

NATALIA FILARDI TAFURI

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS VEGETAIS E FLAVONOIDES
CONTRA O *Bovine herpesvirus 1* (BoHV1).**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2011**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

T124a
2011

Tafuri, Natalia Filardi, 1982-

Atividade antiviral de extratos vegetais e flavonoides
contra o *Bovine herpesvirus 1* (BOHV1) / Natalia Filardi
Tafuri. – Viçosa, MG, 2011.

xiii, 70f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 52-66.

1. Agentes antivirais. 2. Flavonoides. 3. Extratos vegetais.
 4. Herpesviridae. I. Universidade Federal de Viçosa.
- II. Título.


CDD 22. ed. 572.592

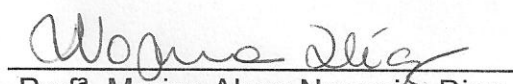
NATALIA FILARDI TAFURI

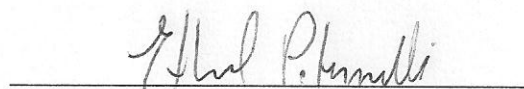
ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS VEGETAIS E FLAVONOIDES
CONTRA O *Bovine herpesvirus 1* (BoHV1).

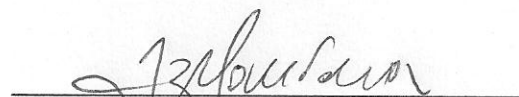
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 22 de fevereiro de 2011.


Prof. Abelardo Silva Júnior-DVT/UFV
(Co-Orientador)


Prof^a. Marisa Alves Nogueira Diaz
(Co-Orientadora)


Ethel F. de Oliveira Peternelli


Prof. Luiz Alberto Santana


Prof^a. Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo
(Orientadora)

“A Deus”

Força maior e constante em minha vida

“Aos meus Pais e Irmãos”

Minha família, minha vida

“Ao meu vizinho Amadeu’

(in memoriam)

Exemplo de amor e humildade.

***“Conquistas sem risos são sonhos sem méritos. Ninguém é digno dos sonhos se não usar suas derrotas para cultivá-los”
(Augusto Cury)***

AGRADECIMENTOS

A Deus, obrigada pela vida, pelas oportunidades e presença constante em todos os momentos de alegrias e tristezas.

A minha família por TUDO. Aos meus pais, Pedro Vitor e Regina, pelo amor incondicional, dedicação, incentivo e apoio. Ao meu irmão Pedrão, pela torcida e pela energia positiva. À minha irmã Nina pelo incentivo, conversas, risadas, presença constante e essencial, mesmo que à distância. À minha vizinha Arlete por ter permitido de maneira primordial que eu chegasse até aqui. Aos meus tios, primos e todos da minha família, pelo amor e carinho e em especial à Tia Lila, por ter me acolhido como “filha”. Amo vocês muito.

Ao meu namorado Lúdyo, pela paciência nos momentos de ausência, carinho e palavras de conforto nos momentos de tristeza e desânimo.

A minha orientadora Márcia Rogéria, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe e pelo apoio em todos os momentos durante o tempo de convivência.

Ao professor Abelardo, pela co-orientação, pelo apoio incondicional, pelos conhecimentos repassados e por disponibilizar o Laboratório de Virologia do Departamento de Veterinária para realização dos experimentos.

À professora Marisa, pela concessão dos extratos vegetais e do derivado sintético de dibenzoilmetano e pela co-orientação.

Ao professor João Paulo e professora Juliana Fietto, pela co-orientação e pelo exemplo de compromisso, dedicação e serenidade.

Ao professor Luiz Alexandre Peternelli, pelo auxílio na realização das análises estatísticas.

Aos funcionários do setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública do Departamento de Veterinária, pela colaboração.

Ao funcionário Marcos Salgado, Departamento de Veterinária, pela amizade, ensinamentos, conversa, risadas e ajuda em toda a pesquisa.

Ao funcionário Luiz Carlos, Departamento de Veterinária, pela disponibilidade em ajudar sempre.

Ao Sr. Valdir, pela convivência divertida e trabalho essencial ao LIMA.

A Fernanda Carvalho, minha estagiária, pela amizade, carinho e por estar sempre ao meu lado. Você é especial e foi essencial.

A todos os amigos do Laboratório de Virologia Animal e do Laboratório de Infectologia Molecular Animal pela amizade.

Aos amigos Marcus, Marcos, Hanna, Luiz, Clarisse e Giuliana pela ótima convivência e ajuda sempre.

Às flores do LIMA pela amizade, conversas, ajuda mútua e até pelos momentos de desespero juntas, através dos quais aprendemos muito.

À Luciana Marques pela amizade e exemplo de dedicação e organização.

À Myrian, pela companhia, amizade e incentivo.

À Julliane Frigine, pela consideração e lealdade.

A todos os amigos que em Viçosa conquistei, pela caminhada juntos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais, pela concessão da bolsa e financiamento do projeto.

Ao Laboratório de Virologia Animal da UFSM/RS pela concessão das amostras virais.

À Universidade Federal de Viçosa, particularmente ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo conhecimento e apoio fornecido através de seus professores e funcionários.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Compostos naturais.....	3
2.1.2 Flavonoides.....	6
2.1.2.1 Estrutura e Função.....	6
2.1.2.2 Atividades Biológicas.....	8
2.1.2.3 Atividade Antiviral dos Flavonoides.....	11
2.1.2.4 Quercetina.....	14
2.1.2.5 Derivados de Dibenzoilmetano.....	15
2.2 Antivirais.....	16
2.3 Herpesvírus.....	18
2.3.1 Bovine herpesvirus 1 (BoHV1).....	19
2.3.1.1 Características Gerais do Agente.....	19
2.3.1.2 Replicação Viral.....	21
2.3.1.3 Epidemiologia.....	21
2.3.1.4 Transmissão e Patogenia.....	22
2.3.1.5 Manifestações Clínicas.....	23
2.3.1.5.1 Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR).....	23
2.3.1.5.2 Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV) e Balanopostite Pustular Infecciosa (IBP).....	24
2.3.1.6 Diagnóstico.....	24
2.3.1.7 Vacinação e Controle.....	25
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos.....	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28

4.1 Células e Vírus.....	28
4.2 Extratos e Substâncias.....	28
4.3 Preparação dos Estoques de Vírus e Titulação.....	29
4.4 Análises <i>in vitro</i>	29
4.4.1 Análise do Efeito Citotóxico.....	29
4.4.2 Determinação da Atividade Virucida.....	31
4.4.3 Análise do Efeito Durante o Ciclo de Replicação Viral (Ensaio timing of addition).....	31
4.5 Análise Estatística.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Análises <i>in vitro</i>	33
5.1.1 Análise do Efeito Citotóxico.....	33
5.1.2 Testes Antivirais.....	36
5.1.2.1 Testes Antivirais do DMSO.....	37
5.1.2.2 Testes Antivirais dos Flavonoides.....	38
5.1.2.2.1 Testes Antivirais da Quercetina.....	39
5.1.2.2.2 Testes Antivirais do Derivado Sintético de Dibenzoilmetano-TMDMB ₂	41
5.1.2.3 Testes Antivirais dos Extratos Vegetais.....	42
5.1.2.3.1 Testes Antivirais do Extrato Hexânico.....	43
5.1.2.3.2- Testes antivirais do Extrato Diclorometano.....	44
5.1.2.3.3- Testes antivirais do Extrato Etanólico.....	46
6 CONCLUSÕES.....	50
7 PERSPECTIVAS.....	51
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
APÊNDICE 1.....	67
APÊNDICE 2.....	68
APÊNDICE 3.....	69
APÊNDICE 4.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Núcleo fundamental dos flavonoides.....	7
Figura 2: Esquema do ciclo infectivo viral. O X representa possível inibição da fase por flavonoides.....	12
Figura 3: Estrutura química da quercetina e rutina.....	14
Figura 4: Núcleo fundamental dos dibenzoilmetanos.....	16
Figura 5: Microscopia eletrônica de um vírion de um alphaherpesvírus..	19
Figura 6: Organização genômica do BoHV1.....	20
Figura 7: Células MDBK não tratadas (A) e após tratamento com extrato hexânico em três concentrações diferentes (B: 40 µg/mL, C: 50 µg/mL e D: 80 µg/mL). Observação em microscópio óptico no aumento de 20X.....	35
Figura 8: Toxicidade do DMSO, Quercetina, TMDMB ₂ e extratos vegetais para células MDBK, determinada pelo ensaio de MTT. Eh:extrato hexânico; Ee:extrato etanólico; Ed:extrato diclorometano. A CMNT de cada composto está indicada pela seta em negrito.....	36
Figura 9: Atividade do DMSO (0,8% e 1,5%) sobre as partículas de BoHV1 em diferentes tempos, obtida pela média de 3 réplicas.....	37
Figura 10: Efeito da adição de DMSO em diferentes etapas do ciclo replicativo do BoHV1. Duas concentrações de DMSO (0,8% e 1,5%) foram adicionadas nas etapas de pré-tratamento (PT), adsorção (ADS), penetração (PEN) e intracelular (IC).....	38
Figura 11: Atividade da quercetina (3 µg/mL, 10 µg/mL e 18 µg/mL) sobre partículas de BoHV1 em diferentes tempos, obtida pela média de 3 réplicas.....	39
Figura 12: Efeito da adição de quercetina em diferentes etapas do ciclo replicativo do BoHV1. Três concentrações de quercetina (3 µg/mL, 10 µg/mL e 18 µg/mL) foram adicionadas nas etapas de pré-tratamento (PT), adsorção (ADS), penetração (PEN) e intracelular (IC). *concentração estatisticamente diferente do controle (p<0,05).....	40
Figura 13: Atividade do TMDMB ₂ (0,08 µg/mL e 0,5 µg/mL) sobre partículas de BoHV1 em diferentes tempos, obtida pela média de 3 réplicas.....	41

Figura 14: Efeito da adição de TMDMB ₂ em diferentes etapas do ciclo replicativo do BoHV1. Duas concentrações de TMDMB ₂ (0,08 µg/mL e 0,5 µg/mL) foram adicionadas nas etapas de pré-tratamento (PT), adsorção (ADS), penetração (PEN) e intracelular (IC).....	42
Figura 15: Atividade do extrato hexânico (8 µg/mL, 15 µg/mL, 35 µg/mL) sobre partículas do BoHV1 em diferentes tempos, obtida pela média de 3 réplicas.....	44
Figura 16: Efeito da adição do extrato hexânico em diferentes etapas do ciclo replicativo do BoHV1. Três concentrações do extrato (8 µg/mL, 15 µg/mL, 35 µg/mL) foram adicionadas nas etapas de pré-tratamento (PT), adsorção (ADS), penetração (PEN) e intracelular (IC). *concentração estatisticamente diferente do controle (p<0,05).....	45
Figura 17: Atividade do extrato diclorometano (5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL) sobre partículas de BoHV1 em diferentes tempos, obtida pela média de 3 réplicas.....	45
Figura 18: Efeito da adição do extrato diclorometano em diferentes etapas do ciclo replicativo do BoHV1. Três concentrações do extrato (5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL) foram adicionadas nas etapas de pré-tratamento (PT), adsorção (ADS), penetração (PEN) e intracelular (IC). *concentração estatisticamente diferente em relação ao controle (p<0,05).....	46
Figura 19: Atividade do extrato etanólico (10 µg/mL, 25 µg/mL, 40 µg/mL) sobre partículas de BoHV1 em diferentes tempos, obtida pela média de 3 réplicas.....	47
Figura 20: Efeito da adição do extrato etanólico em diferentes etapas do ciclo replicativo do BoHV1. Três concentrações do extrato (10µg/mL, 25µg/mL, 40µg/mL) foram adicionadas nas etapas de pré-tratamento (PT), adsorção (ADS), penetração (PEN) e intracelular (IC). *concentração estatisticamente diferente em relação ao controle (p<0,05).....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esqueleto estrutural de algumas classes de flavonoides.....	8
Tabela 2: Vírus inibidos por flavonoides.....	11
Tabela 3: Concentração máxima não tóxica (CMNT) dos compostos para célula MDBK e concentrações escolhidas para os testes antivirais (C1,C2, C3).....	33
Tabela 4: Porcentagem de redução de título viral e relação aos títulos com e sem tratamento, representando a atividade virucida dos compostos sobre o BoHV1.....	67
Tabela 5: Porcentagem de redução de título viral e relação dos títulos com e sem tratamento representando a ação antiviral dos compostos no ciclo infectivo do BoHV1.....	68
Tabela 6: Resultados do teste de inativação direta e <i>timing of addition</i> , mostrando a atividade antiviral da quercetina, TMDMB ₂ , e dos extratos vegetais (Eh, Ed, Ee).....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abifisa: Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde	KMC: célula tumoral de ducto biliar
ADS: fase de adsorção do ensaio <i>timing of addition</i>	L: late mRNA
BCC-1: célula de carcinoma basal	MDBK: Madin Darby Bovine Kidney
C1,C2, C3: concentração 1, 2 e 3 respectivamente	MEM: meio essencial mínimo
C-3: carbono 3 de uma molécula	MTT: 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,-difeniltetrazolium brometo
C-7: carbono 7 de uma molécula	OIE: World Organization for Animal Health
CMNT: concentração máxima não tóxica	PBS: tampão fosfato salino (phosphate buffer solution)
CT ₁₀ : concentração do composto responsável pela redução de 10% da densidade óptica	PEN: fase de penetração do ensaio de <i>timing of addition</i>
DBM: 1,3-difenil-propano-1,3-diona	p.i.: pós-infecção
DMSO: dimetilsulfóxido	PT: fase de pré-tratamento do ensaio de <i>timing of addition</i>
DO: densidade óptica	RNApol II: RNA polimerase II
E: early mRNA	ROS: espécies reativas de oxigênio
Eh: extrato hexânico	SAEG: sistema para análises estatísticas
Ee: extrato etanólico	SFB: soro fetal bovino
Ed: extrato diclorometano	SPSS: Statistical Package for the Social Sciences
ECP: efeito citopático	SW480: célula tumoral de cólon de útero humano
gB, gC, gH, gK, gL, gM, gD, gE, gG, gl: glicoproteínas	TCID ₅₀ : dose 50% infectiva em cultura de Tit.C.: titulação controle
IC: fase intracelular do ensaio de <i>timing of addition</i>	Tit.T.: titulação teste
IC ₅₀ : concentração inibitória para 50% das células/animais infectados	UL: segmento longo único
ID ₅₀ : dose 50% infectiva	US: segmento curto único
IE: immediate early mRNA	VERO: célula de rim de macaco verde
	WHO: World Health Organization

RESUMO

TAFURI, Natalia Filardi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Atividade antiviral de extratos vegetais e flavonoides contra o *Bovine herpesvirus 1 (BoHV1)***. Orientadora: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-orientadores: Abelardo Silva Júnior, João Paulo Viana Leite, Juliana Lopes Rangel Fietto e Marisa Alves Nogueira Diaz.

As infecções virais ainda são tidas como desafio para a saúde pública e setor agropecuário. Diversos estudos têm como foco a descoberta de novos antivirais derivados de produtos naturais, principalmente vegetais. Os herpesvírus são uma classe muito utilizada nestas pesquisas, devido à importância para a saúde pública e impacto econômico. Neste contexto, o presente estudo busca avaliar o efeito *in vitro* de dois flavonoides e três extratos vegetais, na replicação *in vitro* do bovine herpesvirus 1 (BoHV1). A concentração máxima não tóxica (CMNT) do DMSO e dos compostos foi mensurada por uma variação do método colorimétrico baseado na redução do sal MTT. As CMNT obtidas foram 20µg/mL para quercetina, 1,5µg/mL para o TMDMB₂, 1,5% (v/v) para o DMSO e 40, 25 e 60 µg/mL para os extratos hexânico, diclorometano e etanólico respectivamente. A atividade antiviral dos compostos foi avaliada por meio do ensaio de determinação da atividade virucida e ensaio de tempo de adição das drogas em diferentes etapas do ciclo replicativo viral (ensaio *timing of addition*). O DMSO não apresentou atividade antiviral em nenhum dos ensaios realizados. Todas as substâncias avaliadas apresentaram significativo efeito virucida. A quercetina e o extrato diclorometano demonstraram efeito no ensaio de adição da droga nas etapas de adsorção e penetração viral. O extrato hexânico, mostrou redução do título viral apenas na fase de penetração viral. O extrato etanólico interferiu em todas as etapas da replicação *in vitro* do BoHV1, se mostrando o composto mais eficaz. Os resultados deste trabalho sugerem a importância dos compostos avaliados para a medicina veterinária e humana, pois eles se mostraram promissores para o desenvolvimento de novas terapias antivirais.

ABSTRACT

TAFURI, Natalia Filardi, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Antiviral activity of plants extracts and flavonoids against *Bovine herpesvirus 1 (BoHV1)***. Advisor: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-advisors: Abelardo Silva Júnior, João Paulo Viana Leite, Juliana Lopes Rangel Fietto and Marisa Alves Nogueira Diaz.

The infections turn are had still as challenge for the public health and agricultural section. Several studies have as focus the discovery of new antiviral derived of natural products, mainly plants. The herpesvirus are one of the most used groups on this kind of research, due to importance for the public health and economical impact. Therefore, the purpose of this work was to evaluate the antiviral effects of flavonoids and three plants extract on the *in vitro* replication of bovine herpesvirus 1 (BoHV1). The the maximum non-cytotoxic concentration (CMNT) of DMSO and compounds it was measured by a variation of the method colorimeter based on the reduction of the salt MTT. The results showed that CMNT was 20 µg/mL for quercetina, 1.5 µg/mL for µg/mL and 1.5% for DMSO. For hexanic, dichloromethane, and etanolic extracts the values were 40, 25, and 60 µg/mL, respectively. Compounds' antiviral activity was evaluated through the rehearsal of determination of the virucidal activity and rehearsal of time of addition of the drugs in different stages of the cycle replicativo viral (*timing of addition* assays). DMSO did not present any activity in none of the accomplished experimental tests. All of substances presented significant virucidal effect. The quercetin and the dichloromethane extract demonstrated effect in the rehearsal of addition of the drug in the stages of adsorption and penetration viral. The hexanic extract showed reduction of the title viral just in the phase of penetration stage. The ethanolic extract interfered on all stages of the replication *in vitro* of BoHV1, showing to be the most effective compound. The results of this work suggest the importance of the evaluated compounds for the veterinary and human medicine since they appear to be promising for the development of new antiviral therapies.

1 INTRODUÇÃO

As infecções virais são, atualmente, um grande problema de saúde pública e do setor agropecuário mundial, com perdas econômicas da pecuária mundial gerando em torno de US\$ 1 bilhão por ano (Mahony, 2010). Sendo assim, estudos que visam o desenvolvimento de estratégias e produtos para o controle da propagação e manifestação de tais doenças, além da inativação destes patógenos, são de grande interesse científico e industrial (Brady e Bernstein, 2004; Greco *et al.*, 2007; Billaud *et al.*, 2009).

O uso de produtos naturais para fins terapêuticos é uma prática ancestral que muito favorece a medicina atual, aumentando consideravelmente a expectativa de vida a partir do século 20 (Demain, 2009). Muitos são os exemplos de medicamentos produzidos sinteticamente a partir de metabólitos secundários derivados de plantas e microorganismos, produzidos a partir do conhecimento das estruturas desses produtos: a penicilina, um antibiótico de uso disseminado é derivado do fungo *Penicillium notatum*, a aspirina® derivada da casca do salgueiro (*Salix alba*), a digoxina um digitálico derivado da planta *Digitalis lanata*, o antiviral aciclovir derivado de metabólitos isolados de esponjas e o anti-inflamatório Acheflan®, produzido a partir da planta *Cordia verbenacea*, o primeiro medicamento fitoterápico totalmente produzido no Brasil (Demain, 2009; Leite, 2009a; Acheflan®, 2011).

Entre os compostos naturais, os metabólitos secundários vegetais possuem um papel fundamental na pesquisa por diferentes compostos antivirais bioativos, com resultados bastante promissores para a atividade antiviral de flavonoides isolados ou constituintes de extratos vegetais (Choi *et al.*, 2009; Nolkemper *et al.*, 2010).

Experimentos anteriormente realizados no Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA/UFV) já demonstraram a ação de flavonoides contra diversos vírus de importância veterinária. A quercetina mostrou efeito antiviral eficaz em ensaios *in vitro* com *equine herpesvirus 1* (EHV-1) (Gravina *et al.*, 2010; Souza, 2007), *bovine herpesvirus 5* (BoHV-5) (Souza, 2007), *canine parvovirus 2* (CPV-2) (Souza, 2007) e *canine distemper virus* (Brum, 2006). A morina também apresentou efeito antiviral expressivo contra o EHV-1 e o ácido

trans-cinâmico, um precursor de flavonoides, foi capaz de reduzir o título viral em ensaios com *canine distemper virus* (Brum, 2006).

Os estudos para avaliar a atividade de fármacos antivirais são realizados em diferentes modelos utilizando diversas famílias virais. Entre elas, estão as pesquisas do potencial terapêutico de substâncias naturais contra as infecções herpéticas, devido às suas características de infecção e à grande importância para saúde pública e impacto econômico de suas infecções nos animais e humanos.

Na prática veterinária, o *bovine herpesvirus 1* (BoHV1) é um patógeno de distribuição mundial (Del Fava,1998) que ainda causa grandes perdas econômicas, principalmente pelos danos reprodutivos do rebanho infectado, não controlados pela vacina contra este patógeno (Felipe *et al.*, 2006; Mahony, 2010). Neste sentido, nesta pesquisa avaliamos extratos vegetais e substâncias puras quanto a seus potenciais antivirais *in vitro* contra o BoHV1, podendo estes compostos serem utilizados para outros estudos contra outros vírus veterinários e humanos com estrutura semelhante ao BoHV1 e constituírem-se protótipos de novos medicamentos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Compostos naturais

Os produtos naturais têm sido utilizados para o tratamento de doenças desde o início da história humana (Pinto *et al.*, 2002; Leite, 2009a).

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a Organização Mundial de Saúde reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que, 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde, sendo 85% desta prática resultado da utilização de plantas ou suas preparações (WHO, 2002). Essa realidade não é diferente no Brasil, onde 91,9% da população faz uso terapêutico de compostos vegetais (Abifisa, 2011). No entanto, somente recentemente pôde ser observado um crescimento considerável em pesquisas avaliando o potencial e o próprio uso terapêutico dos produtos naturais, principalmente aqueles derivados de plantas (Leite *et al.*, 2008; Simoni *et al.*, 2007). Essas pesquisas são muito importantes, pois quase sempre os derivados vegetais são utilizados de forma empírica, fruto do conhecimento repassado entre gerações. Essa utilização sem comprovação científica favorece a preparação e/ou aplicação de medicamentos naturais de forma errônea, potencializando o risco de efeitos adversos, toxicidade ou falta efetiva de efeito farmacológico (Husdon e Towers, 1993).

