea pulchella</i>	<b>1,76</b>	<b>99</b>	0,26	45	0	0
12) <i>Stryphnodendron adstringens</i>	<b>2,0</b>	<b>99</b>	1,0	90	<b>2,75</b>	<b>99</b>
13) <i>Styrax ferrugineus</i>	1,16	93	0	0	0,25	44
14) <i>Trigonia eriosperma</i>	0	0	0,25	44	0,25	44
15) <i>Trigonia nívea</i>	0,5	68	0,26	45	0,25	44
16) <i>Xylopia aromática</i>	<b>3,24</b>	<b>99</b>	<b>1,76</b>	<b>99</b>	<b>1,5</b>	<b>97</b>

A tabela mostra que os extratos das espécies *B.intermedia*, *B. variabilis* e *X. aromatica* foram ativas frente a todos os herpesvírus testados. Além disso, o extrato da espécie *S. adstringens* foi ativa contra dois dos herpesvírus, o SuHV-1 e HSV-1.

Os extratos das espécies *C. erosa*, *C. xanthocarpa*, *L. hasslerianum* e *O. pulchella* apresentaram atividade somente contra o SuHV-1. Os demais extratos não apresentaram valores iguais ou superiores a 1,5 no IIV e 97% em PI%.

Por fim, a Tab.1, mostra que o extrato da espécie *B. intermedia* apresentou os maiores valores de IIV e PI% contra os três herpesvírus.

Os extratos que apresentaram atividade antiviral foram submetidos ao ensaio com MTT, para o cálculo do índice de seletividade (SI) a partir dos valores do CC<sub>50</sub> (concentração do extrato capaz de reduzir em 50% o crescimento celular) pelo valor de IC<sub>50</sub> (concentração do extrato capaz de reduzir em 50% a replicação viral). Os valores de SI são considerados positivos quando são maiores ou iguais a quatro, e quanto maior é esse valor, mais promissor é considerado o extrato. Os resultados dos ensaios com MTT estão demonstrados na Tab.2.

**Tabela 2:** Índice de seletividade dos extratos com atividade antiviral frente o SuHV-1, EHV-1 e HSV-1

\*: Não foram testados; SI: Índice de seletividade; SuHV-1: Herpesvírus suíno tipo 1; EHV-1: Herpesvírus equino tipo 1; HSV-1: vírus do herpes simplex tipo 1

Extratos	Índice de Seletividade (SI)		
	SuHV-1	EHV-1	HSV-1
1) <i>Banisteriopsis variabilis</i>	<b>307,85 ± 0,3</b>	0,8 ± 0,05	0,5 ± 0,8
2) <i>Byrsonima intermedia</i>	<b>193,97 ± 0,09</b>	<b>4,12 ± 0,1</b>	<b>41,76 ± 0,04</b>
3) <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	<b>68,76 ± 0,05</b>	*	*
4) <i>Cissus erosa</i>	<b>26,7 ± 0,07</b>	*	*
5) <i>Lacistema hasslerianum</i>	<b>960,23 ± 0,5</b>	*	*
6) <i>Ocotea pulchella</i>	1,78 ± 0,01	*	*
7) <i>Stryphodendron adstringens</i>	<b>1121,71 ± 0,9</b>	*	<b>14,97 ± 0,02</b>
8) <i>Xylopia aromatica</i>	<b>864,71 ± 0,9</b>	0,22 ± 0,02	0,43 ± 0,03

Dentre todos os extratos que foram ativos frente ao SuHV-1, somente o extrato de *O. pulchella* não apresentou o valor de SI maior que quatro. Os demais extratos apresentaram valores promissores de SI, com

destaque para o extrato da espécie *S. adstringens*, que apresentou valor de SI de  $1121,71 \pm 0,9$ , o maior valor encontrado contra o SuHV-1. Dos três extratos ativos na triagem antiviral contra o EHV-1, somente o extrato de *B. intermedia* apresentou valor considerado promissor de SI. Já contra o HSV-1, dos quatro extratos ativos, dois deles apresentaram valores acima de 4, os extratos da *S. adstringens* e de *B. intermedia*, sendo que este último apresentou o maior valor de SI contra o HSV-1.

Logo, dos extratos escolhidos na triagem antiviral, os das espécies *S. adstringens*, com o maior valor de SI contra o SuHV-1, e *B. intermedia*, com os maiores valores de SI contra o EHV-1 e HSV-1, destacaram-se neste ensaio como extratos mais promissores.

Esses mesmos extratos dos quais foram calculados os valores de SI, foram submetidos a ensaios de avaliação da atividade virucida nas CMNT's, a fim de verificar se o extrato possui ação direta na partícula viral. Os resultados obtidos nos testes virucidas estão demonstrados na Tab.3.

Os ensaios virucidas mostraram que os extratos de *B. variabilis* e *B. intermedia*, apresentaram atividade frente ao SUHV-1, EHV-1 e HSV-1, sendo do extrato de *B. intermedia* os maiores valores de IIV e PI% contra os três herpesvírus Além disso, o extrato da espécie *X. aromatica* apresentou atividade virucida contra o SuHV-1 e HSV-1. Já o extrato de espécie *S. adstringens* apresentou atividade virucida somente contra o HSV-1. Por fim, os extratos de *C. erosa* e *O. pulchella* foram ativos contra o SuHV-1,

entretanto, os extratos das espécies *C. xanthocarpa*, *L. hasslerianum* e *S. adstringens* não apresentaram atividade virucida contra esse mesmo herpesvírus, ou seja, esses extratos não agem diretamente na partícula viral.

**Tabela 3:** Atividade virucida dos extratos frente o SuHV-1, EHV-1 e HSV-1

\*: Não foram testados; IIV: Índice de inibição viral; PI%: Porcentagem de inibição; SuHV-1: Herpesvírus suíno tipo 1; EHV-1: Herpesvírus equino tipo 1; HSV-1: vírus do herpes simplex tipo 1

Espécies Vegetais	SuHV-1		EHV-1		HSV-1	
	IIV	PI(%)	IIV	PI(%)	IIV	PI(%)
1) <i>Banisteriopsis variabilis</i>	<b>3,34</b>	<b>99</b>	<b>3,67</b>	<b>99</b>	<b>3,0</b>	<b>99</b>
2) <i>Byrsonima intermedia</i>	<b>6,15</b>	<b>99</b>	<b>6,12</b>	<b>99</b>	<b>4,5</b>	<b>99</b>
3) <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	0,1	2	*	*	*	*
4) <i>Cissus erosa</i>	<b>1,5</b>	<b>97</b>	*	*	*	*
5) <i>Lacistema hasslerianum</i>	0,08	16	*	*	*	*
6) <i>Ocotea pulchella</i>	<b>2,58</b>	<b>99</b>	*	*	*	*
7) <i>Stryphnodendron adstringens</i>	0,75	82	*	*	<b>3,5</b>	<b>99</b>
8) <i>Xylopia aromática</i>	<b>1,67</b>	<b>99</b>	0,84	85	<b>1,5</b>	<b>97</b>

