

HUMBERTO DORIGUÊTTO GRAVINA

**ESTUDO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIVIRAL DE ÁCIDO *trans*-
CINÂMICO, FLAVONÓIDES, CORANTE MONASCUS E EXTRATOS
VEGETAIS SOBRE O Herpesvirus equino 1**

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
2008

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

T

G777e
2008 Gravina, Humberto Doriguêto, 1984-
Estudo *in vitro* do potencial antiviral de ácido
trans-cinâmico, flavonóides, corante monascus e
extratos vegetais sobre o Herpesvirus equino 1 /
Humberto Doriguêto Gravina. – Viçosa, MG, 2008.
xvi, 84f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Márcia Rogéria de Almeida.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 67-83.

1. Virologia veterinária. 2. Equino - Doenças.
3. Doenças por Herpesvirus. 4. Agentes antivirais.
5. Flavonóides. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22.ed. 636.089691

HUMBERTO DORIGUETTO GRAVINA

**ESTUDO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIVIRAL DE ÁCIDO *trans*-
CINÂMICO, FLAVONÓIDES, CORANTE MONASCUS E EXTRATOS
VEGETAIS SOBRE O Herpesvirus equino 1**

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*.

APROVADO: 29 de agosto de 2008.

Prof^a. Tânia Toledo de Oliveira
(Co-Orientadora)

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

Prof^a. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Prof. João Paulo Viana Leite

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

Dedico,

“A DEUS”

*Pela vida, oportunidade, força e presença
constante em cada momento,*

“Aos Meus Pais João Carlos e Ângela”

*Pelo Amor, pelas noites de sono perdidas e
dias felizes, pelo apoio, suporte e compreensão,*

“Aos Meus Irmãos”

Por partilharem o crescimento pessoal comigo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS pela oportunidade de vida e possibilidade de cumprir mais uma etapa em convívio com grandes pessoas.

Ao povo brasileiro e à Universidade Federal de Viçosa, particularmente ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo ensino de qualidade oferecido durante o curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa.

Aos meus pais, que com amor incondicional acompanharam cada momento, sendo a base primordial em minha vida.

Aos meus irmãos Fabiana e Marcus Bráulio que estiveram sempre comigo, crescendo e lutando pela mesma jornada.

Aos meus avôs, tios, primos e todos que considero minha família pela estrutura alicerçada que me forneceu berço para poder ser o que sou.

À minha orientadora Márcia Rogéria, pelos bons conselhos e pelos anos de bom convívio e trabalho que propiciaram meu aprendizado com amizade e carinho.

Às professoras Tânia Toledo, Juliana Fietto e Marisa Nogueira, pela co-orientação, ensinamentos e suporte fornecido com paciência a cada momento de dificuldade.

Aos professores João Paulo e Edel Figueiredo que gentilmente aceitaram participar da banca de defesa.

Ao professor Abelardo pelo apoio e amizade e por disponibilizar o Laboratório de Virologia da Veterinária para realização dos experimentos e que a todo o momento esteve presente para sanar dúvidas e dificuldades.

À Fernanda Souza, pelas bases que gentilmente forneceu para a realização deste trabalho.

Ao professor Rogério, pela realização das análises estatísticas.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, e do Departamento de Medicina Veterinária. Ao Eduardo e ao Reginaldo, ao senhor Valdir do LIMA e aos técnicos do setor de Medicina

Veterinária Preventiva, em especial ao Marquinhos e ao Luís Carlos por toda a ajuda e presença, fornecendo total colaboração.

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

Aos companheiros e amigos do Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA) que compartilharam o mesmo ambiente de estudo, aprendizado e trabalho, pela força e torcida, em especial à Patrícia, Orlando, Eduardo, Alexandre, Larissa, Fernandes, Isabela, Thiago, Douglas, Samuel, Janaína, Marcela e Péricles pela amizade, conselhos e enorme auxílio na realização deste trabalho.

Aos membros do Laboratório de Biofármacos, especialmente à Cida e ao José Geraldo que trabalharam comigo durante a graduação e me ajudaram durante o tempo que passei em Viçosa.

Aos amigos que dividiram comigo as salas de aula, pela partilha do conhecimento e horas de estudo.

A todos os amigos que cativei em Viçosa e os que se espalham pelo mundo, àqueles que estão próximos e aos distantes, especialmente ao Dênis que é como um irmão.

Aos amigos de república, Douglas, Lucas, Helimar e Marlon pela amizade, boa convivência e inúmeras gargalhadas. Também à Tonielli e à Zélia.

À menina dona Tita pela boa conversa e ajuda em Viçosa.

Ao grande Alexandre por tudo que fez por mim durante a vida em Viçosa, pelas realizações e torcida.

A todos que de alguma forma contribuíram e torceram por minha realização.

Vocês são partes integrantes de mim, sem as quais não chegaria até aqui.

Muito obrigado a todos!!!

BIOGRAFIA

Nascido em 17 de janeiro de 1984 em Ubá - Minas Gerais, filho de João Carlos Gravina e Ângela Maria Doriguêto Gravina. Graduado em Bioquímica em maio de 2006 pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais - Brasil. Ingressou no mestrado em Bioquímica Agrícola pela UFV em maio de 2006, defendeu a dissertação em Agosto de 2008.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1- INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVOS	3
2.1- Objetivo geral	3
2.2- Objetivos específicos	3
3- REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1- Produtos naturais.....	4
3.1.2 – Ácido <i>trans</i> -Cinâmico.....	6
3.1.2- Flavonóides.....	7
3.1.2.1 – Quercetina	11
3.1.2.2 – Morina	12
3.1.2.3 – Rutina.....	13
3.1.3 – <i>Monascus</i>	14
3.2- Herpesvirus	16
3.2.1- Herpesvirus equino 1 (EHV-1)	17
3.3- Antivirais.....	22
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1- Células e vírus.....	27
4.2- Extratos e substâncias	28
4.3- Preparações dos estoques virais e titulação.....	28
4.4- Análises <i>in vitro</i>	29
4.4.1- Análise do efeito citotóxico	29
4.4.2- Análises pré-infecção.....	31

4.4.2.1- Determinação da atividade virucida (Ensaio de Inativação Direta - AID)	31
4.4.2.2- Determinação da atividade sobre as células (Ensaio “ <i>End Point</i> ” – EP)	32
4.4.3- Análises de efeitos durante o ciclo de replicação viral.....	33
4.4.3.1- Ensaio da cinética de adição de drogas (Ensaio “ <i>Timing of Addition</i> ”-TofA)	33
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 – Análises <i>in vitro</i>	37
5.1.1 – Análises do efeito citotóxico	37
5.1.2 – Testes antivirais AID, EP e TofA.....	39
5.1.2.1 – Testes antivirais do DMSO	40
5.1.2.2 – Testes antivirais da Quercetina	42
5.1.2.3 – Testes antivirais da Morina	44
5.1.2.4 – Testes antivirais da Rutina.....	46
5.1.2.5 – Testes antivirais do Ácido <i>trans</i> -Cinâmico.....	48
5.1.2.6 – Testes antivirais do Monascus	50
5.1.2.7 – Testes antivirais do E1	52
5.1.2.8 – Testes antivirais do E2	55
5.1.2.9 – Testes antivirais do E3	57
5.1.2.10 – Comparações entre os tratamentos	60
6- CONCLUSÕES	64
7 - PERSPECTIVAS FUTURAS.....	66
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
9- APÊNDICE	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do ácido <i>trans</i> -cinâmico.....	6
Figura 2: Estrutura básica dos flavonóides, C6-C3-C6.	7
Figura 3: Rota biossintética das diversas classes de flavonóides.	8
Figura 4: Estrutura química da quercetina.....	11
Figura 5: Estrutura química da morina.	12
Figura 6: Estrutura química da rutina.....	13
Figura 7: Estruturas químicas encontradas no <i>Monascus</i> . 1- Monacolinas, 2- Pigmentos e 3- Outros metabólitos.	14
Figura 8: Micrografias e estrutura do EHV-1.....	17
Figura 9: Estrutura genômica do EHV-1 e EHV-4.	18
Figura 10: Indução, sinalização e ação do IFN tipo I.....	24
Figura 11: Células Vero livres e infectadas por EHV-1.	27
Figura 12: Reação de redução do MTT a formazana.....	30
Figura 13: Esquema do ciclo infectivo viral.....	33
Figura 14: Esquema do tratamento TofA.....	35
Figura 15: Esquema de plaqueamento nos ensaios EP e TofA.	36
Figura 16: Placas de cultivo apresentando o teste AID.	39
Figura 17: Efeito antiviral do teste AID do DMSO sobre o EHV-1.....	41
Figura 18: Efeito antiviral dos testes EP e TofA do DMSO sobre o EHV-1.....	42
Figura 19: Efeito antiviral do teste AID da Quercetina sobre o EHV-1.....	43
Figura 20: Efeito antiviral dos testes EP e TofA da Quercetina sobre o EHV-1.	44
Figura 21: Efeito antiviral do teste AID da Morina sobre o EHV-1.....	45
Figura 22: Efeito antiviral dos testes EP e TofA da Morina sobre o EHV-1.	46
Figura 23: Efeito antiviral do teste AID da Rutina sobre o EHV-1.....	47
Figura 24: Efeito antiviral dos testes EP e TofA da Rutina sobre o EHV-1.....	48
Figura 25: Efeito antiviral do teste AID do Ácido <i>trans</i> -Cinâmico sobre o EHV-1.	49
Figura 26: Efeito antiviral dos testes EP e TofA do Ácido <i>trans</i> -Cinâmico sobre o EHV-1.	50
Figura 27: Efeito antiviral do teste AID do <i>Monascus</i> sobre o EHV-1.....	51
Figura 28: Efeito antiviral dos testes EP e TofA do <i>Monascus</i> sobre o EHV-1.	52
Figura 29: Efeito antiviral dos testes EP e TofA do E1 sobre o EHV-1.	53
Figura 30: Efeito antiviral do teste AID do E1 sobre o EHV-1.	55
Figura 31: Efeito antiviral dos testes EP e TofA do E2 sobre o EHV-1.	56
Figura 32: Efeito antiviral do teste AID do E2 sobre o EHV-1.	56
Figura 33: Efeito antiviral do teste AID do E3 sobre o EHV-1.	58
Figura 34: Efeito antiviral dos testes EP e TofA do E3 sobre o EHV-1.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações Máximas Não Tóxicas (CMNT) dos compostos para a célula Vero e concentrações escolhidas para os testes antivirais.	38
Tabela 2: Efeito virucida do DMSO, expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença do DMSO.....	40
Tabela 3: Efeito virucida da quercetina, expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença da quercetina.	43
Tabela 4: Efeito virucida da morina, expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença da morina.....	45
Tabela 5: Efeito virucida da rutina, expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença da Rutina.	47
Tabela 6: Efeito virucida do ácido <i>trans</i> -cinâmico, expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença do ácido <i>trans</i> -cinâmico.	49
Tabela 7: Efeito virucida do monascus, expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença do monascus.	51
Tabela 8: Efeito virucida do E1, expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença do E1.	54
Tabela 9: Efeito virucida do E2, expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença do E2.	57
Tabela 10: Efeito virucida do E3, expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença do E3.	58
Tabela 11: Ação antiviral dos compostos no teste AID. Efeito virucida expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença do composto nos tempos de 6, 15 e 30 min.	60
Tabela 12: Porcentagem de redução de título viral e relação dos títulos com e sem tratamentos representando a ação antiviral dos compostos no teste EP.	61
Tabela 13: Porcentagem de redução de título viral e relação dos títulos com e sem tratamentos representando a ação antiviral dos compostos no ciclo infectivo viral.	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ADS: fase de adsorção do TofA	ID50: dose 50% infectiva
AID: ensaio de inativação direta	IFN: interferon
BoHV: Herpesvirus bovino (Bovine Herpesvirus)	IL-2: interleucina 2
C+: controle positivo	iNOS: óxido nítrico sintase induzível
CA: controle do composto testado	IR: seqüências internas idênticas repetitivas
CC: controle celular	LDL: lipoproteína de baixa densidade
CD: cluster differentiation	MEM: meio essencial mínimo
CD5+: linfócitos T positivo para CD5	MTT: 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,difeniltetrazolium brometo
CD8+: linfócitos T positivo para CD8	PBMC: células mononucleares sanguíneas periféricas
CMNT: concentração máxima não tóxica	PBS: tampão fosfato salino (phosphate buffer solution)
CT ₁₀ : concentração do produto responsável pela redução de 10% da DO	PC12: células de pheochromocytoma de rato
DMSO: dimetilsulfóxido	PEN: fase de penetração do TofA
DO: densidade óptica	PF-3: Parainfluenza 3
E1, E2, E3: Extratos 1, 2 e 3, respectivamente	PT: fase de pré-tratamento do TofA
ECG: gonadotrofina crônica eqüina (equine chronic gonadotrophin)	ROS: espécies reativas de oxigênio
ECP: efeito citopático	SFB: soro fetal bovino
EHV-1: Herpesvirus equino 1 (<i>Equid herpesvirus 1</i>)	SNC: sistema nervoso central
EP: <i>end point</i>	SOD: superóxido dismutase
GABA: ácido γ-aminobutírico	SuHV-1: Herpesvirus suino 1
gB-gp14, gC-gp13, gD-gp18, gE, gG, gH, gI, gK, gL, e gM: glicoproteínas B; 14; C; 13; D; 18; E; G; H; I; K; L; M.	TCID50: dose 50% infectiva em cultura de tecidos (Tissue Culture Infecting Dose50%)
HHV: Herpesvirus humano	TNFα: fator de necrose tumoral α
HIV: Virus da imunodeficiência humana	TofA: <i>timing of addition</i>
H ₂ O ₂ : peróxido de hidrogênio	TR: seqüências terminais idênticas repetitivas
IC: fase intracelular do TofA	VERO: linhagem celular de rim de macaco verde africano

RESUMO

GRAVINA, Humberto Doriguêto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2008. **Estudo *in vitro* do potencial antiviral de ácido *trans*-cinâmico, flavonóides, corante monascus e extratos vegetais sobre o Herpesvirus equino 1.** Orientadora: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-Orientadores: Tânia Toledo de Oliveira, Marisa Alves Nogueira Diaz e Juliana Lopes Rangel Fietto.

O Herpesvirus equino 1 (EHV-1), um importante patógeno de cavalos, foi escolhido como vírus alvo, pois representa uma família altamente patogênica e apesar de já haver vacinas contra ele, elas são pouco eficientes. Assim, um novo tratamento que evite perdas financeiras irreparáveis em criações de cavalos é bastante relevante. Por outro lado, os produtos naturais são alvos das mais diversas pesquisas para formulação de novos medicamentos, dentre eles os antivirais por possuírem um elevado potencial terapêutico. Neste trabalho, realizamos ensaios biológicos em cultivo celular com células Vero para determinar o efeito citotóxico e os potenciais antivirais de 8 compostos (quatro substâncias puras, um extrato de microrganismo e três extratos vegetais de uma mesma espécie). As citotoxicidades foram determinadas por microscopia óptica e confirmadas usando uma variação do método colorimétrico baseado na redução do sal MTT. Com o objetivo de investigar *in vitro* o potencial antiviral de cada tratamento sobre o EHV-1, foi feita a avaliação da redução de título viral por visualização do efeito citopático seguida de titulação viral em três ensaios antivirais, o de “Inativação Direta”, o “*End Point*” e o “*Timing of Addition*”. O primeiro teve como objetivo determinar se os tratamentos possuem ação sobre as partículas virais desestabilizando-as ou se ligando a elas de forma irreversível. O segundo tem como objetivo determinar se as substâncias puras ou presentes nos extratos se ligam aos receptores celulares ou a outras estruturas moleculares causando modificações celulares duradouras. O terceiro foi realizado com o objetivo de determinar a ação dos compostos sobre quatro etapas do ciclo infectivo viral, avaliando se apresentam ação antiviral em fases específicas da infecção. Os resultados dos testes demonstraram que as concentrações máximas não tóxicas obtidas foram respectivamente, 70, 100, 120, 110 e 70 µg/mL para a quercetina, morina, rutina, ácido *trans*-cinâmico e monascus; 40, 40 e 90 µg/mL para os extratos

E1, E2, E3, respectivamente e 3,0% (v/v) para o DMSO. Nas concentrações testadas, o DMSO não causou variação significativa no título viral em nenhum dos testes, sendo, portanto, um composto inerte. A rutina não demonstrou ação antiviral significativa em nenhum dos testes. Os extratos apresentaram maior potencial antiviral contra o EHV-1 *in vitro*, seguidos das substâncias quercetina e morina. Nos resultados do teste de inativação direta, foi observada a ação dos três extratos, da quercetina e da morina. O E3 foi o único a apresentar ação no teste “*End Point*”. No “*Timing of Addition*”, todos os compostos apresentaram ação antiviral em pelo menos uma etapa de infecção, com exceção da rutina. A morina e o monascus sobre a adsorção, o ácido *trans*-cinâmico sobre os receptores celulares e na adsorção, a quercetina e o E2 nas fases de adsorção e penetração viral, e o E1 e o E3 em todas as fases. O processo de adsorção foi o mais afetado pelos compostos, sugerindo ação principalmente sobre as partículas virais e receptores celulares, impedindo momentos iniciais da infecção. Possivelmente, há nos extratos um efeito sinérgico decorrente da ação de mais de um composto. Com os resultados encontrados neste trabalho, concluímos que estes compostos poderão ser de grande importância nas medicinas veterinária e humana para prevenção e tratamento de infecções virais e para formulação de novos medicamentos.

ABSTRACT

GRAVINA, Humberto Doriguêto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August of 2008. **Study *in vitro* from antiviral potential of *trans*-cinnamic acid, flavonoids, monascus dye and plant extracts on the Equine herpesvirus 1.** Adviser: Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo. Co-Advisers: Tânia Toledo de Oliveira, Marisa Alves Nogueira and Juliana Lopes Rangel Fietto, July 2008.

The Equine herpesvirus 1 (EHV-1), a important pathogen of horses, was chosen as target virus because it represents a highly pathogenic family and although we already have vaccines against it, they are inefficient. Thus, a new treatment that avoid irreparable financial loses in creations of horses is quite relevant. On other hand, due to their high therapeutic potential, the natural products are targets of various researches for formulation of new medicines. In this work, we made biological assays in Vero's cell culture to determine the cytotoxic effect and antiviral potential of 8 compounds (four pure substances, one microorganism extract and three plant extracts from the same specie). The cytotoxicities were determined by optical microscopy and confirmed by using a variation of colorimetric method based on MTT salt reducing. In order to investigate *in vitro* the antiviral potential from each treatment on the EHV-1, we did the viral title reduction evaluation by viewing the cytopathic effect followed by viruses titration in three antiviral assays, "Direct Inactivation", "End Point" and "Timing of Addition". The first aimed to determine whether treatments have action on the viral particles, destabilizing them or binding to them on an irreversible way. The second aims to determine whether the pure substances or those who are in extracts bind to cell receptors or other molecular structures causing lasting cellular changes. The third was carried out to determine the action of the compounds on four stages of the viral infective cycle, assessing whether they have antiviral action in specific stages of infection. The assay results showed that the maximum non-toxic concentrations obtained were respectively, 70, 100, 120, 110 and 70 µg/mL to quercetin, morin, rutin, cinnamic acid and monascus; 40, 40 and 90 µg/mL to extracts E1, E2, E3, respectively and 3.0% (v/v) to DMSO. In the tested concentrations, the DMSO didn't cause significant variation in viral title in any of the assays, being, therefore, an inert compound. The rutin has not shown significant antiviral

action in any of the tests. The extracts had greater antiviral potential against EHV-1 *in vitro*, followed by quercetin and morin. In the direct inactivation assay results, it was observed the action of three extracts, of quercetin and of morin. The E3 was the single to submit action in the assay "End Point ". In the "Timing of Addition," all compounds showed antiviral action in at least one infection stage, except for rutin. Morin and monascus on adsorption, cinnamic acid on cell receptors and adsorption, quercetin and E2 during the adsorption and viral penetration phases, and E1 and E3 at all stages. The adsorption process was the most affected by compounds, suggesting action mainly on the viral particles and cell receptors, preventing infection initial stages. Possibly, there is in extracts a synergic effect resulted from action of more than one compound. With the results found in this work, we find that these compounds may have great importance in human and veterinary medicines for prevention and treatment of viral infections and for formulation of new medicines.

1- INTRODUÇÃO

Devido ao potencial dos produtos naturais, a maioria da população mundial utiliza plantas medicinais como instrumento terapêutico em seus tratamentos, o que demonstra a importância cada vez mais crescente da busca de novas substâncias biologicamente ativas e caracterização de suas diversas funções, entre elas, a ação antimicrobiana para prevenção ou tratamento de infecções. Mais de 90% dos medicamentos atuais derivam de um protótipo de produto natural e cerca de dois terços a três quartos da população mundial utiliza plantas medicinais para seus cuidados primários de saúde (World Health Organization, 2002). Por causa deste potencial, algumas drogas comerciais e muitos outros produtos naturais conhecidos por suas diversas atividades biológicas são alvos das mais diversas pesquisas para formulações de novos medicamentos.

Muitas substâncias com propriedades antivirais têm sido identificadas e seus mecanismos de ação elucidados através da utilização de ensaios *in vitro*, e *in vivo*. Porém, mais estudos são ainda necessários, pois, poucas delas são utilizadas em tratamentos contra infecções virais devido à sua toxicidade, espectro de ação limitado ou falta de evidências que garantam sua aplicação específica (SIMONI, 2003).

Diversas substâncias naturais obtidas de diversos organismos já tiveram atividades antiinflamatória, bactericida e antiviral relatadas, entre elas os ácidos fenólicos, alcoóis e flavonóides extraídos de plantas. Essas substâncias são utilizadas na prevenção de infecções, mas principalmente no tratamento de seus sinais clínicos, sendo componentes de medicamentos para uma série de vírus que infectam animais e humanos, como os herpesvírus, retrovírus, vírus da influenza, flavivírus, picornavírus, dentre outros.

Nos grandes animais, as infecções virais causam grande impacto econômico, porém normalmente não são praticados tratamentos com medicamentos, mas sim vacinações preventivas. Já o tratamento de infecções virais em pequenos animais é praticado e, atualmente, faz parte de um importante segmento da medicina veterinária com significativos avanços.

As infecções virais humanas também têm despertado a atenção nos últimos anos, pois são graves problemas de saúde pública, principalmente quando associadas a pacientes imunodeprimidos portadores do Vírus da imunodeficiência humana (HIV), os quais têm agravamento das infecções primárias porque são mais susceptíveis a infecções oportunistas. Por outro lado, há um grande número de variantes virais associadas à resistência a vários medicamentos comerciais, o que mostra a necessidade da descoberta de novos fármacos e associações medicamentosas para o tratamento das infecções virais.

O Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua fauna e flora, detém biomas ricos em biodiversidade, como a maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, o cerrado, a caatinga, entre outros, portanto, não pode abdicar de sua vocação para o estudo dos produtos naturais (PINTO *et alli*, 2002).

Neste projeto, avaliamos e comparamos oito compostos, dentre extratos e substâncias puras quanto a seus potenciais antivirais contra infecções *in vitro*, sendo o Herpesvírus equino 1 (EHV-1) o modelo viral escolhido para investigação da ação antiviral. Os resultados encontrados poderão ser de grande importância nas medicinas veterinária e humana para prevenção e tratamento de infecções virais e para formulação de novos medicamentos.

Apesar de haver vacinas contra o EHV-1, elas são pouco eficientes, assim um novo tratamento pode evitar perdas financeiras irreparáveis em criações de cavalos e pode representar também, uma esperança de tratamento contra outros vírus com estruturas e mecanismos de infecção semelhantes, até mesmo contra vírus que infectam humanos.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Investigar o potencial antiviral *in vitro* de 8 compostos químicos: quatro substâncias puras, um extrato fúngico e três extratos vegetais de uma mesma planta sobre o Herpesvirus equino 1 (EHV-1).

2.2- Objetivos específicos

1- Determinar as concentrações máximas não tóxicas dos compostos para as células Vero.

2- Avaliar *in vitro* as atividades antivirais dos diferentes compostos em ensaios pré-infecção.

3- Avaliar *in vitro* as atividades antivirais dos diferentes compostos em etapas do ciclo de replicação viral.

3- REVISÃO DE LITERATURA

3.1- Produtos naturais

Dentre os produtos naturais usados no Brasil não se pode deixar de mencionar o corante extraído da árvore do pau-brasil, o principal produto de exportação da colônia durante mais de dois séculos. Isto demonstra como a Química de Produtos Naturais (QPN) é, dentro da Química brasileira, a área mais antiga e a que talvez ainda hoje congregue o maior número de pesquisadores (PINTO *et al.*, 2002).

Utilizados desde tempos antigos, os produtos naturais são encontrados na forma de extratos de materiais biológicos diversos ou de seus compostos purificados, os quais fornecem oportunidades ilimitadas para descobertas de novas drogas devido à sua diversidade química, mas para seu uso farmacológico, é preciso avaliar um número de padrões de qualidade em nível de processamento do material e em teste de eficácia (COS *et al.*, 2006). 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 meio ambiente (MCCHESENEY, 2007).

Os produtos naturais podem ser encontrados na forma de extratos brutos, semi-puros ou compostos naturais purificados. Os extratos brutos necessitam de menos recursos na preparação das amostras, mas elevados requerimentos na identificação dos constituintes bioativos. Os extratos pré-fracionados podem ser utilizados como uma estratégia eficaz na atenuação das interferências encontradas em análises de extratos brutos, e no encurtamento do tempo necessário para identificar o princípio ativo, já os produtos purificados necessitam de muitos recursos para sua preparação, mas fornecem dados precisos quanto à composição (KOEHN, 2008).

Compostos com atividades biológicas são encontrados nos mais diversos seres vivos, como é o caso das proteínas isoladas de extratos naturais derivados de microrganismos, plantas, insetos, vertebrados terrestres, e organismos marinhos (O'KEEFE, 2001). Com isto, os produtos naturais

serviram como a mais significativa fonte de produtos farmacêuticos durante a história, papel evidenciado pelos 60% dos compostos anticancerígenos e 75% das drogas para doenças infecciosas que são produtos naturais ou derivados e que são encontrados no mercado atual (NEWMAN *et al.*, 2003; SHOEB, 2006).

Amplamente utilizada na medicina popular devido às diversas atividades terapêuticas, a própolis é um produto da espécie *Apis mellífera*, cuja composição química é muito complexa e possui ação biológica conseqüente dos seus metabólitos secundários constituintes, que podem exercer efeitos diversos, isto porque suas propriedades biológicas e composição química variam em função da localização geográfica e das diferentes fontes vegetais. Estudos têm demonstrado que a própolis aumenta a atividade natural killer contra células tumorais, modula a produção de óxido nítrico *in vitro* e *in vivo* e de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais, e aumenta a atividade fungicida dessas células (SFORCIN *et al.*, 2005).

Os fitoterápicos são definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) 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. As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers, o qual enumera mais ou menos 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal (PINTO *et al.*, 2002). Das aproximadamente 300.000 espécies de plantas superiores conhecidas, cerca de 1%, ou seja, 3.000 servem para a alimentação, dentre elas, 150 são comercialmente cultivadas. Por outro lado, 10.000 espécies mundiais de plantas têm uso medicinal documentado, um número bem superior que as 3.000 utilizadas como alimentos, porém pequeno quando comparado com o total delas, demonstrando a potencialidade para novas descobertas de aplicação farmacêutica (MCCHESENEY *et al.*, 2007).

Compostos naturais também podem nos fornecer novas drogas ao servirem de modelo para desenho e síntese de um novo composto ou através de processos de semi-síntese gerando modificações nas estruturas de grupos funcionais formando análogos com alta atividade farmacológica e poucos efeitos colaterais. Estes processos associados com protocolos sofisticados de

seleção, químicas combinatorial e computacional e bioinformática são capazes de encontrar compostos que são muito mais eficazes do que aqueles utilizados na prática clínica (GORDALIZA, 2007; MARCAURELLE & JOHANNES, 2008). As técnicas de elucidação estrutural como a espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, cromatografia líquida de alta performance (HPLC), infravermelho e outras técnicas espectroscópicas, juntamente com os ensaios biológicos facilitam o processo de seleção de produtos naturais ativos, seus alvos biomoleculares, e sua caracterização (KOEHN, 2008).