Para o uso farmacológico de produtos derivados de compostos naturais, é preciso avaliar um número de padrões de qualidade em nível de processamento do material e em teste de eficácia (Cos *et al.*, 2006) e alguns critérios para seleção de novos produtos farmacêuticos também devem ser seguidos; por exemplo, eles devem ser econômicos ou de baixo custo de produção, rentáveis e seguros para o paciente e para o meio ambiente (Mcchesney *et al.*, 2007).

No processo de obtenção de novos fármacos, dois aspectos distinguem os produtos de origem natural dos sintéticos: a diversidade estrutural e a função biológica. A diversidade estrutural dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos produtos de síntese. Além disso, existem em uma

mesma planta substâncias de um mesmo grupo químico, com similaridade estrutural, possibilitando uma maior chance de descoberta de informações sobre estrutura-atividade (Harvey, 1999; Nodari e Guerra, 2001). Sendo assim, os compostos naturais, na forma de extrato bruto, semi-puro ou composto natural purificado, são tidos como alternativa promissora na descoberta de importantes moléculas bioativas ainda desconhecidas produzindo novas terapias para diferentes moléstias, como câncer, doenças infecciosas, doenças crônicas (hipertensão, diabetes mellitus) entre outras (Cos *et al.*, 2006; Nobili *et al.*, 2009). Além disso, podem fornecer novas drogas ao servirem de modelo para desenho e síntese de um novo composto ou base para processos de semi-síntese, que por modificações nas estruturas de grupos funcionais formam análogos com alta atividade farmacológica e poucos efeitos colaterais (Gordaliza, 2007).

Desde a década de 80 a produção de drogas derivadas de produtos naturais é expressiva. Estima-se que 60% dos produtos aprovados mundialmente para uso na terapêutica são desenvolvidos a partir de fontes naturais: 6% são produtos naturais, 31% derivados de produtos naturais e 23% sintetizados mimetizando um produto natural (Newman *et al.*, 2003; Newman e Cragg, 2007; Demain, 2009). Embora esses números sejam expressivos, é relevante acrescentar que apenas 15% das espécies vegetais conhecidas no planeta já foram estudadas quimicamente, e apenas 5% apresenta algum relato de estudo farmacológico na literatura (Leite *et al.*, 2008). Mesmo assim, os produtos derivados de compostos naturais são altamente lucrativos no mercado internacional. No Brasil, estima-se que 25% dos US\$ 8 bilhões do faturamento da indústria farmacêutica, no ano de 1996, foram originados de medicamentos derivados de plantas (Nodari e Guerra, 2001; Harvey, 2000). Mais especificamente, o faturamento anual mundial de fitoterápicos em 2010 atingiu 44 bilhões de dólares e no Brasil a estimativa foi de 350 a 550 milhões/ano de faturamento (Abifisa, 2011).

Exemplos de drogas obtidas a partir de extratos vegetais são: a morfina, um potente analgésico derivado do ópio (*Papaver somniferum*), a digoxina, um cardiotônico derivado da digital (*Digitalis* spp.) e a quinidina, uma substância antimalária derivada da *Cinchona* spp., (Cass, 2004; Rates, 2001; Harvey, 1999). Exemplos mais recentes são o Acheflan® e o Daflon®. O primeiro é um anti-inflamatório oriundo de pesquisa 100% nacional, produzido com óleo

essencial de erva-baleeira (*Cordia verbenacea*) (Acheflan®, 2011). O Daflon® 500mg, apresenta ação venotônica e vasoprotetora e é um medicamento composto por fração flavonoídica purificada, sob forma micronizada, contendo 450 mg de diosmina e 50 mg de flavonoides titulados em hesperidina, que apresenta ação venotônica e vasoprotetora (Servier, 2011).

O Brasil, com a grandeza de sua biodiversidade, possui aproximadamente 25% do patrimônio genético mundial, sendo um alvo da comunidade científica em pesquisas por novos compostos naturais bioativos (Leite, 2009a). Essa biodiversidade brasileira, se melhor aproveitada para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, poderia gerar anualmente 5 bilhões de dólares. No entanto, a pequena demanda e os elevados custos para a produção de fitoterápicos tornam esse mercado menos lucrativo, sendo os produtos naturais nacionais utilizados principalmente para exportação, principalmente para Estados Unidos e Alemanha. Entre 1994 e 1998, esses países importaram, respectivamente, 1.521 e 1.466 toneladas de “material vegetal do Brasil” (Reuters, 2002). Na Alemanha 50% dos medicamentos comercializados são fitoterápicos e a prescrição destes produtos alcança mais de 70% (Abifisa, 2011). No Brasil essa realidade é diferente. Somente em 2006, o Ministério da Saúde instituiu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, garantindo a produção e distribuição de fitoterápicos à população e estimulando a pesquisa para a certificação da atividade terapêutica de várias espécies vegetais já tradicionalmente utilizadas (Brasil, 2011), o que favorece a expansão do mercado fitoterápico brasileiro.

Os fitoterápicos são definidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO) como os medicamentos derivados da preparação de plantas com propriedades terapêuticas comprovadas, obtidos através da extração, fracionamento, purificação, concentração ou outros processos físicos ou biológicos e que possuem registro de qualidade (WHO, 2002).

Os produtos naturais são agentes anti-infecciosos importantes (Demain, 2009), sendo, portanto, compostos de grande interesse no combate às infecções virais. Eles interferem com um ou mais processos durante a biossíntese viral ou inativam o vírus extracelular e são conseqüentemente candidatos para o uso clínico. Os métodos geralmente usados para a avaliação da atividade antiviral *in vitro* são baseados nas diferentes habilidades dos vírus de se replicar em cultivos celulares. Alguns causam efeitos citopáticos (ECP)

ou formam placas de lise. A replicação viral também pode ser monitorada pela detecção de produtos virais, isto é, DNA, RNA ou polipeptídeos virais (Cos *et al.*, 2006).

A pesquisa por compostos vegetais com atividade antiviral é realizada há algum tempo em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Como resultado, diversos estudos já têm apresentado relatos de extratos vegetais com ação antiviral para vírus que infectam humanos e animais (Kim *et al.*, 2010; Nolkemper *et al.*, 2010).

Entre os compostos do metabolismo secundário vegetal com atividade antiviral, podemos citar os flavonoides, taninos, saponinas, ácidos fenólicos, alcalóides, entre outros (Hofmann JR *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2007; Schnitzler *et al.*, 2008), sendo os flavonoides metabólitos bastantes pesquisados para a atividade antiviral.

Em um estudo publicado por Nolkemper *et al.* (2010) os extratos aquoso e etanólico de própolis, produzido pela espécie *Apis mellifera*, apresentaram efeitos de supressão contra o herpesvírus simplex 2 (HSV-2), sendo o efeito antiviral diretamente dependente da combinação de diferentes compostos, como polifenóis, entre eles flavonoides e ácidos fenilcarboxílicos. Em 2007, Muller *et al.* avaliaram a atividade antiviral de diferentes extratos de plantas da América do Sul contra herpesvírus simplex 1 (HSV-1), mostrando que o extrato aquoso das folhas da espécie *Ilex paraguariensis* apresenta forte atividade antiviral contra HSV-1, relacionada possivelmente à grande concentração de saponinas triterpênicas e derivados do ácido cafeoilquínico. No mesmo estudo, o extrato metanólico de folhas de *Lafoensia pacari* apresentou atividade antiherpética relacionada à presença de taninos. Já a atividade antiherpética da espécie *Passiflora edulis* parece estar relacionada à presença de flavonoides e saponinas.

2.1.2 Flavonoides

2.1.2.1 Estrutura e Função

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos bioativos mais importantes entre os produtos de origem natural (Ramos, 2007), sendo uma classe de considerável interesse científico e terapêutico. Dos 4000 flavonoides

até hoje conhecidos a grande maioria está incluída regularmente na dieta humana (Comalada *et al.*, 2006).

Os flavonoides podem ser encontrados em diferentes formas estruturais, com um núcleo fundamental de 15 átomos de carbono, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos, como esquematizado na figura 1.

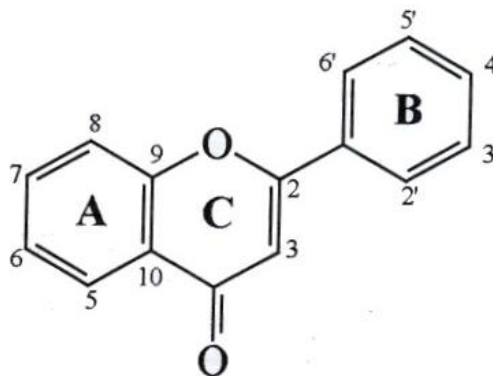


Figura 1: Núcleo fundamental dos flavonoides.

Os flavonoides de origem natural apresentam-se frequentemente oxigenados e conjugados a açúcares, sendo esta forma conhecida como heterosídeo ou forma conjugada. Os carboidratos estão ligados à genina preferencialmente pelos carbonos 3 e 7, podendo ser cruciais para a atividade biológica dos flavonoides (Williams e Harborne, 1994; Zuanazzi, 2001). Quando o flavonóide encontra-se sem o açúcar é chamado de genina ou aglicona, sendo frequentemente também denominado de forma livre. Como heterosídeo, a molécula de flavonóide não pode ser absorvida pelo epitélio intestinal. Assim, a hidrólise enzimática dos glicosídeos pela microbiota intestinal libera suas formas livres favorecendo a absorção (Comalada *et al.*, 2006). Choi *et al.*(2009), avaliaram a atividade antiviral de flavonoides ligados ou não à uma molécula de açúcar, mostrando que aquelas substâncias ligadas ao açúcar pelo C-7 apresentaram uma maior atividade antiviral.

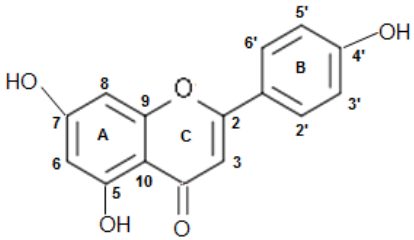
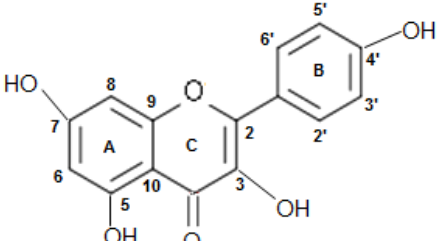
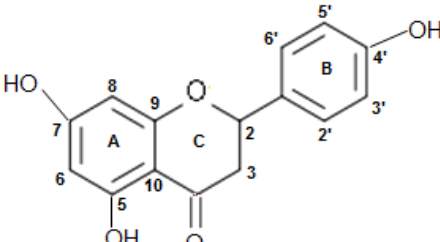
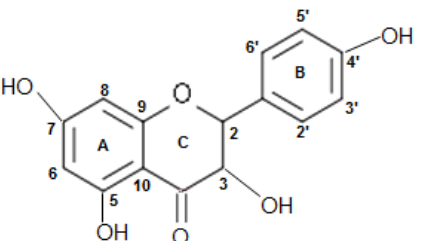
Variações na estrutura básica dos flavonoides permitem a existência de diferentes subclasses, com atividades biológicas bastante diversas, como mostrado na tabela 1 (Cushnie e Lamb, 2005).

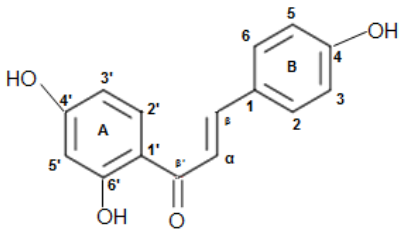
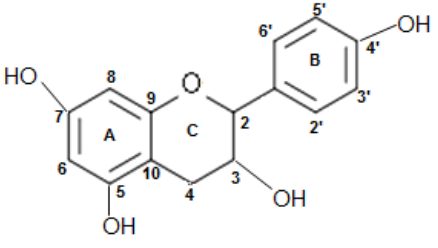
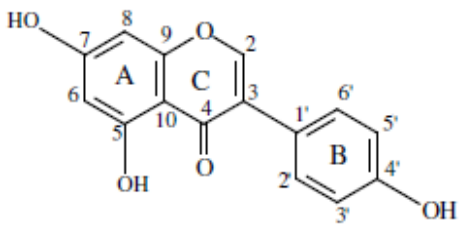
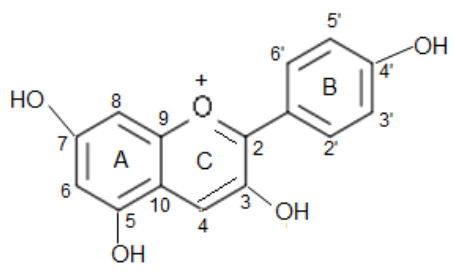
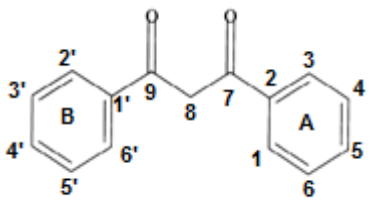
2.1.2.2 Atividades Biológicas

Os flavonoides e outros compostos fenólicos têm sido relatados como possuidores de efeitos fisiológicos diversos em plantas e animais (Machado *et al.*, 2008).

Nas plantas, os flavonoides desempenham diversas funções, como proteção contra raios ultravioleta e visível, proteção contra insetos, fungos, bactérias e vírus, ação antioxidante, controle hormonal, inibição enzimática e efeito alelopático (Havsteen, 2002; Cushnie e Lamb, 2005).

Tabela 1: Esqueleto estrutural de algumas classes de flavonoides (Adaptado de Cushnie e Lamb, 2005).

Classe	Estrutura do núcleo fundamental	Exemplo
Flavona		Apigenina
Flavonol		Quercetina
Flavanona		Naringenina
Flavanonol		Taxifolina

Clalcona		Buteína
Flavan-3-ol		Catequina
Isoflavona		Genisteína
Antocianidina		Cianidina
Derivados de Dibenzoilmetano		TMDMB ₂

Os mecanismos de ação dos flavonoides nas suas diferentes atividades biológicas vêm sendo desvendados por meio de muitas pesquisas. Estas buscam definir os efeitos desses compostos *in vitro*, por meio de estudos utilizando diversos tipos celulares, e *in vivo*, avaliando em vários modelos a interferência dos flavonoides na fisiologia e metabolismo celular (Spencer *et al.*, 2003).

Uma propriedade amplamente estudada dos flavonoides é a sua capacidade antioxidante. Quimicamente, são doadores de elétrons. Eles apresentam estruturas químicas conjugadas em anel β , ricas em grupos

hidroxilas, que tem potenciais ações antioxidantes por reagirem e inativarem ânions superóxido, oxigênio singlete, radicais peróxido de lipídios e/ou estabilizando radicais livres envolvidos no processo oxidativo através da hidrogenação ou complexação com espécies oxidantes (Birt *et al.*, 2001).

Muitas outras atividades biológicas dos flavonoides têm sido pesquisadas e relatadas. Estudos farmacocômicos mostraram que seis flavonoides isolados de três plantas medicinais, utilizadas na Turquia, apresentaram consideráveis atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral (Orhan *et al.*, 2009).

Os flavonoides também apresentam capacidade de proteção contra doenças cardiovasculares, redução de pressão arterial, efeito antitumoral, antiespasmódico e antidiarréico (Halliwell *et al.*, 1995; Carlo *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 2000; Yanmg *et al.*, 2001; Marchand, 2002; Sakihama *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2003; Kuo *et al.*, 2005). Além disso, os flavonoides apresentam efeito antitumoral, relacionados a diferentes mecanismos associados com a toxicidade celular desses compostos flavonoides, incluindo a inibição da DNA topoisomerase (Constantinou *et al.*, 1995), inibição de proteassomas e da síntese de ácidos graxos, inativação da fosfatidilinositol-3-quinase e a indução de bloqueio do ciclo celular (Plochmann *et al.*, 2007).

Os efeitos dos flavonoides em processos inflamatórios também têm sido descritos e já se sabe que eles inibem várias enzimas que são ativadas em certas condições inflamatórias (Kwon *et al.*, 2005). De acordo com García-Mediavilla *et al.* (2007), o flavonóide caenferol produz uma redução, dependente da concentração, nos níveis de expressão das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS), cicloxigenase-2 (COX-2) e proteína C reativa (CRP), as quais estão envolvidas na produção da resposta inflamatória. A quercetina também reduziu o nível de expressão dessas proteínas, porém, somente em altas concentrações. Além disso, os flavonoides são conhecidos por estimular a resposta imune tanto celular quanto humoral. Embora o preciso mecanismo ainda seja desconhecido, é possível que os flavonoides estimulem a produção de citocinas, particularmente as interleucinas 1 e 2 (IL-1 e IL-2), as quais possuem ação mitogênica para linfócitos T e B (Havsteen, 2002). De acordo com Fisher *et al.* (2007), a associação do extrato etanólico de própolis verde com uma vacina oleosa inativada contra BoHV-5 aumentou a resposta imune humoral medida pelo título de anticorpos neutralizantes. Os compostos da própolis responsáveis pela atividade imunoestimuladora não foram ainda

determinados, no entanto, os autores verificaram elevado teor de flavonoides e compostos fenólicos nas amostras de própolis estudadas e sugerem que estes compostos tenham sido as principais substâncias que agiram no sistema imune.

Os diversos efeitos exercidos pelos flavonoides podem estar relacionados às propriedades inibitórias que os flavonoides desempenham nos vários sistemas enzimáticos incluindo hidrolases, isomerases, oxigenases, oxidoredutases, polimerases, fosfatases, proteínas fosfoquinases e aminoácido oxidases (Ferguson, 2001), podendo exercer ações modulatórias nas células pela interação com um amplo espectro de alvos moleculares centrais da maquinaria de sinalização celular (Soobrattee *et al.*, 2005).

2.1.2.3 Atividade Antiviral dos Flavonoides

A atividade antiviral dos flavonoides tem sido investigada desde a década de 40, com efeito relatado contra diferentes vírus humano e veterinário em condições *in vitro* e *in vivo*, como mostrado na tabela 2.

Tabela 2: Vírus inibidos por flavonoides.

Vírus	Composto inibitório	Dose inibitória (IC ₅₀)	Modelo	Referências
<i>Human adenovirus 3 and 8</i>	Quercetina	0,2mM	células BCC-1 /KMC	Chiang <i>et al.</i> , 2003.
<i>Bovine herpesvirus 1</i>	Genistéina	25µM	células MDBK	Akula <i>et al.</i> , 2002.
<i>Bovine virus diarrhea virus</i>	Genistéina	185-370µM	células MDBK	Lecot <i>et al.</i> , 2005.
<i>Human herpesvirus 1</i>	Caenferol	0,4µM	células VERO	Lyu <i>et al.</i> , 2005; Amoros <i>et al.</i> , 1992
<i>Human herpesvirus 2</i>	Genistéina	50µM	células VERO	Lyu <i>et al.</i> , 2005.
<i>Equine herpesvirus 1</i>	Quercetina Morina	Diversas*	células VERO	Gravina <i>et al.</i> , 2010.

*Diferentes concentrações apresentaram atividade antiviral, nos diferentes testes realizados.

A atividade antiviral dos flavonoides está relacionada com a interferência deles em diferentes etapas do ciclo replicativo viral (figura 2).

A infecção viral se inicia pela interação entre as partículas virais e os receptores da membrana plasmática das células-alvo. Quando as partículas virais atravessam a membrana, diferentes eventos ocorrem com o objetivo de expor o material genético viral (Simoni, 2003). Um exemplo desses eventos de desnudamento é a fusão da membrana viral com a membrana lisossomal. Havsteen (2002), apud Miller e Lenard (1981), relata a inibição dessa fusão por flavonoides, justificando o efeito terapêutico desses metabólitos vegetais contra infecções virais.

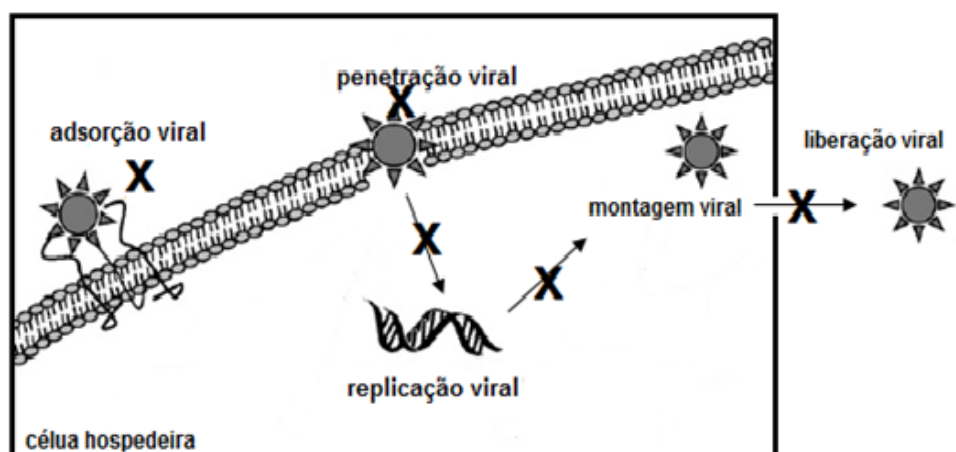


Figura 2: Esquema do ciclo infeccioso viral. O X representa possível inibição da fase por flavonoides (Adaptado de Andres *et al.*, 2009).

Embora outros estudos substanciem esse efeito dos flavonoides (Choi *et al.*, 1999; Guttner *et al.*, 1982), o mecanismo exato da inibição da fusão ainda permanece desconhecido. Algumas suposições já foram levantadas. Uma delas seria a inibição da formação de prostaglandinas pelos flavonoides, pois elas atuam diretamente no processo de fusão da membrana viral e lisossomal (Nagai *et al.*, 1995a,1995b; Carpenedo *et al.*, 1969). Outra hipótese seria a inibição da bomba de prótons dos lisossomos pelos flavonoides. Essa bomba é responsável pela ativação dos lisossomos, e assim, inibindo-a, a liberação do material genético viral e a propagação do ciclo replicativo viral seriam impedidas (Bertorello *et al.*, 1991; Horisberger *et al.*, 1991).

Diante da necessidade da descoberta por novas drogas antivirais, os estudos utilizando flavonoides isolados e outras substâncias vegetais foram se multiplicando em todo o mundo e até hoje continuam como uma forte linha de pesquisa da saúde humana e veterinária.