Dos resultados obtidos até então, as espécies que se destacaram foram: *B. variabilis*, com atividade antiviral e virucida contra os três herpesvírus estudados e resultado promissor de SI frente ao SUHV-1; a

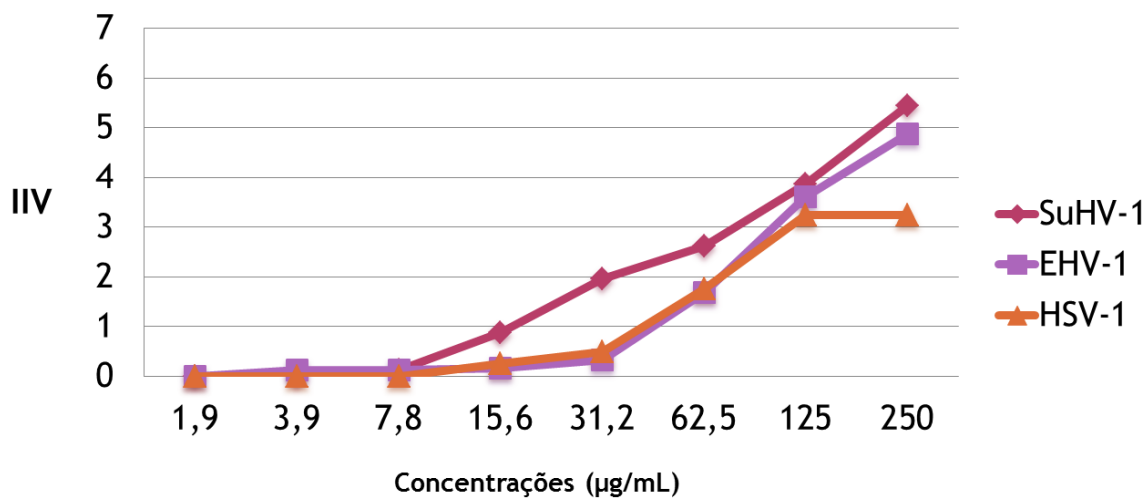


espécie *X. aromatica*, com atividade antiviral contra os três herpesvírus, atividade virucida contra o SuHV-1 e HSV-1, e resultado positivo de SI frente ao SuHV-1; o extrato da espécie *S. adstringens*, que apresentou atividade antiviral contra o SuHV-1 e HSV-1, atividade virucida contra o HSV-1 e o maior valor de SI contra o SuHV-1; e por fim, o extrato da espécie *B.intermedia*, que obteve os melhores resultados, com os maiores valores de IIV e PI% nos ensaios antivirais e virucidas, contra os três herpesvírus estudados, além dos resultados mais promissores de SI contra o EHV-1 e HSV-1.

Portanto, a espécie que foi escolhida para a realização de ensaios antivirais e virucidas adicionais, com a variação da concentração do extrato, foi a *B. intermedia*. Foram realizados ensaios que testaram a atividade antiviral e virucida de concentrações menores do que a CMNT. As concentrações variaram de 1,9 µg/mL a 250 µg/mL, e os resultados dos ensaios antivirais e virucidas estão representados nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

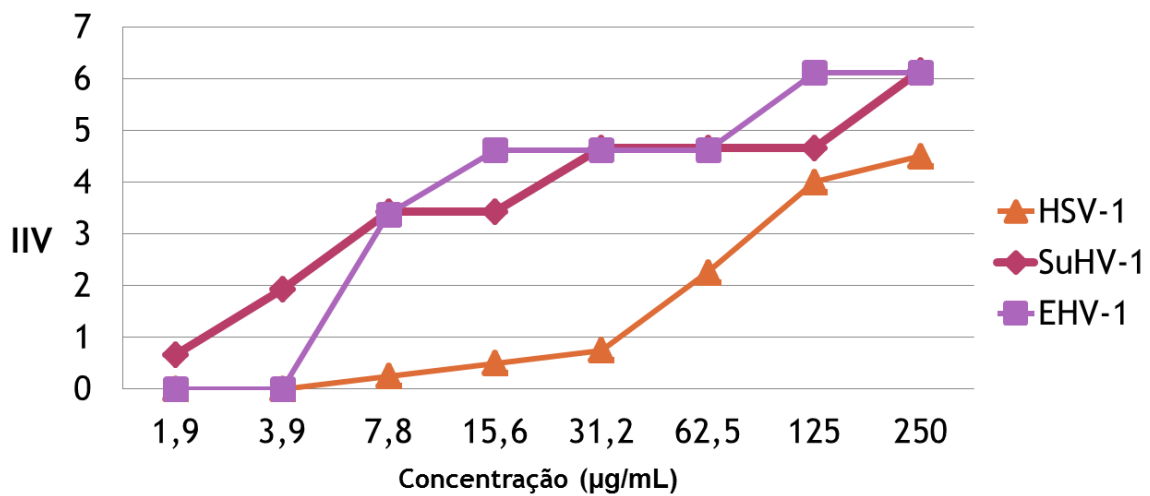
Nos ensaios antivirais, foi possível verificar que o extrato de *B. intermedia* apresenta atividade antiviral em concentrações menores que a CMNT, contra os herpesvírus testados. Contra o SuHV-1, o extrato apresentou valor de IIV acima de 1,5 a partir da concentração 31,2 µg/mL, e frente ao EHV-1 e HSV-1, o extrato foi ativo a partir da concentração 62,5 µg/mL.

Os ensaios virucidas também mostraram atividade do extrato abaixo da CMNT. Contra o SuHV-1, o extrato foi ativo a partir da concentração 3,9 µg/mL, a segunda menor concentração testada. Os experimentos com o EHV-1 mostraram atividade a partir da terceira menor concentração testada, de 7,8 µg/mL. Já contra o HSV-1, o extrato de *B. intermedia* foi ativo a partir da concentração 62,5 µg/mL, a mesma concentração encontrada no ensaio antiviral.



**Figura 2:** Avaliação da atividade antiviral contra SuHV-1, EHV-1 e HSV-1 de diferentes concentrações do extrato de *B. intermedia*

IIV: Índice de inibição viral; SuHV-1: Herpesvírus suíno tipo 1; EHV-1: Herpesvírus equino tipo 1; HSV-1: Vírus do herpes simplex tipo 1



**Figura 3:** Avaliação da atividade virucida contra SuHV-1, EHV-1 e HSV-1 de diferentes concentrações do extrato de *B. intermedia*

IIV: Índice de inibição viral; SuHV-1: Herpesvírus suíno tipo 1; EHV-1: Herpesvírus equino tipo 1; HSV-1: Vírus do herpes simplex tipo 1

## **5. DISCUSSÃO**

---

O uso de produtos naturais como matéria prima para a síntese de novos fármacos tem sido amplamente relatado ao longo do tempo e encontra-se em expansão pelo mundo (Balbino *et al.*, 2010). A própria evolução dos conceitos de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos traduzem esse desenvolvimento que levou a uma abordagem interdisciplinar no estudo de vegetais como fornecedores de matérias primas de interesse terapêutico (Simões *et al.*, 2010).