3.1.2 – Ácido *trans*-Cinâmico

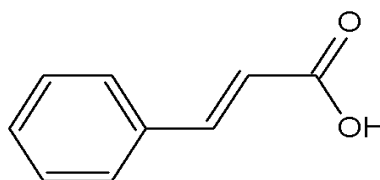


Figura 1: Estrutura química do ácido *trans*-cinâmico

O ácido *trans*-cinâmico (3-fenil-2-propenoíco – figura 1) é um composto encontrado na natureza e precursor de flavonóides. Ele ocorre principalmente em produtos que contenham óleo essencial de canela conferindo-lhes sabor e odor. Tem um amplo potencial para atividades terapêuticas, incluindo ação antimicrobiana e antifúngica. Foi demonstrado que possui atividade contra tumores malignos humanos, tais como o melanoma, glioblastoma e adenocarcinoma de próstata e pulmão. Também foi relacionado o seu uso na prevenção e terapia do cancro, apresentando baixa toxicidade em ratos e coelhos (BIAN *et al.*, 2007). O ácido *trans*-cinâmico/cinamato e seus derivados constituem uma interessante classe de compostos capazes de reagir com radicais livres através de acoplamento oxidativo, tanto pelo anel quanto pelo substituinte, caracterizando uma ação antioxidante (YADAV *et al.*, 2008).

Um composto derivado do ácido *trans*-cinâmico, o ácido *p*-sulfoxi-cinâmico ou ácido zostérico é inibidor da colonização da superfície de plantas aquáticas por esporos de fungos, algas e bactérias. Este e outros cinco compostos químicos com estruturas semelhantes ligadas por regiões variáveis contendo aminas e modificadas com anéis fenol e naftol de forma simétrica e

não-simétrica, apresentaram propriedades antivirais contra o vírus da dengue, demonstrando o potencial antiviral do ácido *trans*-cinâmico (REES *et al.*, 2008).

3.1.2- Flavonóides

Dentre os produtos naturais, os flavonóides são metabólitos secundários vegetais sintetizados em plantas superiores, musgos e samambaias, capazes de absorver UV-B, a fim de protegê-los dos efeitos nocivos da radiação e de outras doenças e infecções fúngicas (FABJAN *et al.*, 2003). Eles servem como agentes de atração para polinização, provendo coloração às plantas, além disto, estão envolvidos com fotossensitização, transferência de energia, ação como hormônios e reguladores do crescimento, controle da respiração e fotossíntese, morfogênese e determinação sexual (CUSHNIE & LAMB, 2005).

Os flavonóides são fenólicos bioativos que fazem parte de uma das maiores classes de compostos nas plantas superiores e são caracterizados quimicamente por um esqueleto de quinze carbonos contidos em dois anéis fenólicos (letras A e B na figura 2) e um terceiro não fenólico (letra C na figura 2), (HAVSTEEN, 2002; KHLEBNIKOV *et al.*, 2007).

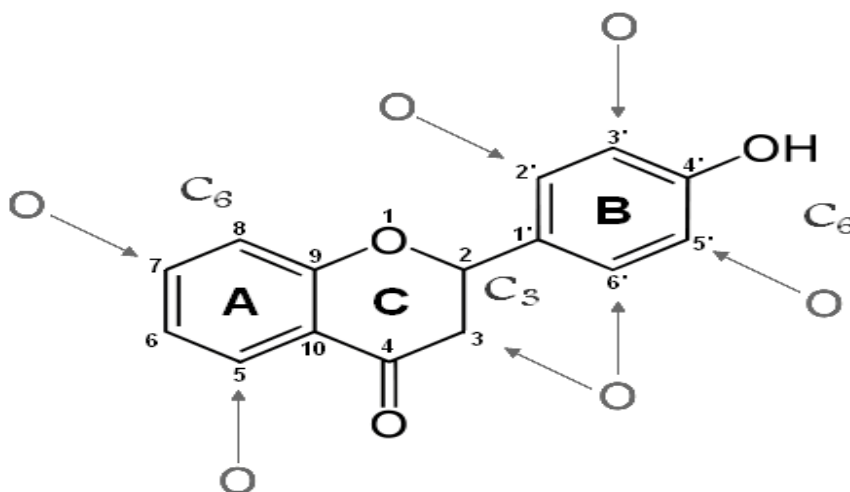


Figura 2: Estrutura básica dos flavonóides, C₆-C₃-C₆. São freqüentemente oxidados nas posições apontadas pelas setas e conjugados a carboidratos.

São conhecidas mais de 6.000 moléculas, derivadas da via biossintética mista Chiquimato/Acetato e classificadas em grupos conforme suas estruturas químicas (figura 3) (NOGUEIRA, 1998).

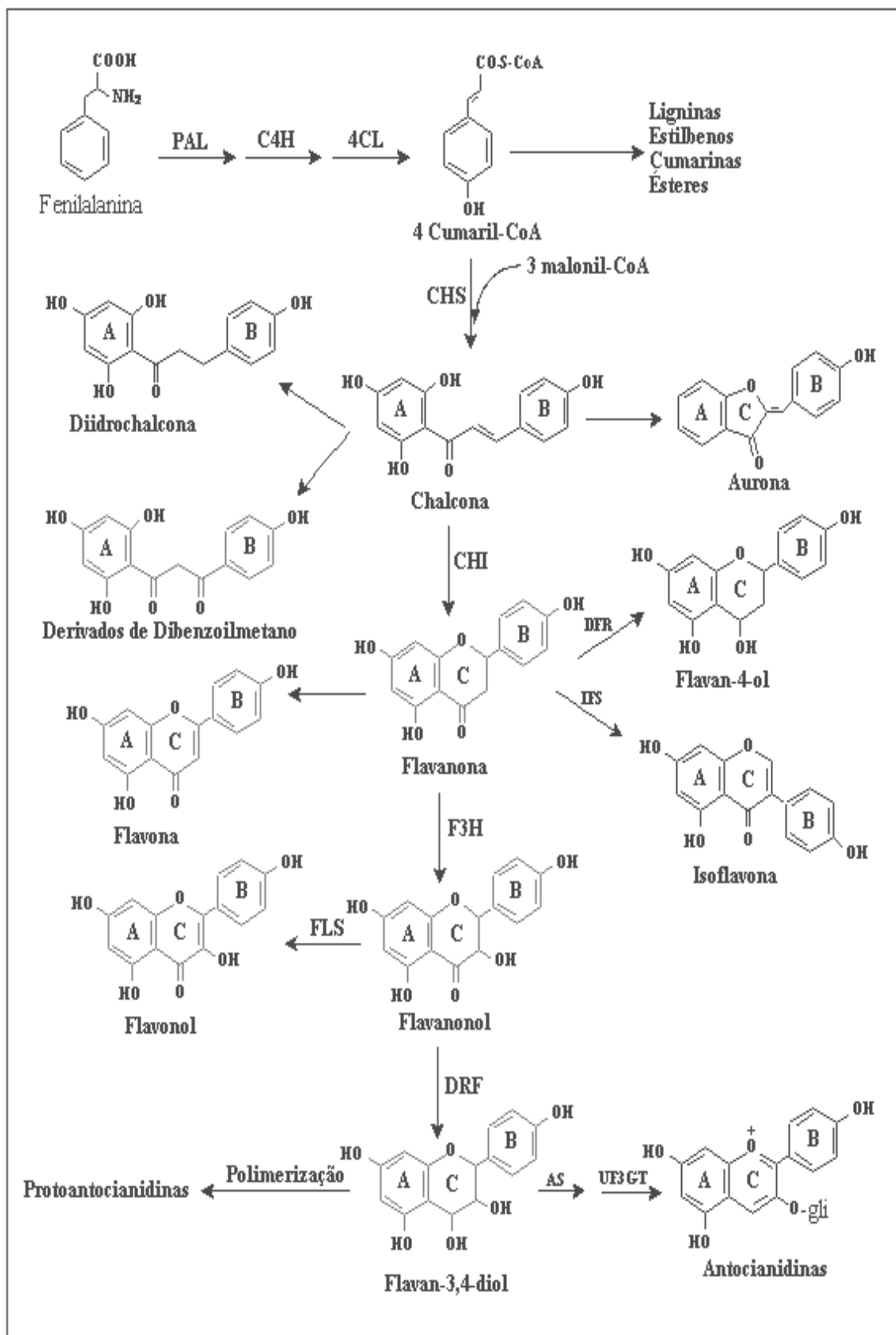


Figura 3: Rota biossintética das diversas classes de flavonóides: PAL = Fenilalanina amônia-liase; C4H = Cinamato-4-hidroxilase; 4CL = 4-cumaroil-coenzima A ligase; CHS = chalcona sintetase; CHI = chalcona flavanona isomerase; F3H = Flavanona 3 - hidroxilase; DFR = Dihidroflavonol 4-redutase; IFS = Isoflavona sintetase; FLS = Flavonol sintetase; AS = Antocianina sintetase; UF3GT = Flavonóide 3-O-glicosiltransferase.

Os flavonóides são responsáveis pela coloração laranja, vermelha e azul nos frutos e produtos hortícolas e podem ser classificados como antocianidinas, flavanóis, flavonas, flavanonas, flavonóis entre outros (MERKEN & BEECHER, 2000). A maioria deles é encontrada glicosilada na natureza e não pode ser absorvida pelo epitélio intestinal nesta forma. Por outro lado, a hidrólise enzimática dos glicosídeos pela flora intestinal libera suas formas livres que são absorvidas mais eficientemente. Assim, para serem aplicadas numa formulação medicamentosa, é possível que sejam administradas na forma glicosilada (COMALADA *et al.*, 2006).

Estudos experimentais e epidemiológicos revelam uma correlação negativa entre o consumo de dietas ricas em frutas e legumes coloridos e os riscos para doenças angiogênicas crônicas, cardiovasculares, artrite, inflamação crônica e cânceros. Os pigmentos presentes em frutas e outros vegetais estão relacionados principalmente com a presença de fenólicos, incluindo flavonóides e carotenóides. Isto aumenta o interesse crescente em pigmentos que podem promover a saúde humana ou diminuir o risco para doenças, porém, poucos estudos revelam os potenciais imunomodulatórios das cores dos vegetais, seja promovendo respostas imunes celulares ou humorais, ou estimulando a proliferação de linfócitos e o título de anticorpos séricos (LIN & TANG, 2007).

Os compostos fenólicos são encontrados na maioria das partes das plantas, dentre caule, folhas, frutos e flores. Relatados como possuidores de ampla variedade de efeitos fisiológicos em plantas e animais, servem como inibidores e ativadores de enzimas, quelantes de metais, antioxidantes, recrutadores de radicais livres, fito-hormônios, reguladores da transcrição, antiinflamatórios, antimutagênicos, anticarcinogênicos, antineoplásicos, antialergênicos, entre outras funções (BERHOW, 1998), o que amplia o espectro de utilidades que podemos extrair destas substâncias.

Os flavonóides apresentam diversas atividades biológicas, apresentando potenciais antiinflamatórios, de proteção em doenças cardiovasculares, de eliminação de radicais livres e de redução de pressão arterial, possuem efeitos antitumorais, antiespasmódicos e antidiarréicos (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). Por outro lado,

diferentes mecanismos estão associados com a toxicidade dos flavonóides, incluindo a inibição de DNA topoisomerasas (CONSTANTINO *et al.*, 1995), a inibição de proteassomas, da síntese de ácidos graxos e de fosfatidilinositol-3-quinase, a indução de bloqueio do ciclo celular, o acúmulo de p53 e aumento da expressão de c-fos e c-myc, o que pode ser útil na terapia contra o câncer (PLOCHMANN *et al.*, 2007).

Os flavonóides também estão envolvidos em funções vitais associadas ao DNA como expressão gênica, transcrição, mutagênese, carcinogênese, e morte celular (ISHIKAWA *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2005; MORRIS *et al.*, 2006; AARTS *et al.*, 2007; HSU *et al.*, 2007; RAMOS, 2007), pois podem se ligar ao DNA tanto por intercalação quanto por ligação externa. São notadas grandes mudanças conformacionais no DNA ocorridas mediante a interação aos flavonóides (NAFISI *et al.*, 2008). Ao se ligar ao DNA ou a fatores ligados à expressão gênica, os flavonóides podem gerar alterações celulares que propiciem uma forma de adaptação, ao estabelecer um estado antiviral através da inibição de vias metabólicas relacionadas com a suscetibilidade da célula à infecção e da ativação de vias responsáveis pela defesa celular.

Muitos estudos já relataram os efeitos de alguns flavonóides sobre a replicação de vírus animais, onde podem atuar inativando diretamente as partículas virais, afetando a infectividade ou podem ter efeito anti-replicativo (SELWAY, 1986; HUDSON, 1990; VISON, 1998). Estudos *in vitro* indicam ação inibitória da infecção e replicação do HIV-1 por baicaleína, robustaflavona e hinokiflavona, sobre a transcriptase reversa do HIV-1. As catequinas são capazes de inibir DNA polimerases e suas interações com enzimas do HIV-1. Uma série de flavonóides inibe a transcrição viral e as enzimas virais proteinase e integrase do HIV-1. Flavonóides também possuem atividade contra uma variedade de outros vírus, por exemplo, a ação da quercetina, morina, rutina, diidroquercetina, diidrofisetina, leucocianidina, e outros contra o Herpesvirus humano (HHV), o Virus sincicial respiratório, o poliovírus e o simdbsvirus. Os mecanismos antivirais propostos incluem a inibição de polimerase viral e ligação ao ácido nucléico ou proteínas do capsídeo virais. Efeitos sinérgicos vêm sendo demonstrados em várias combinações entre flavonas e flavonóis, como é o caso do caenferol com a luteolina contra o HHV (CUSHNIE & LAMB, 2005).

3.1.2.1 – Quercetina

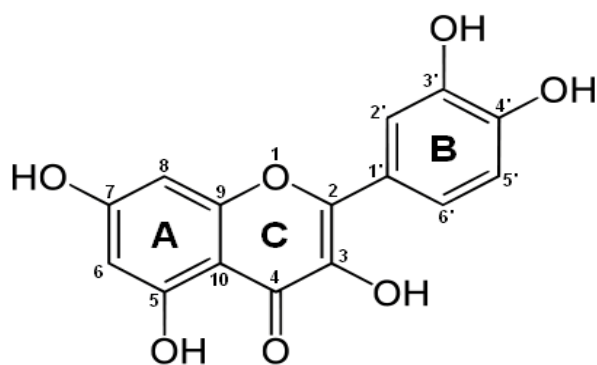


Figura 4: Estrutura química da quercetina.

A quercetina (3',4',3,5,7-pentahidroilflavonol – figura 4) é um flavonol e um dos flavonóides mais abundantes na natureza. Ela ocorre principalmente na forma aglicona, porém também é encontrada como glicosídeo, possuindo um ou mais grupos de açúcares vinculados por ligações glicosídicas, em geral, na posição C3. A glicose é o açúcar mais comum, mas a galactose e a ramnose são freqüentemente encontradas. Quase 180 diferentes glicosídeos de quercetina foram descritos na natureza, sendo a rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo) uma das mais comuns. Uma quantidade considerável de isoquercetina (quercetina-3-O β -glucosídeo) é encontrada em cascas de maçãs e peras (WACH *et al.*, 2007).

Encontrada em alguns frutos e legumes, principalmente nas folhas, a quercetina está associada a diversos efeitos farmacológicos, como supressão da proliferação celular, proteção de oxidação do LDL, prevenção da agregação plaquetária, e indução de apoptose de células tumorais. Ela parece ajudar a combater a asma, o câncer e doenças cardíacas. Como antioxidante, combate as moléculas radicais livres que desempenham um papel importante em muitas doenças. Também impede a redução de atividade intracelular dos sistemas de defesas antioxidantes causada pelo etanol, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase (LU *et al.*, 2006).

Segundo 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, no entanto, os precisos mecanismos farmacológicos protetores da quercetina sobre a lesão oxidativa

induzida nos hepatócitos estão longe de serem completamente compreendidos. Ela também atua reforçando a capacidade antioxidante do cérebro sugerindo ser um inibidor de seu envelhecimento e juntamente com outros flavonóides estruturalmente relacionados mostra um efeito citoprotetor em células PC12 expostas ao H₂O₂, abrandando o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) mediado pelo peptídeo β-amilóide (SUN *et al.*, 2007).

A quercetina e a luteolina são candidatas a antiinflamatórios *in vivo* por causa de seus efeitos inibidores sobre a expressão de marcadores de ativação de macrófagos como o TNFα (Fator de Necrose Tumoral) e o iNOS (Óxido Nítrico Sintase) e por estarem associadas ao aumento da liberação de IL-10 (Interleucina-10), uma citocina antiinflamatória que tem potencial inibidor da resposta imune. A ação antiinflamatória dos flavonóides dos quatro diferentes grupos: flavonóis (Ex: quercetina), flavonas (Ex: luteolina), isoflavonas e flavanona, parece ser potencializada pela hidroxilação nas posições C5, C7, C3' e C4' e pela dupla entre os C2 e C3. Outra ação dos flavonóides pode estar relacionada com sua ação como inibidores de tirosina quinases, o que propicia um efeito antiproliferativo celular (COMALADA *et al.*, 2006).

3.1.2.2 – Morina

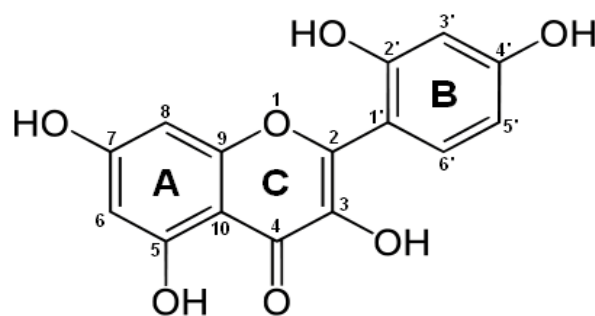


Figura 5: Estrutura química da morina.

A morina (2',4',3,5,7-pentahidroxi-flavonol – figura 5) é um dos flavonóis mais comuns presentes na natureza e foi primeiramente obtida da planta *Morus alba L.* Ela revela propriedades antioxidantes e protetoras para as células, as quais são dirigidas para a eliminação de radicais livres implicados no início da peroxidação lipídica. A morina inibe a xantina oxidase e geralmente exerce

suas funções através da regulação da ativação ou da alteração da estrutura de enzimas (XIE *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007).

A morina possui grupos hidroxilas adjacente nas posições C2' e C4' que podem facilmente formar ligações de hidrogênio. Possui também, uma alta densidade de cargas negativas, o que impede uma forte interação com o duplex de DNA (NAFISI *et al.*, 2008).

3.1.2.3 – Rutina

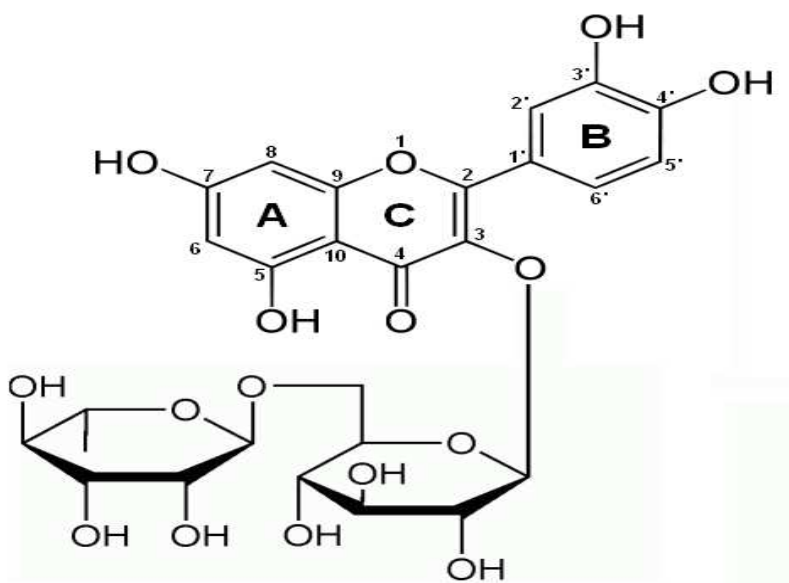


Figura 6: Estrutura química da rutina.

Um dos mais importantes metabólitos do trigo mourisco, a rutina (quercetina 3-ramnosilglucosídeo – figura 6) é um flavonol glicosilado que possui um efeito hipotensor, atividades antioxidantes e é capaz de antagonizar com o aumento da fragilidade capilar associada com hipertensão ou doença hemorrágica no homem (KREFT *et al.*, 1999; DANILA *et al.*, 2007). Segundo FABJAN *et al.* (2003), ela antagoniza com o aumento da fragilidade capilar ao reduzir a alta pressão arterial e diminuindo a permeabilidade dos vasos.

Ela apresenta atividade cardioprotetora, antiinflamatória, e anticarcinogênica e também tem efeitos sobre a flexibilidade de músculos lisos. Comparativamente, a outros 18 compostos antioxidantes (incluindo a quercetina, ácido gálico e α -tocoferol), a rutina tem a mais alta atividade (KALINOVA *et al.*, 2006). Ela reduz o risco de aterosclerose, mostra atividade antioxidante e possui um efeito antiedema (FABJAN *et al.*, 2003).

Entre outros flavonóides, a rutina, quercetina e caenferol têm sido usados extensivamente no estudo dos efeitos de inibição de carbonilredutases, enzimas responsáveis pela reduzida eficácia dos tratamentos com os agentes antineoplásicos antraciclina. O tipo de inibição nunca foi deduzido, pois, nenhuma delas teve suas relações estrutura-atividade determinadas (CARLQUIST *et al.*, 2008).

3.1.3 – *Monascus*

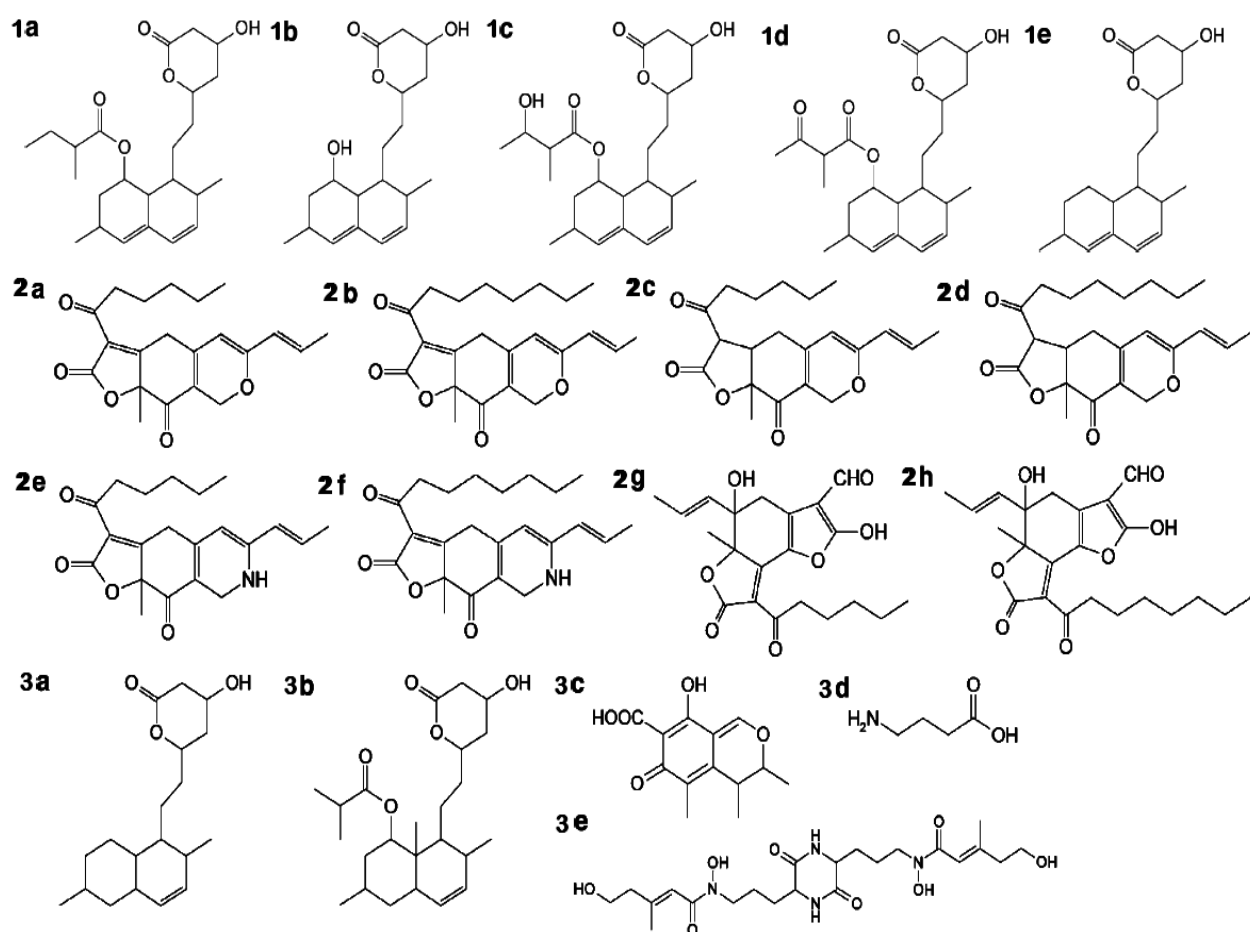


Figura 7: Estruturas químicas encontradas no *Monascus*. 1- Monacolinas, 2- Pigmentos e 3- Outros metabólitos. Monacolina K (1a), monacolina J (1b), monacolina M (1c), monacolina X (1d), monacolina L (1e), rubropunctatina (2a), monascorubrina (2b), monascina (2c), ankaflavina (2d), rubropunctamina (2e), monascorubramina (2f), xantomonasina A (2g), xantomonasina B (2h), diidromonacolina L (3a), diidromonacolina MV (3b), citrinina (3c), ácido γ -aminobutírico (3d) e ácido dimerúmico (3e).

O monascus é um corante obtido a partir dos fungos *Monascus anka*, *Monascus purpureus* e *Monascus ruber*. Um extrato fúngico que possui vários compostos químicos, alguns dos quais já foram purificados e identificados, incluindo monacolinas, pigmentos, diidromonacolinas, citrinina, ácido γ -

aminobutírico (GABA) e ácido dimerúmico (Figura 7). Estes compostos podem ser classificados em três categorias: ingredientes bioativos, toxinas e pigmentos. O gênero *Monascus* também produz enzimas hidrolíticas como α -amilase, β -amilase, glicoamilase, protease e lipase, bem como pigmentos amarelo, vermelho e roxo. Os seguintes pigmentos foram isolados a partir do corante: ankaflavina, rubropunctamina, rubropunctatina, monascorrubramina, monascorrubrina e monascina (ERDOĞRUL & AZIRAK, 2005; LIN *et al.*, 2008).

Utilizado por milhares de anos em alimentos orientais fermentados, o fungo *Monascus spp* do arroz vermelho fermentado produz metabólitos bioativos como o GABA, a monacolina K e alguns pigmentos, que, respectivamente, funcionam como um agente anti-hipertensivo, uma droga redutora de colesterol e um agente antibacteriano. Estes pigmentos possuem reconhecida utilização industrial e terapêutica. Possuidores principalmente de esqueletos azafilona, os pigmentos do *monascus* são metabólitos secundários que têm sido tradicionalmente utilizados como corantes naturais de alimentos. Muitos outros metabólitos também foram relatados em outras pesquisas, a maioria deles isolados do arroz vermelho mofado obtido por fermentação sólida (CHENG *et al.*, 2008).

Os pigmentos amarelo-alaranjado e vermelho produzidos por esses fungos têm sido usados como conservantes nas indústrias alimentares em substituição de nitratos na carne e podem ser úteis também, para tratar ou prevenir cancro, osteoporose, acidente vascular cerebral, degeneração macular, doença de Alzheimer e outras demências (JUZLOVA *et al.*, 1996; ERDOĞRUL & AZIRAK, 2005).