Hoof *et al.* (1984) estudando plantas medicinais africanas demonstraram a atividade antiviral de uma série de flavonas obtidas do extrato de *Euphorbia grantii*. Esse extrato apresentou um pronunciado efeito inibidor sobre os picornavirus e o vírus da estomatite vesicular.

Os flavonoides quercetina, naringenina, hesperidina e catequina foram relacionadas como compostos ativos contra o *human herpesvirus 1* (HHV-1), *human enterovirus C* e a acacetina-7-O- β -O-galactopiranosídeo e a flavona chrisina relacionadas como compostos com alto índice terapêutico antiviral contra o *human immunodeficiency virus 1* (HIV-1) (Sy *et al.*, 2005). A quercetina-7-raminosídeo demonstrou forte atividade contra o *porcine epidemic diarrhea virus* (PED) (Choi *et al.*, 2009). A quercetina também já demonstrou ser inibidora da enzima transcriptase reversa de vírus RNA (Ono *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1994).

Outros grupos de flavonoides, como a baicalina, já foram descritos como inibidores do HIV-1, atenuando a capacidade do vírus de se ligar e ativar receptores celulares. Essa inibição envolve dois tipos de mecanismos, a de ligação do flavonóide a glicoproteínas do envelope e a receptores celulares, principalmente receptores CD4⁺, e a parada de síntese de DNA celular que contribui para uma menor replicação viral (Li *et al.*, 2000). Outro mecanismo antiviral dos flavonoides é também a inibição da transcriptase reversa, dificultando a síntese de DNA viral impedindo a posterior integração ao genoma do hospedeiro (Spedding *et al.*, 1989).

A atividade antiviral de extratos de *Geranium sanguineum L.*, planta que contém flavonoides, ácidos fenólicos e taninos na sua composição, foi testada contra herpesvírus humano 1 e 2. Foi demonstrado efeito virucida diretamente dependente da presença e da concentração das diferentes substâncias (flavonoides, ácidos fenólicos e taninos entre outras) encontradas nos diferentes extratos da planta (Serkedjieva e Ivancheva, 1999).

No Brasil, estudos avaliaram a atividade antiviral da espécie *Persea americana* contra diferentes vírus, com resultados positivos para o *bovine virus diarrhea virus* (BVD), *human adenovirus 3* (Ad-3) e uma amostra de HHV-1, esse resistente ao aciclovir (Koseki *et al.*, 1990; Wigg, 1996; Simoni *et al.*, 1996; Miranda *et al.*, 1997).

2.1.2.4 Quercetina

A quercetina (3',4',3,5,7-pentahidroxi flavonol – figura 2) é um dos flavonoides mais pesquisados e abundantes na natureza. É o mais abundante flavonóide presente na dieta humana, representando cerca de 95% do total dos flavonoides ingeridos (Nijveldt *et al.*, 2001), podendo ser encontrado em alimentos como maçã, cebola e brócolis (Behling *et al.*, 2004). Ela ocorre principalmente na forma livre, podendo também ser encontrada como glicosídeo, com um ou mais grupos de açúcares ligados por ligações glicosídicas, em geral, na posição C-3. A glicose é o açúcar mais comum, mas a galactose e a ramnose são também frequentemente encontradas. Quase 180 diferentes glicosídeos de quercetina foram descritos na natureza, sendo a rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo - figura 3) um dos mais comuns (Wach *et al.*, 2007).

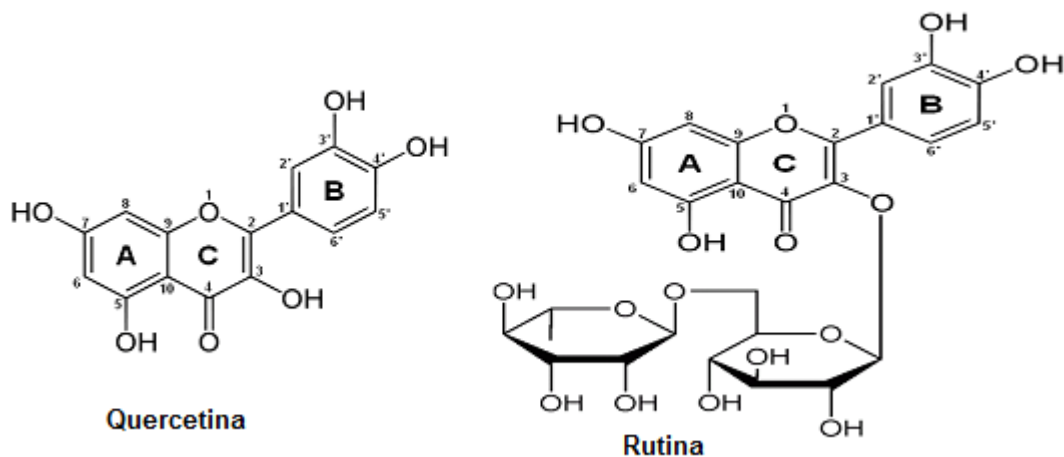


Figura 3: Estrutura química da quercetina e rutina.

Além da atividade antiviral já citada anteriormente, outros efeitos farmacológicos da quercetina já foram relatados, como, por exemplo, supressão da proliferação celular, proteção de oxidação do LDL, prevenção da agregação plaquetária e indução de apoptose de células tumorais, podendo estas ações ajudar no combate à asma, ao câncer e à doenças cardíacas. Outra função bastante importante da quercetina é sua capacidade antioxidante, controlando a atividade de sistemas de defesa como a enzima superóxido

dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase (Lu *et al.*, 2006).

De acordo com Yao *et al.* (2007), a quercetina possui efeitos hepato e gastroprotetor contra danos celulares induzidos pelo etanol, protegendo hepatócitos humanos do dano oxidativo ao servir como um antioxidante natural e aumentando a capacidade antioxidante do plasma. Ela também atua reforçando a capacidade antioxidante do cérebro, sugerindo ser um inibidor de seu envelhecimento e juntamente com outros flavonoides estruturalmente relacionados, mostra um efeito citoprotetor em células expostas ao H₂O₂, abrandando o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) mediado pelo peptídeo β-amilóide (Sun *et al.*, 2007).

2.1.2.5 Derivados de Dibenzoilmetano

Os dibenzoilmetanos (1,3-difenil-propano-1,3-diona, DBM - figura 4) são substâncias pertencentes à classe dos flavonoides, raramente encontrados na natureza e isolados de algumas espécies de *Lonchocarpus* (Magalhães *et al.*, 1996, 1997; Nogueira *et al.*, 2003). Essa subclasse de flavonoides e seus derivados formam um grupo de pequenas β-dicetonas, com algumas propriedades farmacológicas já descritas. Lin *et al.* (2001), mostraram que dieta constituída por 1% de DMB inibiu a promoção e a proliferação de tumor mamário em ratas Sencar, após indução por 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA).

Outros estudos mostram atividade fotoprotetora, antiinflamatória, antitumoral, antimalárica, antimicrobiana e neuroprotetora de diferentes derivados de dibenzoilmetano (Jackson *et al.*, 2002; Magalhães *et al.*, 1996, 1997; Nogueira *et al.*, 2003).

O Eusolex[®] 8020 e Parsol[®] 1789 são exemplos de derivados sintéticos de dibenzoilmetanos, muito utilizados na indústria cosmética para a produção de protetores solares, pois previnem a penetração de radiação solar nas células, bloqueando a produção excessiva de radicais livres (Kligman 1989; Nogueira *et al.*, 2003). Ensaio *in vitro* mostraram o efeito inibitório do DBM em células cancerígenas da próstata (Jackson *et al.*, 2002) e a inibição do crescimento de células cancerígenas de mama, melanoma e pulmão pelo derivado sintético de dibenzoilmetano 1,3-difenil-2-alil-1,3-propanodiona (Nogueira *et al.*, 2003). No

entanto, ainda não foi relatada atividade antiviral desses derivados, a qual pode existir devido uma grande gama de flavóides que já possuem essa atividade biológica bem elucidada.

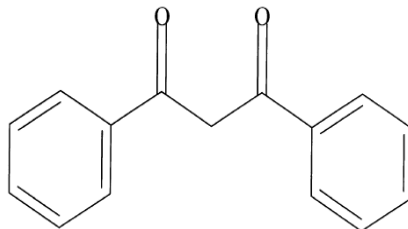


Figura 4: Núcleo fundamental dos dibenzoilmetanos.

2.2 Antivirais

Uma importante estratégia para a defesa antiviral é o desenvolvimento e o uso de fármacos capazes de prevenir uma infecção ou combatê-la. Entretanto, apesar de muitos anos de pesquisa, o arsenal de fármacos antivirais para uso humano e veterinário ainda permanece pequeno (Muller *et al.*, 2007).

Além disso, os fármacos antivirais utilizados ainda apresentam restrições de uso, como reduzido espectro de ação, utilidade terapêutica limitada, desenvolvimento de cepas resistentes e custo e toxicidade elevados. (De Clercq, 2004; Arora e Dixit, 2009). Desta forma, se faz necessária a descoberta de novas alternativas terapêuticas efetivas para doenças virais, à base de substâncias com potente atividade, efeitos colaterais reduzidos, diferentes mecanismos de ação e menor custo de produção e tratamento, beneficiando o paciente portador da infecção viral. Neste contexto, destaca-se a pesquisa de fitoterápicos com potencial antiviral.

Uma importante razão para a falta de sucesso no desenvolvimento de novos fármacos antivirais é a natureza dos vírus. Eles possuem uma estrutura extremamente simples e um sistema enzimático restrito, sendo totalmente dependentes dos processos metabólicos celulares para a sua multiplicação e sobrevivência. Assim, agentes que inibem a replicação viral, geralmente, também apresentam alguma toxicidade às células hospedeiras (Boon, 1997; Wainberg, 2009), dificultando a sua utilização terapêutica e a adesão ao tratamento. No processo infeccioso viral, os pontos de ataque diferencial

específico para os vírus são muito pequenos, e a íntima relação intracelular do vírus com a célula hospedeira torna extremamente difícil encontrar um antiviral específico sem afetar a célula hospedeira (Simoni, 2003). Além disso, durante o processo de infecção viral, as partículas virais ficam protegidas pela própria membrana plasmática da célula hospedeira contra os anticorpos do organismo, dificultando o controle da infecção (Simoni, 2003).

Os interferons tipo I (IFN-I) são um dos mais importantes componentes da defesa contra todos os tipos de vírus. As células infectadas sintetizam e secretam interferons do tipo I (IFN- α/β) após reconhecerem produtos de origem viral, sinalizando um processo infeccioso (Flores, 1996). Esses IFNs secretados circulam no organismo fazendo as células susceptíveis expressarem potentes mecanismos antivirais que limitam ainda mais a propagação viral. Alguns desses mecanismos são: 1) fortificação da membrana plasmática de células vizinhas, tornando-as mais resistentes à penetração de partículas virais; 2) indução da produção de nucleases, que atacam o genoma viral e 3) inibição da síntese de proteínas virais, devido alteração do processo de fosforilação de fatores iniciais de alongamento (Havsteen, 2002; Haller *et al.*, 2006). Estudos apresentam relatos da estimulação da produção de IFNs por flavonoides, por diferentes mecanismos, ainda não muito esclarecidos (Havsteen, 2002).

Em função dessa natureza bastante diversificada dos vírus, a padronização de ensaios antivirais torna-se difícil. Diferentes vírus multiplicam-se em diferentes sistemas celulares, tornando as metodologias específicas para a avaliação dos agentes antivirais muito variáveis de um laboratório para outro (Cos *et al.*, 2006).

De maneira geral, o objetivo dos testes antivirais, especialmente aqueles de triagem, é empregar uma metodologia que apresenta relativa simplicidade, mas com procedimento confiável e capaz de gerar informações úteis sobre uma composição escolhida, a fim de, realizar estudos mais elaborados (Simoni, 2003).

Nos métodos *in vitro* comumente utilizados, as linhagens celulares são os mais empregados durante os bioensaios de seleção de substâncias em potencial pela avaliação de sua efetividade e toxicidade (Simoni, 2003). Em todos eles, o biomonitoramento da replicação viral para avaliação antiviral baseia-se nas diferentes habilidades dos vírus em replicar nas células

cultivadas, por observação dos efeitos citopáticos (ECP), pela formação de placas de lise, ou por detecção de produtos virais (DNA, RNA ou polipeptídeos). Com isso, a determinação do potencial inibidor de uma determinada substância pode ser expressa através de vários índices que comparam os títulos dos vírus dos grupos controles com os tratados com o possível antiviral (Simoni, 2003; Cos *et al.*, 2006).

2.3 Herpesvírus

Os herpesvírus são membros da família *Herpesviridae*. Essa família inclui mais de 200 vírus isolados, os quais se encontram como os principais representantes de doenças víricas em animais e humanos (Roizman e Pellett, 2001). Essa diversidade de hospedeiros evidencia a capacidade de adaptação dos herpesvírus na natureza, assim como sua co-evolução junto a diferentes espécies ao longo do tempo (Davison, 2002).

A estrutura dos herpesvírus é composta por uma molécula linear de DNA fita dupla, circundada por proteínas, formando um nucleocapsídeo icosaédrico com 100-110 nm de diâmetro. Esse é envolto por uma substância amorfa conhecida como tegumento, delimitada por um envelope glicoprotéico (ROIZMAN *et al.*, 1995), com glicoproteínas virais projetando-se da superfície em forma de espículas (Rissi *et al.*, 2007; Thiry *et al.*, 2006). Este conjunto forma um vírion pleomórfico de 120-300nm de diâmetro (figura 5) (Roizman e Pellett, 2001).

Os herpesvírus conhecidos compartilham uma propriedade biológica significativa: possuem a habilidade de permanecerem latentes em seus hospedeiros naturais. O genoma nessa fase retém a capacidade de replicação e de causar a doença após a reativação. Os mecanismos moleculares precisos que levam à reativação do estado de latência não estão ainda totalmente elucidados e podem diferir de um vírus para outro (Roizman e Pellett, 2001).

Os vírus da família *Herpesviridae* estão entre os mais empregados nos estudos da terapia antiviral devido às suas características de infecção e grande importância para a saúde pública, além do impacto econômico de suas infecções nos animais e nos humanos (Gong *et al.*, 2004).

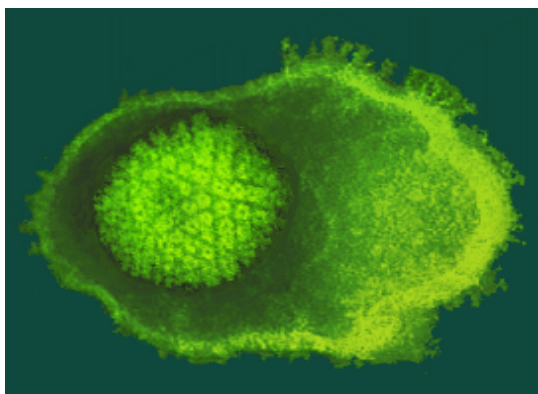


Figura 5: Microscopia eletrônica de um vírion de um alphaherpesvírus (Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB.html>).

Sendo assim, decidiu-se utilizar neste estudo para avaliação de substâncias antivirais o BoHV1 como modelo viral da família *Herpesviridae*, devido à sua importância econômica, sua similaridade com as demais infecções herpéticas, tanto no aspecto estrutural quanto ao próprio processo infeccioso, e também devido à facilidade de sua propagação e observação em cultivo celular.

2.3.1 Bovine herpesvirus 1 (BoHV1)

2.3.1.1 Características Gerais do Agente

A espécie bovina é hospedeira natural de diferentes vírus da família *Herpesviridae*. Entre esses vírus podemos destacar o *bovine herpesvirus 1*, que causa perdas significativas na pecuária mundial (Mahony, 2010).

O BoHV1 está classificado na subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (ICTV, 2011). Os membros dessa subfamília caracterizam-se por apresentarem um ciclo de replicação relativamente curto, rápida disseminação na cultura, destruição eficiente das células infectadas e capacidade de estabelecer infecções latentes em gânglios nervosos (Fenner *et al.*, 1993).

O genoma do BoHV1 contém aproximadamente 137 mil pares de bases (Kpb). A disposição genômica é típica dos herpesvírus do grupo “D”, em que o genoma pode ser dividido em um segmento longo único (“unique long”, UL) de aproximadamente 102 a 104 Kpb e um segmento curto único (“unique short”, US) de aproximadamente 10,5 a 11 Kpd, flanqueado por regiões repetidas

invertidas de aproximadamente 24 Kpb, denominadas repetição interna (IR) e terminal (TR) (figura 6) (Muylkens *et al.*, 2007).

O genoma do BoHV1 codifica aproximadamente 70 proteínas, entre enzimas virais, proteínas estruturais e reguladoras. Um importante exemplo de proteínas estruturais são as glicoproteínas inseridas no envelope viral. Essas glicoproteínas desempenham um papel fundamental na interação vírus-célula e estão envolvidas nos diferentes processos do ciclo viral, tais como reconhecimento e adsorção, penetração, disseminação de célula para célula, maturação e liberação do vírus (Mettenleiter *et al.*, 2006; Thiry *et al.*, 2006).

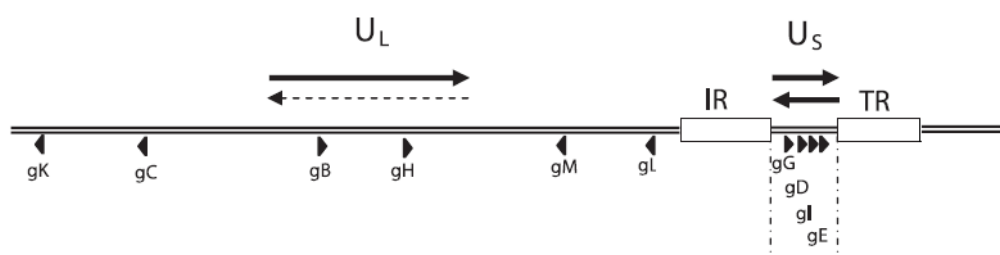


Figura 6: Organização genômica do BoHV1 (Adaptado de Muylkens *et al.*, 2007).

Os diferentes isolados de BoHV1 podem ser divididos em dois subtipos, BoHV1.1 e BoHV1.2, e este último em 2a e 2b. Embora a maioria das cepas de BoHV1.1 tenham sido isoladas de doenças do trato respiratório ou aborto e de BoHV1.2 isoladas de lesões genitais, somente a análise de restrição enzimática é um critério confiável para a distinção entre elas (Muylkens *et al.*, 2007). Bezerros experimentalmente infectados via nasal com cepas de BoHV1.2 demonstraram sinais clínicos respiratórios (Edwards *et al.*, 1991; Spilki *et al.*, 2004) e foram capazes de transmitir infecção respiratória a animais controle (Edwards *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1980). Lesões no trato respiratório de novilhas foram observadas após a inoculação intra-uterina com BoHV1.1 (Miller e Van der Maaten, 1984). Subtipos 1.1 e 1.2a têm sido associados com graves doenças como aborto e infecções fetais (Miller *et al.*, 1991). O subtipo 1.2b, menos virulento e incomum no Brasil, não foi ainda associado com abortos (Smith *et al.*, 1995; Muylkens *et al.*, 2007).

2.3.1.2 Replicação Viral

A infecção pelo BoHV1 se inicia pela interação dos vírions com receptores da membrana plasmática das células-alvo, através da ligação de glicoproteínas virais aos receptores celulares (Tikoo *et al.* 1995, Franco e Roehe, 2007). O processo de adsorção viral também é mediado por moléculas de glicoproteínas, sendo as principais a gC, gB e gD, embora a ação integrada de todas as glicoproteínas seja essencial para o processo de penetração viral (Campadelli-Fiume *et al.*, 2000; Franco e Roehe, 2007; Li *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 1998).

A penetração do vírus requer a fusão do envelope viral com a membrana plasmática e depende da ação conjunta das gB, gD, gH e gL (Spear *et al.*, 1993). Após a fusão, o nucleocapsídeo ligado a microtúbulos celulares é transportado até proximidades do núcleo, onde é desintegrado para liberação do genoma no interior do núcleo (Fenner *et al.*,1993; Tikoo *et al.*,1995; Roizman *et al.*,1995).

No núcleo, os processos de transcrição são regulados por três classes de RNA mensageiro (mRNA) denominadas “immediate early” (IE ou α), “early” (E ou β) e “late” (L ou γ) que são transcritas pela RNA polimerase II (RNAPol II) celular, de acordo com a cinética de expressão e com a função de seus produtos (Fenner *et al.*,1993; Tikoo *et al.*,1995; Roizman,1995).

A replicação do genoma e a montagem do nucleocapsídeo ocorrem no núcleo das células infectadas (Wagner, 2010), o qual migra através da membrana nuclear para tornar-se envelopado. A liberação final do vírion envelopado da célula envolve o vírus sendo incorporado em vesículas exocíticas sendo a seguir liberado da célula como vírus infeccioso livre (Franco e Roehe, 2007).

2.3.1.3 Epidemiologia

A infecção pelo BoHV1 possui distribuição mundial (Del Fava,1998). O BoHV1 foi isolado pela primeira vez em 1950, nos Estados Unidos, mas, somente na década de 60, os sinais respiratórios graves da infecção por esse agente tornaram-se preocupação. Na Europa, a forma de rinotraqueíte

infecçiosa bovina (IBR) mais grave foi relatada em 1972. No Brasil, o BoHV1 foi isolado somente em 1978, no estado da Bahia, a partir de pústulas vaginais. Também em 1978, em São Paulo, o BoHV1 foi isolado de rim de feto bovino proveniente de matadouro e, mais tarde, de casos de aborto (Andrade, 2006; Rocha *et al.*, 1999).

No Brasil, a maioria dos rebanhos apresentam-se sorologicamente positivos para o BoHV1, com índices de soropositividade variando de 10,6% a 96% (Lage *et al.*, 1996; Vieira *et al.*, 2003). Essa grande variação deve-se ao uso de diferentes técnicas de coleta, número e estratificação de amostras, englobando poucos municípios ou, muitas vezes, deve-se a estudos em populações específicas, ou ambas as situações (Barbosa, 2004).

2.3.1.4 Transmissão e Patogenia

A transmissão do BoHV1 pode ocorrer de forma direta através de aerossóis e contato com secreções (respiratórias, oculares, genitais) de animais infectados e de forma indireta através de fômites, inseminação artificial e transferência de embriões (Mars *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 2002; van Oirschot, 1995).

O vírus penetra no animal principalmente pelas mucosas oro-nasal, genital e ocular. Nas células epiteliais dessas regiões ocorrem a replicação e posteriormente a disseminação célula a célula do BoHV1, causando lise destas e produzindo infecção localizada. A infecção sistêmica acontece quando partículas virais invadem linfonodos e vasos linfáticos, seguido de uma viremia associada a linfócitos e disseminação pelo organismo (Engels e Ackermann, 1996).