O Brasil é considerado como um dos países de maior biodiversidade do mundo com cerca de 10% de toda a biota terrestre (Mittermeier *et al.*, 1997). Além do tamanho, o isolamento geográfico e a grande variação de ecossistemas podem ser as razões que explicam tal diversidade, e um exemplo dessa riqueza é o Cerrado (Vila Verde *et al.*, 2003), um bioma rico em espécies vegetais que é confinado praticamente todo ao Brasil e é um dos maiores biomas do mundo. (Durigan *et al.*, 2004)

O presente trabalho demonstrou que algumas espécies vegetais típicas do Cerrado podem servir como fonte de compostos farmacologicamente ativos, que podem vir a ser utilizados na produção de novos fármacos para o tratamento de doenças causadas pelos herpesvírus. Outras pesquisas também comprovam isso contra outros problemas de saúde pública, como a realizada por Pavan *et al.*(2009) que demonstraram a atividade anti-*M. tuberculosis* de dezesseis plantas, e de Mesquita *et al.*(2007) que descreveram a atividade antiplasmódio de espécies já utilizadas tradicionalmente. Além disso, já foram encontradas muitas plantas típicas do Cerrado com atividades

antivirais (Simoni *et al.*, 2007; Brandão *et al.*, 2010) anti-ulcerogênica (Flausino-Jr. *et al.*, 2009), antimicrobiana (Junior *et al.*, 2009), entre outras.

Inicialmente, foram realizados os ensaios de avaliação da concentração máxima do extrato que não causa alterações celulares visíveis ao microscópio de luz. Esta etapa ocorre nos estágios iniciais da pesquisa e é fundamental, pois os vírions utilizam a maquinaria celular para replicar-se. Por isso, devemos garantir que o vírus tenha condições para sua multiplicação (Putnam *et al.*, 2002).

Muitas moléculas promissoras podem ser descartadas logo no início das avaliações, devido à sua citotoxicidade. Este parâmetro é que fornece as primeiras informações sobre a segurança dos compostos em teste, no qual espera-se um composto antiviral mais tóxico para os vírus do que para as células (Flint *et al.*, 2000).

A maioria dos extratos (nove deles) apresentou valores mais elevados da CMNT em células Vero, quatro apresentaram CMNT igual em ambas as linhagens celulares, e apenas três deles apresentaram valores da CMNT maiores em MDBK. Estes resultados demonstram que a linhagem MDBK foi mais sensível aos extratos que a linhagem celular Vero. Este ensaio é importante, pois uma das desvantagens inerentes aos testes antivirais *in vitro* é a sensibilidade ambiental das células animais em cultura (McCutcheon *et al.*, 1995), apesar da metodologia *in vitro* ser mais rápida e menos onerosa (Yunes *et al.*, 2001).

A triagem antiviral foi realizada a fim de identificar os extratos que possuem princípios ativos com propriedades antivirais, ou seja, que inibem o efeito citopático viral (Reed e Muench, 1938). Por definição, efeito citopático (ECP) é o conjunto das modificações provocadas pelas partículas virais nas células hospedeiras. No caso dos herpesvírus, o efeito citopático se expressa pelo aparecimento de células arredondadas, brilhantes, frequentemente ligadas umas às outras por prolongamentos citoplasmáticos, formando focos de infecção. Esses focos têm aspecto característico de cachos de uva, que se estendem pelo tapete celular, desorganizando-o (Girard e Hirth, 1989).

Nesse ensaio destacaram as espécies de *B. variabilis*, *B. intermedia* e *X. aromatica*, que apresentaram atividade antiviral contra os três herpesvírus estudados. Além desses, também destacou-se o extrato da espécie *S. adstringens* que apresentou atividade antiviral contra o herpesvírus suíno tipo 1 e o vírus do herpes simplex tipo 1.

Em 2007, esses mesmos extratos foram descritos por Simoni *et al.* por apresentarem atividade antiviral contra o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1). Além disso, os extratos de *B. variabilis* e *B. intermedia* também foram ativos contra o reovírus aviário.

Os extratos que apresentaram atividade antiviral foram avaliados no ensaio com MTT. A partir desse ensaio, foi possível calcular o valor de SI, devido a elucidação dos valores de IC<sub>50</sub>, que corresponde a inibição de 50% da produção de partículas virais e do CC<sub>50</sub>, que corresponde a

concentração do extrato capaz de reduzir em 50% o crescimento celular. Com a posse dos valores do IC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub>, foi possível determinar o índice de seletividade (SI= CC<sub>50</sub> /EC<sub>50</sub>), que expressa o índice de segurança de determinada substância testada (Coen e Richman, 2007). Quanto maior o valor de SI, mais promissora é a substância (Amoros *et al.*,1992), indicando a viabilidade da realização de estudos posteriores mais detalhados, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Dezengrini *et al.*, 2010).

No ensaio com MTT, novamente destacaram-se os extratos das espécies *B. intermedia*, com maiores valores de SI contra o herpesvírus equino tipo 1 e o vírus do herpes simplex tipo 1, e o extrato de *S. adstringens*, com maior valor de SI frente ao SuHV-1.

Além dos ensaios colorimétricos, também foram realizados ensaios virucidas com os extratos ativos na triagem antiviral. Os testes virucidas foram realizados para identificar se os compostos dos extratos agem diretamente nas estruturas do envelope viral.

Neste teste, os extratos das espécies de *B. variabilis* e *B. intermedia* apresentaram atividade virucida contra os três herpesvírus estudados. O extrato de *X. aromatica* foi virucida apenas contra o SuHV-1 e HSV-1. Já o extrato de *S. adstringens* apresentou atividade virucida apenas contra o HSV-1. Os extratos que não apresentaram atividade virucida, mas foram positivos na atividade antiviral, provavelmente interferem em alguma etapa da replicação viral.



O extrato de *B. intermedia* foi considerado o mais promissor tendo em vista os maiores valores de IIV, PI% e SI nos ensaios antivirais, virucidas e com MTT. Portanto, o extrato foi selecionado para a realização de testes antivirais e virucidas com diferentes concentrações do extrato. Esses ensaios mostraram que o extrato de *B. intermedia* possui atividade em concentrações menores do que CMNT. Contra o HSV-1, o extrato foi ativo, tanto no ensaio virucida como no antiviral, a partir da concentração de 62,5 µg/mL, o que sugere que este extrato tenha apenas ação virucida, em outras palavras, age diretamente na partícula viral.