Em 1998, LI *et al.* demonstraram que extratos do *Monascus purpureus* reduz o colesterol total sérico e triglicérides em coelhos e codornas com hiperlipidemia experimental e reprime a aterosclerose sugerindo que, convenientemente preparado o *Monascus purpureus* poderia ser um agente hipocolesterolêmico eficaz no homem. A monacolina K é um metabólito secundário sintetizado pela policetídeo sintase (PKS) de *Monascus*, também conhecida como lovastatina, essencialmente produzida por *Aspergillus terreus*. Ela foi isolada pela primeira vez a partir do meio de *Monascus ruber* e é um inibidor da síntese do colesterol, pois possui estrutura similar ao 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA), portanto, inibe competitivamente a HMG-CoA

redutase durante a síntese de colesterol (CHEN *et al.*, 2008). Estes extratos chineses também contêm vários componentes semelhantes à estatina que inibem a HMG-CoA redutase e vários outros ingredientes ativos além da monacolina K, assim, vários ensaios de seus possíveis efeitos redutores lipídicos têm sido conduzidos, avaliando a eficácia e a segurança do extrato na modificação lipídica associada à hiperlipidemia primária (LIU *et al.*, 2006).

Extratos da levedura vermelha do arroz (*Monascus purpureus*) também estimulam a formação óssea *in vitro* e *in vivo* em ossos defeituosos, sendo, portanto, um produto natural com potencial de tratar doenças ósseas e provavelmente osteoporose (WONG & RABIE, 2008).

Os produtos do *Monascus* podem ser usados tanto como corantes naturais como suplementos dietéticos. No entanto, não só são produzidos metabólitos secundários úteis, tais como os pigmentos, os fungos também produzem uma toxina chamada citrinina (PATTANAGUL *et al.*, 2008).

3.2- Herpesvirus

Membros da família *Herpesviridae*, os Herpesvirus encontram-se como os principais representantes de doenças víricas em animais e humanos. Sua estrutura é composta de uma molécula linear de DNA fita dupla, envolta em uma substância amorfa conhecida como tegumento e delimitada por um envelope glicoprotéico (ROIZMAN *et al.*, 1992).

Entre seus representantes estão o Herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) e o Herpesvirus bovino 5 (BoHV-5), os quais estão relacionados antigenicamente e geneticamente, o primeiro causa infecções respiratória e genital em bovinos e é associado raramente a quadros de encefalite e o segundo causa meningoencefalites não purulentas em bovinos (METZLER *et al.*, 1986; ROELS *et al.*, 2000). Também se encontram o Herpesvirus suíno 1 (SuHV-1) que causa aborto e doença neurológica em suínos e os Herpesvirus humano 1 e 2 (HHV-1 e HHV-2) que são vírus epiteliotrópicos, estando o primeiro comumente associado a infecções labiais, embora ocorram também casos de encefalite e o segundo associado a infecções recrudescentes genitais (MURPH *et al.*, 1999).

Os vírus bovinos BoHV-1 e BoHV-5 e o humano HHV são neurotrópicos e estabelecem infecções latentes em seus hospedeiros naturais preferencialmente em gânglios de neurônios sensoriais e autonômicos e sistema nervoso central (ROIZMAN *et al.*, 1992). Porém, a habilidade para invadir, replicar e causar doença no SNC varia entre os herpesvírus neurotrópicos HHV, SuHV-1, BoHV-1 e BoHV-5 (MURPH *et al.*, 1999).

3.2.1- Herpesvirus equino 1 (EHV-1)

O EHV-1, apresentado na figura 8, um membro da família *Herpesviridae*, da subfamília *Alphaherpesvirinae*, do gênero *Varicellovirus* e importante patógeno de cavalos, foi isolado pela primeira vez no Brasil por NILSON & CORRÊA em 1966, posteriormente, WEIBLEN *et al.* isolaram o vírus na região sul do Brasil em 1994.

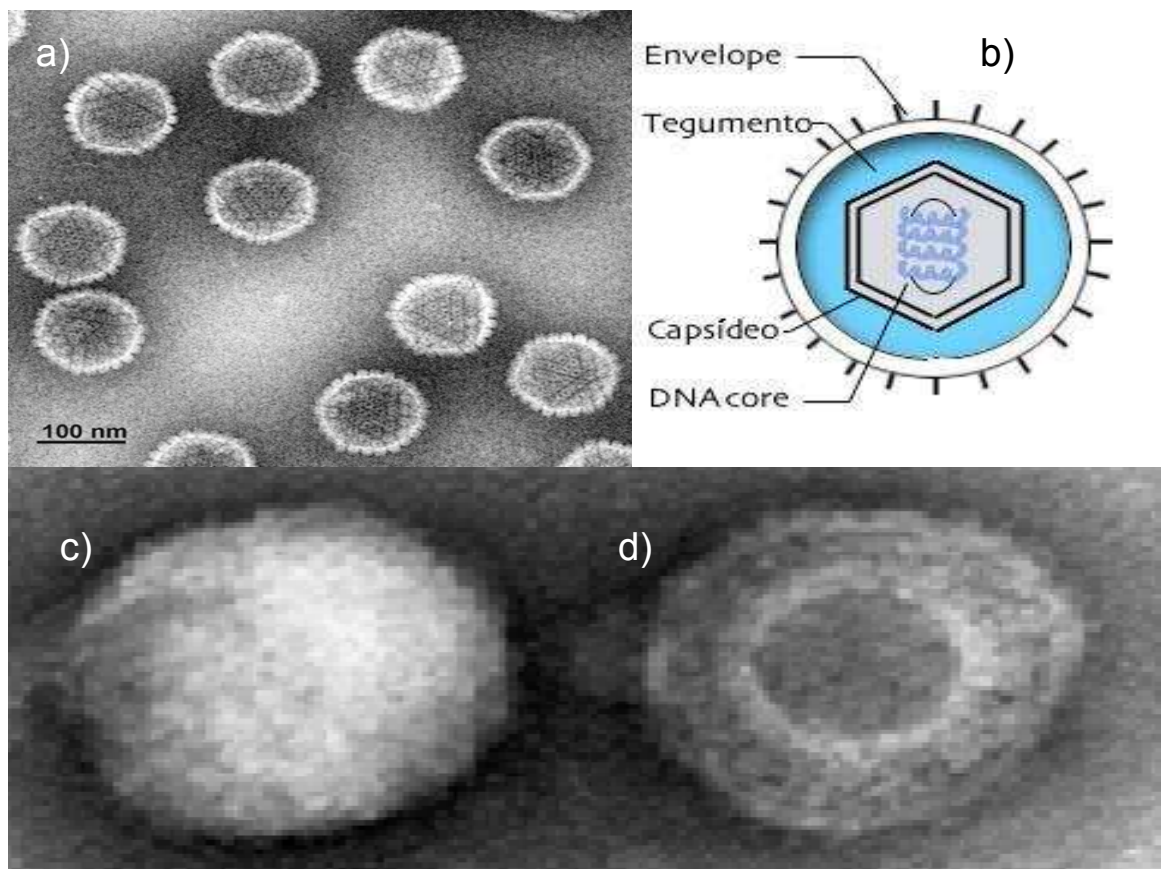


Figura 8: Micrografias e estrutura do EHV-1. a) micrografia eletrônica do nucleocapsídeo nu depois da retirada do envelope e tegumento por centrifugação, b) estrutura esquemática do EHV-1, c) vírion coberto pelo envelope e d) vírion envelopado permitindo observação do capsídeo icosaédrico e do tegumento que o envolve. (por Steven K. Vernon / WHRI, Wyeth-Ayerst Research, Radnor, Pa.)

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) seu código viral é 00.031.1.02.010 e seu genoma possui o código de acesso [M86664].

O genoma do EHV-1 é uma molécula de DNA dupla fita, que contém 80 janelas de leitura abertas (ORFs - Open Reading Frames), quatro em duplicata, portanto, ele possui no mínimo 76 genes. Alguns deles são relacionados com a patogenicidade e virulência do EHV-1, os quais são os genes codificadores das proteínas IR6, gB (glicoproteína B), gD, gM e gp2. Os determinantes de patogenicidade e virulência do EHV-1 são as glicoproteínas B, D, E e M. (GHANEM et al., 2007). Seu genoma possui 155.000 pb e é composto de uma única e longa região covalentemente (L ou U1) ligada a uma pequena região (S ou Us) que tem um único segmento delimitado por um par de seqüências internas idênticas e terminais repetitivas (IR e TR) como apresentado na figura 9. O EHV-1 tem sido estudado como um modelo de regulação gênica dos *alphaherpesvirus* durante infecções líticas e persistentes. Tal como acontece com outros herpesvírus, os genes do EHV-1 são regulados de forma precoce imediata, precoce, e tardia dependendo das proteínas reguladoras virais (AHN et al., 2007).

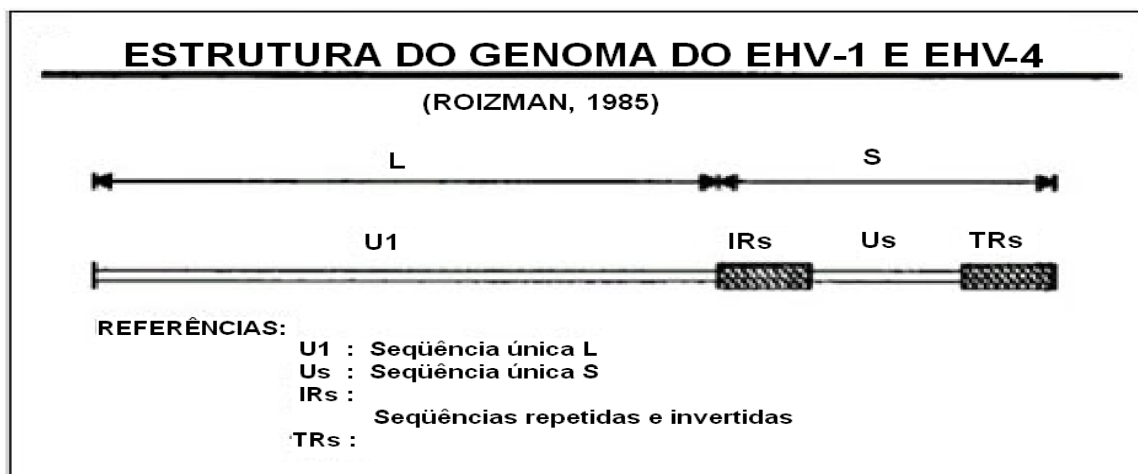


Figura 9: Estrutura genômica do EHV-1 e EHV-4.

Outro membro da subfamília *Alphaherpesvirinae*, o Herpesvirus equino 4 (EHV-4), também induz doenças respiratórias em cavalos e ocasionalmente causa aborto em éguas é intimamente relacionado com o EHV-1, sendo difícil distingui-los. Estes dois vírus têm uma seqüência nucleotídica de cerca de 85% de semelhança e de 90% de homologia na seqüência de aminoácidos. Uma variedade de técnicas tem sido utilizada para detectar e diferenciar o EHV-4 do EHV-1 em cavalos, entre elas a PCR (DIALLO et al., 2007).

O EHV-1 causa abortos, mortes neonatais e desordens do sistema nervoso (VAN DER MEULEN *et al.*, 2006), causa também uma viremia associada às células tanto mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) quanto linfócitos. Desta maneira, o EHV-1 pode ser levado a células endoteliais permissivas e, subseqüentemente, causar abortos ou desordens no sistema nervoso em cavalos. No entanto, o reconhecimento de PBMC infectadas por EHV-1 circulantes pelo sistema imune não é eficiente (VAN DER MEULEN *et al.*, 2006). O EHV-1 também tem sido descrito como o agente causador de uma doença neurológica em éguas que foi caracterizado como uma mieloencefalite (DIALLO *et al.*, 2007).

A infecção primária com EHV-1 ocorre via contato direto e inalação de vírus em aerossóis, este inicialmente replica dentro das células epiteliais do trato respiratório e subseqüentemente alcança o tecido linfóide local, incluindo o submandibular, retrofaringeal e linfonodos bronquiais. Ocorre linfadenopatia local quando células epiteliais do trato respiratório e tecido linfóide são destruídas após a replicação e liberação viral. A infecção por EHV-1 pode espalhar sistematicamente através de disseminação hematológica de linfócitos infectados (viremia associada à célula) para a placenta, feto e SNC, nestes locais, a vasculite local e a trombose podem levar ao aborto, mortalidade neonatal e mieloencefalite (HARLESS *et al.*, 2006).

Infecções leves ou subclínicas são comuns para o EHV-1 (FOOTE *et al.*, 2006). O tempo de incubação para a forma respiratória da doença está entre 3-10 dias. Os sinais clínicos iniciais incluem febre aguda, depressão, letargia, anorexia, inchaço de linfonodos e descarga nasal serosa profusa, que mais tarde torna-se mucopurulenta. A febre pode ser bifásica com os episódios febris correspondendo à viremia associada à célula. Uma infecção vasculotrópica pulmonar fatal, causando severo edema pulmonar, hemorragia e vasculite multissistêmica tem sido demonstrada em cavalos jovens (DEL PIERO *et al.*, 2000; DEL PIERO & WILKINGS, 2001; PATEL & HELDENS, 2005).

Acredita-se que o estabelecimento de viremia associada à célula, que ocorre poucos dias após a infecção, seja crítico na indução nas doenças abortigênicas e neurológicas. Conseqüentemente, tem sido sugerido que o controle desta viremia seja necessário para proteção contra o EHV-1 exigindo

uma resposta imunitária eficiente, baseada na neutralização viral por anticorpos e na ação de linfócitos T citotóxicos. No entanto, respostas imunes ao EHV-1 em cavalos jovens e adultos são qualitativa e quantitativamente diferentes (PAILLOT *et al.*, 2007).

Camundongos inoculados intraperitonealmente com diferentes amostras de EHV-1 mostraram diferenças quanto à neuropatogenicidade. No entanto, todas as cepas utilizadas causaram lesões no SNC quando inoculadas via intracerebral ou intranasal. As lesões encontradas apresentaram-se tanto no cérebro quanto no cordão espinhal e se caracterizavam por moderada meningite e manguitos perivascularares. O mecanismo específico para a entrada do vírus no SNC após inoculação intraperitoneal ainda não é claro. Os camundongos mostraram mielite que foi mais severa do que a encefalite. Ao contrário, após inoculação intracerebral ou intranasal com uma mesma cepa, desenvolveram severa encefalite e menor mielite (MORI *et al.*, 2004). Segundo HASEBE *et al.* (2002), o vírus pode invadir o SNC ou pela rota hematogena ou por disseminação neural a partir dos plexos mesentéricos.

Para sobreviver no ambiente hostil imposto pela imunidade do hospedeiro, muitos vírus interagem com moléculas imunomoduladoras cruciais e interferem com a sua atividade. O mimetismo de quimiocinas do hospedeiro ou receptores de quimiocinas serve para modular a atividade das quimiocinas sendo uma estratégia comum para a geração de um ambiente favorável à replicação viral utilizado por pox e muitos herpesvírus (VON EINEM *et al.*, 2007).

Um importante papel na biologia dos herpesvírus é desenvolvido pelas glicoproteínas, principalmente no processo de infecção (adsorção, penetração e disseminação), patogenicidade e sendo alvo do sistema imune, devido ao fato delas serem expressas na membrana de superfície das células infectadas. Para o EHV-1 existe uma homologia em pelo menos 10 das 11 glicoproteínas conhecidas (gB-gp14, gC-gp13, gD-gp18, gE, gG, gH, gI, gK, gL, e gM) com o HHV-1 (TELEFORD *et al.*, 1998). A entrada dos vírus na célula, a replicação viral e a viremia célula-célula parece ser mediada pela glicoproteína K do envelope viral (VAN MAANEN *et al.*, 2002; NEUBAUER & OSTERRIEDER, 2004). A glicoproteína D (gD) é uma das mais importantes glicoproteínas associadas com o EHV-1 e é considerada o principal alvo da molécula do

sistema imune do hospedeiro. Anticorpos contra ela aparecem logo após a infecção e exibem propriedades neutralizantes. Um dos epítomos indutor de produção de anticorpos neutralizantes parece ser um alvo promissor para a terapia antiviral e uma meta específica para a detecção de infecções EHV-1 (MOLINKOVÁ et al., 2008)

Segundo VAN DER MEULEN et al. (2006), pôneis inoculados intranasalmente com o vírus apresentaram 98% de PBMC infectados presentes no sangue sem as proteínas do envelope viral em sua superfície. Isto faz com que essas células não sejam reconhecidas pela resposta mediada por anticorpos. Essas proteínas virais não somente não foram detectadas na superfície da célula como também intracelularmente. Somente a proteína imediatamente precoce ICP 22 aparece no citoplasma. Isto indica que as proteínas do envelope viral estão ausentes nestas células devido ao fato dessas células estarem presentes apenas nos estágios iniciais de infecção.

Como característico dos herpesvírus, o EHV-1 pode entrar em estado de latência, assim, as células neuronais do gânglio trigêmeo, linfócitos sanguíneos periféricos e dos tecidos linfóides de cavalos com recrudescência experimentalmente induzida têm sido identificadas como locais de latência para o EHV-1 (WELCH et al., 1992; CARVALHO et al., 2000). O animal portador crônico é aquele no qual o vírus persiste de maneira não infecciosa após recuperação da infecção aguda do trato respiratório. Cerca de 60% dos cavalos que se recuperam da infecção respiratória primária provocada pelos herpesvírus tornam-se portadores latentemente infectados durante toda a vida, servindo como uma fonte de infecção para cavalos suscetíveis (EDINGTON et al., 1994). O vírus é reativado principalmente de leucócitos e ocasionalmente da mucosa nasal após tratamento com corticosteróide. Os linfócitos T CD5+/CD8+ foram definidos como sendo o sítio de latência principal do EHV-1, os quais são ativados pela IL-2 e pela gonadotrofina crônica equina (ECG) (PATEL & HELDENS, 2005). Uma subsequente reativação da atividade patogênica pode ocorrer induzindo sinais clínicos e aborto, mesmo em animais vacinados. As éguas grávidas normalmente abortam entre 6 e 11 meses de gestação, na ausência de outros sinais clínicos, porém, tem sido demonstrado que os fetos abortados equinos são infectados com EHV-1, e a transmissão transplacentária tem sido provada (HEBIA et al., 2007).

Não há tratamento específico para a doença respiratória induzida por EHV-1. O uso do aciclovir tem sido restrito a infecções neurológicas e congênitas por este vírus (MURRAY *et al.*, 1998; WILKINGS & SQUARE, 2004). O penciclovir demonstrou diminuir a replicação do EHV-1 em tecidos respiratórios e reduziu a viremia em camundongos e em cultura de tecidos (DE LA FUENTE *et al.*, 1992). Os principais medicamentos utilizados para tratamento da rinopneumonite eqüina não complicada são os antipiréticos para a redução da febre e os antiinflamatórios não esteróides para a redução da inflamação do trato respiratório. Os objetivos básicos do tratamento dos animais infectados são a melhora dos sinais clínicos decorrentes da infecção, a manutenção do animal hidratado e suprido de alimentação adequada e diminuição das complicações por super-infecção bacteriana secundária e disseminação viral além do trato respiratório (SELLON, 2001).

Embora existam vacinas contra o EHV-1, como é o caso do isolado Rach, um vírus EHV-1 modificado comumente usado para vacinar cavalos na Europa e nos Estados Unidos (ROSAS, *et al.*, 2008), elas não são muito protetoras e surtos da doença podem ocorrer em rebanhos vacinados. Assim, há uma grande necessidade de um tratamento antiviral efetivo que reduza a replicação viral e disseminação em cavalos afetados e previna a replicação viral no contato entre animais. A droga também deve ser efetiva tanto em isolados associados a surtos de aborto quanto a surtos associados a manifestações neurológicas (GARRÉ *et al.*, 2007).

Neste trabalho utilizamos o EHV-1 como representante da família *Herpesviridae* devido a sua importância econômica na criação de cavalos, 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.

3.3- Antivirais

Diferentes vírus multiplicam-se em diferentes sistemas celulares, sendo difícil estabelecer um ensaio antiviral único que possa ser aplicado a todos os

vírus. Além disso, metodologias específicas para a avaliação dos agentes antivirais variam muito de um laboratório para o outro (COS *et al.*, 2006). O objetivo dos testes antivirais, especialmente o 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. Outro enfoque na pesquisa de novos antivirais é escolher um extrato ou substância capaz de reduzir ou inativar a replicação viral numa concentração que não seja tóxica. As linhagens celulares são as mais empregadas durante os bioensaios de seleção de substâncias em potencial pela avaliação de sua efetividade e toxicidade (SIMONI, 2003).

Nos métodos *in vitro* comumente utilizados, o biomonitoramento da replicação viral para avaliação antiviral baseia-se nas diferentes habilidades dos vírus em replicar nas células cultivadas, seja por observação dos efeitos citopáticos (ECP) ou formação de placas de lise, ou então, 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 (COS *et al.*, 2006; SIMONI, 2003).

Um agente antiviral ideal deve apresentar um mínimo de toxicidade para a célula hospedeira, e não deve suprimir o processo normal do desenvolvimento da imunidade ativa do indivíduo, também não pode ser suscetível ao desenvolvimento de resistência de variantes virais, o qual é o maior problema encontrado em tratamentos de infecções bacterianas com antibióticos (SIMONI, 2003). Alguns agentes interferem com um ou mais processos dinâmicos virais durante a biossíntese de progênie ou inativam a infectividade viral extracelularmente, outros são capazes de produzir funções especializadas ou de transformação celular e são conseqüentemente candidatos para o uso clínico (COS *et al.*, 2006).

Um sistema antiviral importante na defesa contra todos os tipos de vírus é o sistema de interferons tipo I, o qual é indispensável para vertebrados para controlar as infecções virais ao estabelecer uma forma de estado antiviral em células não infectadas. Ele desempenha um papel junto às células infectadas por vírus, pois estas sintetizam e secretam interferons do tipo I (IFN- α/β),

sinalizando um processo infeccioso após reconhecerem produtos de origem viral como o RNA fita dupla (dsRNA). Estes IFNs secretados circulam no organismo fazendo as células susceptíveis expressarem potentes mecanismos antivirais que limitam ainda mais a propagação viral (HALLER *et al.*, 2006). Um exemplo de mecanismo antiviral está esquematizado na figura 10.

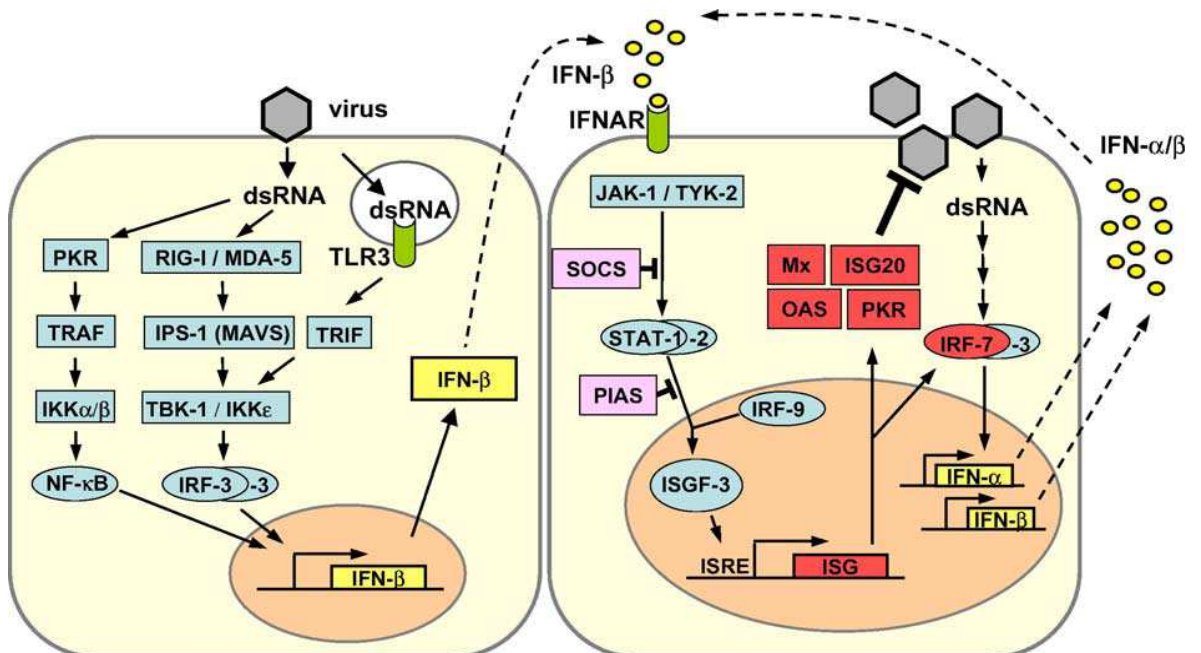


Figura 10: Indução, sinalização e ação do IFN tipo I. Lado esquerdo: dsRNA, produto característico da replicação viral, leva à ativação dos fatores de transcrição NF-κB, IRF-3 e AP-1 (não mostrado). A ação cooperativa destes fatores é requerida para a ativação completa dos promotores de IFN-β. O IRF-3 é fosforilado pelas quinases IKKε e TBK-1 que são indiretamente ativadas por dsRNA. Uma segunda via sinalizadora envolve TLR-3 e TRIF endossomal. Lado direito: o IFN-β recém sintetizado liga ao receptor de interferon do tipo I (IFNAR) e ativa a expressão de fatores de transcrição ISGs via JAK/STAT. O IRF-7 amplifica a resposta ao IFN por induzir a expressão de subtipos de IFN-β. SOCS e PIAS são reguladores negativos da via JAK/STAT. Mx, ISG20, OAS e PKR são exemplos de proteínas com atividade antiviral (HALLER *et al.*, 2006).

As fontes de substâncias naturais como a própolis também são alvo de pesquisas no tratamento de doenças virais em diversos países. Por exemplo, a atividade bactericida, fungicida e antiviral da própolis proveniente de diferentes locais do mundo foram testadas por KUJUMGIEF *et al.* (1999), os quais observaram diferentes níveis de atividades antivirais de acordo com a composição e concentração de flavonóides, ésteres e ácidos fenólicos, demonstrando que a combinação e a concentração das substâncias que compõem a própolis interferem diretamente na atividade antiviral. Seus resultados encontrados em cultivo celular contra o vírus da influenza aviária foram variados e dependentes da composição da própolis testada, portanto, torna-se necessário verificar a atividade biológica de cada componente para determinar a verdadeira atividade bactericida, fungicida e antiviral da própolis.

Extratos de uma planta tradicionalmente usada para o tratamento de lesões de pele, a *Geranium sanguineum*, tiveram sua atividade antiviral testada contra HHV-1 e HHV-2. Ficou demonstrado relativo efeito virucida diretamente dependente da presença e concentração das diferentes substâncias (flavonóides, ácidos fenólicos, taninos, entre outras) encontradas nos diferentes extratos da planta. No entanto, a concentração dessas substâncias está relacionada tanto aos efeitos de redução da atividade viral, bem como aos efeitos citotóxicos encontrados *in vitro*. Isto demonstra que os diferentes graus de inibição viral são dependentes das concentrações dos flavonóides, ácidos fenólicos e taninos e essas são decisivas para determinação de doses e concentrações utilizadas em experimentos *in vitro* e *in vivo* e também para possível utilização da planta como fármaco antiviral (SERKEDJIEVA & IVANCHEVA, 1999).

As atividades antivirais dos flavonóides têm sido investigadas desde a década de 40, com relatos sobre o efeito anti-replicativo sobre vírus animais desde 1975. Sabe-se que a quercetina, a naringenina, a hesperidina e a catequina são ativas contra os vírus HHV-1, parainfluenza 3 (PF-3), e pólio 1. A acetina-7-O- β -O-galactopiranosídeo e a flavona chrisina possuem alto índice terapêutico antiviral contra o HIV-1 (SY *et al.*, 2005).

Experimentos realizados no Laboratório de Infectologia Molecular Animal (LIMA) demonstraram a ação dos flavonóides quercetina e caenferol contra os Herpesvirus bovino 1 e 5, da quercetina e do composto fenólico ácido ferúlico contra o Vírus da cinomose canina (BRUM, 2006). Outro estudo revelou a ação da quercetina sobre o Vírus da parvovirose canina (CPV), EHV-1 e BoHV-5 (OLIVEIRA, 2007).

Os principais flavonóides com atividade antiviral relatada podem ser divididos de acordo com suas estruturas químicas nos três grandes grupos chalcona, flavona e flavonol (SELWAY, 1986; SÁ FILHO, 1995). As propriedades antivirais dos flavonóis foram primeiramente descobertas na década de 40, quando a quercetina foi caracterizada por ter um efeito profilático quando administrada na dieta de ratos infectados via intracerebral com o vírus da raiva e outras viroses (WANG *et al.*, 1998). A quercetina, um dos flavonóides mais pesquisados, parece ter atividade antiviral relacionada à habilidade desse composto de se ligar a proteínas do envelope viral interferindo

na ligação e penetração do vírus na célula, bem como na síntese de DNA (FOMICA & REGELSON, 1995).