Eventualmente, devido fatores externos, como, por exemplo, estresse e corticóides, pode ocorrer a reativação da infecção latente, levando a produção de novas partículas virais infecciosas e o estabelecimento de um novo ciclo lítico de infecção e a re-excreção viral (van Oirschot *et al.*, 1995).

Os bovinos são o principal reservatório do BoHV1, mas outras espécies domésticas e silvestres, como ovinos, caprinos e bubalinos já apresentaram indícios de infecção, sendo possíveis disseminadores da infecção pelas mesmas vias já descritas acima (Hage *et al.*, 1997; Muylkens *et al.*, 2007).

2.3.1.5 Manifestações Clínicas

A infecção do rebanho bovino pelo BoHV1 provoca sérios prejuízos aos produtores mundiais, devido à redução da eficiência produtiva e reprodutiva bovina. Há também restrições ao comércio internacional de animais vivos e seus produtos como sêmen e embriões (Del Fava, *et al.*, 1998; Lemaire *et al.*, 1994; Mahony, 2010).

O BoHV1 é o agente etiológico da IBR, da vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e da balanopostite infecciosa bovina (IPB) (Roizman e Pellett, 2001), podendo causar conjutivite, diarreia e quedas na produção leiteira. Além disso, o vírus pode estar associado a abortos e outras perdas reprodutivas (Muylkens *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2000).

2.3.1.5.1 Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (IBR)

A infecção de animais por BoHV1.1 e BoHV1.2 pode desencadear alterações associadas a problemas respiratórios (IBR) e a problemas reprodutivos como abortos e reabsorção embrionária (Edwards *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1991; Muylkens *et al.*, 2007). A IBR apresenta-se de forma aguda e possui como sinais clínicos febre (40,5 - 42°C), anorexia, dispnéia, tosse, corrimento nasal seroso ou sero-hemorrágico e, posteriormente purulento, hiperemia, pústulas e erosões da mucosa nasal (Kaashoek *et al.*, 1996). Em alguns casos podem ser observadas conjutivite, sialorréia e ulcerações na mucosa oral (Fehler *et al.*, 1992; Riet-Correa *et al.*, 1989). O aborto pode ocorrer quando a vaca prenha é infectada com amostras virais de alta virulência, principalmente entre o 4º e o 8º mês de gestação e após um período de incubação de 3 a 6 semanas (Muylkens *et al.*, 2007). Na forma respiratória, o índice de mortalidade é baixo, podendo aumentar quando o quadro é complicado com infecções bacterianas secundárias ou infecções víricas superpostas (Kahrs, 1981).

2.3.1.5.2 Vulvovaginite Pustular Infecciosa (IPV) e Balanopostite Pustular Infecciosa (IBP)

As infecções genitais estão associadas principalmente com o BoHV1.2a. Nas fêmeas, a IPV caracteriza-se por hiperemia e edema da mucosa vulvovaginal com disseminação de pequenas pústulas que evoluem formando úlceras. O animal pode apresentar secreção vaginal mucopurulenta, causada por infecção bacteriana secundária (Nandi *et al.*, 2009). Nos machos, a sintomatologia clínica da IBP inclui lesões localizadas nas mucosas do pênis e no prepúcio. A infecção em touros é de extrema importância para a inseminação artificial, já que o vírus é eliminado pelo sêmen e, desta forma, pode ser transmitido para fêmeas susceptíveis (Fehler *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1991; Riet-Correa *et al.*, 1989; Rocha *et al.*, 1999). Na ausência de infecções secundárias, a fase aguda da IPV e IBP tem um curso clínico de quatro a sete dias. Muitos casos são subclínicos e podem passar despercebidos, dificultando o controle da infecção (Muylkens *et al.*, 2007; Riet-Correa *et al.*, 1989; Rocha *et al.*, 1999).

2.3.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo BoHV1 não deve ser baseado apenas em sinais clínicos, por serem estes sugestivos e não específicos, mas deve ser confirmado por exames laboratoriais.

O diagnóstico completo deve ser baseado no isolamento do vírus em cultivo celular ou, ainda, com a utilização de métodos moleculares para a identificação de componentes virais ou de anticorpos específicos para o BoHV1 (Franco e Roehe, 2007; Roehe *et al.*, 1997; van Donkersgoed e Babiuk, 1991). Nos casos de IBR, IPB ou IPV, os espécimes clínicos geralmente utilizados são esfregaços de secreções nasais, oculares, genitais e sêmen (Rocha *et al.*, 1999), além de material de fetos abortados (como órgãos e/ou os cotilédones placentários) (OIE, 2010).

O BoHV1 se multiplica bem em cultivos primário (células de rim, pulmão e testículo de bovino) e linhagens estabelecidas (Madin Darby Bovine Kidney - MDBK), causando *in vitro* efeito citopático característico com ruptura do tapete

celular, arredondamento e agrupamento das células, formando placas entre 24 a 72 horas pi (Baugust e Clark, 1972; Franco e Roehe, 2007; McKercher, 1963; Madin *et al.*, 1956).

Entre as técnicas sorológicas para diagnóstico, a soroneutralização e o ensaio imunoenzimático (ELISA) nas suas diferentes classificações são bastante utilizados, sendo que no ELISA o uso de anticorpos monoclonais contra BoHV tem favorecido uma melhor caracterização da composição protéica do agente na avaliação da variabilidade antigênica do BoHV1 e BoHV-5 e na diferenciação entre os tipos de BoHV1 (D'Arce *et al.*, 2002; Roehe *et al.*, 1997). As técnicas de detecção e identificação de ácidos nucléicos, principalmente a reação da polimerase em cadeia (PCR), atualmente possuem uso disseminado e são muito úteis para amostras com pequenas quantidades do agente, amostras com viabilidade comprometida e para detecção de infecção latente (Franco e Roehe, 2007).

2.3.1.7 Vacinação e Controle

As medidas de controle em relação ao BoHV1 estão diretamente relacionadas com a severidade da infecção do rebanho, práticas de manejo dos animais e com a prevalência da infecção em uma determinada região ou propriedade (Ackermann *et al.*, 1990) e pode ser realizada com ou sem a utilização de vacinas (Franco e Roehe, 2007).

Nas propriedades nas quais o rebanho se apresenta com níveis mínimos de soropositividade, sem histórico da enfermidade ou até mesmo em rebanhos com sorologia alta, mas sem histórico clínico de doença respiratória ou genital, e sem problemas reprodutivos (retorno ao cio e infertilidade) estratégias que visem à identificação, segregação e abate de animais soropositivos podem ser aplicadas (Ackermann *et al.*, 1990). O descarte de animais infectados tem como principal vantagem o baixo custo e tem se mostrado bastante eficiente, desde que tomadas medidas severas, visando evitar a introdução de novos animais infectados e controle das possíveis fontes de material contaminado, em especial o sêmem (van Oirschot *et al.*, 1993). Um dos pontos controversos de tais estratégias é a possibilidade da existência de animais soronegativos latentemente infectados (Lemaire *et al.*, 2000), que podem ser possíveis disseminadores do vírus.

Em propriedades em que ocorrem perdas econômicas graves ou onde a prevalência da infecção é alta, o controle das infecções se baseia em programas de vacinação (Franco e Roehe, 2007). Nestas situações, a vacinação sistemática reduz a circulação de vírus e a ocorrência da doença clínica, diminuindo conseqüentemente as perdas econômicas (van Oirschot *et al.*, 1996a; van Oirschot *et al.*, 1999). Entretanto, ainda que possa ocorrer uma redução do número de novas infecções, nenhuma vacina disponível, até o presente momento, previne satisfatoriamente contra a infecção e/ou indução de latência por cepas de laboratório e de campo (Galeota *et al.*, 1997; Muylkens *et al.*, 2007), sendo ainda questionável a proteção das vacinas contra as doenças genitais e aborto (Franco e Roehe, 2007; Muylkens *et al.*, 2007). Além da vacinação, outras medidas de controle são necessárias nessas propriedades, como, por exemplo, teste de sêmen e reprodutores, uso de sêmen e embriões livres de BoHV1 e monitoramento sorológico periódico do rebanho (Franco e Roehe, 2007; Muylkens *et al.*, 2007).

As vacinas para BoHV1 hoje disponíveis podem ser classificadas como vacinas inertes (inativadas ou utilizando subunidade viral), vacinas vivas modificadas, vacinas de DNA e vacinas vetoriais (Muylkens *et al.*, 2007). No entanto, visando a uma melhor erradicação do BoHV1 e à diferenciação de animais infectados (portadores de infecção latente) dos animais vacinados, em alguns países europeus já está sendo utilizada uma vacina diferencial, com deleção do gene que codifica a gE, uma glicoproteína não essencial ao vírus. No Brasil, esta vacina ainda se encontra em fase de desenvolvimento, sem liberação para uso clínico (Franco e Roehe, 2007; Muylkens *et al.*, 2009; van Oirschot *et al.*, 1999).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial antiviral de dois flavonoides e três extratos vegetais, de uma mesma planta, contra o *bovine herpesvirus 1* (BoHV1).

3.2 Objetivos específicos

- Determinar as concentrações máximas não tóxicas das substância para as células.
- Avaliar a atividade antiviral *in vitro* das substâncias em tratamentos pré-infecção (ensaio da atividade virucida).
- Avaliar a atividade antiviral *in vitro* das substâncias em diferentes etapas do ciclo de replicação viral (ensaio “*timing of addition*”).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Células e Vírus

A amostra de *bovine herpesvirus 1* Los Angeles (LA) (Madin *et al.*, 1956) utilizada neste estudo foi cedida pelo Laboratório de Virologia Animal da Universidade Federal de Santa Maria/RS. A amostra foi multiplicada em células da linhagem de rim bovino fetal (Madin Darby Bovine Kidney-MDBK). A mesma linhagem de células foi utilizada para a realização dos ensaios *in vitro* do BoHV1. As células foram mantidas em meio essencial mínimo (MEM) contendo penicilina (1,6 mg/L), estreptomicina (0,4 mg/L) e suplementadas com soro fetal bovino (SFB 5%).

4.2 Extratos e Substâncias

Para a realização dos testes antivirais, foram utilizados cinco compostos, três extratos secos vegetais, a quercetina (flavonóide natural sintético) adquirida do laboratório SIGMA-ALDRICH e um derivado de dibenzoilmetano obtido por semi-síntese. Os extratos secos vegetais e o derivado de dibenzoilmetano foram cedidos pela professora Marisa Alves Nogueira Diaz do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV, co-orientadora deste estudo.

Os extratos vegetais hexânico (Eh), diclorometano (Ed) e etanólico (Ee) foram obtidos de uma mesma espécie de planta e tiveram sua extração baseada na polaridade dos solventes utilizados, hexano, diclorometano e etanol respectivamente. A natureza da planta utilizada para obtenção dos extratos vegetais e do derivado de dibenzoilmetano obtido por síntese foi mantida sob sigilo, já que se encontra em registro de patente.

A diluição inicial dos compostos foi realizada em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração estoque de 10mg/mL para quercetina e derivado de dibenzoilmetano e 100mg/mL para os extratos vegetais e armazenados a 4°C. No momento de utilização foi feita a diluição em MEM, de forma que a concentração final de DMSO da solução não ultrapassasse a concentração de

1,5%, que representa a concentração máxima não tóxica (CMNT) desse diluente determinada para as células MDBK.

4.3 Preparação dos Estoques de Vírus e Titulação

A amostra viral foi inoculada repetidamente em monocamadas celulares semi-confluentes até atingir o título viral máximo. Depois de observada a manifestação do efeito citopático (ECP), aproximadamente 72h, as células foram congeladas e descongeladas três vezes. O sobrenadante coletado foi aliquoteado e estocado. Os estoques virais foram titulados pelo método de TCID₅₀ descrito por Reed e Muench (1938). Nesse método, a diluição do vírus que resulta na infecção de 50% das replicatas de inoculações expressa o título como a dose 50% infectiva (ID₅₀), (“tissue culture infective dose 50% ou TCID₅₀”). Assim, se o ponto de 50% de positividade se encontra na diluição 10^{-5,66}, o título do vírus é de 10^{5,66} doses infectivas por 50 µL ou 10^{5,66} TCID₅₀/50µL.

4.4 Análises *in vitro*

As análises *in vitro* foram baseadas na avaliação por microscopia óptica e métodos de colorimetria do efeito citotóxico dos compostos testados e na avaliação da redução de título viral por visualização do ECP por microscopia óptica para posterior titulação viral pelo método de Reed e Muench (1938).

4.4.1 Análise do Efeito Citotóxico

As substâncias avaliadas como antivirais devem apresentar ação em baixas concentrações, a fim de evitar danos às células ou ao organismo infectado. Desta maneira, o primeiro teste realizado neste estudo foi o teste de citotoxicidade. Esse teve como objetivo determinar a CMNT dos compostos para as células, possibilitando posteriormente a avaliação antiviral desses compostos.

A atividade citotóxica das substâncias foi avaliada microscopicamente por alteração da morfologia celular e confirmada e mensurada através do método colorimétrico MTT, descrito inicialmente por Mosmann (1983), com algumas

modificações. O MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,-difeniltetrazolium brometo) é um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem esse composto em suas mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em formazana, um composto de coloração azul-escuro, não solúvel em água, e fica armazenado no citoplasma celular. O ensaio colorimétrico com MTT mede a quantidade de formazana formado por meio de espectrofotometria e é sensível e quantitativo, já que o valor da absorbância é proporcional ao número de células viáveis.

Para o procedimento desse ensaio, células MDBK foram distribuídas em microplacas de 96 poços (4×10^4 /poço) e após 12 horas de incubação a 37°C e atmosfera 5% CO₂ o meio foi removido e as células novamente incubadas com as diferentes concentrações de cada composto teste a 37°C e atmosfera 5% CO₂ por 72 horas. Após esse período de incubação, avaliou-se microscopicamente o efeito na viabilidade e na morfologia celular (perda da monocamada, granulação, vacuolização no citoplasma, alongamento e estreitamento dos prolongamentos celulares e escurecimento dos limites celulares). Em seguida, o meio foi removido, as placas lavadas duas vezes com tampão salino fosfato (PBS) pH 7,2 e em cada poço foi adicionado 50µL de solução de MTT 1mg/mL. As placas foram incubadas a 37°C e atmosfera 5% CO₂ por mais 4 horas. Posteriormente a solução de MTT foi removida e o sal formado foi solubilizado pela adição de 100µL de DMSO em cada poço. Após 1 hora a 37°C, com leve agitação das placas, a absorbância foi lida em leitor de ELISA a 550nm. A porcentagem de células tratadas viáveis foi calculada em relação ao controle não tratado (% de células controle = DO teste/ DO célula controle x 100). A concentração máxima não tóxica (CMNT) dos compostos foi definida como a CT₁₀, que corresponde à concentração necessária para reduzir a densidade óptica em 10%, indicando uma redução máxima de 10% de viabilidade celular. Três concentrações abaixo da CMNT foram usadas para os ensaios posteriores.

Para cada concentração de cada composto e para o controle, seis poços foram avaliados, e os resultados foram apresentados como a média desses valores.

4.4.2 Determinação da Atividade Virucida

A avaliação da atividade virucida tem como objetivo determinar se os compostos utilizados no estudo possuem ação de inativação direta sobre as partículas virais, desestabilizando-as ou se ligando a elas de forma irreversível, impedindo assim que elas se liguem aos receptores celulares e desencadeiem o processo infeccioso.

Diluições seriadas (10^{-10} TCID₅₀/50µL) de BoHV1 com título conhecido foram incubadas com as três concentrações dos possíveis antivirais em temperatura entre 35-37°C. Em determinados intervalos de tempos (0, 15, 30, 45 e 60 minutos), uma alíquota de cada suspensão vírus-composto foi adicionada em células já plaqueadas e aderidas (4×10^4 células/poço), incubadas em estufa a 37°C e atmosfera 5% CO₂. Após 72 horas, o título viral foi calculado usando o método descrito por Reed e Muench (1938) e comparado com o título controle (vírus não tratado). A atividade virucida foi considerada positiva quando a relação entre o título viral do controle e título viral do teste (Tit.C/Tit.T) foi maior que 10, representando uma redução de pelo menos 1 logTCID₅₀/50µL, conforme descrito por Serkedjieva e Ivancheva (1999). Em todas as placas foram utilizados três controles: 1) controle celular (MEM + células); 2) controle antiviral (MEM + antiviral); 3) controle título viral (MEM + células + vírus). Os controles evitam resultados errôneos e avaliam a interferência de fatores externos, como o tempo ou temperatura, sobre as células ou vírus. Com objetivo de avaliar uma possível atividade antiviral do DMSO, o teste descrito acima foi realizado para o DMSO em duas concentrações superiores àquelas encontradas nas diluições dos compostos e menores ou igual à CMNT do DMSO para as células MDBK, evitando assim resultados falsos positivos.

4.4.3 Análise do Efeito Antiviral Durante o Ciclo de Replicação Viral (Ensaio “*timing of addition*”)

Este ensaio tem como objetivo investigar a interferência dos compostos nas diferentes etapas do ciclo replicativo do BoHV1. O estudo foi realizado seguindo descrições de Serkedjieva e Ivancheva (1999) com algumas

modificações. Monocamadas de células semi-confluentes em placas de 96 poços (4×10^4 células/poço) foram incubadas com três concentrações pré-estabelecidas dos compostos por 1 hora (-1h: pré-tratamento células - PT), lavadas duas vezes com PBS pH 7,2 e infectadas com diluições (10^{-10^7} TCID₅₀/50µL) de BoHV1. Durante a adsorção por 1 hora a 4°C, temperatura que previne a internalização viral, outras placas com células já confluentes (4×10^4 células/poço) foram infectadas com diluições BoHV1 (10^{-10^7} TCID₅₀/50µL) e tratadas com os compostos (0h: efeito na adsorção - ADS). Outra fração de células infectadas com BoHV1 (10^{-10^7} TCID₅₀/50µL) não tratadas (4×10^4 células/poço) foram incubadas a 37°C com MEM contendo os compostos por 1h (1h: efeito na penetração - PEN). Duas horas após a infecção viral, uma outra parcela de células infectadas com BoHV1 (10^{-10^7} TCID₅₀/50µL) (4×10^4 células/poço) foram tratadas com os compostos diluídos em MEM (2h: efeito após a infecção viral - IC). A atividade antiviral de todas as fases foi avaliada após 72 horas de incubação a 37°C e atmosfera 5% CO₂, pela determinação do título viral, calculado pelo método de Reed e Muench (1938).

4.5 Análise Estatística

No ensaio de inativação direta, foi realizada a análise da variância (ANOVA) por meio da regressão linear, usando o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS - versão 15.0). Para o ensaio *timing of addition* os resultados foram avaliados por ANOVA *two-way* e teste de comparação de médias de Tukey pelo programa Sistema para Análises Estatísticas (SAEG – Versão 9.1/2007). Em todas as análises foi considerando um nível de significância $\alpha=5\%$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises *in vitro*

5.1.1 Análise do Efeito Citotóxico

A partir da CMNT determinada para cada composto, foram escolhidas concentrações inferiores ou iguais a ela ([C1], [C2], [C3]), utilizadas nos testes antivirais. A CMNT determinada e as demais concentrações de cada composto utilizadas estão descritas na tabela 3.

Tabela 3: Concentração máxima não tóxica (CMNT) dos compostos para célula MDBK e concentrações escolhidas para os testes antivirais (C1,C2, C3).

Composto	CMNT (µg/mL)	C1 (µg/mL)	C2 (µg/mL)	C3 (µg/mL)
DMSO	1,5 %	0,8%	1,5%	-
Quercetina	20	3	10	18
TMDMB₂	1	0,08	0,5	-
Eh	40	8	15	35
Ed	25	5	10	20
Ee	60	10	25	40

Eh:extrato hexânico; Ee:extrato etanólico; Ed:extrato diclorometano. CMNT = CT₁₀ = concentração do composto capaz de reduzir em 10% a DO.

A concentração máxima não tóxica de cada composto avaliado no presente estudo foi determinada pela associação da observação microscópica da morfologia celular, realizada pela própria autora da pesquisa, com a mensuração da viabilidade dessas mesmas células determinada pelo ensaio de MTT. O teste do MTT é um método rápido, simples, barato e preciso para a determinação da densidade celular, avaliação de atividade antitumoral e antiviral (Freimoser *et al.*, 1999; Betancur-Galvis *et al.*, 2002). Porém, alguns estudos indicam que a atividade específica do MTT é significativamente influenciada por uma série de parâmetros, como o tipo e a idade celular, a velocidade de metabolismo de açúcares, a manutenção da monocamada intacta durante o ensaio, entre outros, sugerindo que os ensaios devem ser

definidos em condições pré-estabelecidas que minimizem os efeitos adversos (Vistica *et al.*, 1991).

A figura 7 mostra células MDBK após tratamento com três concentrações diferentes do extrato hexânico (40, 50 e 80 µg/mL) e incubação por 72h 5% CO₂. Pode-se notar o surgimento de alterações morfológicas das células nas concentrações de 50 e 80 µg/mL, maiores que a CMNT desse extrato para as células MDBK. As principais alterações observadas foram a destruição da monocamada celular, a redução do número de células, possivelmente pela diminuição do ritmo de divisão celular e o prolongamento celular (Serkedjieva e Ivancheva, 1999). Da mesma maneira, o tratamento das células com concentrações do extrato hexânico acima da CMNT, reduziu a viabilidade celular, como mostrado na figura 8. Todos os compostos avaliados apresentaram resultados com a mesma tendência de alterações morfológicas e de viabilidade celular que aqueles acima descritos para o extrato hexânico. Assim, o efeito citotóxico dos flavonoides quercetina e TMDMB₂ e dos três extratos vegetais avaliados como possíveis antivirais foi dose-dependente, como já descrito em outros estudos que avaliaram a citotoxicidade de substâncias puras e extratos vegetais (Melo *et al.*, 2002; Serkedjieva e Ivancheva, 1999). Além da avaliação da citotoxicidade dos possíveis antivirais, a toxicidade celular do DMSO para as células MDBK também foi avaliada, com resultados também dose-dependentes. Isso foi necessário pois o DMSO foi o solvente inicial de todas as substâncias, não devendo a CMNT desse solvente ser ultrapassada em nenhuma das concentrações das substâncias utilizadas nos testes antivirais. Caso contrário, a citotoxicidade do DMSO poderia interferir nos resultados das análises.