As espécies que destacaram-se neste trabalho já tiveram alguns compostos químicos identificados, como os alcaloides harmina e harmalina na *B. variabilis* (McIlhenny *et al.*, 2009); terpenos na espécie *X. aromatica* (Stashenko *et al.*, 2004); taninos na *S. adstringens* (Ishida *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2010); e flavonóides na *B. intermedia* (Sannomiya *et al.*, 2007). Apesar desses compostos já terem sido descritos como antivirais (Simões *et al.*, 2010), ainda são necessárias avaliações mais específicas para atribuir a atividade encontrada a eles, mesmo porque, o extrato bruto, como os utilizados no presente trabalho, geralmente possuem efeito sinérgico dos compostos presentes na planta (Cos *et al.*, 2006)

Espécies do gênero *Banisteriopsis* já foram descritas como antioxidante, antibacteriana (Bussman *et al.*, 2009), alucinógena e também inibem a atividade de monoamino oxidase (MAO) (Schwarz *et al.*, 2003). A espécie mais estudada do gênero é a *B. caapi*, pois é utilizada em alguns

rituais religiosos como ingrediente de uma bebida conhecida como *ayahuasca* (Wang *et al.*, 2010). Os compostos químicos presentes nessa planta são, em sua maioria, alcaloides (McIlhenny *et al.*, 2009; Simões *et al.*, 2010).

Extratos de *X. aromatica* também já foram descritos como antimicrobiano, antiparasitário (de Mesquita *et al.*, 2007), entre outros (Rodrigues *et al.*, 2006; Osório *et al.*, 2007). Muitos compostos dessa espécie já foram identificados, mas os triterpenos são os que estão presentes em maior concentração (Stashenko *et al.*, 2004).

Na etnofarmacologia, dentre os extratos ativos deste trabalho, o mais utilizado é da espécie *S. adstringens*, mas geralmente, são utilizados extratos do tronco (Coelho *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2010). Extratos da folha, como utilizado no presente trabalho, foram descritos por apresentarem atividade tripanocida (de Mesquita *et al.*, 2009).

Por fim, a espécie *B. intermedia* apresentou os resultados mais promissores contra os herpesvírus testados neste trabalho. Espécies de *Byrsonima* também são utilizadas na etnofarmacologia para o tratamento de febres, infecções na pele e úlceras (Sannomiya *et al.*, 2007). Apresenta em sua composição química esteróides, triterpenos, flavonoides, ácido gálico, quercetina e catequinas (Michelin *et al.*, 2008; Rinaldo *et al.*, 2010), compostos que já foram citados por apresentarem potencial antiviral (Simões *et al.*, 2010).

Além da *B. intermedia*, outras espécies desse gênero já foram descritas, como a *B. crassifolia*, com atividade anti-inflamatória (Maldini *et al.*, 2009); *B. bucidaefolia*, como antioxidante (Castillo-Avila *et al.*, 2009); e *B. crassa*, com propriedade antiulcerogênica (Rinaldo *et al.*, 2010). A espécie *B. intermedia*, por sua vez, foi descrita por possuir atividade antimicrobiana contra oito microrganismos diferentes, dentre eles, espécies de *Salmonela* e *Candida* (Michelin *et al.*, 2008).

A triagem realizada neste trabalho possibilitou identificar espécies promissoras, entretanto ainda são necessários experimentos que associem os compostos químicos presentes nessas plantas com a atividade encontrada, além dos mecanismos de ação envolvidos.

## **6. CONCLUSÕES**

---

- Para todos os extratos testados obteve-se uma concentração não citotóxica para cada cultivo celular, com valores variáveis.
- Dos 16 extratos testados na triagem Antiviral, 50% deles apresentaram atividade contra pelo menos um dos herpesvírus.
  - 3 extratos foram ativos contra todos os herpesvírus
  - 8 extratos foram ativos contra o SuHV-1
  - 3 extratos foram ativos contra o EHV-1
  - 4 extratos foram ativos contra o HSV-1
- No ensaio Virucida, 75% dos extratos foram ativos contra pelo menos um dos herpesvírus.
  - 2 extratos foram ativos contra todos os herpesvírus
  - 5 extratos foram ativos contra o SuHV-1
  - 2 extratos foram ativos contra o EHV-1
  - 4 extratos foram ativos contra o HSV-1
- Quanto ao SI, destacaram os extratos da *S. adstringens* (contra SuHV-1) e *B. intermedia* (contra EHV-1 e HSV-1) que apresentaram os maiores valores de SI.
- O extrato da *B. intermedia* apresentou atividade antiviral e virucida em concentrações menores do que a máxima não tóxica.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- Acamovic, T., Brooker, D. (2005). Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. Proceedings of the Nutrition Society, 64: 403-412.
- Agra, M. F., Silva, K. N., Basílio, I. J. L.D., Freitas, P. F. Barbosa-Filho, J. M. (2008). Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. Revista Brasileira de Farmacognosia, 18(3): 472-508.
- Akhtar, J., Shukla, D. (2009). Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. FEBS Journal, 276: 7228-7236.
- Alché, L. E., Barquero, A. A., Sanjuan, N. A., Coto, C. E. (2002). Na antiviral principle presente in a purified fraction from *Melia azedarach* L. leaf aqueous extract restrains herpes simplex vírus type 1 propagation. Phytotherapy Research, 16: 348-352.
- Allen, G. P. (2002). Epidemic disease caused by Equine herpesvírus -1: recommendations for prevention and control. Equine Vet. Educ., 14(3): 136-142.
- Alves, T. M. A., Silva, A. F., Brandão, M., Grandi, T. S. M., Smânia, E. F. A., Júnior, A. S., Zani, C. L. (2000). Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. Mem Inst. Oswaldo Cruz, 95(3): 367-373.
- Amoros, M., Simões, C. M. O., Girre, L. (1992). Synergistic effect of flavones and flavonols agains herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. Journal of Natural Products, 55(12): 1732-40.

- Araújo, S.A.C., Teixeira, M. F. S., Dantas, T. V. M., Melo, V. S. P., Lima, F. E. S., Ricarte, A. R. F., Costa, E. C., Miranda, A. M.(2009). Usos potenciais de *Melia Azedarach* L. (Meliaceae): Um levantamento. Arq. Inst. Biol., 76(1): 141-148.
- Azwa, A.,Barton, S. E. (2009). Aspects of herpes simplex vírus: a clinical review.Journal of Family Planning & Reproductive health Care, 35(4): 237-242.
- Balbino, E. E., Dias, M. F. (2010). Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. Revista Brasileira de Farmacognosia, 20(6):992-1000.
- Barreca, C., O'Hare, P. (2004). Suppression of Herpes Simplex Virus 1 in MDBK Cells via the Interferon Pathway. Journal of Virology, 78: 8641-8653.
- Billaud, G., Thouvenot, D., Morfin, F. (2009). Drug targets in herpes simplex and epstein barr virus infections.Infectious Disorders Drug Targets, 2: 117-25.
- Bloom, D. C., Giordani, N. V., Kwatkowski, D. L. (2010). Epigenetic regulation of latente HSV-1 gene expression. Biochimica et Biophysica Acta, 1799: 246-256.
- Brady, R. C., Bernstein, D. I. (2004). Treatment of herpes simplex virus infections. Antiviral Research, 61(2): 73-81.
- Brandão, M. G. L., Zanetti, N. N. S., Oliveira, P., Graef, C. F. F., Santos, A. C. P., Monte-Mór, R. L. M. (2008). Brazilian medicinal plants