Estudos para testes de fármacos antivirais são realizados em vários modelos de diversas famílias virais. Entre eles, estão as pesquisas com o Vírus da diarreia viral bovina (BVDV) (BUCKWOLD *et al.*, 2003) e as pesquisas de avaliação do potencial terapêutico de diferentes substâncias naturais extraídas de diversas plantas no mundo contra as infecções herpéticas, principalmente nos pacientes imunodeprimidos portadores de HIV. A realização de testes com fármacos comerciais e associações desses com substâncias naturais isoladas vêm sendo testados na busca da prevenção das infecções virais e no tratamento dos sinais clínicos relacionados (GONG *et al.*, 2004).

Devido às suas características de infecção e também à grande importância para saúde pública e impacto econômico de suas infecções nos animais e humanos, os herpesvírus são alvos das mais diversas pesquisas sobre drogas antivirais. Por exemplo, o HHV possui um papel histórico extremamente proeminente no desenvolvimento de quimioterapia antiviral estando entre as primeiras infecções a fornecer o princípio de que uma doença viral é tratada com sucesso por compostos antivirais (FIELD *et al.*, 2006).

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Células e vírus

Foi utilizado um isolado do EHV-1 obtido de um surto no Rio Grande do Sul, o qual foi cedido pelo Laboratório de Virologia Animal da Universidade Federal de Santa Maria/RS. Para a realização dos ensaios *in vitro* foram utilizadas células da linhagem de rim de macaco verde africano (Vero), apresentadas na figura 11, as quais 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 10%).

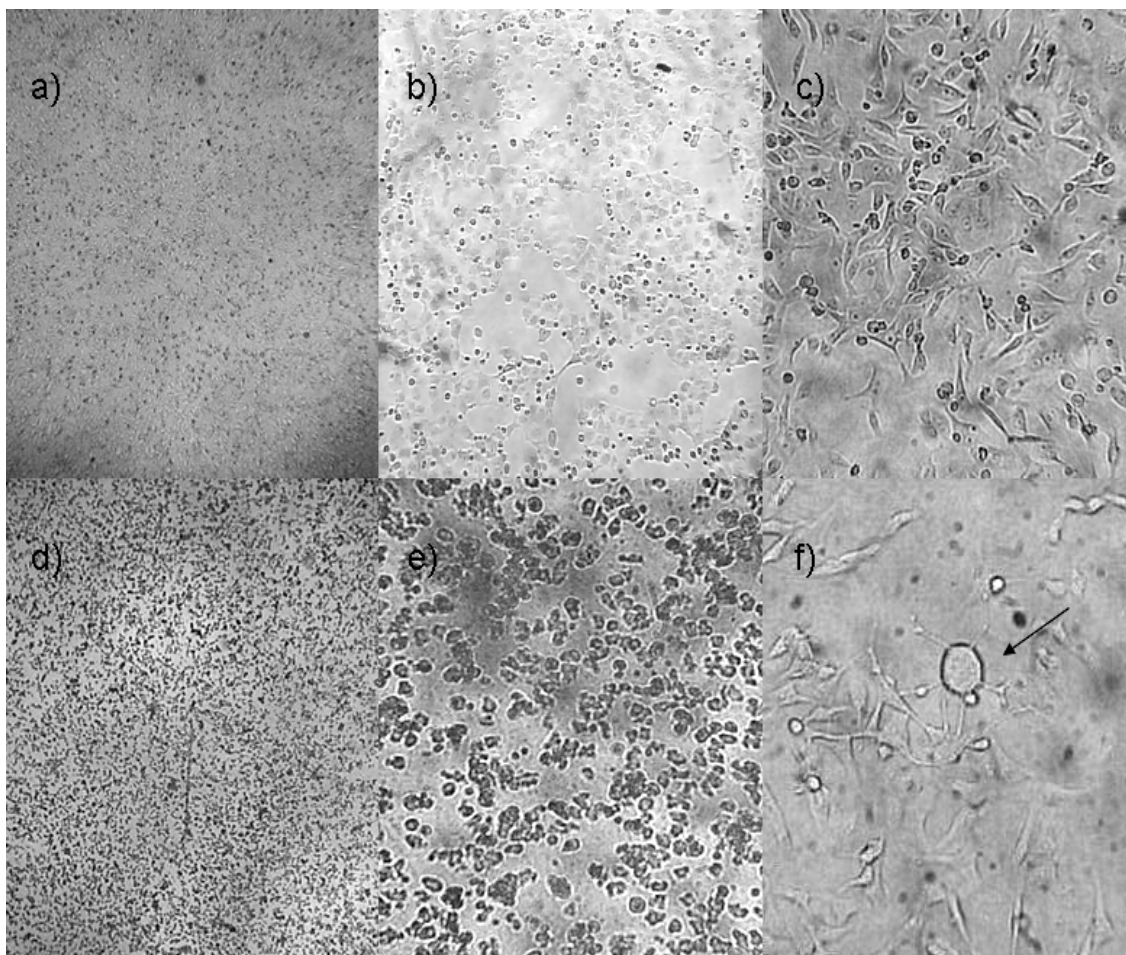


Figura 11: Células Vero livres e infectadas por EHV-1. Monocamadas de células Vero nos aumentos de a)40X, b)200X e c)200X. Monocamadas de células Vero infectadas por EHV-1 apresentando efeito citopático característico nos aumentos de d)40X, e)200X e f)200X com ECP inicial; a seta indica um sincício - estrutura formada por fusão celular decorrente da infecção.

4.2- Extratos e substâncias

Foram realizados os testes antivirais para oito compostos, dentre os quais estão três extratos secos vegetais preparados pelo próprio grupo de pesquisa, um extrato fúngico (*monascus*), e quatro sintéticos (os três flavonóides quercetina, rutina e morina e seu precursor, o ácido *trans*-cinâmico). Os sintéticos foram adquiridos do laboratório SIGMA-ALDRICH e o *monascus* obtido do laboratório CHRISTIAN HANSEN, os quais foram gentilmente cedidos pelo laboratório Biofármacos representado pela professora Tânia Toledo de Oliveira. Os extratos secos vegetais foram gentilmente cedidos pela professora Marisa Alves Nogueira Diaz, ambas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV.

Os extratos vegetais são oriundos de uma mesma espécie de planta e tiveram sua extração baseada na polaridade dos solventes utilizados, hexano, diclorometano e etanol, respectivamente para os extratos E1, E2, E3. A natureza da planta será mantida sob sigilo.

A diluição inicial dos compostos foi realizada em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração estoque de 100 mg/mL e armazenada a 4°C. No momento da utilização foi feita diluição em MEM, de forma que a concentração final de DMSO não ultrapassasse 2,5%.

4.3- Preparações dos estoques virais e titulação

O vírus foi repetidamente inoculado em monocamadas celulares semi-confluentes para atingir o máximo título viral. Depois de observada a manifestação do efeito citopático (ECP), as células foram congeladas e descongeladas três vezes. O sobrenadante coletado foi então aliquoteado (estoque) e titulado pelo método de TCID₅₀ descrito por REED & MUENCH (1938).

Neste método, a diluição do vírus que resulta na infecção de 50% das replicatas de inoculações expressa o título como a dose 50% infectiva (ID₅₀),

com isto, estabelece-se um sistema que inclui a observação do ECP em culturas celulares determinando a dose 50% infectiva em cultura de tecidos (“tissue culture infective dose 50” ou TCID₅₀). Assim, se o ponto de 50% de positividade se encontra na diluição $10^{-4,333}$, o título do vírus é de $10^{4,333}$ doses infectivas por 50 µL ou $10^{4,333}$ TCID₅₀/50µL.

4.4- Análises *in vitro*

As análises *in vitro* se basearam na avaliação por microscopia óptica e confirmação por colorimetria do efeito citotóxico dos compostos testados e na avaliação da redução de título viral por visualização do ECP por microscopia óptica seguida de titulação viral.

4.4.1- Análise do efeito citotóxico

Este teste tem como objetivo determinar a concentração máxima não tóxica (CMNT) dos compostos para as células, pois é de interesse que eles apresentem ação antiviral na menor concentração possível sem causar danos ao organismo infectado. Para isto, as concentrações de cada substância e extrato foram escolhidas com base nos dados disponíveis na literatura ou por meio de pré-incubações das células com os compostos e acompanhamento por microscopia.

As células foram incubadas em estufa por 72 horas à 37°C e atmosfera a 5% de CO₂ com as diferentes concentrações de cada produto teste. Compararam-se os aspectos daquelas que foram tratadas com as não tratadas (controle celular) e determinou-se o efeito na viabilidade e na morfologia celular (perda da monocamada, granulação, vacuolização no citoplasma, alongamento e estreitamento dos prolongamentos e escurecimento dos limites celulares).

A citotoxicidade foi determinada por utilização de uma variação do método colorimétrico baseado na redução do sal tetrazolium3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolium brometo (MTT) por células viáveis, estabelecido por MOSMANN, 1983 & NIU *et al.*, 2001. Este sal é um substrato amarelo que é

reduzido por células vivas, conforme apresentado na figura 12, formando o produto azul escuro formazana, requerendo membranas mitocondriais ativas (células recém-mortas não clivam quantidades significativas de MTT).

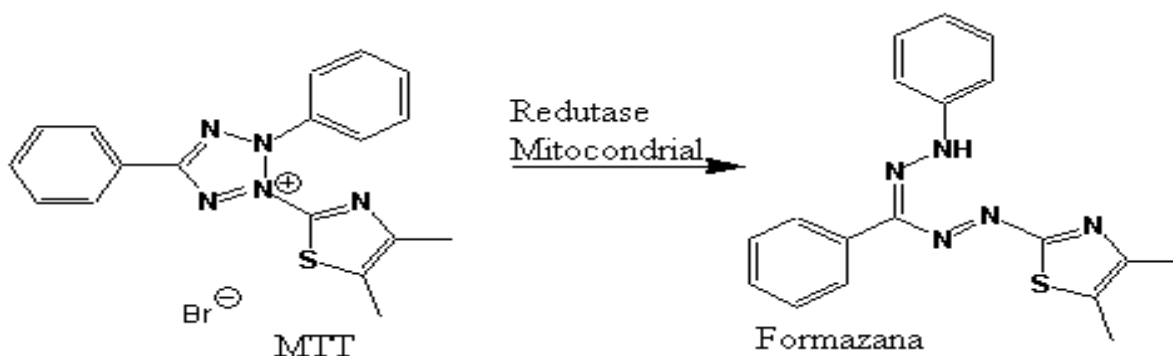


Figura 12: Reação de redução do MTT a formazana

No teste, microplacas de 96 orifícios contendo células Vero foram incubadas a 37 °C por 3 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ para adesão das células, restabelecimento do crescimento e início de formação das camadas celulares. Logo após, elas foram tratadas com soluções de diferentes concentrações dos compostos e incubadas novamente em estufa e monitoradas diariamente por 3 dias por microscopia óptica.

No 3º dia após incubação, as células foram lavadas duas vezes com tampão salino fosfato (PBS) pH 7,2 e incubadas em estufa com MTT 10% por 4 horas. Posteriormente, o sal formado foi solubilizado pela adição de isopropanol-HCl 0,04 N e agitação por pipetagem. A densidade óptica (DO₅₅₀) foi determinada por colorimetria em leitor de ELISA. A porcentagem de células tratadas viáveis foi calculada em relação ao controle não tratado (% de células controle = $DO_{exp} / DO_{célula\ controle} \times 100$). A CT₁₀ é uma expressão que corresponde à concentração necessária para reduzir a densidade óptica em 10%, indicando uma redução máxima de 10% de viabilidade celular.

Determinada a CMNT dos compostos para a célula, escolheu-se para cada um, três concentrações abaixo desta e as mesmas foram utilizadas nos testes antivirais propriamente ditos.

4.4.2- Análises pré-infecção

4.4.2.1- Determinação da atividade virucida (Ensaio de Inativação Direta - AID)

Este teste tem como objetivo determinar se as substâncias e extratos possuem ação sobre as partículas virais desestabilizando-as ou se ligando a elas de forma irreversível, avaliando assim, se os diferentes compostos apresentam ação antiviral em etapas iniciais da infecção, impedindo que o vírus se ligue a novas células.

As células são previamente plaqueadas e quando aderidas, inicia-se o teste (+/- 1 hora). Neste tempo, foram realizadas diluições seriadas do EHV-1, as quais foram incubadas com as três concentrações dos possíveis antivirais em temperatura entre 35-37°C. Em determinados intervalos de tempos (0, 2, 4, 6, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 min), uma alíquota de cada suspensão vírus-composto foi adicionada às células, incubada em estufa e ao terceiro dia, avaliada quanto ao ECP e titulada. O tempo zero é o momento em que são incubadas as diluições do vírus com o composto testado. A atividade antiviral foi determinada pela visualização da redução do ECP nas células infectadas em relação à titulação controle em cada tempo e a ação antiviral determinada pela redução no título viral.

Para evitar resultados errôneos e verificar se outro fator poderia estar atuando de alguma forma sobre as células, em todas as placas foram utilizados dois controles celulares sem inoculação viral: 1) a incubação das células somente com MEM e 2) a incubação das células com cada composto diluído em MEM na concentração testada. Um terceiro controle também foi realizado, o controle de título viral, para evitar que ele tenha decaimento por um fator externo ao teste, como o tempo ou temperatura.

Foi realizada a análise da possível ação antiviral do DMSO em concentrações igual e superior àquelas encontradas nas diluições dos compostos, uma vez que ele é o solvente inicial dos compostos, evitando assim falsos positivos.

4.4.2.2- Determinação da atividade sobre as células (Ensaio “*End Point*” – EP)

Este teste tem como objetivo determinar se os compostos se ligam a receptores celulares ou a outras estruturas moleculares causando modificações celulares duradouras, de forma a afetar a infectividade por resistência celular ao vírus, mesmo após a retirada das diluições dos tratamentos. Ou estabelecendo uma indução de estado antiviral nas células sem estas terem tido contato prévio com o vírus.

Após 15 horas de plaqueamento, as monocamadas de células semi-confluentes foram incubadas por 1h em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ com os compostos nas três concentrações pré-estabelecidas. Foram então lavadas duas vezes com PBS e utilizadas para titulação de uma partida viral com título pré-estabelecido de 10⁷ TCID₅₀/50µL. Em seguida, as células foram incubadas em estufa e o ECP foi lido ao terceiro dia. A atividade antiviral foi determinada pela redução no ECP dos vírus inoculados em monocamadas celulares tratadas em relação aos vírus inoculados em monocamadas celulares não tratadas (controle).

Como no ensaio AID, em todas as placas foram utilizados os dois controles celulares: a incubação das células somente com MEM e com os compostos diluídas em MEM. Também foram realizadas a titulação controle e análise da possível ação antiviral do DMSO em concentrações igual e superior àquelas encontradas nas diluições dos compostos.

4.4.3- Análises de efeitos durante o ciclo de replicação viral

4.4.3.1- Ensaio da cinética de adição de drogas (Ensaio “*Timing of Addition*”-TofA)

Este ensaio foi realizado com o objetivo de determinar a ação dos compostos sobre quatro etapas do ciclo infectivo viral: Pré-Tratamento (PT), Adsorção (ADS), Penetração (PEN) e fase Intracelular (IC), as quais estão apresentadas na figura 13. Avaliando assim, se os compostos apresentam ação antiviral em fases específicas da infecção, impedindo a formação de progênie, mesmo que as células já estejam infectadas.

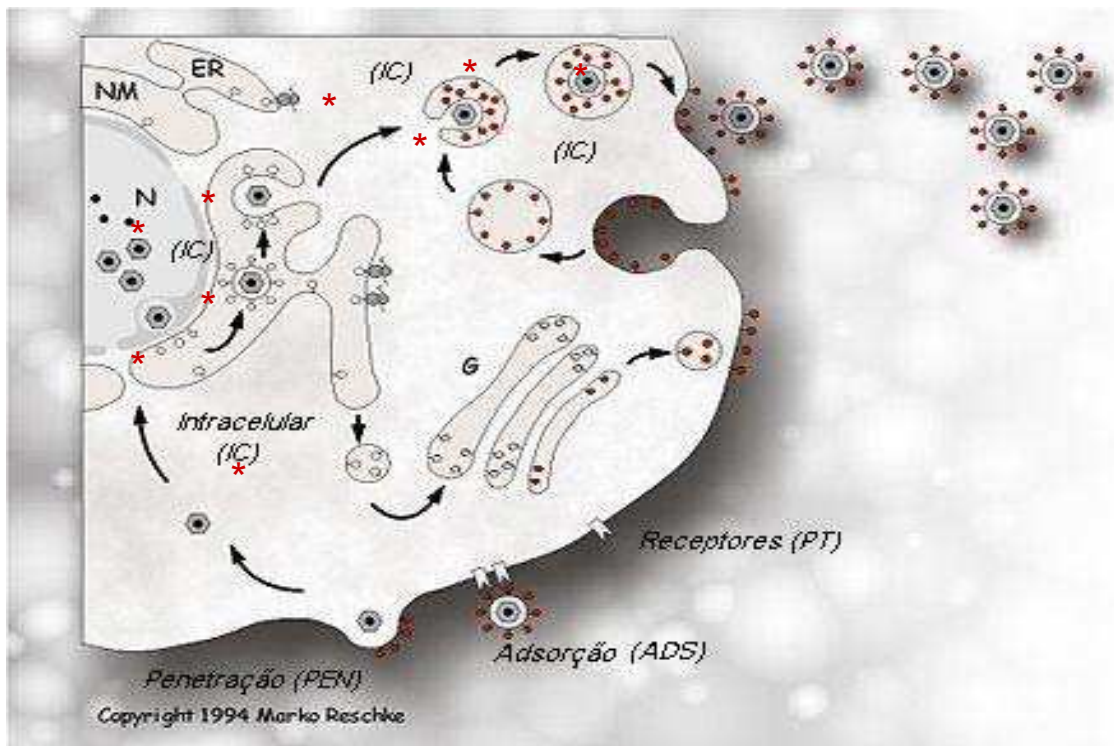


Figura 13: Esquema do ciclo infectivo viral. Fases nas quais um antiviral pode atuar. O asterisco vermelho representa alguns dos processos que podem ser afetados no interior das células, ou fase IC.

O efeito antiviral dos compostos foi avaliado segundo sua adição em diferentes tempos relativos às fases específicas da infecção viral conforme especificado na figura 14.

Na etapa PT, é avaliado se o composto se liga de forma irreversível aos receptores das células ao vírus, desestabilizando-os e impedindo a adsorção viral. Para tal, monocamadas celulares confluentes de um dia foram incubadas por 1h com MEM contendo cada composto diluído nas três concentrações pré-estabelecidas. Após este tempo, as células foram então lavadas duas vezes com PBS, inoculadas com o vírus e incubadas por 1h a 4°C para prevenir a internalização do vírus. Em seguida, foram lavadas novamente por 2 vezes com PBS e incubadas a 37°C por 72h em MEM suplementado com SFB 5%.

Para as demais etapas, outras placas contendo monocamadas celulares foram lavadas 2 vezes com PBS, inoculadas com as suspensões virais e mantidas por 1h a 4°C, sendo que uma fração delas foi tratada com os compostos. As células tratadas foram novamente lavadas 2 vezes com PBS e incubadas com MEM suplementado com SFB 5% por 72h a 37°C (fase ADS). Após a adsorção, as placas não tratadas foram incubadas a 37°C para permitir a penetração do vírus, dentre elas uma nova fração foi incubada com MEM contendo o composto por 1h, para então serem lavadas com PBS por duas vezes e incubadas com MEM e SFB 5% e cultivadas por 72h a 37°C (fase PEN). A outra fração de células que não recebeu tratamento foi finalmente incubada com os compostos diluídos em MEM com SFB 5% por 72h (fase IC). A atividade antiviral de todas as fases foi avaliada pela redução no ECP.

O abaixar da temperatura decresce a permeabilidade da membrana plasmática e despolariza parcialmente as células, diminuindo drasticamente os processos de internalização e exportação mediados por proteínas celulares, sugerindo que estes processos são dependentes de energia e que a rigidez da membrana minimiza os processos de captação e fusão de membranas. Isto demonstra que em baixas temperaturas a maioria dos complexos a serem transportados via membrana plasmática permanece ancorado nela e não são processados. Apesar da deficiência em energia celular reduzir a absorção, ainda assim, uma pequena fração de complexos é capaz de ser atravessada pela membrana a baixas temperaturas, sugerindo uma associação estável ou aceitação. Todos os processos endocíticos (endocitoses clatrina-dependente e independente, macro e micropinocitose) são bloqueados a baixas temperaturas e em células com deficiência de energia (SAALIK *et al.*, 2004).

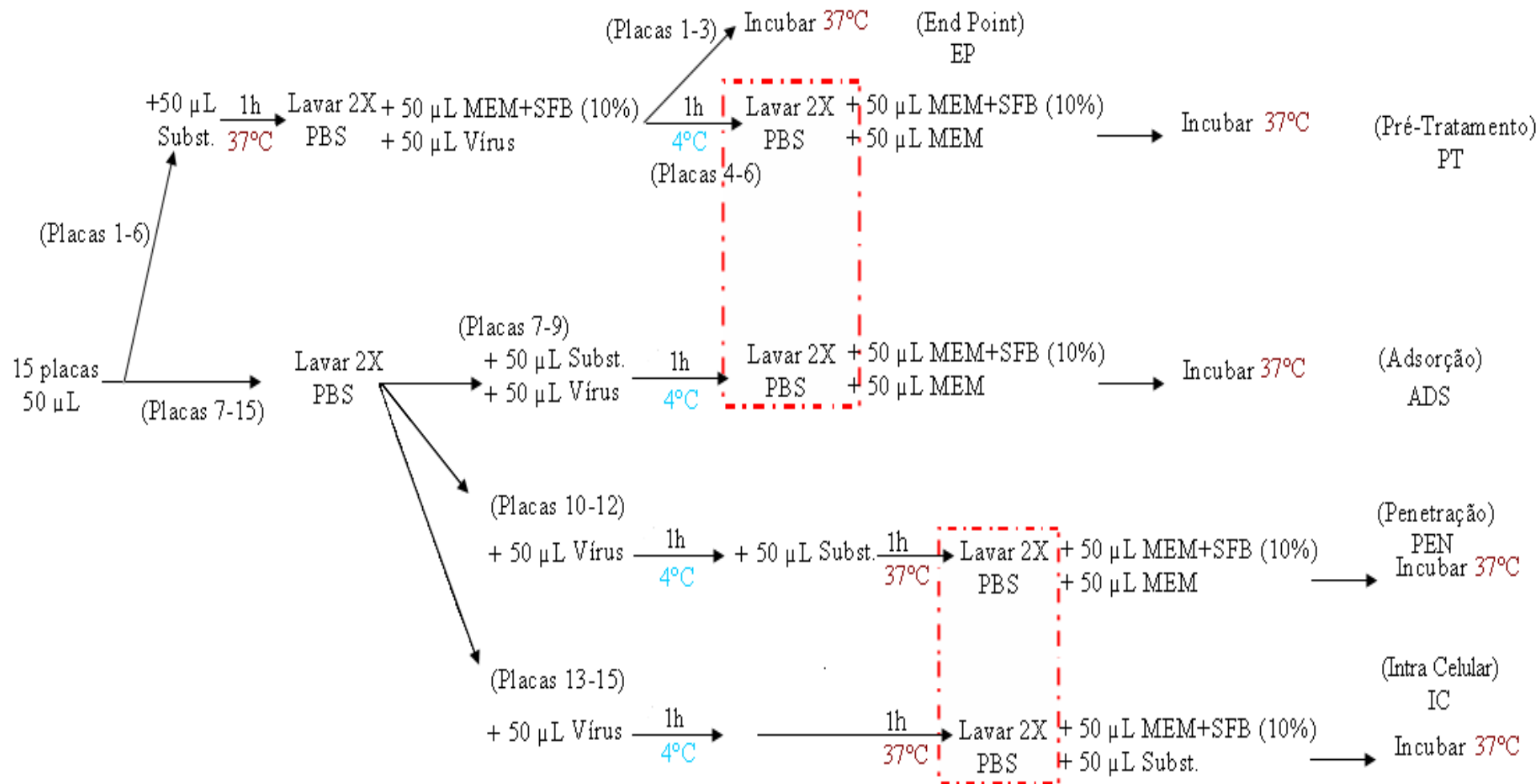


Figura 14: Esquema do tratamento TofA. A adição dos compostos em cada tempo determina a suas ações antivirais em cada fase de infecção. MEM = Meio Essencial Mínimo; SFB = Soro Fetal Bovino; PBS = Tampão Salino Fosfato; Subst.= Substância Testada.

A disposição de plaqueamento dos testes EP e TofA estão esquematizadas na figura 15.

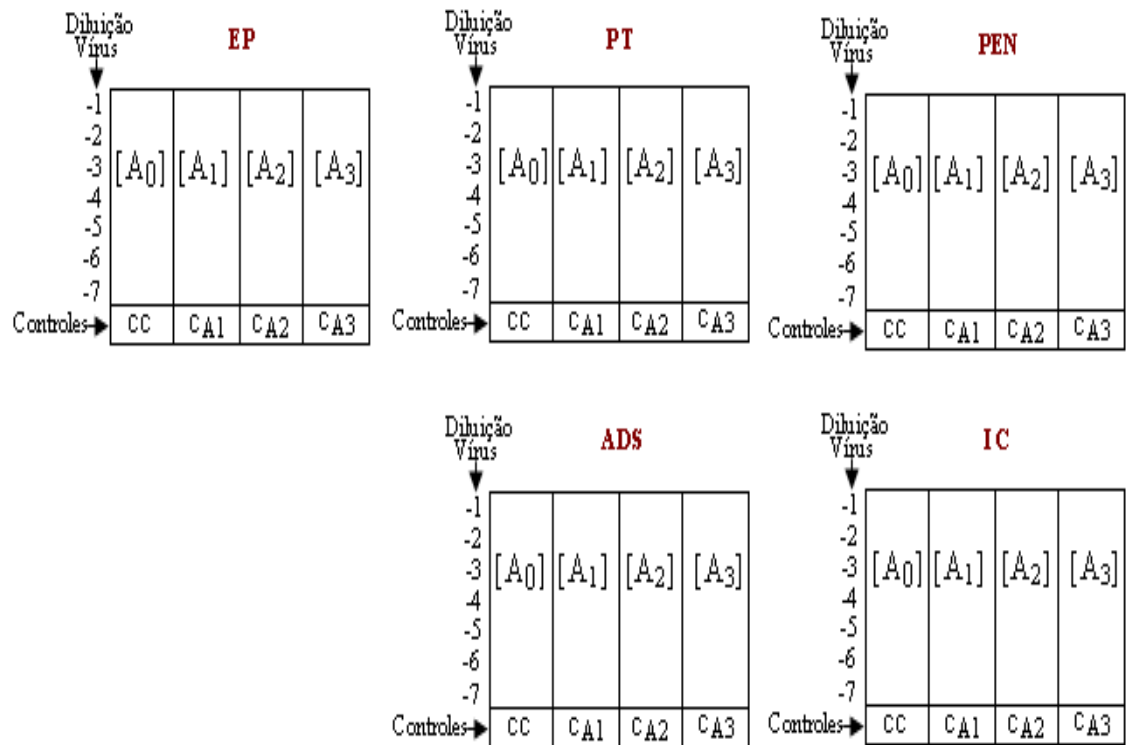


Figura 15: Esquema de plaqueamento nos ensaios EP e TofA. Fases: Pré-Tratamento (PT), Adsorção (ADS), Penetração (PEN) e Intracelular (IC); [A₀], [A₁], [A₂], [A₃]: Concentrações da composição, sendo que em [A₀] é a titulação controle (sem a composição ou C+); CC, CA₁, CA₂, CA₃: controles celulares onde não foi incubado o vírus.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Análises *in vitro*

5.1.1 – Análises do efeito citotóxico

O primeiro passo para realização dos testes antivirais é a realização do teste de citotoxicidade, o qual fornece a concentração máxima não tóxica (CMNT) de cada composto para as células Vero.