O teste de citotoxicidade para as substâncias com potencial antiviral na pesquisa *in vitro* são importantes para discriminar o efeito citotóxico do efeito antiviral (Schnitzler *et al.*, 2008). Esses testes também são importantes para verificar a toxicidade de novos compostos nos estágios iniciais de desenvolvimento de fármacos (Putnam *et al.*, 2002), pois o equilíbrio entre os efeitos farmacológicos e toxicológicos de um composto é um requisito essencial para sua aplicabilidade como futuro agente terapêutico (Melo *et al.*, 2002).

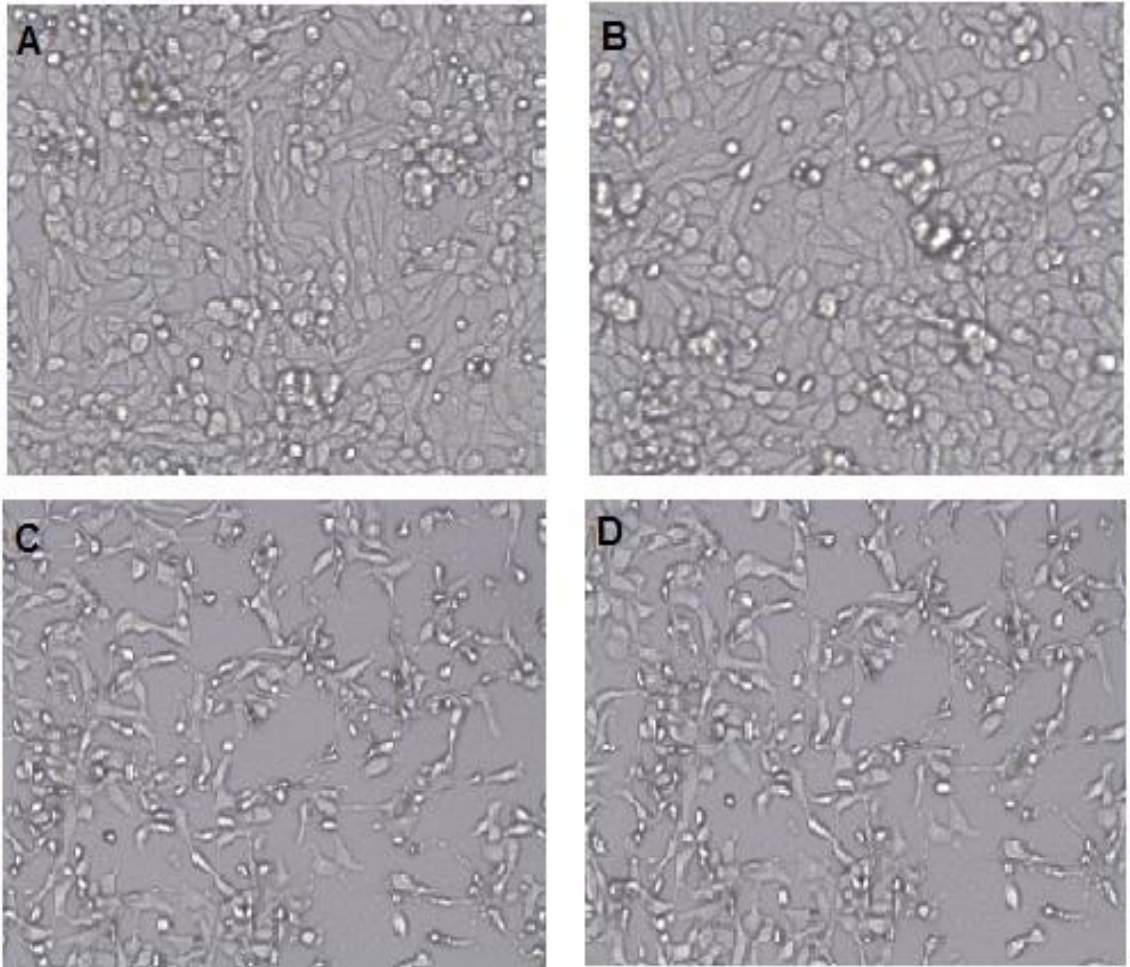


Figura 7: Células MDBK não tratadas (A) e após tratamento com extrato hexânico em três concentrações diferentes (B: 40 µg/mL, C: 50 µg/mL e D: 80 µg/mL). Observação em microscópio óptico no aumento de 20X. (Fotos da autora).

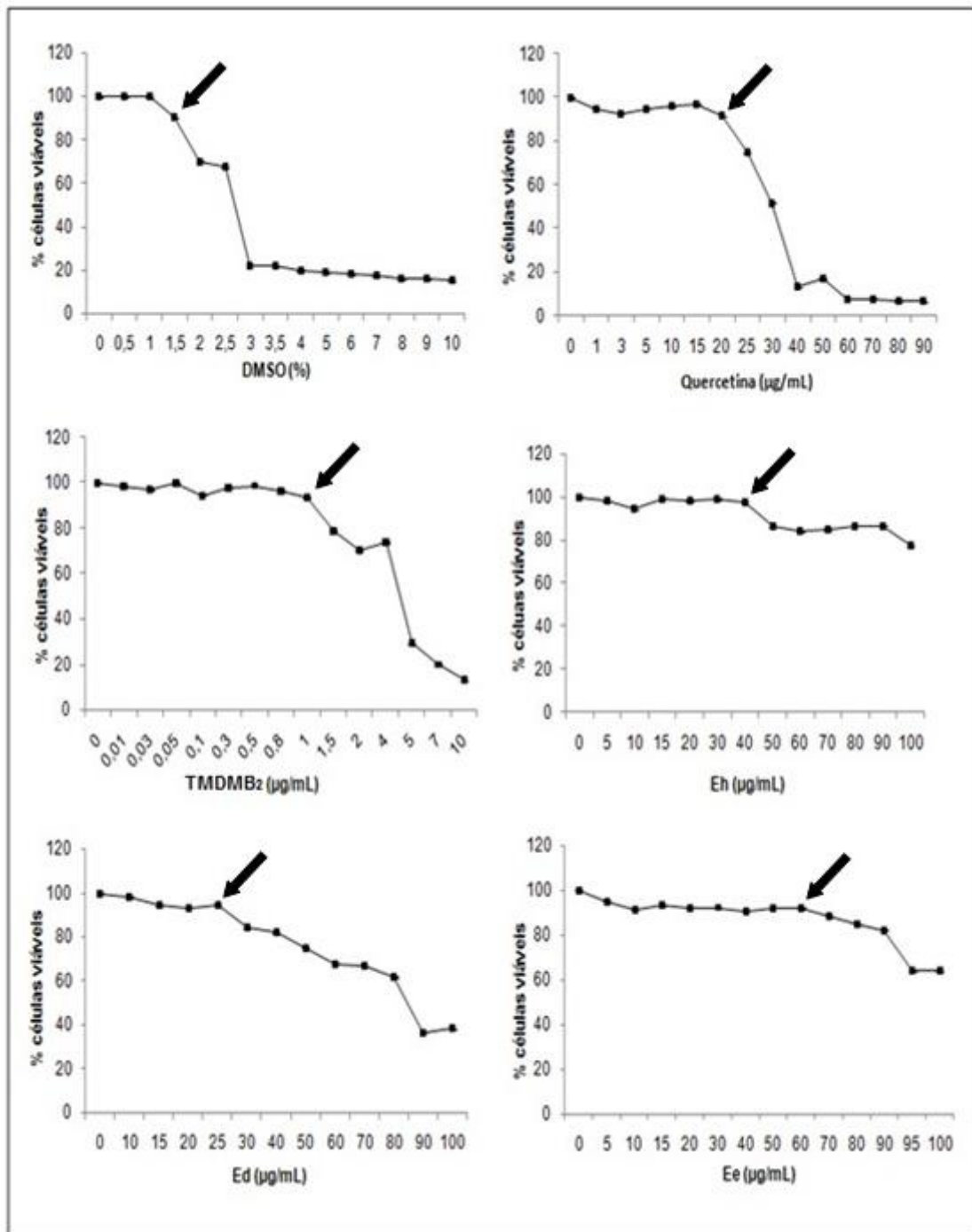


Figura 8: Toxicidade do DMSO, Quercetina, TMDMB₂ e extratos vegetais para células MDBK, determinada pelo ensaio de MTT. Eh:extrato hexânico; Ee:extrato etanólico; Ed:extrato diclorometano. A CMNT de cada composto está indicada pela seta em negrito.

5.1.2 Testes Antivirais

A capacidade dos compostos de inibir a infecção herpética foi avaliada por dois ensaios: análise da atividade virucida e ensaio de *timing of addition*. No

primeiro foi avaliada a capacidade dos compostos de inibirem de forma direta a partícula viral. No segundo ensaio foi avaliado em qual etapa do ciclo replicativo do vírus os compostos estariam agindo para inibir a infecção viral.

5.1.2.1 Testes Antivirais do DMSO

Todos os compostos usados neste estudo foram inicialmente solubilizados com DMSO. Sendo assim, a fim de avaliar a possível atividade antiviral desse solvente, o que levaria a resultados falsos positivos, os testes antivirais foram primeiramente realizadas com o DMSO. Foram usadas as concentrações 0,8% e 1,5%, concentrações menores ou igual à CMNT do DMSO para as células MDBK e maiores que àquelas encontradas nas diluições dos compostos usadas para os testes antivirais.

Na figura 9, observa-se que o DMSO não apresentou efeito virucida sobre as partículas de BoHV1 em nenhuma das concentrações utilizadas no decorrer do tempo de 60 minutos, sem efeito significativo ($p > 0,05$) do tempo e da concentração no logaritmo do título viral.

Da mesma maneira, no ensaio de *timing of addition* o DMSO não demonstrou atividade antiviral em nenhuma das etapas do ciclo replicativo do BoHV1, sem significância estatística ($p > 0,05$) para a diferença entre os títulos virais em nenhuma das concentrações de todas as etapas, quando comparadas com o controle (teste de Tukey com 5% de significância) (figura 10).

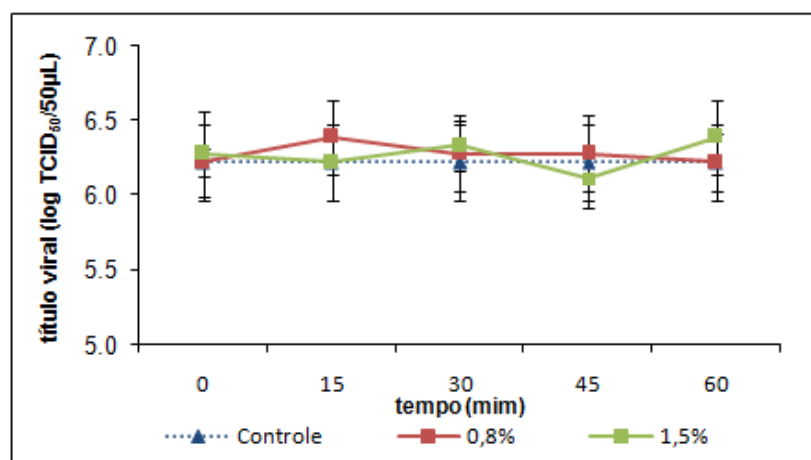


Figura 9: Atividade do DMSO (0,8% e 1,5%) sobre as partículas de BoHV1 em diferentes tempos, obtida pela média de 3 réplicas.

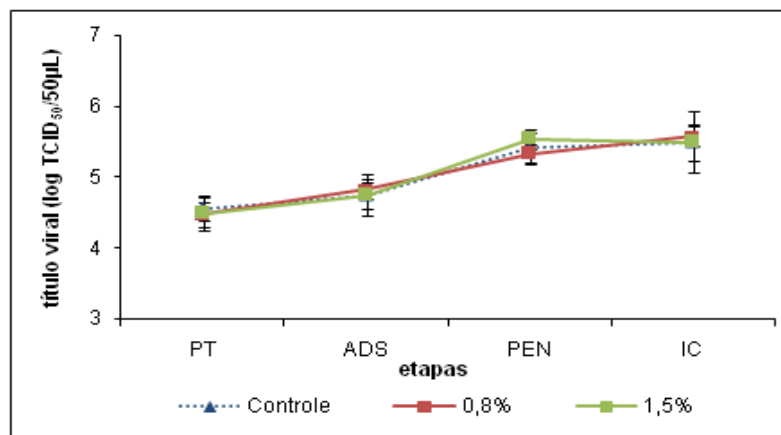


Figura 10: Efeito da adição de DMSO em diferentes etapas do ciclo replicativo do BoHV1. Duas concentrações de DMSO (0,8% e 1,5%) foram adicionadas nas etapas de pré-tratamento (PT), adsorção (ADS), penetração (PEN) e intracelular (IC).

Baseado nos resultados apresentados acima pode considerar-se que em concentrações menores que 1,5% o DMSO se apresenta como um composto sem ação antiviral sobre o BoHV1. Como as concentrações desse solvente nas diluições dos compostos utilizadas para os testes antivirais foram menores que 1,5%, pode-se inferir que o DMSO não interfere nas análises da atividade antiviral dos compostos realizadas neste estudo.

O DMSO é um solvente muito utilizado na pesquisa por possuir um amplo poder de diluição para diversas classes de compostos e muito requerido em técnicas de cultivo celular. Na prática clínica esse solvente é usado como adjuvante na formulação de medicamentos antivirais de uso tópico para aumentar a absorção e a ação terapêutica da droga antiviral (Spruance *et al.*, 1990). Estudos já mostraram que esse solvente é capaz de bloquear a infecção *in vitro* pelo *human herpesvirus 1* (HHV-1) em células VERO por inibir a replicação do DNA viral (Aguilar *et al.*, 2002). Dessa forma, o DMSO pode potencializar a ação de agentes antivirais, não só por favorecer a absorção desses agentes, mas também por apresentar ação antiviral.

5.1.2.2 Testes Antivirais dos Flavonoides

Flavonoides são compostos fenólicos encontrados em diversas plantas. Vários são os estudos que relatam as suas inúmeras propriedades biológicas, entre elas a atividade antiviral (Chiang *et al.*, 2003). Neste estudo foram

utilizados dois flavonoides: a quercetina, um flavonóide sintético natural (SIGMA-ALDRICH) e o derivado sintético de dibenzoilmetano-TMDMB₂, sintetizado e cedido pela professora Marisa Diaz, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV e coorientadora da pesquisa.

5.1.2.2.1 Testes Antivirais da Quercetina

Nas três concentrações avaliadas nesta pesquisa (3, 10 e 18 µg/mL) a quercetina mostrou significativo efeito virucida ($p < 0,05$) contra o BoHV1. Na figura 11 observa-se que o título viral sofreu variação a partir do tempo de 15 minutos em todas as concentrações testadas, com redução máxima do título viral em 175,2 vezes (99,42%).

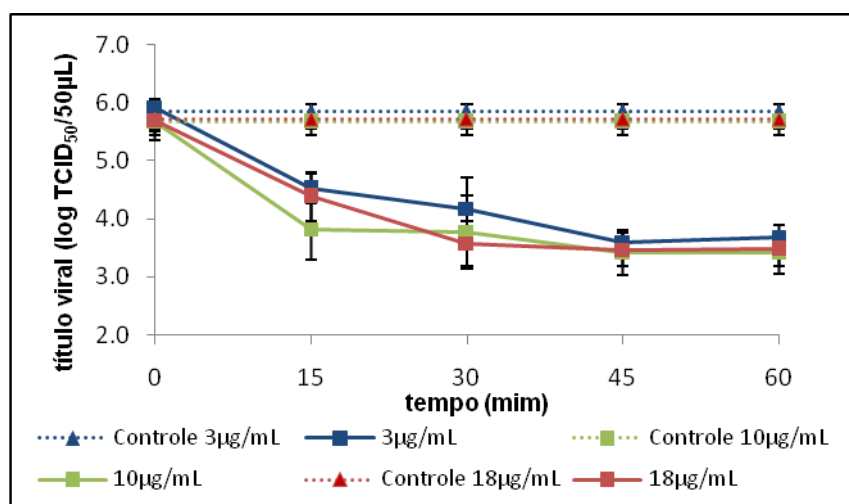


Figura 11: Atividade da quercetina (3 µg/mL, 10 µg/mL e 18 µg/mL) sobre partículas de BoHV1 em diferentes tempos, obtida pela média de 3 réplicas.

No ensaio de *timing of addition* (figura 12), pode-se notar redução do título viral na etapa de adsorção, com as concentrações 10 e 18 µg/mL. Já nas etapas de penetração e intra-celular, apenas a concentração de 18 µg/mL promoveu redução do título viral. No entanto, apenas a maior concentração (18 µg/mL) foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) o título viral nas fases de adsorção e penetração do ciclo replicativo do BoHV1. Isso não descarta a possibilidade da utilização da quercetina na concentração de 10 µg/mL associada a outras drogas antivirais, podendo potencializar o efeito antiviral dessas preparações.

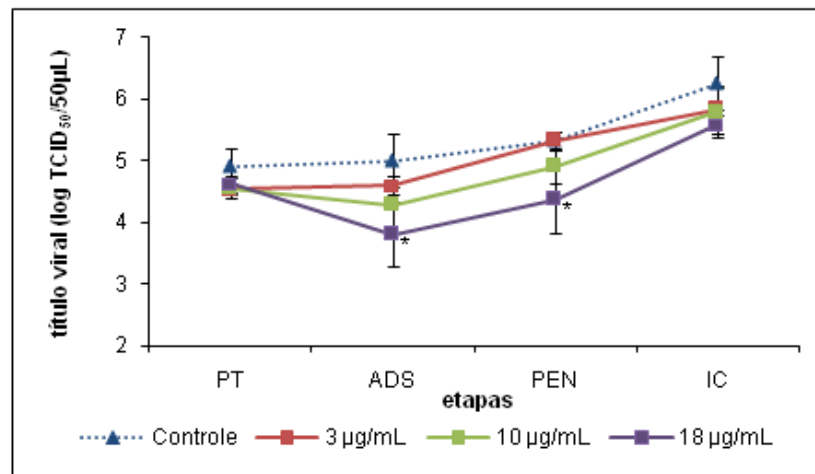


Figura 12: Efeito da adição de quercetina em diferentes etapas do ciclo replicativo do BoHV1. Três concentrações de quercetina (3 µg/mL, 10 µg/mL e 18 µg/mL) foram adicionadas nas etapas de pré-tratamento (PT), adsorção (ADS), penetração (PEN) e intracelular (IC). *concentração estatisticamente diferente do controle ($p < 0,05$).

Os resultados mostrados sugerem a inativação direta das partículas virais pela quercetina, devido à ligação dessa substância às estruturas virais essenciais para a infecção. Schnitzler *et al.* (2008), mostraram que a ligação da quercetina com glicoproteínas do envelope viral, impediam a interação célula-vírus, protegendo essa célula contra a infecção. Resultados similares também foram relatados para o tratamento de partículas virais de EHV-1 com os flavonoides quercetina e morina antes da infecção em células VERO (Gravina *et al.*, 2010).

Além disso, os resultados do presente estudo sugerem que a quercetina pode proteger efetivamente células MDBK contra infecção por BoHV1 nos estágios iniciais da infecção viral. Ela interfere com a adesão e penetração viral, devido possivelmente à sua ligação a proteínas virais envolvidas nesses processos iniciais do ciclo replicativo viral. Outros flavonoides e taninos, sintéticos ou extraídos de plantas, também têm sido relacionados a resultados de inibição das etapas de adsorção e penetração de diferentes vírus (Felipe *et al.*, 2006; Gravina *et al.*, 2010; kuo *et al.*, 2009).

Assim, a quercetina se mostra capaz de interferir com a atividade infectiva das partículas virais de BoHV1, impedindo a entrada do vírus nas células. Isso reduz o número de novas células infectadas, contendo, portanto, a propagação viral e formação de progênie. Isso caracteriza a quercetina como possível composto ativo contra o BoHV1, com efeito antiviral já relatado contra

outros vírus, como HHV-1 e HHV-2 (Chiang *et al.*, 2003) e EHV-1 (Gravina *et al.*, 2010).

5.1.2.2.2 Testes Antivirais do Derivado Sintético de Dibenzoilmetano-TMDMB₂.

A figura 13 representa os resultados do ensaio de inativação direta para o TMDMB₂ contra o BoHV1. Pode-se observar que esse flavonóide foi capaz de reduzir o título viral de forma significativa ($p < 0,05$) a partir do tempo de 45 minutos na maior concentração utilizada (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), com redução máxima de 11,39 vezes (91,22%).

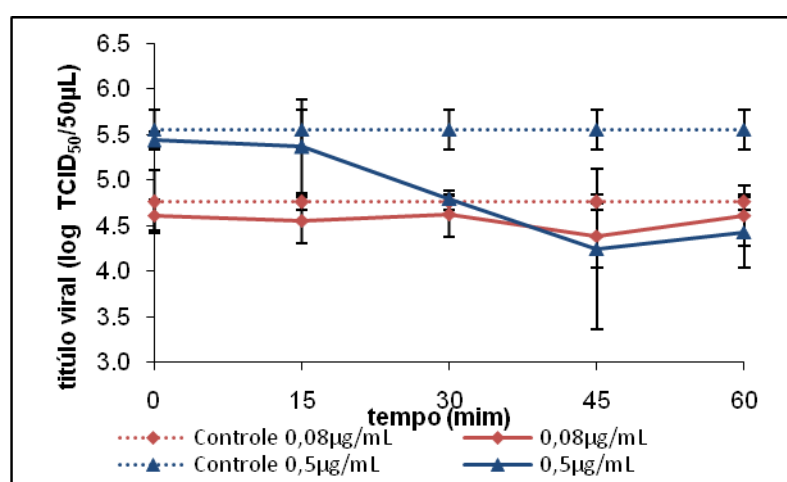


Figura 13: Atividade do TMDMB₂ (0,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre partículas de BoHV1 em diferentes tempos, obtida pela média de 3 réplicas.

No ensaio *timing of addition*, o TMDMB₂ não apresentou resultados significativos ($p > 0,05$) em nenhuma das etapas do ciclo de replicação do BoHV1 (figura 14), uma vez que o título viral das células infectadas e tratadas não sofreu redução em relação ao título do controle positivo (células infectadas não tratadas).

A inativação direta das partículas de BoHV1 pelo TMDMB₂, pode ser explicada pela ligação do TMDMB₂ às estruturas virais necessárias à interação célula-vírus. Assim, sem essa interação não ocorre a penetração viral, e consequentemente a replicação necessária para a propagação da infecção.