- described by 19th century European naturalists and in Official Pharmacopeia. Journal of Ethnopharmacology, 120: 141-148.
- Brandão, G. C., Kroon E. G., Dos Santos, J. R., Stehmann, J. R., Lombardi, J. A., Oliveira, A. B. (2010). Antiviral activity of Bignoniaceae species occurring in the State of Minas Gerais (Brazil): part 1. Lett Appl Microbiol 51(4): 469-476.
- Bussmann, R. W., Malca-Garcia, G.; Glenn, A.; Sharon, D.; Chait, G.; Dias, D.; Pourmand, K.; Jonat, B.; Somogy, S.; Guardado, G.; Aguirre, C.; Chan, R.; Meyer, K.; Kuhlman, A.; Townesmith, A.; Effio-Carbajal, J.; Frías-Fernandez, M. B. (2010). "Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies." J Ethnopharmacol 132(1): 101-108.
- Butera, S.T. (2000). Therapeutic targeting of human immunodeficiency virus type-1 latency: current clinical realities and future scientific possibilities. Antiviral Research, 48:143-176.
- Cechinel Filho, V., Yunes, R. A. (1998). Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Química Nova, 21(1): 99-105.
- Chattopadhyay, D., Sarkar, M. C., Chatterjee, T., Dey, R. S., Bag, P., Chakraborti, S., Khan, M. T. H. (2009). Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products. New Biotechnology, 25(5): 347-368.
- Chiang, L. C., Chiang, W., Chang, M. Y., Ng, L. T., Lin, C. C. (2002). Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. Antiviral Res, 55(1): 53-62.

- Ciacci-Zanella, J. R., Amaral, A. L., Ventura, L. V., Morés, N., Bortoluzzi, H. (2008). Aujeszky's disease eradication in Santa Catarina State: relevance of sanitary of replacement gilts. Ciência Rural, 38(3): 749-754.
- Clark, A. M. Natural Products as a resource for new drugs. Pharmaceutical Research, 8: 1133-44, 1996
- Clemens, S. A. C., Farhat, C. K. (2010). Soroprevalência de anticorpos contra vírus herpes simples 1-2 no Brasil. Rev. Saúde Pública, 44(4): 726-734.
- Coen D.M. & Richman D.D. 2007. Antiviral agents, p.447-485. In: Knipe D.M. & Howley P.M. (Eds), Fields Virology. 5<sup>th</sup> ed. Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Conrady, C. D., Drevets, D. A., Carr, D. J.J. (2010). Herpes simplex type 1 (HSV-1) infection of the nervous system: Is an immune response a good thing? Journal of Neuroimmunology, 220: 1-9.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. V., Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro "proof-of-concept". Journal of Ethnopharmacology, 106: 290-302.
- Cunha, E.M. S., Ferrari, C. I. de L., Lara, C. C. S. H., da Silva, L. H. Q. (2002). Presença de anticorpos contra o herpesvírus equino 1 (HVE-1) em equinos do noroeste do Estado de São Paulo. Arq. Inst. Biol., 69(1): 1-5.
- D´Cruz, O., J., Uckun, F. M. (2001a). Pokeweed antiviral protein: a potencial nonspermicidal prophylactic antiviral agent. Fertility and Sterility, 75: 106-114.
- D´Cruz, O., J., Uckun, F. M. (2001b). Effect of pretreatment of semen with pokeweed antiviral protein on pregnancy outcome in the rabbit model. Fertility and Sterility, 76: 830-833.

- De Logu, A.; Loy, G.; Pellerano, M. L.; Bonsignore, L.; Schivo, M. L. (2000). Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by Santolina insularis essential oil. Antiviral Res. 48(3):177-85.
- de Mesquita, M. L., Desrivot, J., Bories, C., Fournet, A., de Paula, J. E., Grellier, P., Espindola, L. S. (2005). Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 100(7): 783-787.
- de Mesquita, M. L., Grellier, I., Mambu, L., de Paula, J. E., Espindola, L. S. (2007). In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. Journal of Ethnopharmacology, 110: 165-170.
- de Mesquita, M. L., J. E. de Paula, *et al.* (2009). "Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines." J Ethnopharmacol 123(3): 439-445.
- da Silva, A. D., Sortica, V. A., Braga, A. C., Spilki, F. R., Franco, A. C., Esteves, P. A., Rijsewijk, F., Rosa, J. C. A., Batista, H. B. C. R., Oliveira, A. P., Roehe, P. M. (2005). Caracterização antigênica e molecular de oito amostras do vírus de Aujeszky isoladas no estado do Rio Grande do Sul em 2003. Pesq. Vet. Bras., 25: 21-24.
- de Souza, C. M., Sobestiansky, J., Matos, M. P. C., Caiado, K. L. (2001). Prevalência da infecção pelo vírus da doença de Aujeszky em matrizes de sistemas de produção que abastecem o mercado consumidor de Goiânia. Ciência Animal Brasileira, 3(2): 53-56.
- Deruelle, M. J., Favoreel, H. W. (2011). Keep it in the subfamily: the conserved alphaherpesvirus US30 protein kinase. Journal of General Virology, 92: 18-30.

- Dezengrini R, Weiss M, Torres FD, Oliveira MS, Furian F, Mello CF, *et al.* (2009). Bovine herpesvirus 5 induces an overproduction of nitric oxide in the brain of rabbits that correlates with virus dissemination and precedes the development of neurological signs. J Neurovirol 15: 153-163.
- Diel, D. G., Almeida, S. R., Welblen, R., Frandoloso, R., Anzilliero, D., Kreutz, L. C., Groff, F. H. S., Flores, E. F. (2006). Prevalência de anticorpos contra os virus da influenza, da arterite viral e herpesvírus em equinos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Ciência Rural, 36(5): 1-11.
- Dourado, R. S., Ladeira, A. M. (2008). Identificação de flavonoides em *Hypericum cordatum* (Vell.) N. Robson (Clusiaceae). Revista Brasil. Bot., 31(4): 611-620.
- Durigan, G., Baitello, J. B., Franco, G.A.D.C., Siqueira, M.F. (2004). Plantas do Cerrado Paulista: Imagens de uma paisagem ameaçada. São Paulo. Páginas & Letras Editora e Gráfica.
- Dzabic, M., Hendricks R., Münz C., Söderberg-Nauclér C. (2010). Welcome to Herpesviridae – A new premier virology journal. Herpesviridae. 1:1.
- Esimono, C. O., Grunwald, T., Wildner, O., Nchinda, G., Tippler, B., Proksch, P., Uberlak, K. (2005). In vitro pharmacodynamic evaluation of antiviral medicinal plants using a vector-based assay technique. Journal of Applied Microbiology, 99: 1346-1355.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. (2005). Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Elsevier Academic Press. E Report., p.193-211.