Em baixas concentrações dos compostos, as células não sofrem alterações estruturais visíveis por microscopia óptica, porém, a partir da CMNT, os efeitos tóxicos nas células tornam-se cada vez mais drásticos. Foi observado que ao aumentar a concentração dos compostos, as células tornam-se cada vez mais escassas por diminuição do ritmo de divisão celular, apresentam um aumento de volume, com afinamento dos prolongamentos e limites escuros.

Para confirmar a avaliação da viabilidade celular e realizar a mensuração do efeito citotóxico foi realizado o método colorimétrico do MTT. Os resultados encontrados estão apresentados na tabela 1. O teste do MTT é um método rápido, simples, barato e preciso para a determinação da densidade celular (FREIMOSER *et al.*, 1999), porém, alguns estudos indicam que a atividade específica do MTT é significativamente influenciada por uma série de parâmetros, como o tipo celular, a idade, a velocidade de metabolismo de açúcares, entre outros, sugerindo que os ensaios devem ser definidos em condições pré-estabelecidas que minimizem os efeitos adversos (VISTICA *et al.*, 1991).

No processo de lavagem com PBS durante este teste, o tapete celular pode ser danificado, caso o procedimento não seja feito corretamente, o que pode interferir na qualidade dos resultados, pois a perda da monocamada celular pode fornecer uma CMNT menor do que a real, fato que deve ser evitado.

A partir da CMNT encontrada para cada composto, foram escolhidas pelo menos três outras inferiores a ela ([A₁], [A₂], [A₃], [A₄]), as quais foram utilizadas nos testes antivirais. As concentrações utilizadas estão descritas na tabela 1.

Tabela 1: Concentrações Máximas Não Tóxicas (CMNT) dos compostos para a célula Vero e concentrações escolhidas para os testes antivirais.

Composto	CMNT/MO (µg/mL)	CMNT /MTT (µg/mL)	[A ₁] (µg/mL)	[A ₂] (µg/mL)	[A ₃] (µg/mL)	[A ₄] (µg/mL)
Quercetina	70	75,1	15	30	60	_____
Morina	100	101,3	30	60	90	_____
Rutina	120	119,7	30	60	120	_____
Ác. <i>trans</i> -Cinâmico	110	109,3	25	50	100	_____
Monascus	70	83,1	15	30	60	_____
E1	40	31,5	7	15	30	_____
E2	40	34,4	10	20	40	_____
E3	90	90,9	20	40	80	_____
E3*	90	90,9	5*	11,2*	22,5*	80*
DMSO	3,0 (%)	3,1 (%)	0,6 (%)	1,2 (%)	2,4 (%)	_____

*Utilizado somente no teste AID. MO = Avaliado por Microscopia Óptica; MTT = Avaliado pelo teste do MTT, sendo a CMNT = CT₁₀ = concentração do composto capaz de reduzir em 10% a DO.

A rutina, o ácido *trans*-cinâmico a morina e o E3 foram os que apresentaram menores toxicidades para a célula Vero, porém isto não corresponde a uma ação antiviral propriamente dita por parte dos compostos.

A determinação da CMNT do DMSO é muito importante porque ela não pode ser atingida em nenhum teste, uma vez que este é o primeiro solvente utilizado para dissolver os compostos testados. Caso contrário, o DMSO poderia interferir nos resultados das análises.

5.1.2 – Testes antivirais AID, EP e TofA

Os testes antivirais *in vitro* foram baseados na determinação da redução do título viral pela avaliação do ECP por microscopia óptica. Em cada concentração, tempo e fase de cada teste e em todos os ensaios foram feitos controles celulares a fim de evitar resultados errôneos, isto porque a análise do ECP só pode ser feita quando comparada a eles. Os controles utilizados foram: 1) a incubação das células com MEM+SFB sem os compostos (CC – Controle Celular), 2) com MEM+SFB acrescido das diluições da composição (CA – Controle do possível Antiviral), e 3) uma titulação controle (C+ – Controle Positivo). Nenhum dos ensaios apresentou alterações na morfologia das células controles, seja por contaminação por outro microrganismo ou por toxicidade de algum reagente. Na figura 16, estão apresentados os três controles no teste AID.

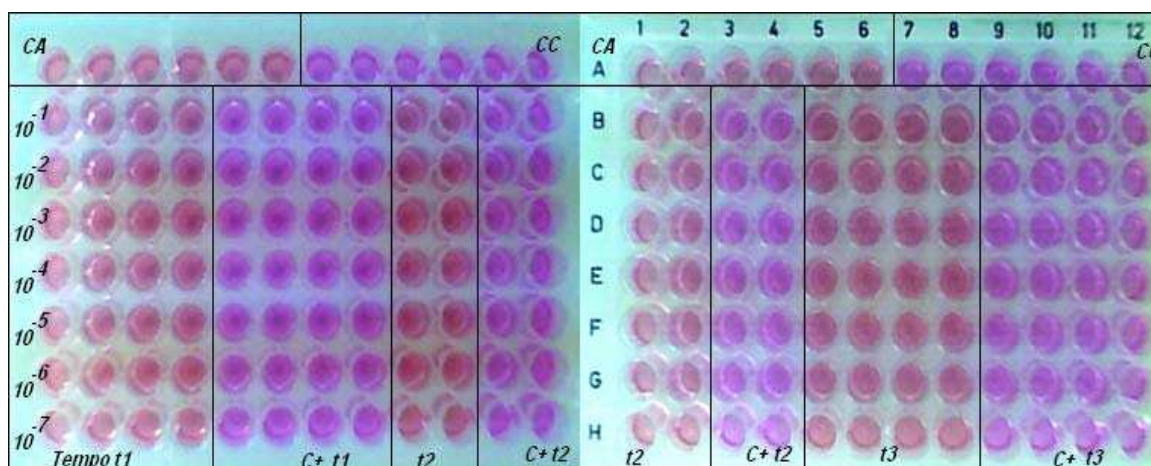


Figura 16: Placas de cultivo apresentando o teste AID. A coloração rósea é decorrente do MEM e a vermelha é devido à presença do composto diluído no MEM. Na primeira linha temos os controles sem vírus (CA e CC). Nas linhas de B a H temos as células incubadas com vírus nas diluições de 10^{-1} a 10^{-7} , respectivamente. Os testes antivirais estão à esquerda (t1, t2 e t3 em vermelho) e o controle positivo à direita (C+ t1, C+ t2 e C+ t3 em rosa). A cada duas placas foram realizadas 3 análises de tempos (t1, t2, t3, ...) e cada tempo teve 4 repetições.

As titulações e o período de incubação dos compostos com o vírus no teste AID foram realizados entre 35-37°C para evitar que a mensuração do título viral tenha decaimento devido a um fator externo, como é o caso do calor excessivo. O calor acima de 37°C pode inativar partículas virais, o que pode ser interpretado erroneamente como efeito antiviral.

5.1.2.1 – Testes antivirais do DMSO

Para solubilização inicial de todos os compostos foi utilizado o DMSO, uma vez que, este é um solvente muito requerido em técnicas de cultivo celular e possui um amplo poder de diluição para diversas classes de compostos. Portanto, é necessário descobrir a concentração máxima que o DMSO pode estar presente nos ensaios sem causar citotoxicidade ou atuar como agente antiviral, o que corresponderia a um falso positivo para os compostos testados.

No teste AID, foram utilizadas duas concentrações, 1,2%, a qual corresponde à maior porcentagem de DMSO encontrada nas diluições dos compostos e o dobro desta 2,4%, a qual foi utilizada para comprovar com maior veracidade que ele atua como um composto inerte. Já nos testes EP e TofA, além das concentrações acima, foi utilizada uma terceira concentração, a de 0,6%, que corresponde à menor concentração de DMSO encontrada nas diluições dos compostos.

A figura 17 e a tabela 2 demonstram que o título viral, inicialmente 10^7 TCID₅₀/50µL, não sofreu variação no decorrer do tempo de 40 minutos em nenhuma das concentrações.

Tabela 2: Efeito virucida do DMSO, expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença do DMSO.

Tempo (min)	1,2%	2,4%
	$\frac{\text{Tit C+}}{\text{Tit [A}_1]}$	$\frac{\text{Tit C+}}{\text{Tit [A}_2]}$
0	1,0	1,0
2	1,0	1,0
4	1,0	1,0
6	1,0	1,0
10	1,0	1,0
15	1,0	1,0
20	1,5	1,0
25	1,0	1,0
30	4,6	1,0
40	1,9	1,0

Há ação antiviral quando $\text{Tit C+} / \text{Tit[A]} > 10$, ou seja, redução de título de pelo menos um log. A concentração está expressa em % (v/v). Tit C+ = Titulação controle; Tit [A] = Titulação com o tratamento.

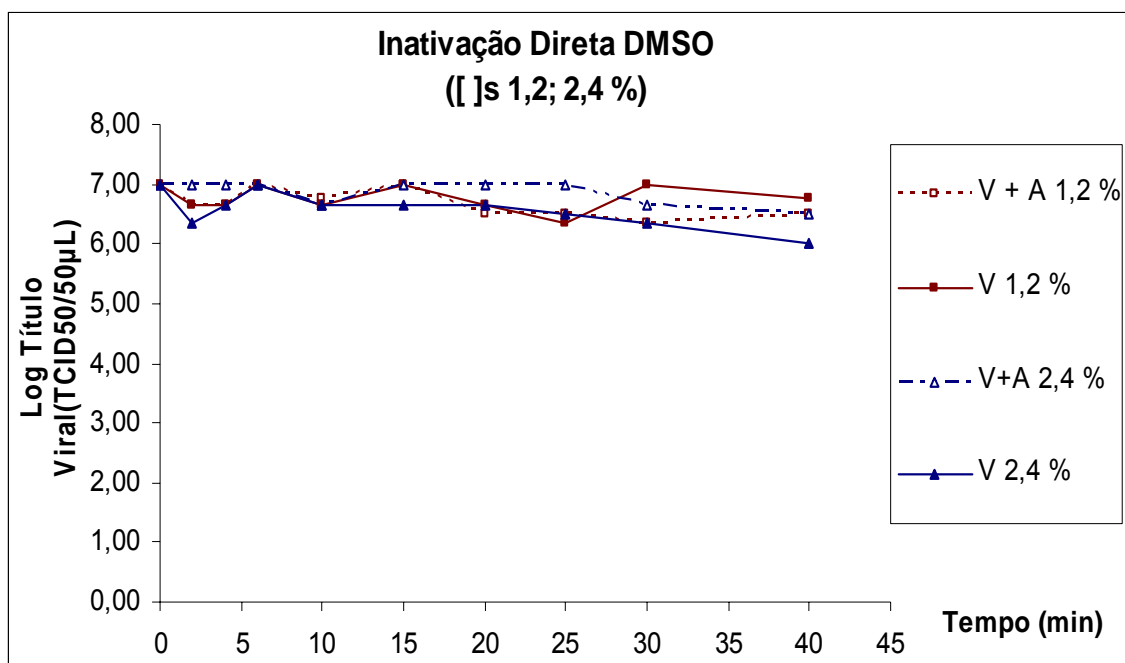


Figura 17: Efeito antiviral do teste AID do DMSO sobre o EHV-1. As linhas pontilhadas correspondem às titulações com o DMSO e as linhas contínuas correspondem às titulações controle (C+). Cada cor corresponde à titulação em uma concentração e a de seu controle (C+).

Por falta de repetições suficientes para calcular os títulos virais com maior precisão, mesmo que sejam elevadas as porcentagens de redução de título, estas não podem ser consideradas significativas. Portanto, considera-se efeito antiviral apenas quando a redução seja maior que 10X, caracterizando uma inibição de no mínimo 90% das partículas virais ou um log.

Os testes EP e TofA do DMSO são apresentados na figura 18, e também não demonstram diferença significativa entre os títulos virais em nenhuma das etapas quando comparadas com os respectivos controles C+.

Baseado nos resultados encontrados pode-se dizer que o DMSO não possui ação antiviral contra o EHV-1, e que não interferiu nos demais testes, pois as concentrações deste nas diluições dos compostos são inferiores às testadas. Portanto, o DMSO é um solvente inerte nas demais análises realizadas.

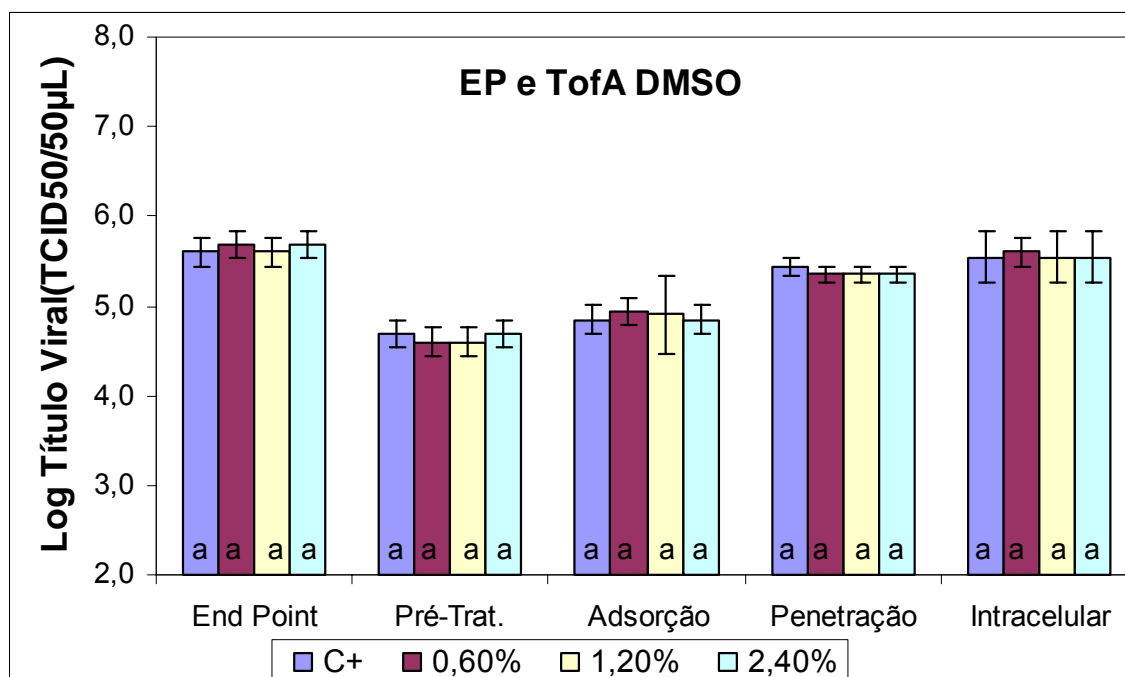


Figura 18: Efeito antiviral dos testes EP e TofA do DMSO sobre o EHV-1. Dentro de cada teste, cada barra corresponde a uma titulação com uma concentração de DMSO. Mesmas letras correspondem às médias de título iguais, letras diferentes correspondem às médias diferentes, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

5.1.2.2 – Testes antivirais da Quercetina

A quercetina apresentou ação antiviral tanto no teste AID quanto no TofA, assim, concluímos que ela atua como agente antiviral sobre as partículas virais e em etapas específicas da infecção viral, principalmente nas fases iniciais de adsorção e penetração viral.

No teste AID da quercetina, as três concentrações testadas apresentam semelhante redução de título, havendo redução máxima de 2729 vezes, conforme apresentado na tabela 3 e na figura 19, indicando assim, uma ação antiviral sobre as partículas virais, por se ligarem a elas de forma irreversível ou desestabilizando estruturas indispensáveis ao vírus, como o envelope glicoprotéico.

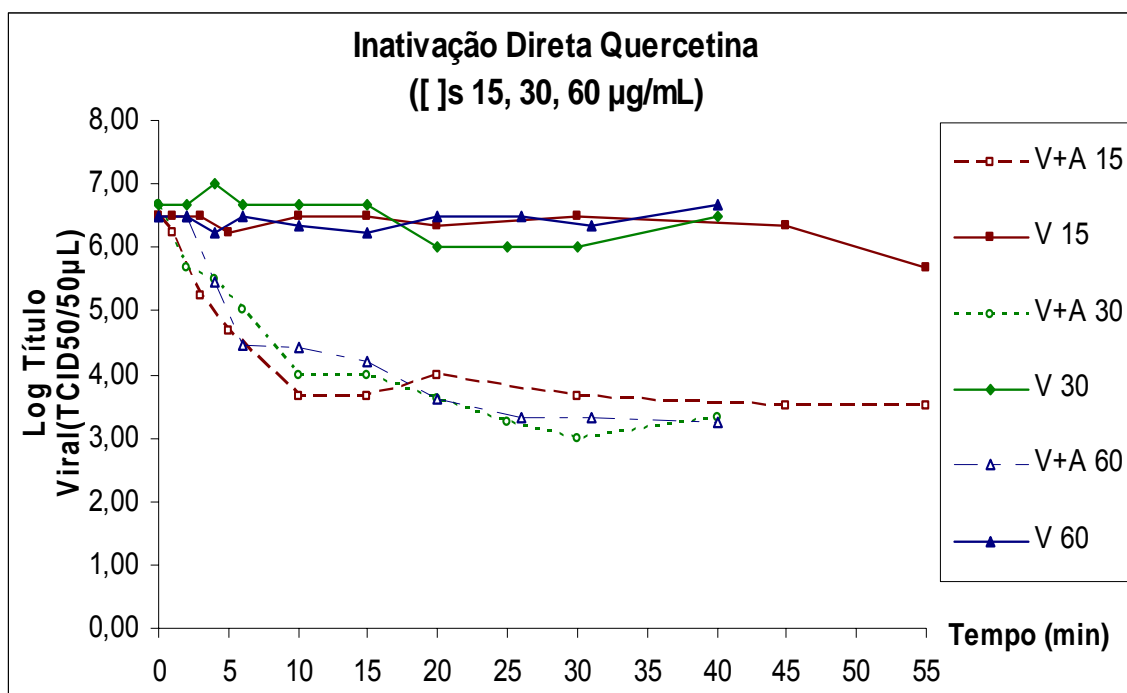


Figura 19: Efeito antiviral do teste AID da Quercetina sobre o EHV-1. As linhas pontilhadas correspondem às titulações com a quercetina e as linhas contínuas correspondem às titulações controle (C+). Cada cor corresponde à titulação de uma concentração e a de seu controle (C+).

Tabela 3: Efeito virucida da quercetina, expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença da quercetina.

[]	15	30	60
Tempo (min)	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_1]}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_2]}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_3]}$
0	1,0	1,0	1,0
1	1,9	10,0	1,0
3	18,6	31,6	5,7
5	36,7	46,4	106,2
10	681,3	464,2	78,7
15	681,3	464,2	102,8
20	215,4	237,1	774,3
30	681,3	587,9	1468,1
45	681,3	1000,0	1000,2
55	146,8	40	2728,7

Há ação antiviral quando $\text{Tit C+} / \text{Tit[A]} > 10$, ou seja, redução de título de pelo menos um log. A concentração está expressa em $\mu\text{g/mL}$. Tit C+ = Titulação controle; Tit [A] = Titulação com o tratamento.

A desestabilização das partículas virais pela quercetina pode de certa forma se dar sobre os receptores virais, impedindo a ligação vírus-célula alvo. A redução de título observada em cerca de 3 casas decimais caracteriza um elevado potencial antiviral e terapêutico da quercetina, sendo ela um possível agente a ser empregado em uma formulação medicamentosa.

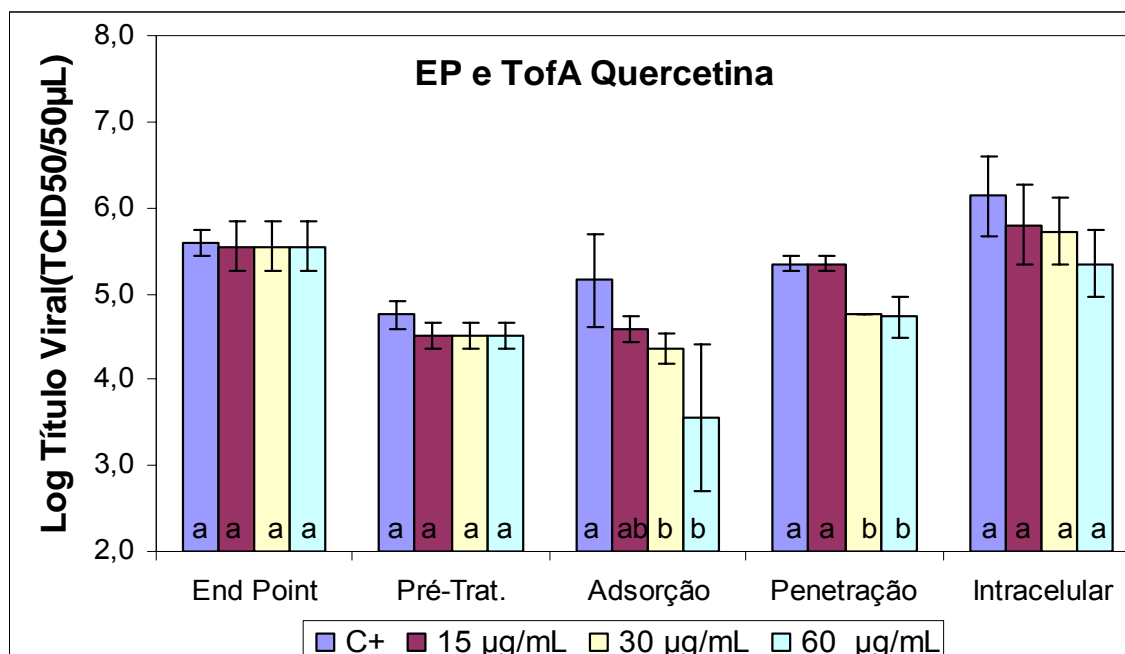


Figura 20: Efeito antiviral dos testes EP e TofA da Quercetina sobre o EHV-1. Dentro de cada teste, cada barra corresponde a uma titulação com uma concentração de quercetina. Mesmas letras correspondem às médias de título iguais, letras diferentes correspondem às médias diferentes pelo teste Tukey, 5% de probabilidade.

No teste TofA, a quercetina em altas concentrações apresenta ação antiviral sobre as fases de adsorção (ADS) e penetração viral (PEN) conforme apresentado na figura 20. Isto indica que, além de possuir uma atividade virucida, a quercetina pode, respectivamente, interferir na ligação do vírus ao seu receptor celular e no processo de internalização nas células.

Uma vez impedindo a entrada dos vírus nas células, a quercetina pode atuar como antiviral reduzindo o número de novas células infectadas, contendo, portanto, a propagação viral e formação de progênie. Demonstrando, assim, o potencial dos flavonóides sobre a estrutura dos herpesvírus, representados neste trabalho pelo EHV-1. Outros compostos similares podem apresentar resultados melhores, ou atuar de forma sinérgica.

5.1.2.3 – Testes antivirais da Morina

Um flavonol similar à quercetina, a morina, também apresentou resultados positivos com relação à ação antiviral sobre o EHV-1.

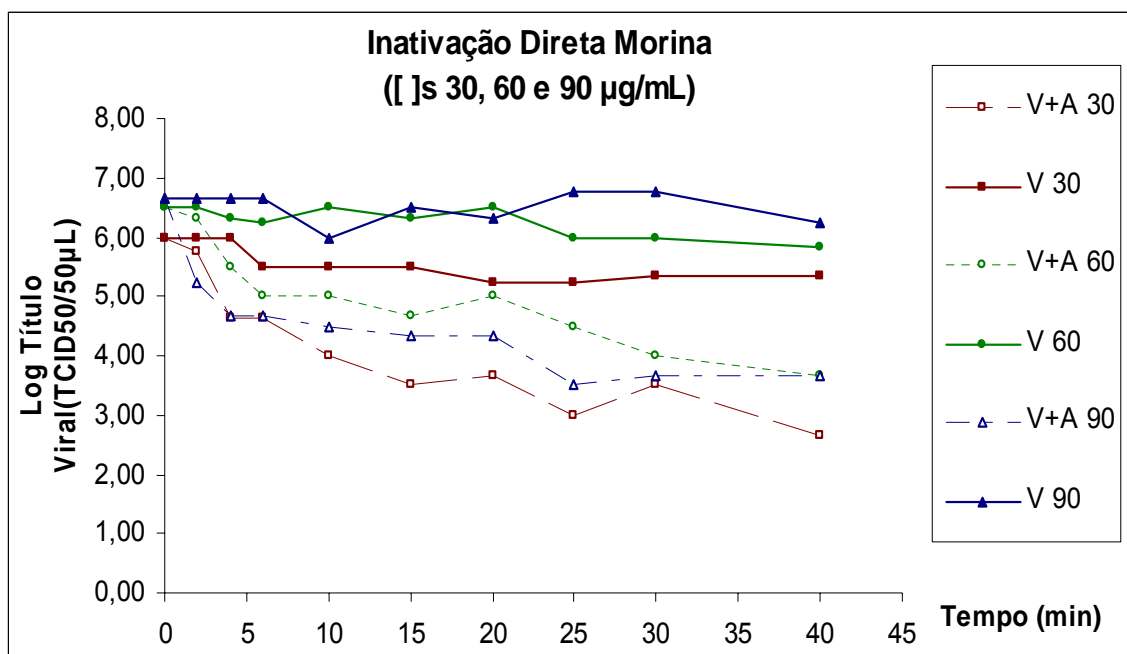


Figura 21: Efeito antiviral do teste AID da Morina sobre o EHV-1. As linhas pontilhadas correspondem às titulações com a morina e as linhas contínuas correspondem às titulações controle (C+). Cada cor corresponde à titulação de cada concentração e a de seu controle (C+).

O teste AID apresentado na tabela 4 e na figura 21 demonstra uma redução do título viral decorrente da ação da morina sobre as partículas virais, apresentando uma redução máxima de 1859 vezes no título viral. As três concentrações testadas apresentam ação.

Tabela 4: Efeito virucida da morina, expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença da morina.

[] Tempo (min)	30	60	90
	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_1]}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_2]}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_3]}$
0	1,0	1,0	1,0
2	1,7	1,5	27,3
4	23,7	6,8	100,0
6	7,5	17,0	100,0
10	31,6	31,6	31,6
15	100,0	46,4	146,8
20	36,6	31,6	100,0
25	170,1	31,6	1859,0
30	68,1	100,0	1266,3
40	464,3	146,8	366,5

Há ação antiviral quando $\text{Tit C+} / \text{Tit[A]} > 10$, ou seja, redução de título de pelo menos um log. A concentração está expressa em $\mu\text{g/mL}$. Tit C+ = Titulação controle; Tit [A] = Titulação com o tratamento.

A figura 22 mostra os testes EP e TofA da morina, a qual apresenta uma elevada ação antiviral sobre a adsorção viral independentemente da concentração, chegando a reduzir o título viral em cerca de 2 casas decimais.

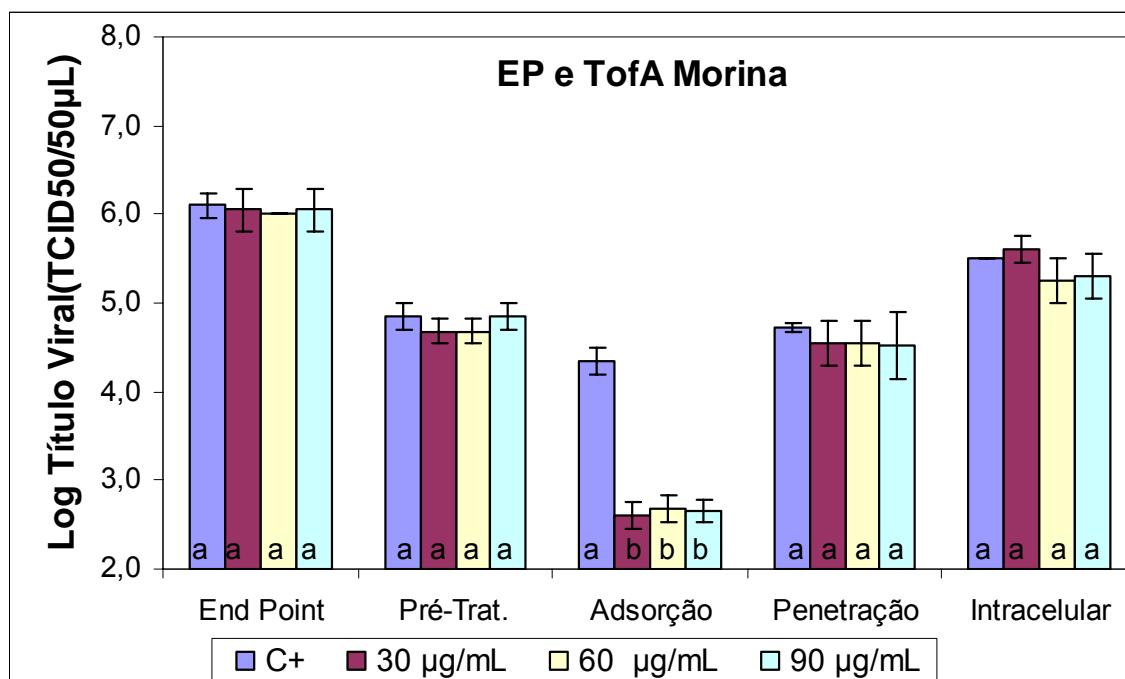


Figura 22: Efeito antiviral dos testes EP e TofA da Morina sobre o EHV-1. Dentro de cada teste, cada barra corresponde a uma titulação com uma concentração de morina. Mesmas letras correspondem às médias de título iguais, letras diferentes correspondem às médias diferentes pelo teste Tukey, 5% de probabilidade.