A fase de adsorção viral corresponde à interação das proteínas virais, representadas nos herpesvírus principalmente por glicoproteínas do envelope, com moléculas receptoras das células hospedeiras. Assim, como o TMDMB₂

mostrou atividade expressiva no teste de inativação direta, devido inibição da interação vírus-célula, resultados significativos na etapa de adsorção viral seriam esperados. No entanto, a ausência desse resultado, sugestivamente, pode ser explicada pela alta especificidade da ligação viral aos receptores celulares, dificultando a ação inibitória do flavonóide, por meio da ligação dele às estruturas virais responsáveis pelo processo de adsorção.

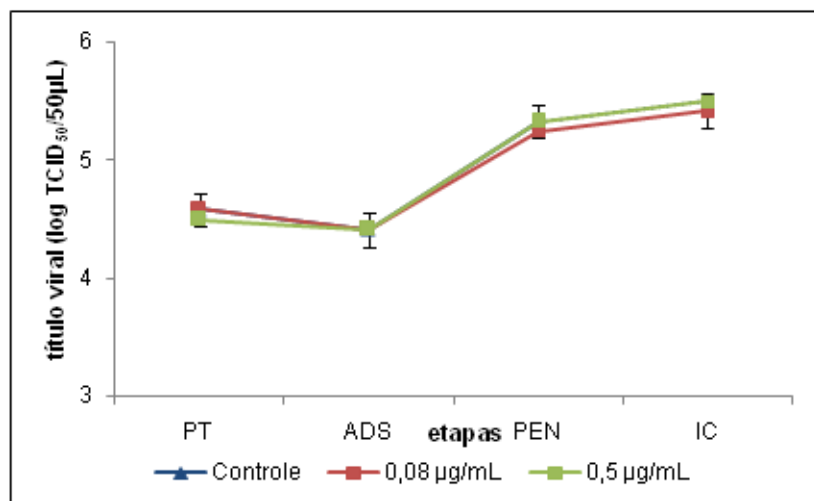


Figura 14: Efeito da adição de TMDMB₂ em diferentes etapas do ciclo replicativo do BoHV1. Duas concentrações de TMDMB₂ (0,08 µg/mL e 0,5 µg/mL) foram adicionadas nas etapas de pré-tratamento (PT), adsorção (ADS), penetração (PEN) e intracelular (IC).

Os derivados de dibenzoilmetano são flavonoides que já apresentam ação antitumoral e fotoprotetora descritas (Magalhães *et al.*, 1996; Nogueira *et al.*, 2003). No entanto, a atividade antiviral desses derivados ainda não foi relatada, e por serem pertencentes à classe dos flavonoides, podem apresentar atividade contra diferentes vírus. Por este motivo, a atividade antiviral do TMDMB₂ foi avaliada contra o vírus BoHV1, e os resultados obtidos sugerem que o TMDMB₂ inativa as partículas virais antes do processo de adsorção viral, podendo ser um futuro candidato à terapêutica clínica antiviral.

5.1.2.3 Testes Antivirais dos Extratos Vegetais

Atualmente, as pesquisas de novos agentes antivirais buscam utilizar substâncias naturais provenientes de plantas com valor medicinal e que já são empregadas para tratamento de infecções virais na medicina popular. Essa associação da pesquisa científica com o conhecimento popular favorece muito a descoberta de novos compostos bioativos, aumentando a possibilidade de novas descobertas e reduzindo o tempo da pesquisa (Khan *et al.*, 2005).

O efeito antiviral dos extratos vegetais está associado à presença de diferentes metabólitos secundários vegetais, que em muitos casos agem de forma sinérgica, potencializando a ação biológica dos extratos (Khan *et al.*, 2005). Por sua vez, a concentração desses metabólitos nos extratos é influenciada por muitos fatores, como a natureza e a concentração do solvente utilizado para a extração, o processo utilizado para extração, condições físico-químicas mantidas durante o processamento (temperatura, pH, tempo de agitação) (Marques e Vigo, 2009) e condições ambientais, por exemplo, local e época de coleta do vegetal (Leite, 2009b; Spitaler *et al.*, 2006). Geralmente, a concentração de cada metabólito nos extratos é pequena. Então, para ser detectada sua ação, esta deve ser altamente significativa. Quando detectada alguma atividade biológica, o extrato pode ser fracionado até a purificação completa e caracterização dos compostos ativos, favorecendo o aumento da atividade e o entendimento do mecanismo de ação dos compostos isolados (Felipe *et al.*, 2006).

A similaridade estrutural entre os constituintes de um mesmo extrato pode ser útil na pesquisa de novas formas ativas, pois compostos similares podem agir de forma sinérgica ou antagônica, potencializando ou inibindo suas ações, uma vez que estes constituintes podem atuar sobre alvos moleculares comuns, porém de forma diferenciada ao ativar ou inibir suas funções (Spitaler *et al.*, 2006).

5.1.2.3.1 Testes Antivirais do Extrato Hexânico

Uma redução significativa ($p < 0,05$) do título viral pelo extrato hexânico foi observada a partir do tempo de 15 minutos em todas as concentrações testadas (8 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 35 $\mu\text{g/mL}$), no ensaio de inativação direta. A redução máxima do título viral foi aproximadamente 5699,9 vezes, correspondendo a 99,98% de redução (figura 15). No entanto, no ensaio de *timing of addition* esse extrato demonstrou efeito menos expressivo, com efeito antiviral significativo ($p < 0,05$) apenas para a concentração de 35 $\mu\text{g/mL}$ na fase de penetração viral (figura 16).

A redução expressiva do título viral nos ensaios acima citados, sugere ação protetora do extrato hexânico para as células MDBK contra infecção com BoHV1. Alguns mecanismos já foram relacionados com essa atividade

protetora, como: a interação do extrato com estruturas virais superficiais que permitem a ligação vírus-célula, e conseqüentemente a adsorção e penetração viral e a redução da fluidez da membrana viral levando à inibição da fusão entre membrana viral e membrana celular (Fiore *et al.*, 2008).

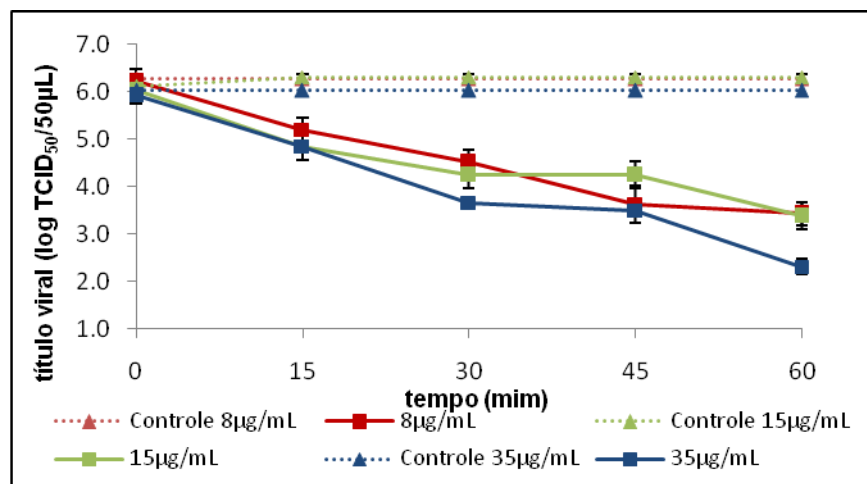


Figura 15: Atividade do extrato hexânico (8 µg/mL, 15 µg/mL, 35 µg/mL) sobre partículas de BoHV1 em diferentes tempos, obtida pela média de 3 réplicas.

Como pode ser observado na tabela 7 (Apêndice 2) as concentrações de 15 e 35 µg/mL, na fase intracelular, apresentaram reduções no título viral de 74 e 77% respectivamente. Embora o efeito inibitório do extrato nessas concentrações não tenha sido significativo ($p > 0,05$) isoladamente, a utilização dele associado a outros compostos com atividade antiviral, poderia favorecer a defesa celular, agindo de maneira somatória e contribuindo para o controle da infecção viral.

5.1.2.3.2- Testes Antivirais do Extrato Diclorometano

O extrato diclorometano mostrou resultados significativos ($p < 0,05$) no ensaio de inativação direta, com redução do título viral em todas as concentrações testadas (5, 10 e 20 µg/mL). Após o tempo de 15 minutos, houve redução do log do título viral em relação ao log do controle, com redução máxima de 103172 vezes (99,99%) (figura 17).

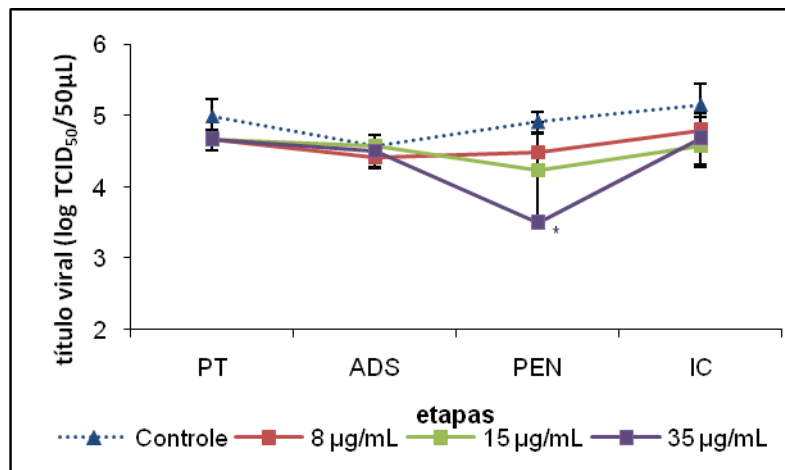


Figura 16: Efeito da adição do extrato hexânico em diferentes etapas do ciclo replicativo do BoHV1. Três concentrações do extrato (8 µg/mL, 15 µg/mL, 35 µg/mL) foram adicionadas nas etapas de pré-tratamento (PT), adsorção (ADS), penetração (PEN) e intracelular (IC). *concentração estatisticamente diferente do controle ($p < 0,05$).

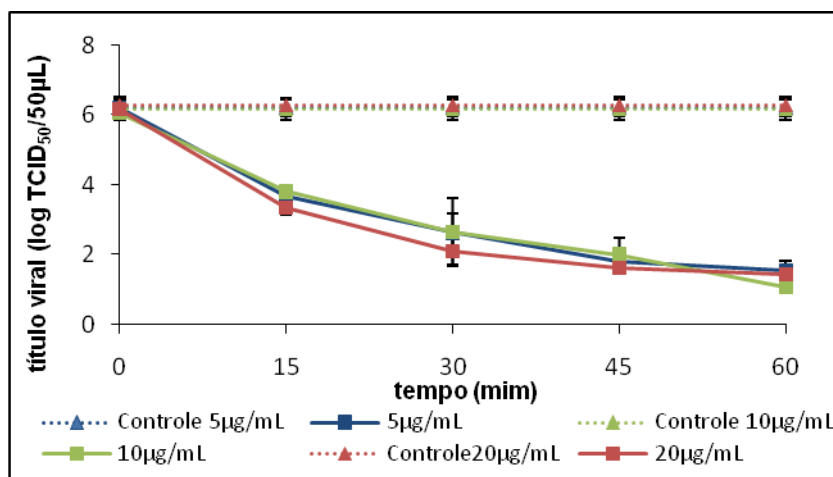


Figura 17: Atividade do extrato diclorometano (5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL) sobre partículas de BoHV1 em diferentes tempos, obtida pela média de 3 réplicas.

Avaliando mais especificamente os possíveis efeitos desse extrato nas diferentes etapas do ciclo replicativo do BoHV1, foi possível observar interferência com as etapas de adsorção e penetração viral. Nessas etapas, o extrato mostrou-se efetivo nas três concentrações utilizadas (5, 10 e 20 µg/mL). Todas as concentrações reduziram o título viral de maneira significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle não tratado (figura 18).

Estes resultados sugerem que as partículas de BoHV1 são inativadas em mais de uma etapa do estágio inicial da infecção em células MDBK. O extrato possivelmente desestabiliza a partícula viral e impede a ligação vírus-célula. Possivelmente, esses mecanismos sejam resultado da ação conjunta e complementar de vários compostos ativos presentes no extrato diclorometano.

Assim, outros estudos são necessários para isolar os compostos que poderiam ser responsáveis por essa atividade antiviral do extrato e confirmar os mecanismos como eles exercem seus efeitos antivirais.

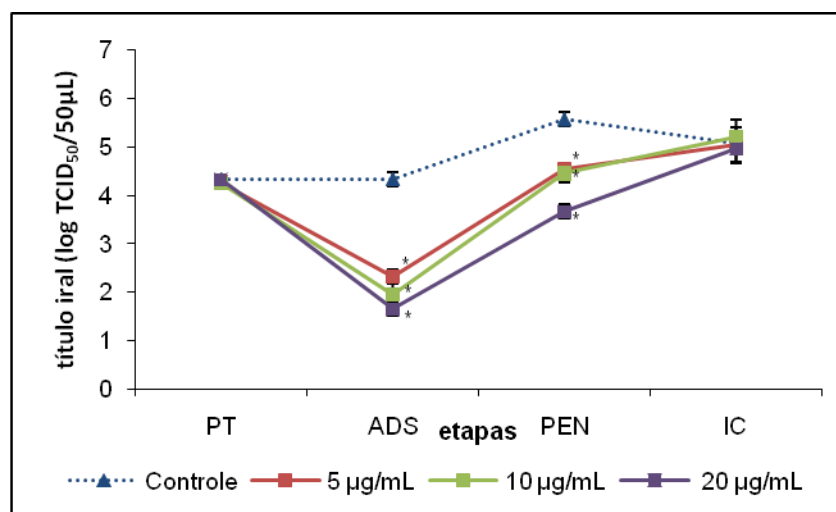


Figura 18: Efeito da adição do extrato diclorometano em diferentes etapas do ciclo replicativo do BoHV1. Três concentrações do extrato (5µg/mL, 10µg/mL, 20µg/mL) foram adicionadas nas etapas de pré-tratamento (PT), adsorção (ADS), penetração (PEN) e intracelular (IC). *concentração estatisticamente diferente em relação ao controle ($p < 0,05$).

5.1.2.3.3- Testes Antivirais do Extrato Etanólico

Quando as partículas virais de BoHV1 foram tratadas com o extrato etanólico antes da infecção nas células MDBK, foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$) do título viral, a partir do tempo de 15 minutos, nas três concentrações utilizadas (10, 25 e 40 µg/mL). Esse potencial é demonstrado na figura 19, com redução máxima do título viral de 134534,9 vezes (99,99%).

Como mostrado na tabela 4 (Apendice 1), mesmo a menor concentração do extrato etanólico testada (10 µg/mL) apresentou efeito virucida expressivo, com redução do título viral em mais de 90%. Isso pode estar relacionado à alta afinidade dos metabólitos ativos presentes no extrato etanólico pelas partículas virais do BoHV1.

Quando as células MDBK foram previamente tratadas com o extrato etanólico (pré-tratamento), o título viral apresentou redução significativa ($p < 0,05$) nas concentrações de 25 e 40 µg/mL. Isso sugere que esse extrato consiga também interagir com estruturas da superfície celular, garantindo às

células certa resistência à infecção. Schnitzler *et al.* (2008), mostram que o extrato etanólico a 20% da espécie *Salvia officinalis*, obtido de plantas coletadas na região sul da Alemanha, possui um modo de ação duplo. Esse extrato interage com estruturas da superfície celular e estruturas do envelope viral de HSV-1 e HSV-2, com redução de 94% da infecção.

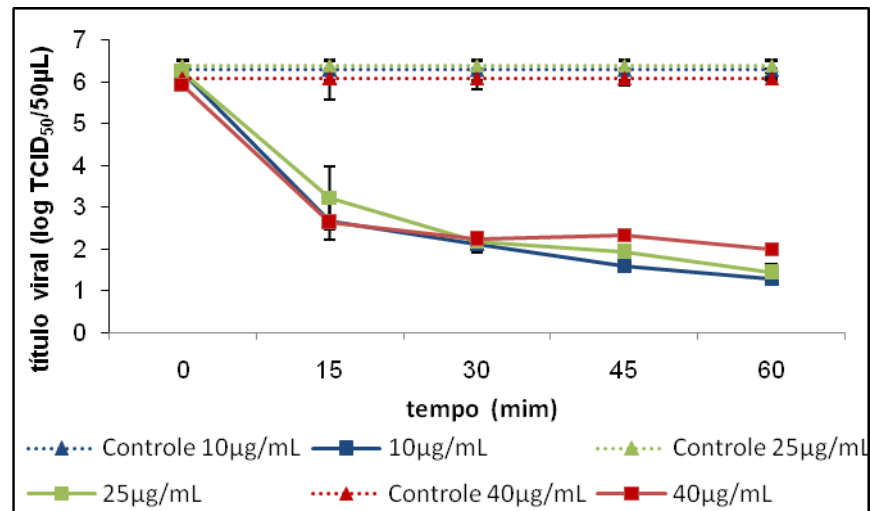


Figura 19: Atividade do extrato etanólico (10 µg/mL, 25 µg/mL, 40 µg/mL) sobre partículas de BoHV1 em diferentes tempos, obtida pela média de 3 réplicas.

Na adição do extrato durante a adsorção, penetração e fase intracelular do ciclo de replicação do vírus, o log do título viral também sofreu redução expressiva. Na adsorção, a redução foi significativa ($p < 0,05$) em todas as concentrações testadas em relação ao controle. Na penetração, apenas as concentrações de 25 e 40 µg/mL conseguiram reduzir significativamente ($p < 0,05$) o título viral nas células tratadas em relação ao controle não tratado. Já a adição do extrato após a penetração (fase intra-celular), diminuiu a atividade viral de forma significativa ($p < 0,05$), em todas as concentrações (figura 20). Esses resultados sugerem que o modo de ação do extrato seja derivado da inibição da adsorção viral e da inibição dos estágios iniciais do ciclo de replicação viral.

O extrato etanólico se apresentou como o melhor composto antiviral entre os diversos compostos avaliados no estudo para uma possível formulação terapêutica antiviral. Ele atuou em todos os estágios da infecção viral e pré-infecção. Uma possível explicação para esse efeito seria sua interação com estruturas protéicas nas membranas celulares ou virais, que dificultariam a interação das partículas virais com seus respectivos receptores celulares

(Serkedjieva e Ivancheva, 1999). Além desse possível mecanismo inibitório, o extrato poderia estar causando modificações na membrana viral, como por exemplo, reduzindo a fluidez da membrana, que favoreceriam o efeito inibitório da infecção (Fiore *et al.*, 2008). Esses mecanismos, isolados ou de maneira complementar, acabam por prejudicar a replicação viral e a liberação de novas partículas virais, combatendo a infecção.

A possível diversidade de mecanismos antivirais e a excelente resposta do extrato etanólico contra a infecção por BoHV1, pode estar relacionada com a presença de diferentes metabólitos secundários. Eles estariam agindo de maneira complementar, aumentando a proteção da infecção de células MDBK por partículas de BoHV1. Ensaios complementares são de suma importância para a identificação e isolamento das moléculas ativas desse extrato. Esse isolamento garante uma melhor avaliação do efeito inibitório do extrato contra as partículas de BoHV1, possibilitando a elucidação efetiva dos mecanismos de ação responsáveis pela atividade antiviral.

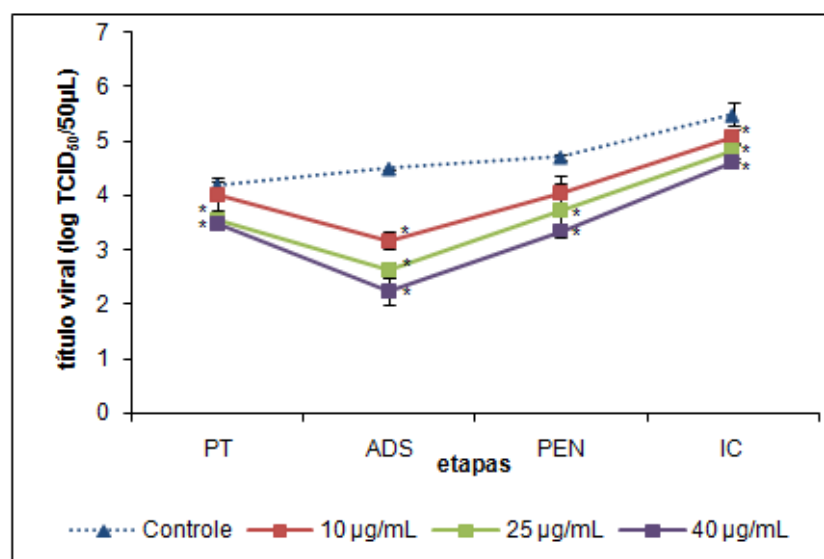


Figura 20: Efeito da adição do extrato etanólico em diferentes etapas do ciclo replicativo do BoHV1. Três concentrações do extrato (10µg/mL, 25µg/mL, 40µg/mL) foram adicionadas nas etapas de pré-tratamento (PT), adsorção (ADS), penetração (PEN) e intracelular (IC). *concentração estatisticamente diferente em relação ao controle (p<0,05).

A atividade antiherpética tem sido encontrada em muitas espécies vegetais e parece estar relacionada a alguns metabólitos secundários já bastante estudados, como flavonoides, taninos e outros compostos polifenólicos (Chiang *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2009.; Freitas *et al.*, 2009; Schnitzler *et al.*, 2008).

Já se sabe que os compostos polifenólicos são capazes de se ligar a proteínas, formando complexos bastante instáveis (Haslam, 1996). Assim, possivelmente a atividade antiviral dos compostos fenólicos está relacionada à sua ligação a proteínas virais, entre elas glicoproteínas do envelope viral. Essa ligação favorece a desestabilização da partícula viral e a inibição da interação vírus-células, favorecendo assim o controle da infecção viral. Muitos relatos relacionados à atividade dos compostos fenólicos a caracterizam por ser ativa principalmente na pré-infecção e nos estágios iniciais da infecção viral (Felipe *et al.*, 2006; Nolkemper *et al.*, 2010; Schnitzler *et al.*, 2008; Serkedjieva e Ivancheva, 1999).

A tabela 6 (Apêndice 3) resume os resultados dos testes antivirais de todos os compostos avaliados no nosso estudo. Os extratos vegetais apresentaram melhor atividade antiviral e virucida. Isso pode estar relacionado à presença de vários constituintes ativos nos extratos brutos e à possível interação sinérgica entre esses, que acaba por potencializar o efeito inibitório dos extratos vegetais contra as partículas virais (Amoros *et al.*, 1992; Serkedjieva e Ivancheva, 1999). Além disso, em baixas concentrações o extrato pode não interagir com as partículas virais, mas uma inativação parcial pode ocorrer devido à ligação de componentes residuais com alta afinidade à glicoproteínas virais (Serkedjieva e Ivancheva, 1999). Por isso, esses extratos possuem um perfil promissor para a continuação dos estudos *in vitro* e *in vivo* para o futuro desenvolvimento de formulações com ação antiviral contra o BoHV1 para uso terapêutico.