- Fernandes, M. J. B., Simoni, I. C. (1995). Caracterização de linhagens celulares: identificação de espécies por análise isoenzimática. Arquivos do Instituto Biológico, 62: 59-63.
- Field, H. J., Biswas, S., Mohammad, I. T. (2006). Herpesvírus latency and therapy, from a veterinary perspective. Antiviral Res., 71: 127 – 133.
- Flausino-Jr, O., Abissi, B.M., Vieira Jr., G. M., dos Santos, A. G., da Silva, D. H., Cavalheiro, A., Bolzani, V. S. (2009). Protease inhibition activity of extracts from Salicaceae species from Brazilian Cerrado and Atlantic Rain Forest and of an enriched fraction of clerodane diterpenes (casearins). Revista Brasileira de Farmacognosia, 19(3): 755-758.
- Flint, S. J.; Enquist, L. W.; Krug, R. M.; Racaniello, V. R.; Skalka, A.M. (2000). Principles of virology: molecular, biology, pathogenesis and control. Washington: ASM, p. 662-714.
- Flores, E. F., Franco, A. C., Roehle, P. M., *et al.*, (2007). Virologia Veterinária. Ed. UFSM p. 435-488.
- Fonseca Jr., A. A., Carmagos, M. F. D'Ambros, R. M. F., Braga, A. C., Ciacci-Zanella, J., Heinemann, B., Leite, R. C., Reis, J. K. P. (2010). Diagnóstico e genotipagem do vírus da pseudorraiva por nested-PCR a análise de restrição enzimática. Ciência Rural, Santa Maria, 40(4): 921-927.
- Fonseca Jr., A. A., Dias, N. L., Leite, R. C., Heinemann, M. B., Reis, J. K. P. (2010). PCR duplex para diferenciação de amostras vacinais e selvagens do vírus da doença de Aujeszky. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 62(5): 1259-1262.

- Fritsche, A. K., Borchers, K. (2010). Detection of neuropathogenic strains of Equid Herpesvirus 1 (EHV-1) associated with abortions in Germany. Veterinary Microbiology, 147: 176-180.
- Garré, B., Meulen, K. van der, Nugent, J., Neyts, J., Croubels, S., Backer, P. DE, Nauwynck, H. (2007). In vitro susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet. Veterinary Microbiology, 122: 43-51.
- Gershburg, E., Pagano, J. S. (2008). Conserved herpesvirus protein kinases. Biochimica et Biophysica Acta 1784: 203-212.
- Girard, M.; Hirtch, L. (1989). Virologie Moléculaire. 2.ed. Paris: Doin. p. 617.
- Gilbert, C., Bestman-Smith, J., Boivin, G. (2002). Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. Drug Resistance Updates 5: 88-114.
- Grebe-Mariam, T., Neubert, R., Schmidt, P. C., Wutzler, P., Schmidtke, M. (2006). Antiviral activities of some Ethiopian medicinal plants used for the treatment of dermatological disorders. Journal of Ethnopharmacology, 104: 182-187.
- Greco, A., Diaz, J.J., Thouvenot, D., Morfin, F. (2007). Novel targets for the development of anti-herpes compounds. Infectious Disorders Drug Targets, 7(1):11-
- Groff, F. H. S., Merlo, M. A., Stoll, P. A., Stepan, A. L., Weiblen, R., Flores, E. F. (2005). Epidemiologia e controle dos focos da doença de Aujeszky no Rio Grande do Sul, em 2003. Pesquisa Veterinária Brasileira, 25(1): 25-30.

- Hay, R., Caputo, J., Chen, T. R., Marvin, M. S.M., McClintock, P., Reid, Y. (1994). ATCC Cell Lines and Hybridomas. 8th ed. American type culture collection. p.48.
- Harden, E. A., Falshaw, R., Carnachan, S. M., Kern, E. R., Prichard, M. N. (2009). Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus. Antiviral Research, 83: 282-289.
- Hazuda, D., Iwamoto, M., Wenning, L. (2009). Emerging Pharmacology: Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Integration. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 49: 377-94.
- Ishida, K., S. Rozental, *et al.* (2009). "Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on growth, capsule size and pigmentation." Ann Clin Microbiol Antimicrob 8: 29.
- Junior, I. E. S., Filho, V. C., Zacchino, S. A., Lima, J. C. S., Martins, D. T. O. (2009). Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. Revista Brasileira de Farmacognosia, 19(1B): 242-248.
- Khan, M. T. H., Ather, A., Thompson, K. D., Gambari, R. (2005). Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. Antiviral Research, 67: 107-119.
- Kuo, Y. C.; Chen, C. C.; Tsai, W. J. & Ho, Y. H. (2001). Regulation of Herpes Simplex Virus Type 1 Replication in Vero Cells by *Psychotria serpens*: Relationship to Gene Expression, DNA Replication, and Protein Synthesis. Antiviral Res., v. 51, p. 95 - 109.
- Kuo, Y. C.; Lin, L. C.; Tsai, W. J.; Choy, C. J.; Kung, S. H.; Ho, Y. H. (2002). Samarangenin B from *Limonium sinense* suppresses herpes simplex virus type 1

- replication in Vero cells by regulation of viral macromolecular synthesis. Antimicrob Agents Chemother. 2002 Sep;46(9):2854-64.
- Lazarini, P. R., Vianna, M. F., Alcantara, M. P. A., Scalia, R. A., Filho, H. H. C. (2006). Pesquisa do vírus herpes simples na saliva de pacientes com paralisia facial periférica de Bell. Ver.Bras. Otorrinolaringol., 72(1): 7-11.
- Lipipun, V.; Kurokawa, M.; Suttisri, R.; Taweechoitipatr, P.; Pramyothin, P.; Hattori, M.; Shiraki, K. (2003). Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo. Antiviral Res. 60(3):175-80.
- Liu, F.; Liu, Y.; Meng, Y.; Yang, M.; He, K. (2004). Structure of polysaccharide from *Polygonatum cyrtoneura* Hua and the antiherpetic activity of its hydrolyzed fragments. Antiviral Res.63(3):183-9.
- Lourenço, M, V. (2003) Biotecnologia de plantas medicinais: produção de biomoléculas. In: Reunião Anual do Instituto Biológico, 16(1-2): 63-65.
- Lunn, D. P., Davis-Poynter, N., Flaminio, M. J. B. F., Horohov, D. W., Osterrieder, K., Pusterla, N., Townsend, H. G. G. (2009). Equine Herpesvírus -1 Consensus Statement. J. Vet. Intern Med., 23: 450-461.
- Mancini, D. A. P., Torres, R. P., Pinto, J. R., Mancini-Filho, J. (2009). Inhibition of DNA Vírus: Herpes -1 (HSV-1) in cellular culture replication, through an antioxidante treatment extracted from Rosemary spice. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 45: 127- 133.
- Marconi, E. C. M., Lara, M. C. C. S. H., Cunha, E. M. S., Villalobos, E. M. C., Castro, A. M. M. G., Brandão, P. E., Richtzenhain, L. J., Mori, E. (2010). Caracterização molecular e sorológica do EHV-1 e do EHV-4 em populações de cavalos