A única diferença estrutural da quercetina para a morina é uma alteração na posição de uma hidroxila, do carbono C3' (posição *orto*) na quercetina para C2' (posição *para*) na morina. Esta diferença representou uma ação virucida mais rápida por parte da quercetina, porém menos eficaz sobre as duas etapas de adsorção e penetração viral, enquanto que a morina atuou mais fortemente sobre a adsorção viral, porém não sobre a internalização.

Esses resultados encontrados para a morina demonstram um elevado potencial da utilização da mesma em formulações terapêuticas contra o EHV-1 e, também, o potencial da utilização de flavonóis contra infecções herpéticas.

5.1.2.4 – Testes antivirais da Rutina

De acordo com os resultados apresentados na tabela 5 e figura 23 (AID) e na figura 24 (EP e TofA), a rutina não apresenta redução significativa do título viral em nenhum dos testes *in vitro* nas condições testadas.

Tabela 5: Efeito virucida da rutina, expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença da Rutina.

[]	30	60	120
Tempo (min)	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_1]}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_2]}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_3]}$
0	1,0	1,0	1,0
2	2,2	1,0	1,0
4	1,5	1,0	1,0
6	1,0	1,0	1,0
10	1,0	4,6	1,0
15	4,6	1,0	2,2
20	1,0	1,0	1,0
25	1,0	3,2	4,6
30	2,2	1,5	1,0
40	1,0	1,0	1,0

Há ação antiviral quando $\text{Tít C+} / \text{Tít[A]} > 10$, ou seja, redução de título de pelo menos um log. A concentração está expressa em $\mu\text{g/mL}$. Tit C+ = Titulação controle; Tit [A] = Titulação com o tratamento.

A rutina não possui ação virucida nas condições testadas, como demonstrado na tabela 5 e figura 23 do teste AID, e também não demonstra ação sobre os receptores celulares ou sobre as fases infectivas específicas do ciclo viral como apresentado na figura 24. Portanto, considera-se que a rutina não possui atividade *in vitro* contra o EHV-1.

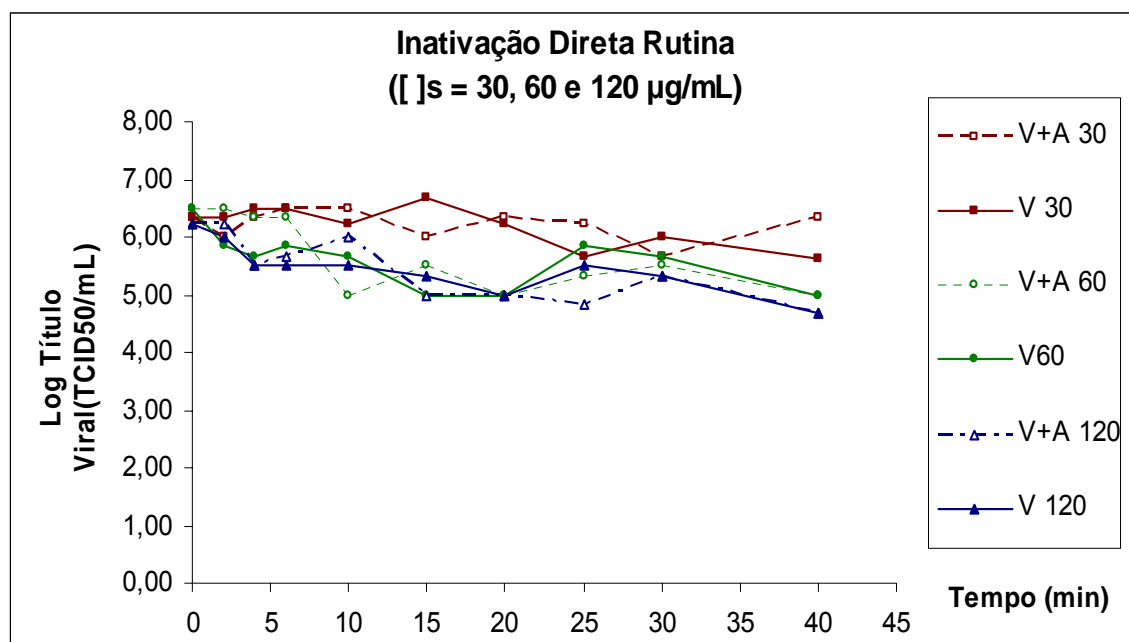


Figura 23: Efeito antiviral do teste AID da Rutina sobre o EHV-1. As linhas pontilhadas correspondem às titulações com a rutina e as linhas contínuas correspondem às titulações controle (C+). Cada cor corresponde à titulação de cada concentração e a de seu controle (C+).

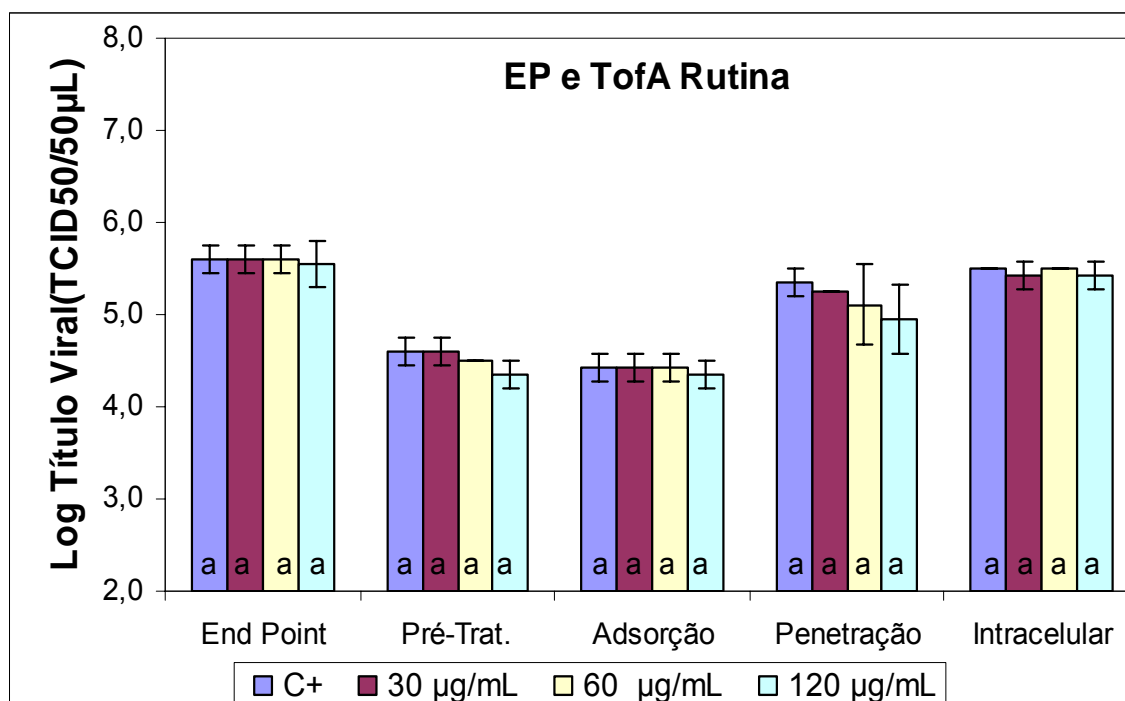


Figura 24: Efeito antiviral dos testes EP e TofA da Rutina sobre o EHV-1. Dentro de cada teste, cada barra corresponde a uma titulação com uma concentração da rutina. Mesmas letras correspondem às médias de título iguais, letras diferentes correspondem às médias diferentes pelo teste Tukey, 5% de probabilidade.

Vale lembrar, que a rutina é um flavonol glicosilado na posição C3, sendo a quercetina sua forma aglicona. Assim a glicosilação nesta posição poderia estar influenciando em sua ação, uma vez que a quercetina apresentou atividade antiviral. Possivelmente, isto ocorre porque o resíduo de açúcar da rutina causa um impedimento estérico, evitando sua aproximação junto ao receptor ou então, por ocupar um sítio funcional na molécula da rutina, que no caso se representaria pela hidroxila do carbono C3, ou talvez por ambos os motivos.

Em cultivo celular, possivelmente não há clivagem do açúcar, o que *in vivo* poderia ocorrer devido à presença de enzimas digestivas, liberando, assim, a forma ativa da quercetina, ou forma aglicona.

5.1.2.5 – Testes antivirais do Ácido *trans*-Cinâmico

O teste AID apresentado na tabela 6 e figura 25 mostra que, nas concentrações testadas, o ácido *trans*-cinâmico não possui ação antiviral sobre

as partículas virais, porém, a figura 26 mostra uma redução significativa do título viral decorrente da ação do mesmo sobre os receptores das células e sobre a fase de adsorção viral.

Tabela 6: Efeito virucida do ácido *trans*-cinâmico, expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença do ácido *trans*-cinâmico.

[]	25	50	100
Tempo (min)	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_1]}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_2]}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_3]}$
0	1,0	1,0	1,0
2	1,7	1,0	2,2
4	1,0	1,0	10,0
6	1,0	1,0	2,2
10	1,5	1,0	2,2
15	1,5	1,0	2,2
20	1,0	2,2	1,0
25	1,0	1,0	1,0
30	3,2	1,0	1,0
40	3,2	1,5	1,7

Há ação antiviral quando $\text{Tit C+} / \text{Tit[A]} > 10$, ou seja, redução de título de pelo menos um log. A concentração está expressa em $\mu\text{g/mL}$. Tit C+ = Titulação controle; Tit [A] = Titulação com o tratamento.

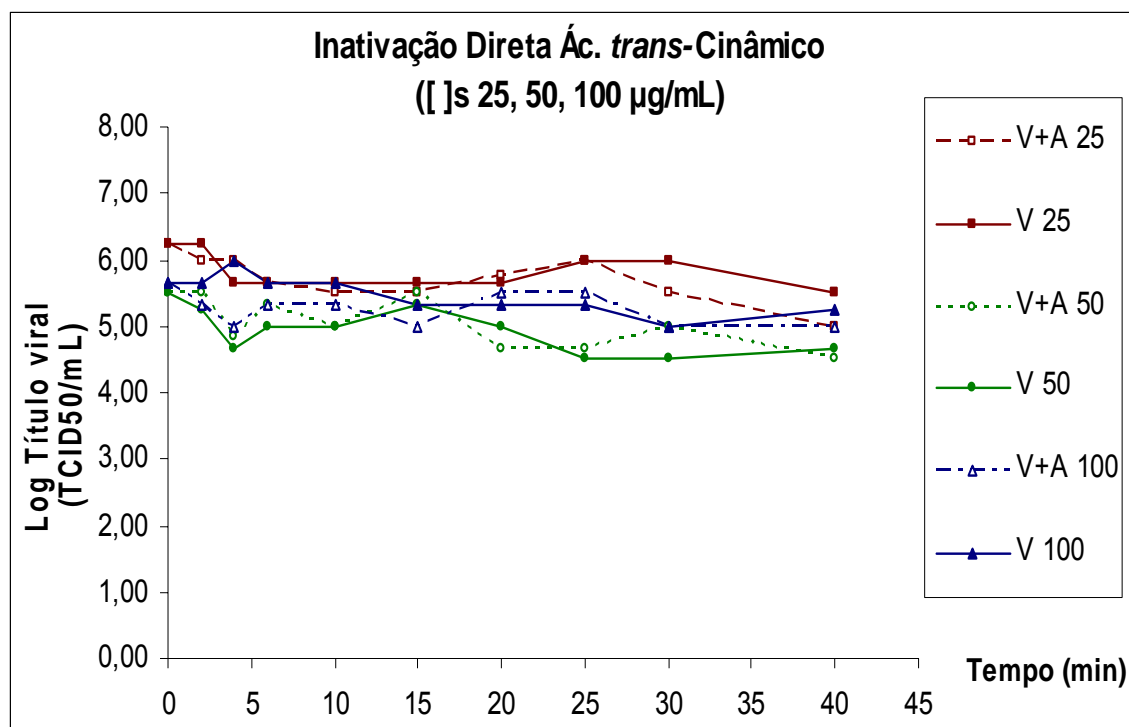


Figura 25: Efeito antiviral do teste AID do Ácido *trans*-Cinâmico sobre o EHV-1. As linhas pontilhadas correspondem às titulações com o ácido *trans*-cinâmico e as linhas contínuas correspondem às titulações controle (C+). Cada cor corresponde à titulação de cada concentração e a de seu controle (C+).

Apesar de não ter apresentado uma atividade virucida nas concentrações testadas, o ácido *trans*-cinâmico apresentou indícios de que é

capaz de afetar a ligação vírus-célula por causar alterações nos receptores celulares se ligando a eles de forma irreversível, e também interferindo no processo de adsorção viral.

O fato do ácido *trans*-cinâmico ser um dos precursores dos flavonóides também com estrutura fenólica e possuir atividade antiviral, demonstra uma relação positiva entre a estrutura fenólica dos compostos com suas atividades antivirais. Por isto, novos estudos com outros compostos de estruturas semelhantes são de grande importância.

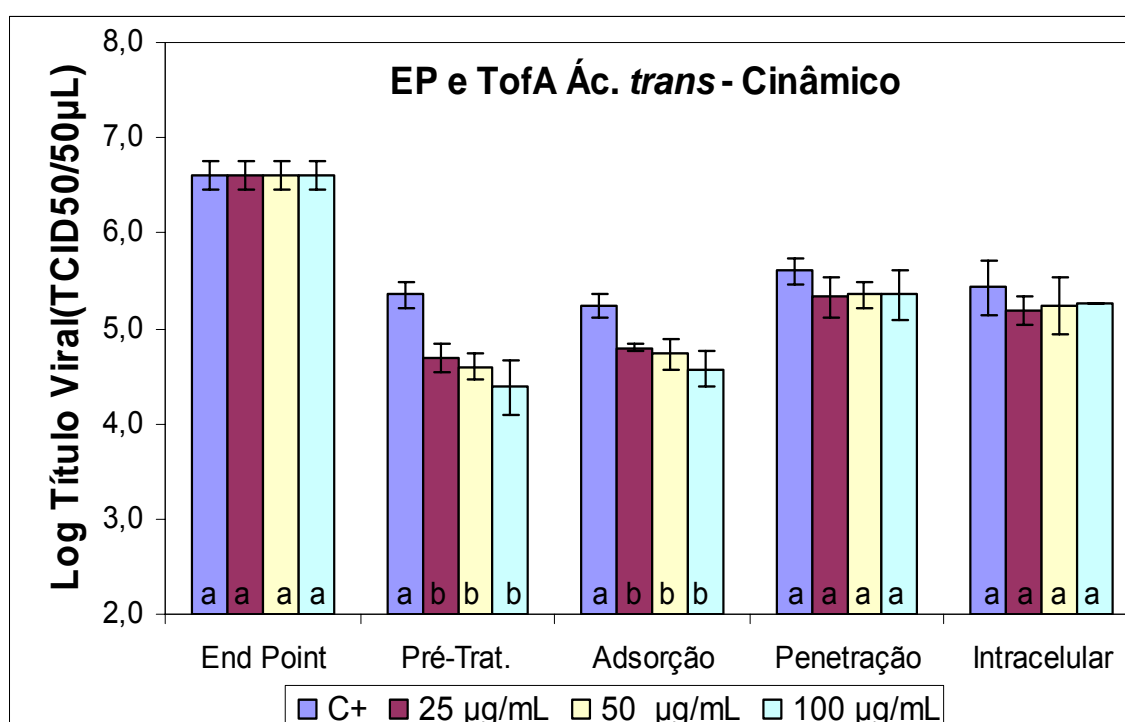


Figura 26: Efeito antiviral dos testes EP e TofA do Ácido *trans*-Cinâmico sobre o EHV-1. Dentro de cada teste, cada barra corresponde a uma titulação com uma concentração do ácido *trans*-cinâmico. Mesmas letras correspondem às médias de título iguais, letras diferentes correspondem às médias diferentes pelo teste Tukey, 5% de probabilidade.

5.1.2.6 – Testes antivirais do Monascus

A possibilidade de encontrarmos substâncias biologicamente ativas em extratos é elevada e como a similaridade estrutural entre os compostos presentes em um extrato de uma espécie é bem alta, eles podem atuar de forma sinérgica, potencializando a ação antiviral.

No teste AID, apresentado na figura 27 e na tabela 7, o monascus não demonstra ação sobre as partículas virais.

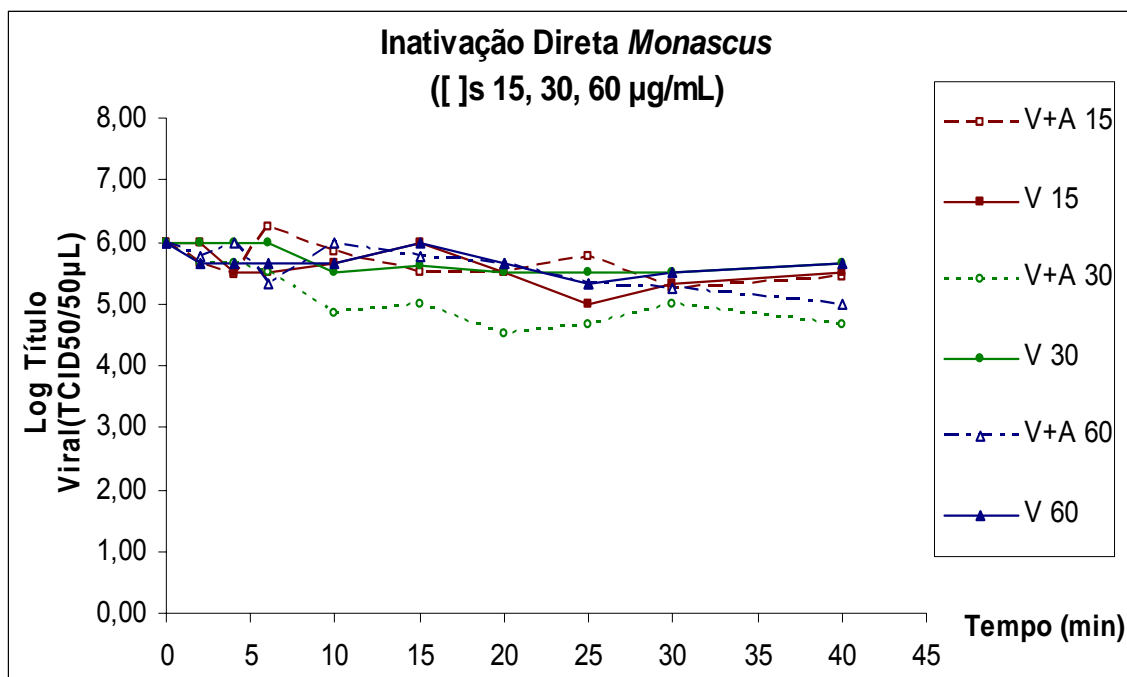


Figura 27: Efeito antiviral do teste AID do Monascus sobre o EHV-1. As linhas pontilhadas correspondem às titulações com o monascus e as linhas contínuas correspondem às titulações controle (C+). Cada cor corresponde à titulação de cada concentração e a de seu controle (C+).

Lembrando que, apesar da relação $\text{Tit C+}/\text{Tit[A]}$ ter apresentado valores elevados, estes não podem ser consideradas significativos por falta de repetições suficientes para calcular os títulos com maior precisão, portanto considera-se efeito antiviral apenas quando a redução seja superior a 10X.

Tabela 7: Efeito virucida do monascus, expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença do monascus.

[]	15	30	60
Tempo (min)	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_1]}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_2]}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_3]}$
0	1,0	1,0	1,0
2	2,2	2,2	1,0
4	1,1	2,2	1,0
6	1,0	3,2	2,2
10	1,0	4,6	1,0
15	3,2	4,2	1,7
20	1,0	10,0	1,0
25	1,0	6,8	1,0
30	1,3	3,2	1,9
40	1,2	10,0	4,6

Há ação antiviral quando $\text{Tit C+} / \text{Tit[A]} > 10$, ou seja, redução de título de pelo menos um log. A concentração está expressa em $\mu\text{g/mL}$. Tit C+ = Titulação controle; Tit [A] = Titulação com o tratamento.

Por outro lado, é observada uma pequena ação antiviral na fase de adsorção no TofA, porém, nas demais etapas não houve redução significativa de título em nenhuma das concentrações testadas conforme visto na figura 28.

Devido ao extrato do monascus ser um produto de origem fúngica, a inibição da adsorção viral que ele causa demonstra o potencial antiviral dos diversos produtos de origem de microrganismos, além daqueles de origem vegetal.

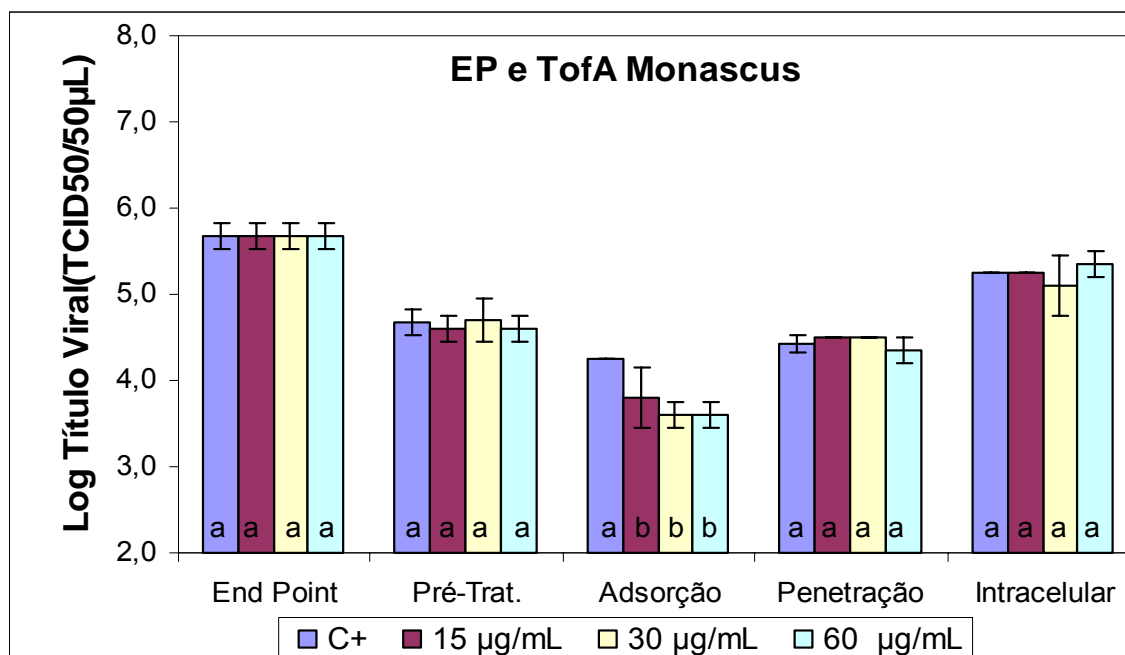


Figura 28: Efeito antiviral dos testes EP e TofA do Monascus sobre o EHV-1. Dentro de cada teste, cada barra corresponde a uma titulação com uma concentração de monascus. Mesmas letras correspondem às médias de título iguais, letras diferentes correspondem às médias diferentes pelo teste Tukey, 5% de probabilidade.

5.1.2.7 – Testes antivirais do E1

Os três extratos vegetais, E1, E2 e E3, foram obtidos de uma mesma planta com a utilização de solventes extratores com polaridades diferentes, por isso eles se diferenciam quanto a seus constituintes e também pela concentração destes. Alguns compostos podem estar presentes em um extrato e ausentes em outro, e mesmo caracterizada nos três extratos, uma substância pode estar em concentrações desiguais. Isto implica que, a ação antiviral decorrente das substâncias presentes no extrato está intimamente ligada com a concentração dos constituintes e conseqüentemente, da sua forma de extração e processamento.

A similaridade estrutural entre os constituintes de um extrato pode ser útil na pesquisa de novas formas ativas, pois compostos similares podem atuar de forma sinérgica ou antagônica, ou seja, potencializando ou inibindo a ação alheia, uma vez que estes constituintes podem atuar sobre alvos moleculares comuns, porém de forma diferenciada ao ativar ou inibir suas funções.

Como os três extratos vegetais testados neste trabalho são da mesma planta, muitos compostos encontrados possuem características semelhantes e conseqüentemente atividades similares, pois possuem estruturas básicas comuns que se ligam aos mesmos sítios de ligação. Por outro lado, não se pode descartar que substâncias presentes no extrato podem potencializar a ação de outras ou também inibi-las e que nem sempre ao serem purificadas carregam a mesma função. Portanto, cabe à forma de processamento do extrato o poder de encontrar uma droga com ação antiviral que seja eficaz, não tóxica, estável, de fácil obtenção e custo reduzido.

No teste TofA, observa-se uma redução do título viral decorrente da ação de todas as concentrações do E1 sobre os receptores celulares (PT), sobre a adsorção viral na concentração de 30 µg/mL (ADS) e nas etapas de penetração e infecção intracelular de forma dependente da concentração, conforme apresentado na figura 29.

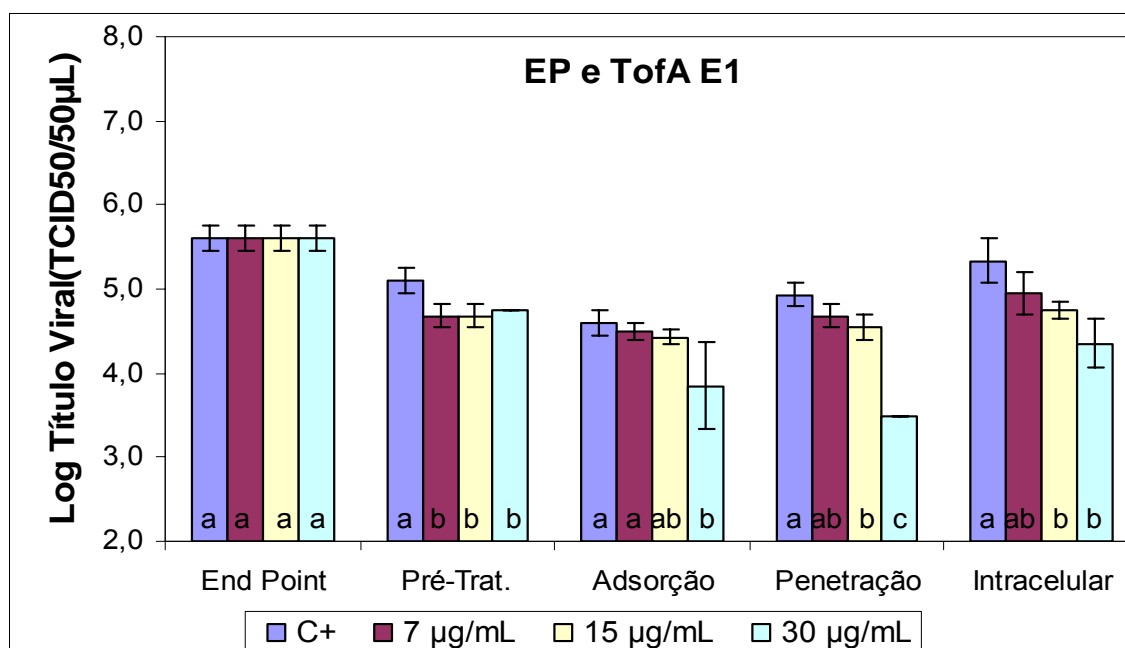


Figura 29: Efeito antiviral dos testes EP e TofA do E1 sobre o EHV-1. Dentro de cada teste, cada barra corresponde a uma titulação com uma concentração de E1. Mesmas letras correspondem às médias de título iguais, letras diferentes correspondem às médias diferentes pelo teste Tukey, 5% de probabilidade.