6 CONCLUSÕES

- Foram determinadas as concentrações máximas não tóxicas dos compostos para as células MDBK. Concentrações abaixo da CMNT de cada composto foram utilizadas para os testes antivirais.
- O DMSO, nas concentrações testadas, se comportou como um solvente inerte, sem interferir na ação antiviral e virucida dos compostos.
- Todos os compostos tiveram efeito virucida. O efeito virucida dos extratos vegetais foi mais efetivo que aquele apresentado pelas substâncias puras.
- A quercetina teve atividade antiviral nas fases de adsorção e penetração do ciclo replicativo do BoHV1, uma vez que interferiu com as etapas iniciais do processo de infecção viral.
- O TMDMB₂ não apresentou efeito inibitório em nenhuma das fases do ciclo replicativo viral.
- Os extratos diclorometano e etanólico mostraram atividade antiviral nas fases de adsorção e penetração viral, atuando nos estágios iniciais da infecção das células MDBK pelo BoHV1.
- Somente o extrato etanólico atuou em todas as fase do ciclo replicativo do BoHV1, se mostando o mais eficaz como antiviral entre os compostos testados.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados deste estudo demonstram a importância da continuidade da pesquisa, buscando confirmar a atividade antiviral dos compostos *in vitro* e *in vivo* contra outros vírus e o isolamento e purificação dos componentes biologicamente ativos dos extratos vegetais responsáveis pela atividade, já que compostos avaliados se mostraram promissores como substâncias antivirais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abifisa-Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. Medicamentos fitoterápicos. Disponível em: < http://www.abifisa.org.br/noticias_ver.asp?news=2610>. Acesso em: 18 de janeiro de 2011.
- Abifisa-Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. Plantas medicinais na dose certa. Disponível em: <http://www.abifisa.org.br/noticias_ver.asp?news=2887>. Acesso em: 17 de jan.2011.
- Abifisa-Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. País deixa de gerar US\$ 5 bi por ano com fitoterápicos. Disponível em: <http://www.abifisa.org.br/noticias_ver.asp?news=3594 >. Acesso em: 17 de jan.2011.
- Acheflan®: creme e aerosol. Farmacêutico Responsável: Dr. Wilson R. Farias. Guarulhos, SP: Aché Laboratórios S.A., 2011. Bula de remédio. Disponível em: <[http://www.ache.com.br/Downloads/LeafletText/4/bu%20acheflan%20cr%202220603\(A\).pdf](http://www.ache.com.br/Downloads/LeafletText/4/bu%20acheflan%20cr%202220603(A).pdf)>. Acesso em: 19/01/2011.
- Ackermann, M.; Muller, H.K.; Bruckner, L.; Kihm, U. Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland: review and prospects. *Veterinary Microbiology* 23: 365-370, 1990.
- Aguilar, J.S.; Roy, D.; Ghazal, P.; Wagner, E.K. 2002 Dimethyl sulfoxide blocks herpes simplex vírus-1 productive infection in vitro acting at different stages with positive cooperativity. Application of micro-array analysis. *BioMed Central Infectious Diseases*. Disponível em: www.biomedcentral.com/1471-2334/2/9. Acesso em: 29 de dezembro de 2010.
- Akula, S.M.; Hurley, D.J.; Wixon, R.L.; Wang, C.; Chase, C.C. Effect of genistein on replication of bovine herpesvirus type 1. *American Journal of Veterinary Research* 63:1124-1128, 2002.
- Amoros, M.; Simoes, C.M.; Girre, L.; Sauvager, F.; Cormier, M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products* 55:1732-1740, 1992.
- Andrade, G.I. Diagnóstico sorológico de *herpesvírus bovino 1* e *5*: proteínas virais, recombinantes e peptídeos sintéticos em suportes sólidos comerciais e modificados por engenharia de superfície. 2006. 134 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2006.
- Andres, A.; Donovan, S.M.; Kuhlenschmidt, M.S. Soy isoflavones and virus infections. *Journal of Nutritional Biochemistry* 20:563-569, 2009.

- Arora, P.; Dixit, N.M. Timing the emergence of resistance to anti-HIV drugs with large genetic barriers. *PLoS Computational Biology* 3:305-310, 2009.
- Barbosa, A.C.V.C. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo *herpesvírus bovino* tipo 1 (BoHV1) no estado de Goiás. 2004. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2004.
- Baugust, T.J.; Clark, L. Pathogenesis of meningo-encephalitis produced in calves by infectious bovine rhinotracheitis herpesvirus. *Journal of Comparative Pathology* 82:375-383, 1972.
- Behling, E.B.; Sendão, M.C.; Francescato, H.D.C.; Antunes, L.M.G.A.; Bianchi, M.L.P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Brazilian Journal of food and nutrition* 15: 285-292, 2004.
- Bertorello, A.M.; Aperia, A.; Walaas, S.I.; Nairn, A.C.; Greengard, P. Phosphorylation of the catalytic subunit of Na⁺/K⁺-ATPase inhibits the activity of the enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:11359-11362, 1991.
- Betancur-Galvis, L.A.; Morales, G.E.; Forero, J.E.; Roldan, J. Cytotoxic and Antiviral Activities of Colombian Medicinal Plant Extracts of the *Euphorbia* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 541-546, 2002.
- Billaud, G.; Thouvenot, D.; Morfin, F. Drug targets in herpes simplex and epstein barr virus infections. *Infectious Disorders-Drug Targets* 2:117-25, 2009.
- Birt, D.F.; Hendrich, S.; Wang, W. Dietary agents in cancer prevention: Flavonoides and isoflavonoids. *Pharmacology. Therapeutics* 90:157-177, 2001.
- Boon, R. Antiviral treatment: from concept to reality. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 8:5-10, 1997.
- Brady, R.C.; Bernstein, D.J. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Research* 61:73-81, 2004.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília, 60p. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 17 de janeiro de 2011.
- Brum, L.P. Atividade antiviral dos compostos fenólicos (ácidos ferúlico e transcinâmico) e dos flavonoides (quercetina e Kaempferol) sobre os Herpesvirus bovino 1, Herpesvirus bovino 5 e vírus da cinomose canina. 86 folhas. (Doutorado em Bioquímica Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

- Campadelli-Fiume, G.; Cocchi, F.; Menotti, L.; Lopes, M. The novel receptors that mediated the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesvirus into cells. *Reviews in Medical Virology* 10: 305-319, 2000.
- Carlo, G.D.; Mascolo, N.; Izzo, A.A.; Capasso, F. Flavonoids: old and new aspects of class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* 65: 337-53, 1999.
- Carpeneo, F.; Bortignon, C.; Bruni, A.; Santi, R. Effect of quercetin on membrane-linked activities. *Biochemical Pharmacology* 18:1495-1500, 1969.
- Cass, H. Herbs for the nervous system: Ginkgo, Kava, Valerian, Passionflower. *Seminars in Integrative Medicine* 2: 82-88, 2004.
- Chiang, L.C.; Chiang, W.; Liu, M.C.; Lin, C.C. In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:194-198, 2003.
- Choi, H.J.; Kim, J.H.; Lee, C.H.; Ahn, Y.J.; Song, J.H.; Baek, S.H.; Kwon, D.H. Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic. *Antiviral Research* 81:77–80, 2009.
- Choi, S.U.; Kim, K.H.; Choi, E.J.; Park, S.H.; Lee, C.O.; Jung, N.P.; Yoon, S.K.; Ryu, S.Y. P-glycoprotein (Pgp) does not affect the cytotoxicity of flavonoids from *Sophora flavescens*, which also have no effects on Pgp action. *Anticancer Research* 19:2035-2040, 1999.
- Comalada, M.; Ballester, I.; Bailon, E.; Sierra, S.; Xaus, J.; Galvez, J.; Medina, F.S.; de Zarzuelo, A. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure–activity relationship. *Biochemical Pharmacology* 72:1010-1021, 2006.
- Constantinou, A.; Mehta, R.; Runyan, C.; Rao, K.; Vaughan, A.; Moon, R. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure–activity relationships. *Journal of Natural Products* 58:217-25, 1995.
- Cos, P.; Vlietinck, A.J.; Berghe, D.V.; Maes, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* ‘proof-of-concept’. *Journal of Ethnopharmacology* 106: 290-302, 2006.
- Cushnie, T.P.T.; Lamb, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26: 343-356, 2005.
- D’Arce, R.C.F.; Almeida, R.S.; Silva, T.C.; Franco, A.C.; Spilki, F.R.; Roehe, P.M.; Arns, C.W. Restriction endonuclease and monoclonal antibody analysis of Brazilian isolates of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Veterinary Microbiology* 88:315-324, 2002.

- Davison, A.J. Evolution of Herpesviruses. *Veterinary Microbiology* 86:315-324, 2002.
- De Clercq, E. Antiviral Drugs in Current Clinical Use. *Journal of Clinical Virology* 30:115-133, 2004.
- Del Fava, C.; de Stefano, E.; Pitucos, E.M; Bilynsky, M.C.V.; Okudas, L.H; Pozzi, C.R; Verissimo, C.J.; Demarchi, J.A. Erradicação do herpesvírus bovino-1 (BHV-1) de um rebanho bovino leiteiro em manejo semi-intensivo. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 18:65-68,1998.
- Demain, A.L. *Antibiotics: Natural Products Essential to Human Health*. 2009. Disponível em: www.interscience.wiley.com. Acesso em: 30 de dezembro de 2010.
- Edwards, S.; Newman, R.H.; White, H. The virulence of British isolates of bovid herpesvirus 1 in relationship to viral genotype. *British Veterinary Journal* 147: 216-231, 1991.
- Engles, M.; Ackermann, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Veterinary Microbiology* 53:3-15, 1996.
- Felipe, A.M.; Rincão, V.P.; Benati, F.J. *et al.* Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on *Poliovirus* and *Bovine Herpesvirus*. *Bio Pharm Bulletin* 29:1092-1095, 2006.
- Fehler, F.; Hermann, J.M; Saalmuller, A.; Mettenleir, T.C.; Keil, G.M. Glycoprotein IV of *bovine herpesvirus 1* expressing cell-lines complements and recues a conditionally lethal viral mutant. *Journal of Virology* 66:831-839, 1992.
- Fenner, F.J.; Gibbs, E.P.J.; Rott, R.; Studdert, M.J.; White, D.O. Herpesviridae. In:_____.*Veterinary Virology*. London: Academic Press, 1993. Cap.19, p.337-368.
- Ferguson, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research* 475: 89-111, 2001.
- Fiore, C.; Eisenhut, R.; Krausse, R.; Ragazzi, D.; Pellati, D.; Armanini, D.; Bielenberg, J. Antiviral effects of *Glycyrrhiza* species. *Phytoter. Research* 22: 141-148, 2008.
- Fischer, G.; Cleff, M.B.; Dummer, L.A.; Paulino, N.; Paulino, A.S.; Vilela, C.O.; Campos, F.S.; Storch, T.; Vargas, G.D.; Hubner, S.O.; Vidor, T. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with *bovine herpesvirus* type 5. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 116: 79-84, 2007.
- Flores, E.F. *Herpesvírus bovino* tipo 1 (BHV-1). In: Encontro Internacional de Virologia Molecular Veterinária, 1996, Santa Maria. Anais. Santa Maria:Ed. da UFSM, 1996. 149-156.

- Franco, A.C.; Roehe, P.M. *Herpesviridae*. In: Flores, E.F. (ORG). *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Ed. UFMS, 2007, cap.17, p.433-488.
- Freitas, A.M.; Almeida, M.T.R; Andrighetti-Fröhner, C.R. ; Cardozo, F.T.G.S.; Barardic, C.R.M.; Farias, M.R.; Simões, C.M.O. Antiviral activity-guided fractionation from *Araucaria angustifolia* leaves extract. *Journal of Ethnopharmacology* 126:512-517, 2009.
- Freimoser, F.M.; Jakob, C.A.; Aebi, M.; Tuor, U. The MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3727–29, 1999.
- Galeota, J.A.; Flores, E.F.; Kit, S.; Kit, M.; Osorio, F.A. A quantitative study of the efficacy of a deletion mutant bovine herpesvirus-1 differential vaccine in reducing the establishment of latency by wildtype virus. *Vaccine* 15:123-128, 1997.
- García-Mediavilla, V.; Crespo, I.; Collado, P.S.; Esteller, A.; Sánchez-Campos, S.; Tunón, M.J.; González-Gallego, J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappa β pathway in Chang Liver cells. *European Journal of Pharmacology* 557:221-229, 2007.
- Gong, Y.; Raj, K.M.; Luscombe, C.A. Gadawski, I.; Tam, T.; Chu, J.; Gibson, D.; Carlson, R.; Sacks, S.L. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses. *Antiviral Research* 64:127-130, 2004.
- Gordaliza, M. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology* 12:767-76, 2007.
- Gravina, H.D; Tafuri, N.F.; Silva Júnior, A.; Fietto, J.L.R.; Oliveira, T.T.; Diaz, M.A.N.; Almeida, R. In vitro assessment of the antiviral potential of trans-cinnamic acid, quercetina and morin against equid herpesvirus 1. *Research in Veterinary Science*, 2010.
- Greco, A.; Diaz, J.J.; Thouvenot, D.; Morfin, F. Novel targets for the development of anti-herpes compounds. *Infectious Disorders Drug Targets* 7:11-8, 2007.
- Guttner, J.; Veckenstedt, A.; Heinecke, H.; Pusztai, R. Effect of quercetin on the course of mengo virus infection in immunodeficient and normal mice. A histological study. *Acta Virologica* 26:148-155, 1982.
- Hage, J.J.; Vellema, P.; Schukken, Y.H.; Barkema, H.W.; Rijsewijk, F.A.; van Oirschot., J.T.; Wentink, G.H. Sheep do not have a major role in bovine herpesvirus1 transmission. *Veterinary Microbiology* 57:41-54, 1997.
- Haller, O.; Kochs, G.; Weber, F. The interferon response circuit: Induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 344: 119-130, 2006.

- Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Loliger, J.; Arouma, O.I. Antioxidant characterization. *Food and Chemical Toxicology* 33: 6176-18, 1995.
- Harvey, A.L. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? *Trends in Pharmacological Sciences* 20: 196-198, 1999.
- Harvey, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today* 5: 294-300, 2000.
- Haslam, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products* 59: 205-215, 1996.
- Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96: 67-202, 2002.
- Hofmann Jr, A.E.; Seben, C.; Montanha, J.A.; Dutilh, J.; Sobral, M.; Henriques, A.; Zuanazzi, J.A.S. Avaliação da atividade antiviral e determinação do perfil cromatográfico de *Hippeastrum glaucescens* (Martius) Herbert (Amaryllidaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 14:7-14, 2004.
- Hoof, L.V.; Berghe, D.A.V.; Hatfield, G.M.; Vlietinck, A.J. Plant antiviral agents. V. 3-methoxyflavones as potent inhibitors of viral induced block of cell synthesis. *Planta Medica* 50:513-517, 1984.
- Horisberger, J.D.; Jannin, P.; Reuben, M.A.; Lasater, L.S.; Chow, D.C.; Forte, J.G.; Sachs, G.; Rossier, B.C.; Geering, K. The H⁺-ATPase b-subunit can act as a surrogate for the b-subunit of Na⁺/K⁺-pumps. *Journal of Biological Chemistry* 266:19131-19134, 1991.
- Hudson, J.B.; Towers, G.H.N. Phytochemicals with antiviral properties- A review. *Indian Journal of Medical Microbiology* 11: 5-25, 1993.
- ICTV-International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_herpe.htm>. Acesso em: 18 de janeiro de 2011.
- Jackson, K.M.; DeLeon, M.; Reynold, C.; Verret, C.R.; Harris, W.B. Dibenzoylmethane induces cell cycle deregulation in human prostate cancer cells. *Cancer Letters* 178:161-165, 2002.
- Kaashoek, M.J.; Sraever, P.H.; Van Rooij, E.M.; Quak, J.; Van Oirschot, T.J. Virulence, immunogeneticity and reactivation of seven *bovine herpesvirus* 1.1 strains: clinical and virological aspects. *Veterinary Record* 139:416-421, 1996.
- Kahrs, R.F. Infectious Bovine Rhinotracheitis. In _____ *Viral diseases of Cattle*. Iowa: Iowa State University Press, 1981, cap.15, 135-156.
- Khan, M.T.H.; Ather, A.; Thompson, K.D.; Gambari, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Research* 67: 107-119, 2005.

- Kim, Y.; Narayanan, S.; OkChang, K. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. *Antiviral Research* 88:227-235, 2010.
- Kligman, L.H. The effects of UVA radiation-are sunscreens protective enough. *Journal of Toxicology - Cutaneous and Ocular Toxicology* 8:565-568, 1989.
- Koseki, I.; Simoni, I.C.; Nakamura, I.T.; Noronha, A.B.; Costa, S.S. Antiviral activity of plant extracts against aphovirus, pseudorabies virus and pestivirus in cell cultures. *Microbios Letters* 44:19-30, 1990.
- Kuo, k., Chang, J., Wang, K., Chiang, L. Water Extract of Glycyrrhiza uralensis Inhibited Enterovirus 71 in a Human Foreskin Fibroblast Cell Line. *The American Journal of Chinese Medicine* 37: 383-394, 2009.
- Kuo, P.L.; Hsu, Y.L.; Lin, C.C. The chemopreventive effects of natural products against human cancer cells. *International Journal of Engineering Science* 3: 203-214, 2005.
- Kwon, K.H.; Murakami, A.; Tanaka, T.; Ohigashi, H. Dietary rutin, but not its aglycon quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochemistry Pharmacology* 69:395-406, 2005.
- Lage, A.P.; Castro, R.S.; Melo, M.I.; Aguiar, P.H.; Barreto Filho, J.B.; Leite,R.C. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State, Brazil. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 49:195-197, 1996.
- Lecot, S.; Belouzard, S.; Dubuisson, J.; Rouille, Y. Bovine viral diarrhoea virus entry is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology* 79:10826-10829, 2005.
- Leite, J.P.V. Desenvolvimento da Fitoterapia. In_____Fitoterapia:bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Atheneu, 2009a, cap.1, p.3-20.
- _____. Desenvolvimento da Fitoterapia. In_____Fitoterapia:bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Atheneu, 2009b, cap.3, p.47-97.
- Leite, J.P.V.; Fernandes, J.M.; Fávaro, L.B.; Gontijo, D.C.; Marotta, C.P.B.; Siqueira, L.C.; Maia, R.T.; Garcia, F.C.P. Plantas medicinais no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. MG. *Biota:Boletim Técnico Científico da Diretoria de Biodiversidade do IEF-MG. Instituto Estadual de Florestas, Belo Horizonte* 1(4): 16-34, 2008.
- Lemaire, M.; Weynants, V.; Godfroid, J.; Schynts, F.; Meyer, G.; Letesson, J.J.; Thiry, E. Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *Journal of Clinical Microbiology* 38:1885-1894, 2000.

- Lemaire, M.; Pastoret, P.P.; Thiry, E. Le contrôle de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. *Annales de Médecine Vétérinaire* 138:167-180, 1994.
- Li, E.; Stupack, D.G.; Brown, S.L.; Klemke, R.; Schlaepfer, D.D.; Nemerow, G.R. Association of p130CAS with phosphatidylinositol-3-OH kinase mediates adenovirus cell entry. *Journal of Biological Chemistry* 275:14729-35, 2000.
- Li, Y.; Van Drunen Little-Van Den Hurk, S.; Babiuk, L.A.; Liang, X. Characterization of cell-binding properties of bovine herpesvirus 1 glycoproteins B, C and D: identification of dual cell-binding function of gB. *Journal of Virology* 69: 4758-4768, 1995.
- Lin, C.C.; Lu, Y.P.; Lou, Y.R.; Ho, C.T.; Newmark, H.H.; MacDonald, C.; Singletary, K.W.; Huang, M.T. Inhibition by dietary dibenzoylmethane of mammary gland proliferation, formation of DMBA-DNA adducts in mammary glands, and mammary tumorigenesis in Sencar mice.
- Lu, J.; Zheng, Y.; Luo, L.; Wu, D.; Sun, D.; Feng, Y. Quercetin reverses D-galactose induced neurotoxicity in mouse brain. *Behavioural Brain Research* 171:251-260, 2006.
- Lyu, S.Y.; Rhim, J.Y.; Park, W.B. Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro. *Archives of Pharmacal Research* 28:1293-1301, 2005.
- Machado, H.; Nagem, T.J.; Peters, V.M.; Fonseca, C.S.; Oliveira, T.T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução de Juiz de Fora* 27: 33-39, 2008.
- Madin, S.H.; York, C.J.; McKercher, D.G. Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. *Science* 129:721-722, 1956.
- Magalhães, A.F.; Tozzi, A.M.G.A.; Sales, B.H.L.N.; Magalhães, E.G. Twenty-three Flavonoids from *Lonchocarpus subglaucescens* roots. *Phytochemistry* 42:1459-1471, 1996.
- Magalhães, A., Nogueira, M. A. Three dibenzoylmethane derivatives from *Lonchocarpus* species. *Phytochemistry* 46: 1029-1033, 1997.
- Mahony, T.J. Bovine herpesvirus: What is missing from our understanding of the relationship between BoHV1 and BoHV-5? *The Veterinary Journal* 184:124-125, 2010.
- Marchand, L.L. Cancer preventive effects of flavonoids. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56:296-301, 2002.
- Marques, L.C.; Vigo, C.L.S. Preparação e padronização de extratos vegetais. In _____ *Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas*. São Paulo: Atheneu, 2009, cap.7, p.169-204.