- naturalmente infectados no Estado de São Paulo. Anais da Semana Científica Benjamim Eurico Malucelli, 4: 29-30.
- McCutcheon, A. R., T. E. Roberts, *et al.* (1995). "Antiviral screening of British Columbian medicinal plants." J Ethnopharmacol 49(2): 101-110.
- McIlhenny, E. H., Pipkin, K. E.; Leanna, J. S.; Wechkin, H. A.; Strassman, R.; Barker, S. A. (2009). "Direct analysis of psychoactive tryptamine and harmala alkaloids in the Amazonian botanical medicine ayahuasca by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry." J Chromatogr A 1216(51): 8960-8968.
- Melo e Silva, F., de Paula, J. E., Espindola, L. S. (2009). "Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants." Mycoses 52(6): 511-517.
- Michelin, D. C., Sannomiya M., Figueiredo, M. E., Rinaldo, D., dos Santos, Lourdes C., Souza-Brito, A. R. M., Vilegas, W., Salgado, H. R. N. (2008). Antimicrobial Activity of Bursonima species (Malpighiaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia 18: 690-695.
- Miranda, M. M. F. S., Romanos, M. T. V., Wigg, M. D. (2002). Viroses dermatópicas In: Introdução a virologia humana. Ed. 1º. Guanabara Koogan. Capítulo 7, pp.75-85.
- Mittermeier, R. A., Gil, P. R. (1997). Megadiversity: Earth's biologically wealthiest nations. Cemex, México City, México.
- Moreira, N., Kruger, E. R., Warth, J. F., Biesdorf, S. M., Goularte, M. M. M., Weiss, R.R. (1998). Aspectos etiológicos e epidemiológicos do aborto equino. Arch. Vet. Scienc., 3(1): 25-30.

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunology Methods, 65:55-63.
- Naithani, R., Mehta, R. G., Shukla, D., Chandrasekera, S. N., Moriarty, R. M. (2010). Antiviral Activity of Phytochemicals: Current Perspective, capítulo 24.
- Nauwynck, H., Glorieux, S., Favoreel, H., Pensaert, M. (2007). Cell biological and molecular characteristics of pseudorabies virus infections in cell cultures and in pigs with emphasis on the respiratory tract. Vet. Res., 38: 229-241.
- Neto, G. G., de Moraes, R. G. (2003). Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. Acta Bot. Bras., 17(4): 561-584.
- Nishimura, T., Fukuyasu, H. (1997). Antiviral activity of aminohydrazone of alkoxyphenyl substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and mice. Kitasato Arch. Exp. Med., 50:39-46
- Orhan, I., Deliorman-Orhan, D., Özçelik, B. (2009). Antiviral activity and cytotoxicity of the lipophilic extracts of various edible plants and their fatty acids. Food Chemistry, 115: 701-705.
- Orhan, D. D., Özçelik, B., Özgen, S., Ergun, F. (2010). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. Microbiological Research, 165: 496-504.
- Osório, E.; Arango, G. J.; Jiménez, N.; Alzate, F.; Ruiz, G.; Dutierrez, D.; Paco, M. A.; Giménez, A.; Robledo, S. (2007). Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. Journal of Ethnopharmacology, 111(3): 630-635.

- Okeke, I. N., Laxmaninarayan, R., Bhutta, Z. A., Duse, A. G., Jenkins, P., O'Brien, T. F., Pablos-Mendez, A., Klugman, K. P. (2005). Antimicrobial resistance in developing countries. Part 1: recent trends and current status. Lancet Infectious Diseases, 5: 481-493.
- Oliveira, F., Akissue, G. (2005). Fundamentos da Farmacobotânica. Ed. 2ª. Editora Atheneu
- Özçelik, B., Aslan, M., Orhan, I., Karaoglu, T. (2005). Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophilic extracts of *Pistacia vera*. Microbiological Research, 160: 159-164.
- Patel, J. R., Heldens, J. (2005). Equine herpesvirus 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) – epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review. The Veterinary Journal, 170: 14-23.
- Paula-Junior, W., Rocha, F. H., Donatti, L., Fadel-Picheth, C.M.T., Weffort-Santos, A.M. (2006) Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.16, p.625-630.
- Paulus, C., Nitzsche, A., Nevels, M. (2009) Chromatinisation of herpesvirus genomes. Reviews in Medical Virology, 20: 34-50.
- Pavan, F. R., Sato, D. N., Higuchi, C. T., Santos, A. C. B., Vilegas, W., Leite, C. Q. (2009). In vitro anti –*Mycobacterium tuberculosis* activity of some Brazilian “Cerrado” plants. Revista Brasileira de Farmacognosia, 19(1B): 204-206.

- Pellett, P., Roizman, B. (2007). The family Herpesviridae: a brief introduction. In: D. Knipe and P.M. Howley, Editors, Fields Virology (5th edition), Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, p. 2479–2499.
- Pena, L. J., Pena, D. A., Barrios, P. R., Dale, R., Lamêgo, M. R. A., Moraes, M. P. (2006). Levatamento soro-epidemiológico da infecção pelo vírus da Anemia Infecciosa Equina, da Influenza Equina-2 do Herpesvírus Equino -1 em rebanhos do sul do Estado do Pará, Brasil. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci, 43(4): 537-542.
- Peng, T. (2010). Strategies for Antiviral Screening Targeting Early Steps of Virus Infection. Virologica Sinica, 25: 281-293.
- Placek, B. J., Berger, S. L. (2010). Chromatin dynamics during herpes simplex virus -1 lytic infection. Biochimica et Biophysica Acta, 1799: 223-227.
- Pomeranz, L. E., A. E. Reynolds, *et al.* (2005). Molecular Biology of Pseudorabies Virus: Impact on Neurovirology and Veterinary Medicine. Microbiology and Molecular Biology Reviews 69(3): 462-500.
- Pusterla, N., Wilson, W. D., Madigan, J. E., Ferraro, G. L. (2009). Equine herpesvírus -1 myeloencephalopathy: A review of recent developments. The Veterinary Journal, 180: 279-289.
- Putnam, K.P.; Bombick, D.W.; Doolittle, D.J. (2002). Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. Toxicology In Vitro, v. 16, p. 599-607.
- Ramadan, M. F., Asker, M. M. S.(2009). Antimicrobial and Antiviral impact of novel quercetin-enriched lecithin. Journal of Food Biochemistry, 33(4): 557-571.
- Rates, S.M., (2001). Plants as source of drugs. Toxicon, 39(5): 603-613.