Isto indica que, o E1 atua em mais de uma etapa da infecção viral, impedindo a ligação vírus-célula, a internalização e os processos intracelulares virais (desmontagem, síntese protéica, replicação, montagem, liberação, entre outros). Possivelmente, o E1 possui mais de um composto ativo atuando nas diferentes fases da infecção.

Conforme demonstrado no teste AID e apresentado na tabela 8 e na figura 30, o E1 possui atividade virucida contra as partículas virais independentemente da concentração, chegando a reduzir o título em 5624 vezes, ou seja, 3 casas decimais.

Tabela 8: Efeito virucida do E1, expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença do E1.

[]	7	15	30
Tempo (min)	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_1]}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_2]}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_3]}$
0	1,0	1,0	1,0
2	1,0	1,0	1,0
4	1,5	14,7	10,0
6	3,2	17,0	46,4
9	14,7	46,4	62,0
12	31,6	215,4	100,0
15	31,6	215,4	100,0
20	79,0	215,4	999,9
25	46,4	316,2	1000,2
30	146,8	1266,3	681,2
35	316,3	3162,5	1000,1
40	1000,2	5623,9	1778,6

Há ação antiviral quando $\text{Tit C+} / \text{Tit[A]} > 10$, ou seja, redução de título de pelo menos um log. A concentração está expressa em $\mu\text{g/mL}$. Tit C+ = Titulação controle; Tit [A] = Titulação com o tratamento.

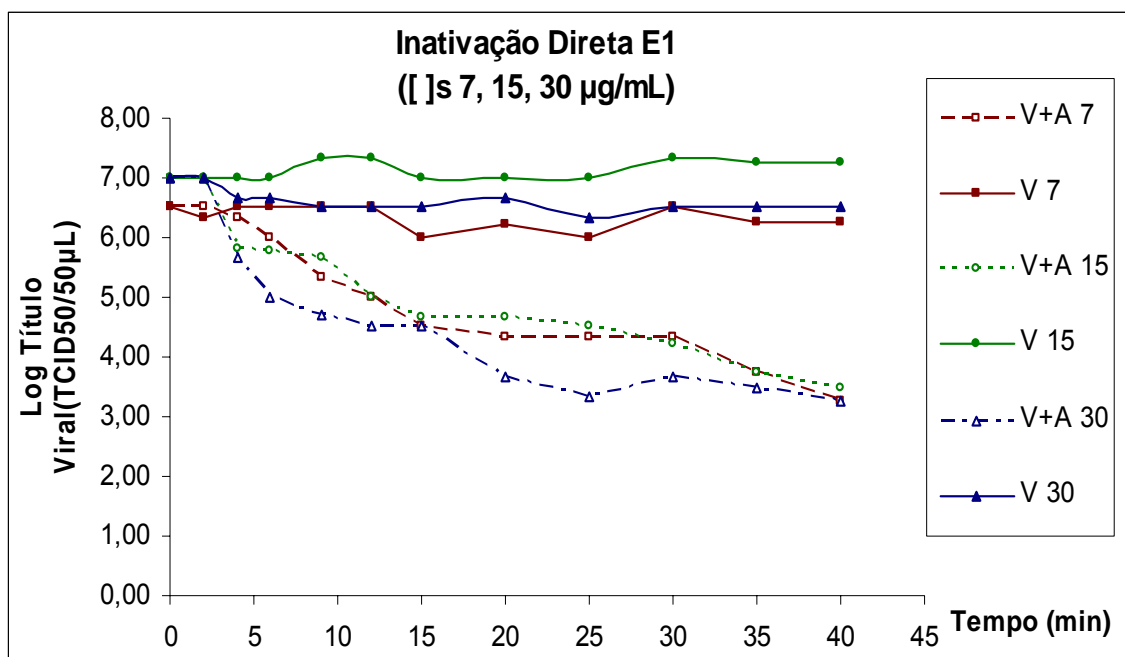


Figura 30: Efeito antiviral do teste AID do E1 sobre o EHV-1. As linhas pontilhadas correspondem às titulações com o E1 e as linhas contínuas correspondem às titulações controle (C+). Cada cor corresponde à titulação de cada concentração e a de seu controle (C+).

5.1.2.8 – Testes antivirais do E2

Os extratos possuem um elevado potencial de descoberta de novos compostos ativos por serem constituídos de muitas substâncias, as quais também podem atuar sinergicamente de várias formas. Por outro lado, a concentração de cada substância nos extratos é pequena, assim, para ser detectada sua ação, esta deve ser altamente significativa, e se detectada, o extrato pode ser fracionado até a purificação completa e caracterização do composto ativo.

Vale lembrar que, se purificado, o extrato que apresentou atividade em baixa concentração poderá ter uma ação ainda maior, porém, deve ser avaliado se somente um composto possui esta atividade ou se mais de um atuam sinergicamente.

Como pode ser observado na figura 31, o E2 apresenta uma elevada redução do título viral no teste TofA sobre a adsorção e na penetração viral, independentemente da concentração testada.

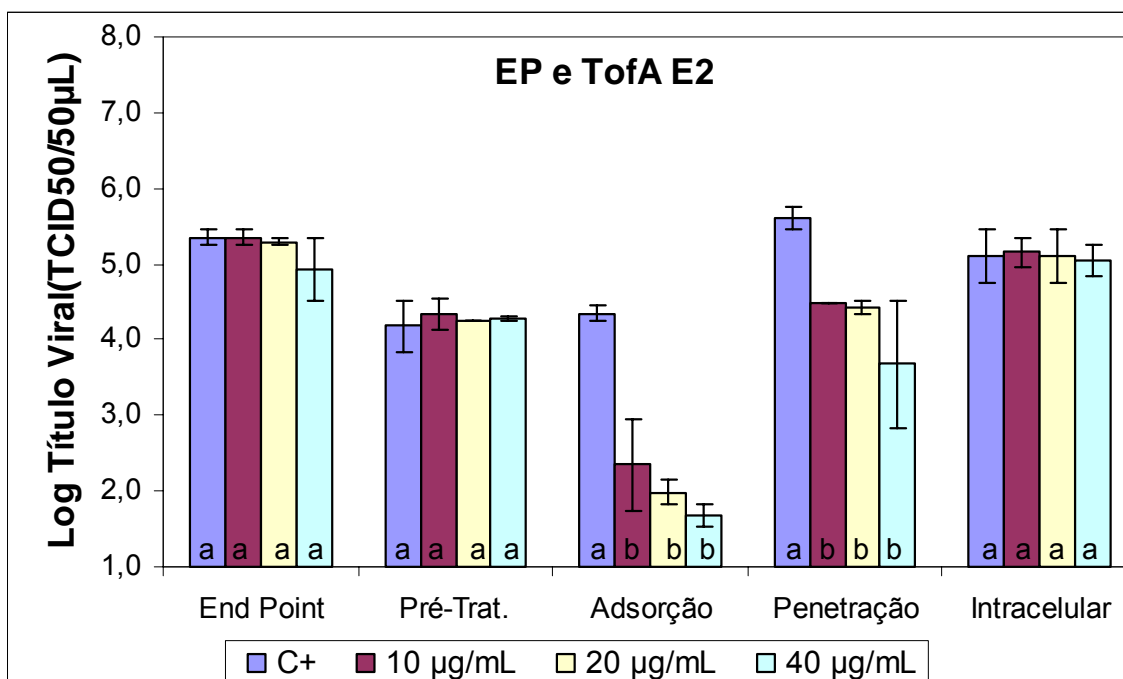


Figura 31: Efeito antiviral dos testes EP e TofA do E2 sobre o EHV-1. Dentro de cada teste, cada barra corresponde a uma titulação com uma concentração de E2. Mesmas letras correspondem às médias de título iguais, letras diferentes correspondem às médias diferentes pelo teste Tukey, 5% de probabilidade.

No teste AID, a redução chegou a 632455,6 vezes conforme mostrado na figura 32 e na tabela 9. Esta redução em até 5 casas decimais demonstra uma elevada atividade virucida por parte do E2.

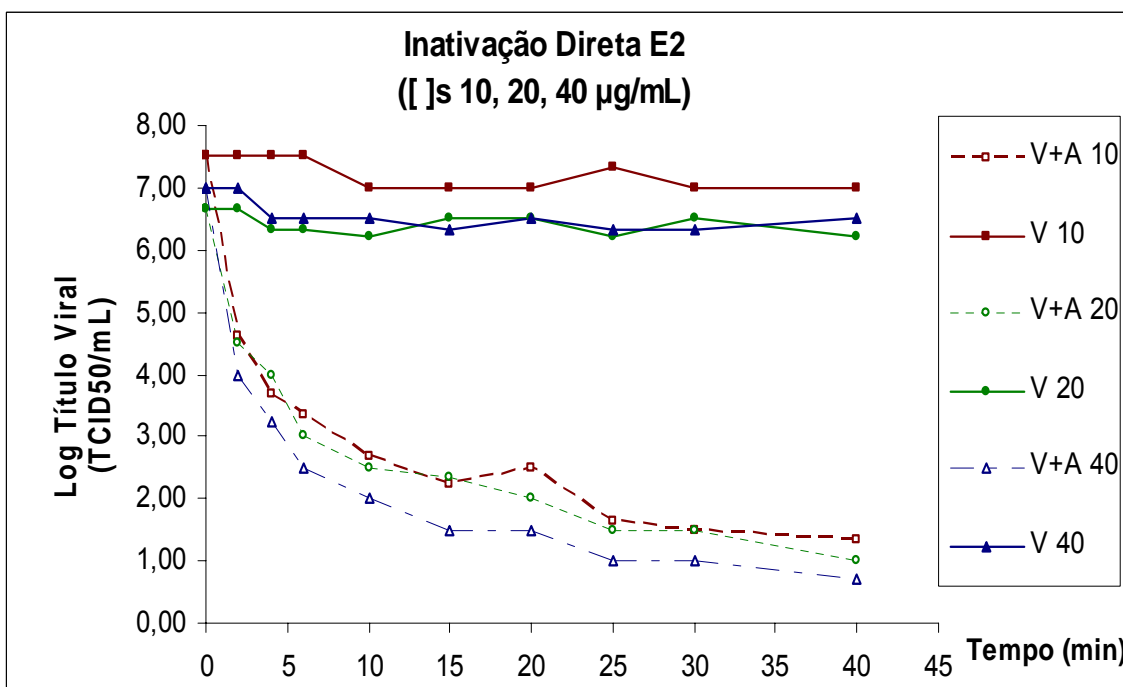


Figura 32: Efeito antiviral do teste AID do E2 sobre o EHV-1. As linhas pontilhadas correspondem às titulações com o E2 e as linhas contínuas correspondem às titulações controle (C+). Cada cor corresponde à titulação de cada concentração e a de seu controle (C+).

Tabela 9: Efeito virucida do E2, expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença do E2.

[]	10	20	40
Tempo (min)	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_1]}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_2]}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_3]}$
0	1,0	1,0	1,0
2	749,9	146,8	1000,0
4	6812,3	215,4	1859,1
6	14681,0	2154,4	10007,2
10	21551,7	5383,7	31622,8
15	60606,1	14708,3	67326,1
20	31645,6	31622,8	98821,2
25	512960,6	53164,2	215443,5
30	312500,0	98821,2	215443,5
40	454545,5	170125,4	632455,6

Há ação antiviral quando $\text{Tít C+} / \text{Tít[A]} > 10$, ou seja, redução de título de pelo menos um log. A concentração está expressa em $\mu\text{g/mL}$. Tit C+ = Titulação controle; Tit [A] = Titulação com o tratamento.

5.1.2.9 – Testes antivirais do E3

O E3 é o tratamento que aparentemente apresenta resultados mais eficazes dentre todos os compostos testados, se comportando de forma menos tóxica e com elevado potencial antiviral quando em baixas concentrações.

Este potencial é demonstrado na tabela 10 e na figura 33, pelo efeito virucida verificado pela redução do título viral em 1.054.093 vezes no teste AID, e por praticamente zerar o título na dose de 80 $\mu\text{g/mL}$. Mesmo em baixas concentrações, o E3 apresenta efeitos antivirais elevados, o que indica alta afinidade pelas partículas virais.

Esta redução de seis casas decimais no título viral é altamente significativa, pois significa que o extrato atua fortemente sobre as partículas virais, inativando-as. Sem sua estrutura íntegra, o vírus é incapaz de se ligar a seus receptores, o que permite um controle da infecção ao impedir sua propagação para novas células. Porém, células já infectadas continuam como portadoras latentes, o que torna indispensáveis os mecanismos intracelulares de controle de infecção.

Tabela 10: Efeito virucida do E3, expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença do E3.

[]	5	11,2	22,5	80
Tempo (min)	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_1]}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_2]}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_3]}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A}_4]}$
0	1,0	1,0	1,0	1,0
2	4,6	31,6	100,0	58780,2
4	14,7	316,2	1000,0	10090,4
6	53,8	1000,1	7499,6	98821,2
10	316,2	1468,1	130571,8	293559,8
15	1000,2	21739,1	100072,1	718145,0
20	215,5	4641,6	183688,0	200000,0
25	1700,7	98821,2	98821,2	1054092,7
30	10007,2	98821,2	988211,8	333333,3
45	98821,2	14505,0	988211,8	1054092,7
				35 59276,0
				40 59276,0

Há ação antiviral quando $\text{Tit C+} / \text{Tit[A]} > 10$, ou seja, redução de título de pelo menos um log. A concentração está expressa em $\mu\text{g/mL}$. Tit C+ = Titulação controle; Tit [A] = Titulação com o tratamento.

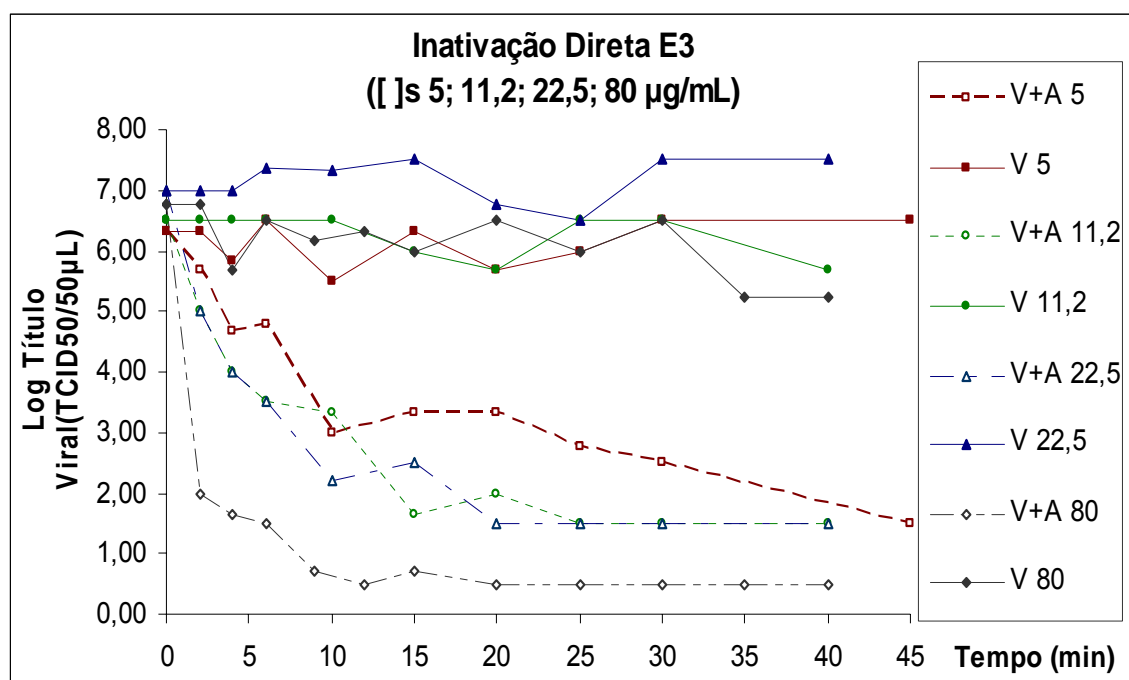


Figura 33: Efeito antiviral do teste AID do E3 sobre o EHV-1. As linhas pontilhadas correspondem às titulações com o E3 e as linhas contínuas correspondem às titulações controle (C+). Cada cor corresponde à titulação de cada concentração e a de seu controle (C+).

A redução de título observada no EP nas duas maiores concentrações demonstra uma modificação irreversível ou duradoura sobre as estruturas celulares causada pelo E3, o que garante às células certa resistência à infecção. Ou seja, é de se esperar que algum composto esteja atuando de forma a gerar nas células um modo capaz de suportar mais fortemente o

processo infeccioso, chamado de estado antiviral, o que seria de grande reforço para conter a propagação viral no organismo, pois células não susceptíveis, mesmo que infectadas não desenvolveriam meios para realização de processos indispensáveis para infecção.

A figura 34 mostra uma redução significativa de título viral em todas as etapas do TofA, o que corresponde a uma possível ação sinérgica de mais de uma substância presente na composição do E3.

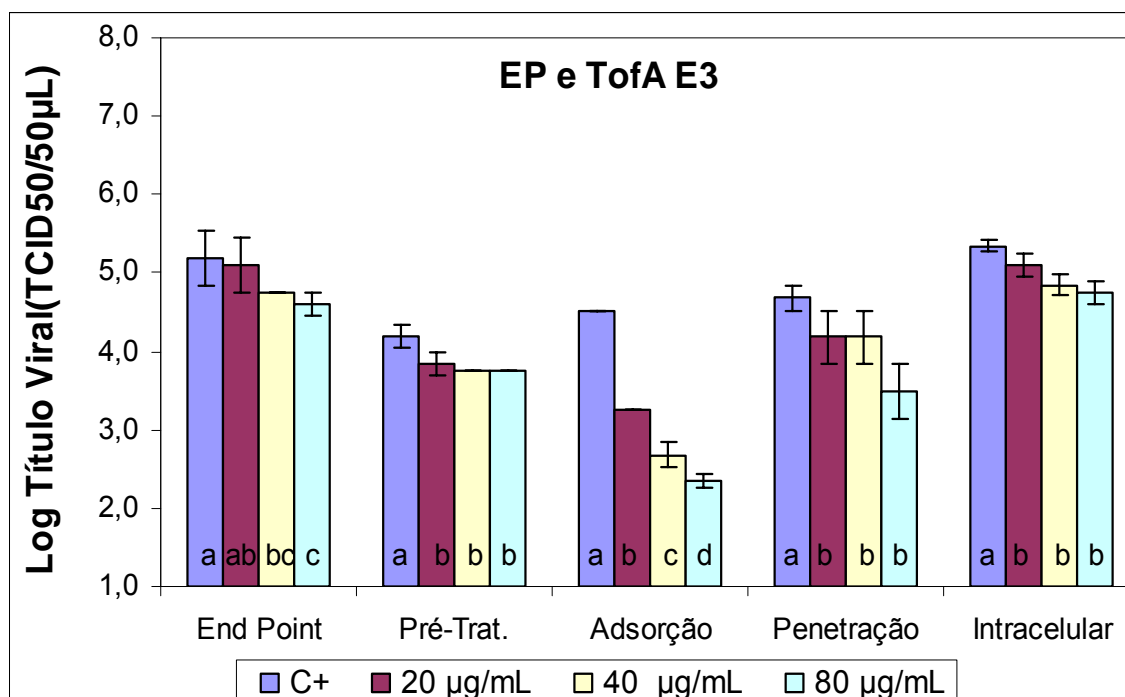


Figura 34: Efeito antiviral dos testes EP e TofA do E3 sobre o EHV-1. Dentro de cada teste, cada barra corresponde a uma titulação com uma concentração o E3. Mesmas letras correspondem às médias de título iguais, letras diferentes correspondem às médias diferentes pelo teste Tukey, 5% de probabilidade.

As etapas PT e ADS do TofA também sugerem ação do E3 sobre os receptores das células e na adsorção viral, respectivamente. A ação antiviral sobre as etapas de penetração e infecção intracelular estão apresentadas nas fases PEN e IC, respectivamente, conforme apresentado na figura 34.

5.1.2.10 – Comparações entre os tratamentos

A ação antiviral virucida dos compostos testados nos tempos de 6, 15 e 30 minutos estão sumarizadas na tabela 11.

Tabela 11: Ação antiviral dos compostos no teste AID. Efeito virucida expresso pela relação entre a titulação controle e a titulação na presença do composto nos tempos de 6, 15 e 30 min.

Tempo (min)		6	15	30
Tratamento	[] (µg/mL)	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A]}}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A]}}$	$\frac{\text{Tít C+}}{\text{Tít [A]}}$
Ác. <i>trans</i> -Cinâmico	25	1,0	1,5	3,2
Rutina	30	1,0	4,6	2,2
Monascus	30	3,2	4,2	3,2
Morina	30	7,5	100	68
Quercetina	30	46	464	1000
E1	30	46	100	1000
E2	20	2154	14708	98821
E3	22,5	7500	100072	988212
Ác. <i>trans</i> -Cinâmico	50	1,0	1,0	1,0
Ác. <i>trans</i> -Cinâmico	100	2,2	2,2	1,0
Rutina	60	1,0	1,0	1,5
Rutina	120	1,0	2,2	1,0
Monascus	15	1,0	3,2	1,3
Monascus	60	2,2	1,7	1,9
Morina	60	17	46	100
Morina	90	100	147	1266
Quercetina	15	37	681	681
Quercetina	60	106	102	1000
E1	7	3,2	32	46
E1	15	17	215	316
E2	10	14681	60606	312500
E2	40	10007	67326	215444
E3	5	54	1000	10007
E3	80	98821	200000	1054093
E3	11,2	1000	21739	98821
DMSO (1,2%)		1,0	1,0	4,6
DMSO (2,4%)		1,0	1,0	1,0

Há ação antiviral quando $\text{Tit C+} / \text{Tit[A]} > 10$, ou seja, redução de título de pelo menos um log. A concentração está expressa em µg/mL, com exceção do DMSO que está em % (v/v). Tit C+ = Titulação controle; Tit [A] = Titulação com o tratamento.

Dentre as substâncias puras, somente a morina e a quercetina tiveram atividade virucida relatada, porém a quercetina foi a mais eficaz, uma vez que em poucos minutos demonstrou fortemente sua ação. A única diferença

estrutural entre elas é o posicionamento de uma hidroxila, a qual, aparentemente, foi o suficiente para propiciar esta diferença.

A ação virucida dos extratos foi superior à ação observada das substâncias, e dentre eles, o E3 foi o que apresentou maior ação, seguido do E2.

A tabela 12 sumariza o teste EP de todos os tratamentos, destacando a única ação do E3, sendo uma característica peculiar a este. Isto demonstra que o E3 foi o único capaz de gerar modificações profundas e duradouras nas células, fornecendo-lhes certa resistência à infecção sem que elas tivessem contato prévio com as partículas virais. Isto indica que de alguma forma o E3 foi capaz de promover um estado antiviral nas células.

Tabela 12: Porcentagem de redução de título viral e relação dos títulos com e sem tratamentos representando a ação antiviral dos compostos no teste EP.

Tratamento	% redução	% redução	% redução	Tít C+	Tít C+	Tít C+
	[A ₁]	[A ₂]	[A ₃]	Tít [A ₁]	Tít [A ₂]	Tít [A ₃]
DMSO	0,00	0,00	0,00	1,0	1,0	1,0
Quercetina	11,58	11,58	11,58	1,1	1,1	1,1
Morina	11,58	20,60	11,58	1,1	1,3	1,1
Rutina	0,00	0,00	11,58	1,0	1,0	1,1
Ác. <i>trans</i> -Cinâmico	0,00	0,00	0,00	1,0	1,0	1,0
Monascus	0,00	0,00	0,00	1,0	1,0	1,0
E1	0,00	0,00	0,00	1,0	1,0	1,0
E2	0,00	11,58	61,86	1,0	1,1	2,6
E3	17,08	62,98	73,78	1,2	2,7	3,8

Os números vermelhos representam ação antiviral estatisticamente significativa pelo teste Tukey, 5% de probabilidade. [A] = concentração dos compostos em µg/mL, com exceção do DMSO que está em % (v/v); Tit C+ = Titulação controle; Tit [A] = Titulação com o tratamento.

Os resultados do teste TofA são apresentados na tabela 13, os quais mostram que todos os compostos testados apresentam atividades em pelo menos uma das etapa de infecção viral, com exceção da rutina.

Tabela 13: Porcentagem de redução de título viral e relação dos títulos com e sem tratamentos representando a ação antiviral dos compostos no ciclo infectivo viral.

Tratamento	Fase	% redução	% redução	% redução	Tít C+	Tít C+	Tít C+
		[A ₁]	[A ₂]	[A ₃]	Tít[A ₁]	Tít[A ₂]	Tít[A ₃]
DMSO	PT	17,08	17,08	0,00	1,2	1,2	1,0
DMSO	ADS	0,00	0,00	0,00	1,0	1,0	1,0
DMSO	PEN	17,08	17,08	17,08	1,2	1,2	1,2
DMSO	IC	0,00	0,00	0,00	1,0	1,0	1,0
Quercetina	PT	43,77	43,77	43,77	1,8	1,8	1,8
Quercetina	ADS	0,00	83,94	97,44	1,0	6,2	39,1
Quercetina	PEN	0,00	74,89	76,35	1,0	4,0	4,2
Quercetina	IC	54,39	61,13	83,69	2,2	2,6	6,1
Morina	PT	32,18	32,18	0,00	1,5	1,5	1,0
Morina	ADS	98,22	97,86	98,00	56,2	46,6	50,0
Morina	PEN	33,51	33,51	38,41	1,5	1,5	1,6
Morina	IC	0,00	43,77	37,38	1,0	1,8	1,6
Rutina	PT	0,00	20,60	43,77	1,0	1,3	1,8
Rutina	ADS	0,00	0,00	17,08	1,0	1,0	1,2
Rutina	PEN	20,60	42,36	60,46	1,3	1,7	2,5
Rutina	IC	14,59	0,00	14,59	1,2	1,0	1,2
Ác. <i>trans</i> -Cinâmico	PT	78,55	82,22	89,10	4,7	5,6	9,2
Ác. <i>trans</i> -Cinâmico	ADS	63,30	68,38	78,39	2,7	3,2	4,6
Ác. <i>trans</i> -Cinâmico	PEN	46,40	43,77	43,96	1,9	1,8	1,8
Ác. <i>trans</i> -Cinâmico	IC	43,77	36,29	34,16	1,8	1,6	1,5
Monascus	PT	17,08	0,00	17,08	1,2	1,0	1,2
Monascus	ADS	64,79	77,60	77,60	2,8	4,5	4,5
Monascus	PEN	0,00	0,00	17,08	1,0	1,0	1,2
Monascus	IC	0,00	29,18	0,00	1,0	1,4	1,0
E1	PT	61,86	61,86	55,35	2,6	2,6	2,2
E1	ADS	20,60	32,18	82,22	1,3	1,5	5,6
E1	PEN	43,77	58,77	96,30	1,8	2,4	27,0
E1	IC	58,96	74,18	89,72	2,4	3,9	9,7
E2	PT	0,00	0,00	0,00	1,0	1,0	1,0
E2	ADS	99,00	99,57	99,79	100,0	231,4	466,3
E2	PEN	92,06	93,22	98,79	12,6	14,7	82,9
E2	IC	0,00	0,00	11,58	1,0	1,0	1,1
E3	PT	53,37	62,98	62,98	2,1	2,7	2,7
E3	ADS	94,38	98,48	99,29	17,8	65,8	141,2
E3	PEN	68,38	68,38	93,42	3,2	3,2	15,2
E3	IC	42,06	67,42	74,13	1,7	3,1	3,9

Os números vermelhos representam ação antiviral estatisticamente significativa pelo teste Tukey, 5% de probabilidade. [A] = concentração dos compostos em µg/mL, com exceção do DMSO que está em % (v/v); Tit C+ = Titulação controle; Tit [A] = Titulação com o tratamento.