- Mars, M.H.; Jong, M.C.M.; Van Maanen, C.; Hage, J.J.; Van Oirschot, J.T. Airborne transmission of bovine herpesvirus 1 infections in calves under field conditions. *Veterinary Microbiology* 76:1-13, 2000.
- Mcchesney, J.D.; Venkataraman, S.K.; Henri, J.T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry* 68: 2015-2022, 2007.
- McKercher, D.G. Studies of etiologic agents of infectious bovine rhinotracheitis and blaschenausschlag (coital vesicular exanthema). *American Journal of Veterinary Research* 24:501-508, 1963.
- Melo, P.S.; Maria, S.S.; Vidal, B.C.; Haun, M.; Duran, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In vitro Cellular & Developmental Biology: Animal* 36:639-543, 2002.
- Mettenleiter, T.C.; Klupp, B.G.; Granzow, H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Current Opinion in Microbiology* 9:423-429, 2006.
- Meyer, G.; Hanon, E.; Georgette, D.; Pastoret, P.; Thiry, E. Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture. *Journal of General Virology* 79:1983-1987, 1998.
- Miller, J.M.; Whetstone, C.A.; Bello, L.J.; Lawrence, W.C. Determination of ability of a thymidine kinase negative deletion mutant of bovine herpesvirus-1 to cause abortion in cattle. *American Journal of Veterinary Research* 52:1038-1043, 1991.
- Miller, J.M.; Van der Maaten, M.J. Reproductive tract lesions in heifers after intrauterine inoculation with infectious bovine rhinotracheitis virus. *American Journal of Veterinary Research* 45:790-794, 1984.
- Miranda, M.N.F.S.; Almeida, A.P.; Costa, S.S.; Santos, M.G.M.; Lagrota, M.H.C.; Wigg, M.D. In vitro activity of *Persea americana* leaves on acyclovir-resistant and PPA-resistant herpes simplex virus. *Phytotherapy* 4:267-272, 1997.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65:55-63, 1983.
- Muller, V.; Chávez, J.H.; Reginatto, F.H.; Zucolotto, S.M.; Niero, R.; Navarro, D.; Yunes, R.A.; Schenkel, E.P.; Barardi, C.R.M.; Zanetti, C.R.; Simões, C.M.O. Evaluation of Antiviral Activity of South American Plant Extracts Against *Herpes Simplex Virus* Type 1 and *Rabies Virus*. *Phytotherapy Research* 21:970-974, 2007.
- Muylkens, B.; Thiry, J.; Kirten, P.; Schynts, F.; Thiry, E. Bovine herpesvirus infection and bovine herpesvirus rhinotracheitis. *Veterinary Research* 38:181-209, 2007.
- Nagai, T.; Moriguchi, R.; Suzuki, Y.; Tomimori, T.; Yamada, H. Mode of action of the anti-influenza virus activity of plant flavonoid, 5,7,40-trihydroxy-8-

- methoxyflavone, from the roots of *Scutellaria baicalensis*. *Antiviral Research* 26:11-25, 1995a.
- Nagai, T.; Suzuki, Y.; Tomimori, T.; Yamada, H. Antiviral activity of plant flavonoid, 5,7,40-trihydroxy-8-methoxyflavone, from the roots of *Scutellaria baicalensis* against influenza A (H3N2) and B viruses. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 18:295-299, 1995b.
- Nandi, S.; Kumar, M; Manohar, M.; Chauhan, R.S. *Bovine herpes virus* infections in cattle. *Animal Health Research Reviews* 10:85-98, 2009.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M.. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* 70:461-477, 2007.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products* 66:1022-1037, 2003.
- Ng, T.B.; Liu, F.; Wang, Z.T. Antioxidant activity of natural products from plants. *Life Sciences* 66: 709-723, 2000.
- Nijveldt, R.J.; van Nood, E.; van Hoorn, D.E.C.; Boelens, P.G.; van Norren, K.; Leeuwen, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 74: 418-425, 2001.
- Nobili, S.; Lippib, D.; Witortc, E.; Donninic, M.; Bausi, L.; Minia, E.; Capacciolic, S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research* 59: 365-378, 2009.
- Nodari, R.O.; Guerra, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C.M.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, L.A.; Mentez; Petrovick,P.R. (Ed.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2001 cap.1, p. 13-28.
- Nogueira; M.A.; Marsaioli, A.J. A novel sunscreen agent having antimelanoma activity. *Il Farmaco* 58:1163-1169, 2003.
- Nolkemper, S.; Reichling, J.; Sensch, K.H.; Schnitzlu, P. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine* 17:132-138, 2010.
- OIE- World Organisation for Animal Health. Disease information- Disease distribution maps. Disponível em: <http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_status_map&disease_type=Terrestrial&disease_id=37&disease_category_terrestrial=0&empty=999999&disease_category_aquatic=0&disease_serotype=0&sta_method=semesterly&selected_start_year=2009&selected_report_period=2&selecte

d_start_month=1&page=disease_status_map&date_submit=OK.> Acesso em: 10 de janeiro de 2011.

- OIE- World Organisation for Animal Health. Terrestrial Animal Health Code 2010. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/nomes/mcode/en_sommaire.htm> Acesso em: 10 de janeiro de 2011.
- Oliveira, F.S. Atividade antiviral da quercetina sobre alguns vírus de importância veterinária. 2007. 138 folhas, (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- Ono, K.; Nakane, H.; Fukushima, M.; Chermann, J.C.; Barre-Sinoussi, F. Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *European Journal Biochemistry* 190:469-476, 1990.
- Orhan, D.D.; ozçelik,B.; ozgen,S.; Ergun, F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research* 1-9, 2009.
- Perez, S.E.; Bretschneider, M.R.; Leunda, F.A.; Osorio, E.A.; Flores, E.F.; Odeon, A.C. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvírus type 5 in the bovine nervous system. *Veterinary Pathology* 39: 437-444, 2002.
- Pinto, A.C.; Silva, D.H.S.; Bolzani, E.S.; Lopes, N.P.; Epifanio, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova* 25: 45-61, 2002.
- Plochmann, K.; Korte, G.; Koutsilieris, E.; Richling, E.; Riederer, P.; Rethwilm, A.; Schreier, P.; Scheller, C. Structure–activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 460:1-9, 2007.
- Putnam, K.P.; Bombick, D.W.; Doolittle, D.J. Evaluation of eight *in vitro* assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology In Vitro* 16:599-607, 2002.
- Ramos, S. Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18:427-442, 2007.
- Rates, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 39: 603-613, 2001.
- Reed, L.; Muench, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 18: 493-944, 1938.
- Ren, W.; Qiao, Z.; Wang, H.; Zhu, L.; Zhang, L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Medical Care Research Review* 23: 519-34, 2003.
- Reuters. Brasil terá primeiro banco de dados de plantas medicinais. Folha *On line*, Brasil, 2002. Disponível em: <<http://www.uol.com.br/folha/reuters/ult112u12329.shl>>. Acesso em: 18 de janeiro de 2011.

- Riet-Correa, F.; Vidor, T.; Schild, A.L.; Mendez, M.C. Meningoencefalites e necrose do córtex cerebral em bovinos causadas por herpesvírus bovino tipo 1. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 9:13-16, 1989.
- Rissi, D.R.; Rech, R.R.; Flores, E.F.; Kommers, G.D.; Barros, C.S.L. Meningoencefalite por herpesvírus bovino-5. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 27:251-260, 2007.
- Rocha, M.A.; Gouveia, A.M.G; Leite, R.C. *Herpesvírus bovino* tipo 1 no sêmen-revisão bibliográfica. *Ciência Rural* 29:373-380, 1999.
- Roehe, P.M.; Silva, T.C.; Nardi, N.B.; Oliveira, L.B.; Rosa, J.C.A. Diferenciação entre os vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BoHV1) e vírus da encefalite bovina (BoHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 17:41-44, 1997.
- Roizman, B.; Desrosiers, R.C.; Fleckenstein, R.; Lopez, C.; Minson, A.C.; Studdert, M.J. Family Herpesviridae. *Archives of Virology* 140 114-127, 1995.
- Roizman, B.; Pellet, P.E. The family herpesviridae: A brief introduction. In: Roizman e Pellet, 2001, D.M.; Howley, P.M.. *Field's virology*. 4th ed. Philadelphia: Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2001, v.1, cap.71, p.2381-2461, 2001.
- Sakihama, Y.; Cohen, M.F.; Grace, S.C.; Yamasaki, H. Plant phenolic prooxidant activities: phenolics induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177: 67-80, 2002.
- Schnitzler, P.; Nolkemper, S.; Stintzing, F.C.; Reichling, J. Comparative in vitro study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations. *Phytomedicine* 15:62-70, 2008.
- Serkedjiva J.; Ivancheva S. Antiherpes virus activity of extracts from medicinal plant *Geranium sanguineum* L. *Journal of Ethnopharmacology* 64: 59-68, 1999.
- Servier. Production Description. Disponível em: <<http://www.servier.com/Pro/Venous/Daflon/Daflon.aspx?id=658>>. Acesso em: 16 de janeiro de 2011.
- Silva, T.C.S.; Oliveira, E.A.S.; Melo, S.V.; Spilki, F.R.; Esteves, P.A.; Schmidt, C.S.R.; Moojen, V.; Esmeraldino, A.M.; Roehe, P.M. Molecular and antigenic characterization of bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5) isolated from semen. *Virus Reviews* 5:116, 2000.
- Simoni, I.C. Tratamentos antivirais. *Biológico* 65: 41-44, 2003.
- Simoni, I.C.; Fernandes, M.J.B.; Gonçalves, C.R.; Almeida, A.P.; Costa, S.S.; Lima, A.P. A study on the antiviral characteristics of *Persea americana* extracts against Aujeszky's disease virus. *Biomedical Letters* 54:173-181, 1996.

- Simoni, I.C.; Manha, A.P.S.; Sciessere, L.; Hoe, V.M.H.; Takinami, V.H.; Fernandes, M.J.B. Evaluation of the antiviral activity of Brazilian cerrado plants against animal viruses. *Virus Reviews & Research* 12:1-10, 2007.
- Smith, G.A.; Young, P.L.; Reed, K.C. Emergence of a new bovine herpesvirus 1 strain in Australian feedlots. *Archives of Virology* 140:599-603, 1995.
- Smith, V.W.; Coakley, W.; Maker, D. Transmission of a genital isolate of bovine herpesvirus 1 to calves by the respiratory route. *Australian Veterinary Journal* 56:302-304, 1980.
- Soobrattee, M.A.; Neergheen, V.S.; Luximon-Ramma, A.; Aruoma, O.I.; Bahorun, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research* 579:200-213, 2005.
- Spear, P.G. Entry of alphaherpesviruses into cells. *Seminars in Virology* 4:167-180, 1993.
- Spencer, J.P.E., Kuhnle, G.G., Williams, R.J. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochemistry Journal* 372:173-181, 2003.
- Spilki, F.R.; Esteves, P.A.; de Lima, M.; Franco, A.C.; Chiminazzo, C.; Flores, E.F.; Weiblen, R.; Driemeir, D.; Roehe, P.M. Comparative pathogenicity of bovine herpesvirus 1 (BoHV1) subtypes 1 (BoHV1.1) and 2a (BoHV1.2a). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 24:43-49, 2004.
- Spitaler, R.; Schlorhauser, P.D.; Ellmerer, E.P.; Merfort, I.; Bortenschlager, S.; Stuppner, H.; Zidorn, C. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO. *Phytochemistry* 67:409-417, 2006.
- Spruance, S.L.; Stewart, J.C.B.; Freeman, D.J.; Brightman, V.J.; Cox, J.L.; Wenerstrom, G.; McKeough, M.B.; Rowe, N.H. Early application of topical 15% idoxuridine in dimethyl sulfoxide shortens the course of herpes simplex labialis: A multicenter placebo-controlled trial. *Journal of Infectious Diseases* 161:191-197, 1990.
- Spedding, G.; Ratty, A.; Middleton, F.J.R. Inhibition of reverse transcriptase by flavonoids. *Antiviral Research* 12:99-110, 1989.
- Sun, S.W.; Yu, H.Q.; Zhang, H.; Zheng, Y.L.; Wang, J.J.; Luo, L. Quercetin attenuates spontaneous behavior and spatial memory impairment in d-galactose-treated mice by increasing brain antioxidant capacity. *Nutrition Research* 27: 169-75, 2007.
- Sy, L.; Jy, R.; Wb, P. Antiherpetic activities of flavonoids against *Herpes Simplex Virus* type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) *in vitro*. *Archives of Pharmacology Research* 28:1293-1301, 2005.

- Thiry, J.; Keuser, V.; Muylkens, B.; Meurens, F.; Gogev, S.; Vanderplasschen, A.; Thiry, E. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Veterinary Research* 37:169-190, 2006.
- Tikoo, S.K.; Campos, M.; Babiuk, L.A. Bovine Herpesvirus 1 (BoHV1): biology, pathogenesis, and control. *Advances in Virus Research* 45:191-223, 1995.
- van Donkersgoe, D.J.V.; Babiuk, L.A. Diagnosing and managing the respiratory form of infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Medicine* 86:86-98, 1991.
- van Oirschot, J.T.; Kaashoek, M.J.; Maris-Veldhuis, M.A.; Rijsewijk, F.A. Strains of bovine herpesvirus 1 that do not express an epitope on glycoprotein E in cell culture still induce antibodies that can be detected in a gE-blocking ELISA. *Veterinary Microbiology* 65:103-13, 1999.
- van Oirschot, J.T.; Kaashoek, M.J.; Rijsewijk, F.A. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Veterinary Microbiology* 53: 43-54, 1996a.
- van Oirschot, J.T. Bovine herpesvirus 1 in semen of bulls and the risk of transmissions: a brief review. *Veterinary Quarterly* 17: 29-33, 1995.
- van Oirschot, J.T.; Straver, P.J.; Van Lieshout, J.A.; Quak, J.; Westenbrink, F.; Van Exsel, A.C. A subclinical infection of bulls with bovine herpesvirus type 1 at an artificial insemination centre. *Veterinary Records* 132: 32-35, 1993.
- Vieira, S.; Brito, W.M.E.D.; Souza, W.J.; Alfaia, B.T.; Linhares, D.C.L. Anticorpos para o *herpesvírus bovino* 1(bhv-1) em bovinos do estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira* 4:131-137, 2003.
- Vistica, D.T.; Skehan, P.; Scudiero, D.; Monks, A.; Pittman, A.; Boyd, M.R. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Research* 51: 2515-2520, 1991.
- Zuanazzi, J.A.S. Flavonoides. In: In: Simões, C.M.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, L.A.; Mentez; Petrovick, P.R. (Ed.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2001 cap.23, p. 489-516.
- Wach, A.; Pyrzynska, K.; Biesaga, M. Quercetin content in some food and herbal samples. *Food Chemistry* 100: 699-704, 2007.
- Wainberg, M.A. Perspectives on antiviral drug development. *Antiviral Research* 81:1-5, 2009.
- Wagner, E. University of California-Irvine/Irvine, California, USA American Society of Microbiology. Disponível em: <http://www.microbelibrary.org>. Acesso em: 23 de dezembro de 2010.
- Wang, J.N.; Hou, C.Y.; Liu, Y.L.; Lin, L.Z.; Gil, R.R.; Cordell, G.A. Swertifrancheside, an HIV-reverse transcriptase inhibitor and the first

flavone-xanthone dimer, from *Swertia franchetiana*. *Journal of Natural Products* 57:211-217,1994.

Wigg, M.D.; Al-Jabri, A.; Costa, S.S.; Race, E.; Bodo, B.; Oxford, J. *In vitro* virucidal and virustatic anti HIV-1 effects of extracts from *Persea americana* Mill. (avocado) leaves. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 7:179-183, 1996.

Williams,C.A.; Harborne,J.B. In: HARBORNE, J.B. The flavonoids. Advances in research since 1986. London: Chapman & Hall, 337- 385,1994.

World Health Organization. Traditional medicine strategy 2002-2005. Geneva, 2002. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/afctsheets/fs134/en>. Acesso em 25 de janeiro 2010.

Yanmg, C.S.; Lndau, J.M.; Huang, M.T.; Newmark, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition* 21: 381-406, 2001.

Yao, P.; Nussler, A.; Liu, L.; Hao, L.; Song, F.; Schirmeier, A.; Nussler, N. Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathway. *Journal of Hepatology* 47: 253-61, 2007.

APÊNDICE 1

Tabela 4: Porcentagem de redução de título viral e relação aos títulos com e sem tratamento, representando a atividade virucida dos compostos sobre o BoHV1.

Tratamento	Tempo (min)	%Red. C1	%Red. C2	%Red. C3	TitC/TiT C1	TitC/TiT C2	TitC/TiT C3
DMSO	0	9,79	8,19	-	1,11	1,09	-
DMSO	15	0	0	-	1	1	-
DMSO	30	0	17,97	-	1	1	-
DMSO	45	0	26,16	-	1	1,22	-
DMSO	60	5,69	0	-	1,06	1,35	-
Quercetina	0	15,96	-3,18	-2,38	0,84	0,97	0,98
Quercetina	15	94,96	97,97	94,34	19,84	49,33	17,67
Quercetina	30	96,54	97,40	99,16	28,88	38,32	118,45
Quercetina	45	99,43	99,32	99,42	175,19	145,13	172,23
Quercetina	60	99,32	99,42	99,35	146,20	166,90	151,72
TMDMB ₂	0	12,05	28,20	-	1,14	1,39	-
TMDMB ₂	15	30,37	14,67	-	1,44	1,18	-
TMDMB ₂	30	19,64	83,84	-	1,24	6,19	-
TMDMB ₂	45	49,50	89,94	-	1,98	9,94	-
TMDMB ₂	60	17,42	91,22	-	1,21	11,39	-
Eh	0	2,43	9,95	30,79	1,03	1,11	1,45
Eh	15	90,57	96,94	94,16	10,60	32,647	17,12
Eh	30	98,10	99,18	99,62	52,56	121,67	264,54
Eh	45	99,72	99,70	99,74	353,68	330,71	384,49
Eh	60	99,84	99,88	99,98	638,65	813,83	5699,91
Ed	0	0	32,95	26,94	1,00	1,49	1,37
Ed	15	99,74	99,61	99,86	387,86	255,19	713,15
Ed	30	99,96	99,88	99,99	2596,80	830,12	13287,01
Ed	45	99,99	99,99	99,99	24735,92	11553,45	50805,15
Ed	60	99,99	99,99	99,99	47474,24	139534,45	72628,91
Ee	0	10,94	24,66	31,38	1,12	1,33	1,46
Ee	15	99,97	99,84	99,94	3153,68	632,99	1768,30
Ee	30	99,99	99,99	99,98	15204,82	16182,21	6705,80
Ee	45	99,99	99,99	99,98	52321,72	28836,49	5567,04
Ee	60	99,99	99,99	99,99	103172,01	85865,56	12566,67

Eh: extrato hexânico; Ed: extrato diclorometano; Ee: extrato etanólico.

APÊNDICE 2

Tabela 5: Porcentagem de redução de título viral e relação dos títulos com e sem tratamento representando a ação antiviral dos compostos no ciclo infectivo do BoHV1.

Tratamento	Fase	%Red. C1	%Red. C2	%Red. C3	TitC/TitT C1	TitC/TitT C2	TitC/TitT C3
DMSO	PT	17,91	8,35	-	1,22	1,09	-
DMSO	ADS	-6,58	23,10	-	0,94	1,22	-
DMSO	PEN	-13,19	0	-	1,21	1,00	-
DMSO	IC						
Quercetina	PT	63,28	60,27	54,81	2,73	2,52	2,22
Quercetina	ADS	70,51	81,92	92,59	3,40	5,53	13,50
Quercetina	PEN	0	56,81	84,36	1,00	2,32	6,40
Quercetina	IC	61,53	63,58	82,66	2,60	2,75	5,77
TMDMB ₂	PT	0	20,60	-	1,00	1,26	-
TMDMB ₂	ADS	0	0	-	1,00	1,00	-
TMDMB ₂	PEN	20,77	0,03	-	1,26	1,00	-
TMDMB ₂	IC	14,66	0	-	1,17	1,00	-
Eh	PT	56,81	56,81	56,81	2,32	2,32	2,32
Eh	ADS	32,24	0	9,72	1,48	1,00	1,11
Eh	PEN	58,81	64,49	96,31	2,43	2,82	27,07
Eh	IC	61,40	74,83	76,95	2,60	3,97	4,33
Ed	PT	15,08	15,08	0	1,18	1,18	1,00
Ed	ADS	99,0	99,48	99,79	100,0	192,42	487,55
Ed	PEN	91,11	92,27	98,79	11,24	12,94	82,97
Ed	IC	-5,31	15,12	11,62	0,95	0,61	1,13
Ee	PT	26,03	76,36	79,66	1,35	4,23	4,92
Ee	ADS	94,97	98,55	99,38	19,92	68,95	159,80
Ee	PEN	74,13	84,22	95,40	3,87	6,34	21,74
Ee	IC	62,93	79,12	87,32	2,70	4,80	7,89

Eh: extrato hexânico; Ed: extrato diclorometano; Ee: extrato etanólico. ADS: adsorção viral; PT: pré-tratamento celular; PEN: penetração viral; IC: fase intra celular.

APÊNDICE 3

Tabela 6: Resultados do teste de inativação direta e *timing of addition*, mostrando a atividade antiviral da quercetina, TMDMB₂, e dos extratos vegetais (Eh, Ed, Ee).

Ensaio		Inativação		<i>Timing of addition</i>			
		Direta	Red.máx	PT	ADS	PEN	IC
Quercetina	C1	+	99,42%	-	-	-	-
	C2	+		-	-	-	-
	C3	+		-	+	+	-
TMDMB ₂	C1	-	91,22%	-	-	-	-
	C2	+		-	-	-	-
Extrato Hexânico (Eh)	C1	+	99,98%	-	-	-	-
	C2	+		-	-	-	-
	C3	+		-	-	+	-
Extrato diclorometano (Ed)	C1	+	99,99%	-	+	+	-
	C2	+		-	+	+	-
	C3	+		-	+	+	-
Extrato etanólico (Ee)	C1	+	99,99%	-	+	-	+
	C2	+		+	+	+	+
	C3	+		+	+	+	+

Eh: extrato hexânico; Ed: extrato diclorometano; Ee: extrato etanólico.

+: efeito antiviral significativo em relação ao controle ($p < 0,05$); -: efeito antiviral não significativo em relação ao controle ($p > 0,05$).

APÊNDICE 4

1. Cultivo Celular

Meio Essencial Mínimo Sigma®

MEM	1 frasco
Água MilliQ	q.s.p. 1000mL

→ pH 7,2, conservar a 4°C até por 6 meses, conservando as características físicas do meio como a cor, vedar com parafilme, alíquotar em garrafas de vidro estéreis de 90 mL.

2. Composições

Solução estoque das substâncias puras para experimentos *in vitro* (100 mg/mL)

Composição	100 mg
DMSO	q.s.p. 1 mL

→ Posteriormente, essa solução foi diluída em MEM para os testes.

Solução estoque dos extratos vegetais para experimentos *in vitro* (100 mg/mL)

Composição	10 mg
DMSO	q.s.p. 1 mL

→ Posteriormente, essa solução foi diluída em MEM para os testes

3. Demais soluções

Tampão Fosfato (PBS- pH 7,2):

NaCl	7,2g
KH ₂ PO ₄	0,43g
Na ₂ HPO ₄	1,48g
Água MilHQ	q.s.p 1000 mL

→ *Para lavagem de células, completar com soro fetal bovino a 5%.
(95 ml de PBS + 5ml de SFB)*

MTT

MTT	1 mg
PBS	1 mL

→ Esta solução deve ser preparada no momento do uso.