- Reed, J. H.; Muench, H. (1938). "A simple method for estimating fifty percent endpoints."  
Amer. J. Hyg. 27: 493-496.
- Reed, S. M., Toribio, R. E. (2004). Equine herpesvírus 1 and 4. Veterinary Clinics Equine,  
20: 631-642.
- Reggiori, M. G., Allegretti, C. E., Scabar, L. F., Armonia, P. L., Giovani, E. M. (2008).  
Laser Therapy for herpes simplex treatment in HIV patients: case report. Rev. Inst.  
Ciênc. Saúde, 26(3): 357-361.
- Rinaldo, D.; Batista Jr., J. M.; Rodrigues, J.; Benfatti, A. C.; Rodrigues, C. M.; Dos Santos,  
L. C.; Furlan, M.; Vilegas, W. (2010). "Determination of catechin diastereomers  
from the leaves of *Byrsonima* species using chiral HPLC-PAD-CD." Chirality  
22(8): 726-733.
- Roberts, N.A., Martin, J. A., Kinchingto, N.D., Broadhurst, A.V., Duncan, I. B., Galpin,  
S.A. (1990). Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. Science,  
248: 358-361.
- Rodrigues, A. M.; De Paula, J. E.; Degallier, N.; Molez, J. E.; Espindola, L. S. (2006).  
Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. J Am  
Mosq Control Assoc 22(2): 314-317.
- Rogero, S. O., Lugão, A. B., Ikeda, T. I., Cruz, A. S. (2003). Teste in vitro de  
citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. Materials Research,  
6(3): 317-320.
- Ruffa, M. J., Wagner, M. L., Suriano, M., Vicente, C., Nadinic, J., Pampuro, S., Solomón,  
H., Campos, R. H. , Cavallaro, L. (2004). Inhibitory effect of medicinal herbs

- against RNA and DNA viruses. Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 15:153–159.
- Sannomiya, M.; Cardoso, C. R.; Figueiredo, M. E.; Rodrigues, C. M.; dos Santos, L. C.; dos Santos, F. V.; Serpeloni, J. M.; Cólus, I. M.; Vilegas, W.; Varanda, E. A. (2007). Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. J Ethnopharmacol 112(2): 319-326.
- Santana, A. M., Oliveira, R. A. (2005). Desempenho de reatores anaeróbios de fluxo ascendente com manta de lodo em dois estágios tratando águas residuárias de suinocultura. Eng. Agríc., Jaboticabal, 25(3): 817-830.
- Schnitzler, P., Schuhmacher, A., Astani, A., Reichling, J. (2008). Melissa officinalis oil effects infectivity of enveloped herpesviruses. Phytomedicine, 15: 734-740.
- Schuhmacher, A., Reichling, J., Schnitzler, P. (2003). Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. Phytomedicine, 10: 504–510.
- Schwarz, M. J.; Houghton, P. J.; Rose, S.; Jenner, P.; Lees, A. D. (2003). Activities of extract and constituents of *Banisteriopsis caapi* relevant to parkinsonism. Pharmacol Biochem Behav 75(3): 627-633.
- Siakallis, G., Spandidos, D. A., Sourvinos, G. (2009). Herpesviridae and novel inhibitors. Antiviral Therapy, 14: 1051-1064.
- Silva, I. T.; Costa, G. M.; Stoco, P. H.; Schenkel, E. P.; Reginatto, F. H.; Simões, C. M. (2010). In vitro antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. Lett Appl Microbiol 51(2): 143-148.

- Simões, C., Castro, T. C., Cordeiro, L. S., Albarello, N., Mansur, E., Romanos, M. T. V. (2010). Antiviral activity of *Cleome rosea* extracts from field-grown plants and tissue culture-derived materials against acyclovir-resistant Herpes simplex viruses type 1 (ACVr-HSV-1) and type 1 (ACVr-HSV-2). World J. Microbiol Biotechnol., 26: 93-99.
- Simões, M. O., Guerra, M. P., Nodari, R. O., [et al.]. (2010). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Ed. 6°. Editora UFRGS. Capítulo 1, pp. 13-29.
- Simoni, I.C. (2003). Tratamentos antivirais. In: Reunião Anual do Instituto Biológico, 65(1-2): 41-44.
- Simoni, I. C., Manha, A. P. S., Sciessere, L., Hoe, V. M. H., Takinami, V. H., Fernandes, M. J. B. (2007). Evaluation of the antiviral activity of Brazilian Cerrado plants against animal viroses. Virus Reviews and Research, 12(1-2): 25-31
- Sousa, F. C. F., Melo, C. T. V., Citó, M. C. O., Felix, F. H. C., Vasconcelos, M. M., Fonteles, M. M. F., Filho, J. M. B., Viana, G. S. B. (2008). Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. Revista Brasileira de Farmacognosia, 18(4): 642-654.
- Stashenko, E. E.; Jaramillo, B. E.; Martínez, J. R. (2004). Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. J Chromatogr A 1025(1): 105-113.

- Sui, X., Yin, J., Ren, X. (2010). Antiviral effect of diammonium glycyrrhizinate and lithium chloride on cell infection by pseudorabies herpesvirus. Antiviral Research, 85(2): 346-353.
- Szpara, M.L., Kobilier, O., Enquist, L.W. (2010). A Common Neuronal Response to Alphaherpesvirus Infection. Journal of Neuroimmune Pharmacology, 5: 418-427.
- Takeuchi, H., Baba, M.; Baba, M.; Shigeta, S. (1991). An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. Journal of Virology Methods, 33(1-2): 61-71.
- Thiry, E., Meurens, F., Muylkens, B., McVoy, M., Gogev, S., Thiry, J., Vanderplasschen, A., Epstein, A., Keil, G., Schynts, F. (2005). Recombination in alphaherpesviruses. Reviews in Medicinal Virology, 15: 89-103.
- Tischer, B. K., Osterrieder, N. (2010). Herpesviruses- A zoonotic threat? Veterinary Microbiology, 140: 266-270.
- Vila Verde, G. M., Paula, J. R., Caneiro, D. M. (2003). Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). Revista Brasileira de Farmacognosia, 13(1): 64-66.
- Wang, Y. H.; Samoylenko, V.; Tekwani, B. L.; Khan, I. A.; Miller, L. S.; Chaurasiya, N. D.; Rahman, M. M.; Tripathi, L. M.; Khan S. I.; Joshi, V. C.; Wigger, F. T.; Muhammad I. (2010). Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. Journal of Ethnopharmacology 128(3): 662-671.
- Xiang, Y., Pei, Y., Wang, Y. (2008). Current Status of Natural Products from Plants as Anti-herpes Simplex Virus 1 Agents. Virologica Sinica, 23(5): 305-314.



Yancey, R. J. (1993). Recent Advances in Bovine Vaccine Technology.  
Journal of Dairy Science, 76: 2418-2436.

Yunes, R. A.; Calixto, J. B. (2001). Plantas Mediciniais: sob a ética da Química Medicinal  
Moderna. Chapecó - SC, Argos: 523.