A hidroxila na posição C3 é provavelmente o sítio de ligação dos flavonóis aos seus receptores, ela encontra-se livre nas estruturas da morina, da quercetina e bloqueada na estrutura da rutina. A diferença estrutural observada entre quercetina e morina, parece ser a responsável por um maior

efeito antiviral da morina sobre a adsorção e pela ação diferencial da quercetina sobre a penetração viral. No caso da rutina, o açúcar acrescido à molécula parece estar envolvido no impedimento de sua ação antiviral.

O ácido *trans*-cinâmico, um precursor dos flavonóides, os E1 e E3 foram os únicos que apresentaram ação sobre a ligação dos vírus aos receptores das células, o que significa que estes impedem a adsorção viral por competição pelo sítio de ligação ou por modificações tridimensionais dos receptores.

O ácido *trans*-cinâmico e o monascus apesar de não apresentarem efeito virucida, compartilham da ação sobre a adsorção viral, impedindo a ligação do vírus a seu receptor por se interporem a eles. Possivelmente o ácido *trans*-cinâmico causa modificações irreversíveis aos receptores das células, pois demonstrou esta ação na fase PT, o monascus por sua vez possivelmente liga-se reversivelmente aos receptores, uma vez que apresentou efeito na fase ADS e não na PT, pois durante o processo de lavagem com PBS o monascus deve ser retirado.

As tabelas 11, 12 e 13 mostram que a ação antiviral dos extratos sobre as partículas virais é superior à ação das substâncias, sendo o E3 o mais eficaz antiviral contra o EHV-1, seguido pelo E2. Possivelmente, isto ocorra por causa da ação sinérgica de vários compostos presentes no extrato, e que são capazes de balancear a ação individual dos compostos testados. Pelo fato das ações sinérgicas dos compostos no extrato serem altamente eficazes, se o extrato for enriquecido por fracionamentos seus componentes podem apresentar potencias antivirais ainda maiores.

Dentre os extratos, consideramos que o E2 e o E3 apresentam os melhores resultados, pois enquanto que o E2 apresentou resultados mais consistentes e específicos, o E3 apresentou atividade em todos os testes realizados, possivelmente, devido à presença de constituintes com estruturas semelhantes, porém com propriedades químicas distintas como polaridade e carga. Acredita-se que eles são fortes candidatos a fitoterápicos, e prováveis fontes para novas formulações medicamentosas naturais.

6- CONCLUSÕES

- As concentrações máximas não tóxicas encontradas para as células Vero são de 70, 100, 120, 110 e 70 µg/mL para as substâncias quercetina, morina, rutina, ácido *trans*-cinâmico e o extrato monascus, respectivamente, 40, 40 e 90 µg/mL para os extratos E1, E2, E3 e 3,0% (v/v) para o DMSO;
- Nas concentrações testadas, o DMSO não é capaz de causar uma variação significativa no título viral em nenhum dos testes, comportando como um composto inerte;
- A rutina não demonstra ação antiviral significativa em nenhum dos testes;
- Os extratos vegetais apresentam maior potencial antiviral contra o EHV-1 *in vitro*, seguidos das substâncias quercetina e morina;
- Os três extratos vegetais, a quercetina e a morina possuem ação sobre a viabilidade das partículas virais, ou seja, um efeito virucida determinado pelo teste AID;
- O E3 é o único a apresentar ação no teste “*End Point*”, o que demonstra uma capacidade de induzir resistência à infecção nas células, mesmo após ter sido retirado;
- Segundo o teste “*timing of addition*”, quando em altas concentrações, a quercetina também apresenta ação antiviral nas fases de adsorção e penetração viral, atuando como um bloqueador da ligação entre os vírus e as células e a conseqüente internalização viral, portanto, ela é capaz de inibir as etapas iniciais da infecção;
- A morina apresenta ação eficaz na fase de adsorção, com elevada redução de título;
- O ácido *trans*-cinâmico apresenta atividade antiviral sobre os receptores celulares, desestabilizando-os ou atuando como um inibidor competitivo para o vírus e também atua sobre a fase de adsorção;
- O monascus apresenta ação sobre a adsorção viral;

- ⌘ O E1 atua em todas as etapas do teste “*timing of addition*”, apresentando ação sobre os receptores celulares e nas fases de adsorção, penetração e vias intracelulares nas concentrações mais altas, portanto é um potente agente antiviral, uma vez que demonstra capacidade de bloquear todo o ciclo infectivo viral;
- ⌘ O E2 apresenta elevada atividade antiviral nas fases de adsorção e penetração, impedindo ligação do vírus à célula e seu processo de internalização;
- ⌘ O E3 é o agente antiviral estudado mais eficaz contra o EHV-1, pois reduz o título viral em todas as fases do “*timing of addition*” e no “*End Point*”, possivelmente por ação de mais de um composto com ação sinérgica;
- ⌘ O processo de adsorção é o mais afetado pela ação dos compostos, sugerindo ação antiviral principalmente sobre as partículas virais e receptores celulares, o que bloqueia momentos iniciais da infecção.

7 - PERSPECTIVAS FUTURAS

Além dos compostos testados, existe uma gama de outros produtos naturais a serem avaliados, incluindo várias classes de flavonóides e outros extratos. Neste trabalho, alguns dos compostos apresentaram potencial antiviral *in vitro* contra o EHV-1, mas para sua aplicação farmacêutica mais estudos são necessários. Dentre eles, a definição da dosagem, testes de resistência viral, determinação da ação dos compostos sobre outras vias metabólicas celulares e também a padronização química dos extratos ativos, a fim de elucidar as estruturas de seus constituintes e comparar quimicamente em que se diferenciam. Além dos testes *in vitro*, deverão ser realizados outros testes *in vivo* para verificação se os mesmos resultados encontrados se reproduzem em modelos experimentais animais. Assim, na experimentação animal, outros fatores podem ser avaliados como a toxicidade para o indivíduo, metabolismo da composição e ação sobre o sistema imune, resposta inflamatória e outros parâmetros bioquímicos. Mas antes é necessário estabelecer a forma experimental de indução da doença em modelos animais e as concentrações dos compostos a serem utilizadas nos tratamentos. E no final, se ficar caracterizada a ação antiviral dos compostos com resultados positivos nos modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, estes poderão ser avaliados em testes de campo, em cavalos naturalmente infectados e que estejam apresentando os sinais clínicos do EHV-1.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARTS, J., LEE-HILZ, Y., BOERBOOM, A.M., WESTPHAL, A., BERKEL, W.V., RIETJENS, I., **Mechanism of EpRE-mediated gene transcription by flavonoids.** *Toxicology Letters* 172: 68–69, 2007.

AHN, B.C., BREITENBACH, J.E., KIM, S.K., O'CALLAGHAN, D.J., **The Equine herpesvirus 1 IR3 gene that lies antisense to the sole immediate-early (IE) gene is trans-activated by the IE protein, and is poorly expressed to a protein.** *Virology* 363: 15-25, 2007.

BERHOW, M.A., **Flavonoid accumulation in tissue and cell culture. Flavonoids in the living system.** *Plenum Press*, New York. 1998.

BIAN, H., ZHANG, H., YU, Q., CHEN, Z.H., LIANG, H., **Studies on the interaction of cinnamic acid with bovine serum albumin.** *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 55: 871–75, 2007.

BRUM, L.P., **Atividade antiviral dos compostos fenólicos (ácidos ferúlico e *trans*-cinâmico) e dos flavonóides (quercetina e kaempherol) sobre os Herpesvírus Bovino 1, Herpesvírus Bovino 5 e Vírus da Cinomose Canina.** *Universidade Federal de Viçosa, M.G.- Brasil. Tese Doutorado* 73p, 2006.

BUCKWOLD, V., BEER, B.E., DONIS, R.O., **Bovine Viral Diarrhea Virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents.** *Antiviral Research* 60: 1–15, 2003.

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.

CARLQUIST, C., FREJD, T., GRAUSLUND, M.F.G., **Flavonoids as inhibitors of human carbonyl reductase 1.** *Chemico-Biological Interactions* 174: 98–108, 2008.

CARVALHO, R., OLIVEIRA, A.M., SOUZA, A.M., PASSOS, L.M.F., MARTINS, A.S., **Prevalence of equine Herpesvirus type 1 latency detected by polymerase chain reaction.** *Archives of Virology* 145: 1773–87, 2000.

CHENG, M.J., WU, M.D., CHEN, I.S., YUAN, G.F., **Secondary metabolites from the mycelia of the fungus *Monascus pilosus* BCRC 38072.** *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 56: 394–97, 2008.

CHEN, Y.P., TSENG, C.P., LIAW, L.L., WANG, C.L., CHEN, I.C., WU, W.J., WU, M.D., YUAN, G.F., **Cloning and Characterization of Monacolin K Biosynthetic Gene Cluster from *Monascus pilosus*.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 5639–46, 2008.

COMALADA, M., BALLESTER, I., BAILÓN, E., SIERRA, S., XAUS, J., GÁLVEZ, J., MEDINA, F.S., 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: 1010–21, 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: 290–02, 2006.

CUSHNIE, T.P.T, LAMB, A.J., **Antimicrobial activity of flavonoids.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 26: 343–356, 2005.

DANILA, A.M., KOTANI, A., HAKAMATA, H., KUSU, F., **Determination of rutin, catechin, epicatechin, and epicatechin gallate in buckwheat *Fagopyrum esculentum Moench* by micro-high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 1139–43, 2007.

DE LA FUENTE, R., AWAN, R., FIELD H.J., **The acyclic nucleoside analogue penciclovir is a potent inhibitor of equine Herpesvirus type 1 (EHV-1) in tissue culture and in a murine model.** *Antiviral Research* 18: 77–89, 1992.

DEL PIERO, F., WILKINS, P., **Pulmonary vasculotropic EHV-1 infection in equids.** *Veterinary Pathology* 38: 474–75, 2001.

DEL PIERO, F., WILKINS, P., TIMONEY, P., KADUSHIN, J., VOGELBACKER, H., LEE, J.W., BERKOWITZ, S.J., LA PERLE, K.M.D., **Fatal nonneurological EHV-1 infection in a yearling filly.** *Veterinary Pathology* 37: 672–76, 2000.

DIALLO, I.S., HEWITSON, G., WRIGHT, L.L., KELLY, M.A., RODWELL, B.J., CORNEY, B.G., **Multiplex real-time PCR for the detection and differentiation of equid herpesvirus 1 (EHV-1) and equid herpesvirus 4 (EHV-4).** *Veterinary Microbiology* 123: 93–103, 2007.

EDINGTON N., WELCH H.M., GRIFFITHS L., **The prevalence of latent Equid herpesviruses in the tissues of 40 abattoir horses.** *Equine Veterinary Journal* 26: 140–42, 1994.

ERDOĞRUL, Ö., AZIRAK, S., **A Review on the Red Yeast Rice (*Monascus purpureus*).** *KSU Journal of Science and Engineering* 8: 10–15, 2005.

FABJAN, N., RODE, J., KOSYIR, I.J., WANG, Z., ZHANG, Z., KREFT, I., **Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum Gaertn.*) as a source of dietary rutin and quercitrin.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6452–55, 2003.

FIELD, H.J., BISWAS, S., MOHAMMAD, I.T. **Herpesvirus latency and therapy-From a veterinary perspective.** *Antiviral Research* 71: 127–33, 2006.

FOMICA, J.V., & REGELSON, W., **Review of biology of quercetin and related bioflavanoids.** *Food Chemical Toxicology* 33: 1061–80, 1995.

FOOTE, C.E., LOVE, D.N., GILKERSON, J.R., WELLINGTON, J.E., WHALLEY, J.M., **EHV-1 and EHV-4 infection in vaccinated mares and their foals.** *Veterinary Immunology and Immunopathology* 111: 41–46, 2006.

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.

GARRÉ, B., VAN DER MEULEN, K., NUGENT, J., NEYTS, J., CROUBELS, S., DE BACKER, P., NAUWYNCH, H., **In vitro susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet.** *Veterinary Microbiology* 122: 43–51, 2007.

GHANEM, Y.M., IBRAHIM, EL-S.M., YAMADA, S., MATSUMURA, T., OSTERRIEDER, N., YAMAGUCHI, T., FUKUSHI, H., **Molecular characterization of the Equine Herpesvirus 1 strain RacL11 and Kentucky D.** *The Journal of Veterinary Medical Science* 69: 573-76, 2007.

GONG, Y., RAJ, K.M., LUSCOMBE, C.A. *et al.* **The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses.** *Antiviral Research* 64: 127–30, 2004.

GORDALIZA, M., **Natural products as leads to anticancer drugs.** *Clinical and Translational Oncology* 12: 767–76, 2007.

HALLER, O., KOCHS, G., WEBER, F., **The interferon response circuit: Induction and suppression by pathogenic viruses.** *Virology* 344: 119–30, 2006.

HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LOLIGER, J., AROUMA, O.I., **Antioxidant characterization.** *Food and Chemical Toxicology* 33: 617–18, 1995.

HARLESS, W., PUSTERIA, N., **Equine Herpesvirus 1 and 4 respiratory disease in the horse.** *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2006.

HASEBE, R., KIMURA, T., SATO, E., OKAZAKI, K., OCHIAI, K., WAOA, R., UMEMURA, T., **Equine Herpesvirus-1-induced encephalomyelitis in mice: a comparative study of neuroadapted virus and its parental strain.** *Journal Comparative Pathology* 127: 118–25, 2002.

HAVSTEEN, B.H., **The biochemistry and medical significance of the flavonóides.** *Pharmacology & Therapeutics* 96: 67–202, 2002.

HEBIA, I., DUCHAMP, F.F.G., DESTRUMELLE, S., PELLERIN, J.-L., ZIENTARA, S., VAUTHEROT, J.-F., BRUYAS, J.-F., **Potential risk of equine Herpes virus 1 (EHV-1).** *Theriogenology* 67: 1485–91, 2007.

HUDSON, J.B. **Antiviral compounds from plants.** *CRC Press Florida*: 119–31, 1990.

HSU, S.L., CHEN, C.Y., PENG, W.H., TSAI, K.W., **Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF-kB and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages.** *Life Sciences* 81: 1602–14, 2007.

ISHIKAWA, M., KANNO, S.I., SHOUJI, A., HIRATA, R., ASOU, K., **Effects of naringin on cytosine arabinoside (Ara-C)-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells.** *Life Sciences* 75: 353–65, 2004.

JUZLOVA, P., MARTINKOVA, L., KREN, V., **Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 16:163–70, 1996.

KALINOVA, J., TRISKA, J., VRCHOTOVA, N., **Distribution of vitamin E, squalene, epicatechin, and rutin in common buckwheat plants (*Fagopyrum esculentum Moench*).** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 5330–35, 2006.

KHLEBNIKOV, I., SCHEPETKIN, I.A., DOMINA, N.A., KIRPOTINA, L.I., QUINN, M.T., **Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15: 1749–70, 2007.

KIM, Y.K., LEE, S.W., SONG, G.S., KWON, C.H., **Beneficial effect of flavonoid baicalein in cisplatin-induced cell death of human glioma cells.** *Neuroscience Letters* 382: 71–75, 2005.

KOEHN, F.E., **High impact technologies for natural products screening.** *Progress in Drug Research*. 65: 175, 177–210, 2008.

KREFT, S., KNAPP, M., KREFT, I., **Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*) seeds and determination by capillary electrophoresis.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4649–52, 1999.

KUJUMGIEV, A., TSVETKO I., SERKEDJIVA *et al.*, **Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin.** *J. of Ethnopharmacology* 64: 235–40, 1999.

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: 203–14, 2005.

LI, C., ZHU, Y., WANG, Y., ZHU, J.S., CHANG, J., KRITCHEVSKY, D., ***Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice): a natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia.** *Nutrition Research* 18: 71–81, 1998.

LIN, J.Y., TANG, C.Y., **Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation.** *Food Chemistry* 101: 140–47, 2007.

LIN, Y.L., WANG, T.H., LEE, M.H., SU, N.W., **Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: a review.** *Applied Microbiology & Biotechnology* 77: 965–73, 2008.

LIU, J., ZHANG, J., SHI, Y., GRIMSGAARD, S., ALRAEK, T., FØNNEBØ, V., **Chinese red yeast rice (*Monascus purpureus*) for primary hyperlipidemia: a meta-analysis of randomized controlled trials.** *Chinese Medicine* 1: 1–13, 2006.

LU, J., ZHENG, Y.L., LUO, L., WU, D.M., SUN, D.X., FENG, Y.J., **Quercetin reverses d-galactose induced neurotoxicity in mouse brain.** *Behavioural Brain Research* 171: 251–60, 2006.

MARCAURELLE, L.A. & JOHANNES, C.W., **Application of natural product-inspired diversity-oriented synthesis to drug discovery.** *Progress in Drug Research* 66: 187, 189–216, 2008.

MARCHAND, L.L., **Cancer preventive effects of flavonoids.** *Biomedicine & Pharmacotherapy* 56: 296–01, 2002.

MCCHESENEY, J.D., VENKATARAMAN, S.K., HENRI, J.T., **Plant natural products: Back to the future or into extinction?** *Phytochemistry* 68: 2015–22, 2007.

MERKEN, H.M. & BEECHER, G.R., **Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 577–99, 2000.

METZLER, A.E., SCHUDEL, A.A., ENGELS, M. **Bovine Herpesvirus 1: molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease.** *Archives of Virology* 87: 205–17, 1986.

MOLINKOVÁ, D., SKLÁDAL, P., CELER, V., ***In vitro* neutralization of equid herpesvirus 1 mediated by recombinant antibodies.** *Journal of Immunological Methods* 333: 186–91, 2008.

MORI, E., MORI, C.M.C., MASSIRONI, S.M.G., LARA, M.C.C.S.H., FERNANDES, W.R., **Modelo de infecção experimental do herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) em camundongos Balb/c.** *Revista da Universidade Rural - Série Ciências da Vida, Seropédica - RJ* 24: 459–60, 2004.

MORRIS, M.E., MOON, Y.J., WANG, X., **Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism.** *Toxicology In Vitro* 20: 187–10, 2006.

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

MURPHY, F.A., GIBBS, E.P.J., HORZINEK, M.C. *et al.*, **Vet. Virol. Ed: 3, printed Boston, USA** 301–25, 1999.

MURRAY, M.J., DEL PIERO, F., JEFFREY, S.C., DAVIS, M.S., FURR, M.O., DUBOVI, E.J., MAYO, J.A, **Neonatal Equine Herpesvirus type 1 infection on a thoroughbred breeding farm.** *Journal Veterinary Internal Medicine* 12: 36–41, 1998.

NAFISI, S., HASHEMI, M., RAJABI, M., RIAH, T.H.A., **DNA adducts with antioxidant flavonoids: Morin, apigenin, and naringin.** *DNA And Cell Biology* 27: 1–10, 2008.

NEUBAUER, A, OSTERRIEDER, N., **Equine Herpesvirus type 1 (EHV-1) glycoprotein K is required for efficient cell-to-cell spread and virus egress.** *Virology* 329: 18–32, 2004.

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: 1022–37, 2003.

NG, T.B., LIU, F., WANG, Z.T., **Antioxidant activity of natural products from plants.** *Life Sciences*. 66: 709–23, 2000.

NILSON, M.R., CORREA, W.M., **Isolamento do vírus do aborto equino no Estado de São Paulo.** *Arquivos do Instituto Biológico* 33: 23–25, 1966.

NIU, Q.X., ZHAO, C.Y., JING, Z.A., **An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity.** *Journal of Immunological Methods* 251: 11–19, 2001.

NOGUEIRA, M.A., **Estudo fitoquímico de *Lonchocarpus latifolius* (Willd) DC Leguminosae isolamento, determinação estrutural, atividade biológica e análise sazonal.** *Universidade Estadual de Campinas, SP - Brasil. Tese Doutorado*, 1998.

OLIVEIRA, F.S., **Atividade antiviral da quercetina sobre alguns vírus de importância veterinária.** *Universidade Federal de Viçosa, MG - Brasil. Dissertação Mestrado* 125p, 2007.

O'KEEFE, B.R., **Biologically Active Proteins from Natural Product Extracts.** *Journal of Natural Products* 64: 1373–81, 2001.

PAILLOT, R., DALY, J.M., LUCE, R., MONTESSO, F., DAVIS-POYNTER, N., HANNANT, D., KYDD, J.H., **Frequency and phenotype of EHV-1 specific, IFN-gamma synthesising lymphocytes in ponies: The effects of age, pregnancy and infection.** *Developmental and Comparative Immunology* 31: 202–14, 2007.

PATEL, J. R., HELDENS, J., **Equine Herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) epidemiology, disease and immunoprophylaxis: A brief review.** *Veterinary Journal* 170: 14–23, 2005.

PATTANAGUL, P., PINTHONG, R., PHIANMONGKHOL A., THARATHA, S., **Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus sp.*** *International Journal of Food Microbiology*, in press, 2008.

PINTO, A.C., SILVA, D.H.S., BOLZANI, E.S., LOPES, N.P., EPIFANIO, R.A., **Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas.** *Quimica Nova* 25: 45–61, 2002.

PLOCHMANN, K., KORTE, G., KOUTSILIERI, 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.

RAMOS, S., **Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention.** *The Journal of Nutritional Biochemistry* 18: 427–42, 2007.

REED L. & MUENCH, H., **A simple method of estimating fifty percent endpoints.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 18: 493–94, 1938.

REES, C.R., COSTIN, J.M., FINK, R.C., MCMICHAEL, M., FONTAINE, K.A., ISERN, S., MICHAEL, S.F., ***In vitro* inhibition of dengue virus entry by p-sulfoxy-cinnamic acid and structurally related combinatorial chemistries.** *Antiviral Research*, in press, 2008.

REN, W., QIAO, Z., WANG, H., ZHU, L., ZHANG, L., **Flavonoids: promising anticancer agents.** *Medical Care Research Review* 23: 519–34, 2003.

ROELS, S., CHARLIER, G., LETELLIER, C. *et al.*, **Natural case of Bovine Herpesvirus 1 meningoencephalitis in an adult cow.** *The Veterinary Record* 13: 586–88, 2000.

ROIZMAN, B., BATTERSON, W., **Herpesvirus and their replication.** Em: Fields, B. N., *et al.*, **Virology.** *Rayen press, New York* 497–526, 1985.

ROIZMAN, B. DESROSIERS R.C., FLECKENSTEIN B. *et al.*, **The family herpesviridae: an update. The herpesvirus study group of the international committee on taxonomy of viruses.** *Archives of Virology* 123: 425–49, 1992.

ROSAS, C., VAN DE WALLE, G.R., METZGERA, S.M., HOELZERB, K., DUBOVI, E.J., KIMC, S.G., PARRISH, C.R., OSTERRIEDER, N., **Evaluation of a vectored equine Herpesvirus type 1 (EHV-1) vaccine expressing H3 haemagglutinin in the protection of dogs against canine.** *Vaccine* 26: 2335–43, 2008.

SAALIK, P., ELMQUIST, A., HANSEN, M., PADARI, K., SAAR, K. L., VIHT, K., LANGEL, U., POOGA, M., **Protein cargo delivery properties of cell-penetrating peptides. a comparative study.** *Bioconjugate Chemistry* 15: 1246–53, 2004.

SÁ FILHO, D.J., **Efeito do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* e de diferentes flavonóides na multiplicação do vírus Mayaro (ALFAVÍRUS).** *Universidade Federal de Viçosa, M.G.- Brasil. Monografia* 40p, 1995.

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.

SELLON, D.C., **Investigating outbreaks of respiratory disease in older foals.** *Proceedings of the Annual Meet Am. Assoc. Equine Pract.* 47: 447–55, 2001.

SELWAY, A., **Plant flavonoids in biology and medicine.** *Biochemical, Pharmacological and Structure - Activity Relationships* 213: 521–36, 1986.

SERKEDJIVA J. & IVANCHEVA S., **Antiherpes virus activity of extracts from medicinal plant *Geranium sanguineum* L.** *Journal of Ethnopharmacology* 64: 59–68. 1999.

SFORCIN, J.M., ORSI, R.O., BANKOVA, V., **Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production.** *Journal of Ethnopharmacology* 98: 301–05, 2005.

SHOEB, M., **Anticancer agents from medicinal plants.** *Bangladesh Journal Pharmacology.* 1: 35–41, 2006.

SIMONI, I.C., **Tratamentos antivirais.** *Biológico, São Paulo* 65: 41–44, 2003.

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: 1293–01, 2005.

TELEFORD, E.A.R., WATSON, M.S., PERRY, J., Cullinane, A.A., Davison, A.L., **The DNA sequence of Equine Herpesvirus-4.** *Journal of General Virology* 79: 1197–03, 1998.

VAN DER MEULEN, K., CAIJ, B., PENZAERT, M., NAUWYNCK, H., **Absence of viral envelope proteins in Equine Herpesvirus 1 infected blood mononuclear cells during cell-associated viremia.** *Veterinary Microbiology* 113: 265–73, 2006.

VAN MAANEN, C., **Equine Herpesvirus 1 and 4 infectious: an update.** *Veterinary Quarterly* 24: 55–58, 2002.

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: 2515–20, 1991.

VON EINEM, J., SMITH, P.M., VAN DE WALLE, G.R., O'CALLAGHAN, D.J., OSTERRIEDER, N., ***In vitro* and *in vivo* characterization of equine**

herpesvirus type 1 (EHV-1) mutants devoid of the viral chemokine-binding glycoprotein G (gG). *Virology* 362: 151–62, 2007.

VISON, J. A., **Flavonoids in foods as *in vitro* and *in vivo* antioxidants. Flavonoids in the Living System.** *Manthey and Buslig Plenum Press, New York*, 1998.

WACH, A., PYRZYNSKA, K., BIESAGA, M., **Quercetin content in some food and herbal samples.** *Food Chemistry* 100: 699–04, 2007.

WANG, F., XU, Y., ZHAO, J., HU, S., **Electrochemical oxidation of morin and interaction with DNA.** *Bioelectrochemistry* 70: 356–62, 2007.

WANG, H. K., XIA, Y., YANG, Z. Y., NATSCHKE, S. L. M. & LEE, K. H., **Recent advances in the discovery and development of flavonóides and their analogues as antitumor and anti- HIV agents. Flavonoids in the Living System.** *Manthey and Buslig Plenum Press, New York*, 1998.

WEIBLEN, R., RABUSKE, M., REBELADO, M.C., NOBRE, V.M.T., CANABARRO, T.F., **Abortions due to equine herpesvirus in Southern Brazil.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 27: 1317–20, 1994.

WELCH, H.M., BRIDGES, C.G., LYON, AM., *et al.*, **Latent equid herpesviruses 1 and 4: detection and distinction using the polymerase chain reaction and co-cultivation from lymphoid tissues.** *Journal General Virology* 73: 261–68, 1992.

WILKINGS, P.A., SQUARE, K., **Acyclovir in the treatment of EHV-1 myeloencephalopathy.** *In 2004 Scientific Proceedings, 22nd Annual Meeting*

of the American College of Veterinary Internal Medicine. Minneapolis, MN, American College of Veterinary Internal Medicine, 2004.

WONG, R.W.K., RABIE, B., **Chinese red yeast rice (*Monascus purpureus*-fermented rice) promotes bone formation.** *Chinese Medicine* 3: 1–6, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Traditional and Alternative Medicine.** *Fact Sheet # 271, World Health Organization, Geneva, 2002.*

XIE, M.X., LONG, M., LIU, Y., QIN, C., WANG, Y.D., **Characterization of the interaction between human serum albumin and morin.** *Biochimica et Biophysica Acta* 1760: 1184–91, 2006.

YADAV, P., MOHAN, H., MAITY, D.K., SURESH, C.H., RAO, B.S.M., **Oxidation of cinnamic acid derivatives: A pulse radiolysis and theoretical study.** *Chemical Physics* 351: 57–64, 2008.

YANMG, C.S., LNDAU, J.M., HUANG, M.T., NEWMARK, H.L., **Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds.** *Annual Review of Nutrition* 21: 381–06, 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.

9- APÊNDICE

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.

Isopropanol/HCl 0,004N

HCl 163 µL
Isopropanol q.s.p 100 mL

2. Composições

Solução estoque 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.

3. Demais soluções

Tampão Fosfato (PBS- pH 7,2):

NaCl 7,2g
KH₂PO₄ 0,43g
Na₂HPO₄ 1,48g
Água MillHQ 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 5 mg
PBS 1 mL

→Esta solução deve ser preparada no momento do uso.

Álcool 70%

Álcool 92,8% _____ 1.000 mL
70% _____ x

$$X = 757 \text{ mL}$$

760 mL de Álcool 92,8% + 240 mL de Água destilada