

ALYNE VIEIRA BARROS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIVIRAL DE EXTRATOS
DA PLANTA *Guettarda angelica* Mart. ex Müll. Arg. FRENTE A
VÍRUS ANIMAIS**

Campinas, 2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ANTIVIRAL DE EXTRATOS
DA PLANTA *Guettarda angelica* Mart. ex Müll. Arg. FRENTE A
VÍRUS ANIMAIS**

Alyne Vieira Barros

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para Obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, Área de Concentração Ciências Básicas. Sob orientação da Prof^a. Dr^a. Clarice Weis Arns

Campinas, 2011

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

B278a Barros, Alyne Vieira, 1986 -
Avaliação *in vitro* do potencial antiviral de extratos da
planta *Guettarda angelica* Mart. Ex Müll. Arg. frente a
vírus animais. / Alyne Vieira Barros. -- Campinas, SP :
[s.n.], 2011.

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

1. Agentes antivirais. 2. Extratos vegetais. 3.
Herpesvirus. 4. Metapneumovirus. 5. Orthoreovirus
aviário. I. Arns, Clarice Weis. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: *In vitro* antiviral evaluation of plant extracts of *Guettarda Guettarda*
angelica Mart. Ex Müll. Arg. against animal viruses

Palavra-chave em inglês:

Didanosine

Plant extracts

Herpesviruses

Avian metapneumovirus

Orthoreovirus, Avian

Área de concentração: Ciências Básicas

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Banca examinadora:

Clarice Weis Arns [Orientador]

Viviane Fongaro Botosso

Luciana Kohn Konecny

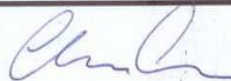
Data da defesa: 05-02-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

COMISSÃO EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO

ALYNE VIEIRA BARROS

Orientador (a) PROFA. DRA. Clarice Weis Arns




Membros:

1. PROFA. DRA. VIVIANE FONGARO BOTOSSO



2. PROFA. DRA. LUCIANA KONECNY KOHN



3. PROFA. DRA. CLARICE WEIS ARNS



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 05 de agosto de 2011

Dedicatória

Dedico esta dissertação de mestrado a *Maria Helena e Carlos Alberto*, que em nenhum momento mediram esforços para realização dos meus sonhos, que me guiaram pelos caminhos corretos, me orientaram a fazer as melhores escolhas, me mostraram que a honestidade e o respeito são essenciais à vida, e que devemos sempre lutar pelo que queremos. A eles devo a pessoa que me tornei, sou extremamente feliz e tenho muito orgulho por chamá-los de pai e mãe.

AMO VOCÊS!

Agradecimentos

À Professora Dr^a. Clarice Weis Arns, pela orientação, por sempre estar pronta a nos atender, pelo carinho, dedicação, respeito e acima de tudo por acreditar na minha capacidade.

À minha querida “Co-orientadora” Dr^a. Maria Judite, pelo companheirismo, pela dedicação, por me aceitar, por me ajudar e por me acalmar quando muitas vezes o desespero falou mais alto, ah se não fosse você!

À Dr^a. Luciana Konecny Kohn, pela atenção, pelo carinho, pelo conhecimento transmitido, e por estar sempre disposta a ajudar.

À Dr^a. Isabela Cristina Simoni, pela paciência e ensinamento.

À Dr^a. Aline O. Conceição, do Departamento de Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - Bahia que auxiliou para a realização deste trabalho fornecendo os extratos e as frações de *Guettarda angelica* Mart. ex Müll. Arg.

Aos amigos Daniel, Luciana Antoniassi, Marina, Matheus e Paulo pelas ótimas histórias vividas e longos papos, pela amizade e por ajudar a tornar a vida acadêmica muito mais divertida. Agradeço também aos grandes funcionários da UNICAMP, Paula (Paulet) e Geneci, por toda a ajuda e risadas.

Ao meu incrível namorado, Guilherme, por todo amor e companheirismo nos momentos de conquistas e perdas.

Aos grandes amigos Camila (Camis), Erika, Equipe PP7, Fabíola, Gabys, Loreni (Loly), Maurício, Renata Grisoli, Rita, Thaís e Will Lioto por tornarem meus finais

de semana mais alegres. Vocês sempre terão um lugar especial em minha vida.

VALEU!

À minha mãe Maria Helena, meu pai Carlos Alberto, a minha “vovózinha” querida e toda família pelo amor, afeto, incentivos constantes e por acreditarem em mim.

Aos funcionários do laboratório de Biologia Celular do Instituto Biológico em São Paulo pela compreensão e colaboração.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Agradeço a Deus, por todas as oportunidades, por olhar por mim e por toda a minha família. Obrigada Senhor por colocar tantas pessoas boas em meu caminho que me fizeram ter forças para chegar até aqui.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse à conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada!!

"Para ser bem sucedido no trabalho, a primeira coisa
a fazer é apaixonar-se por ele."

Mary Lauretta

	PÁG.
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
1. INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1. Planta	17
1.2. Plantas Medicinais	19
1.3. Terapia Antiviral	21
1.4. Famílias Herpesviridae, Paramyxoviridae e Reoviridae utilizadas como modelos para os testes dos extratos e frações de <i>Guettarda angelica</i> Mart. ex Müll. Arg.	25
1.4.1. Herpesviridae	25
1.4.1. 1. Herpesvírus bovino	26
1.4.1. 2. Herpesvírus suíno	27
1.4.1. 3. Herpesvírus eqüino	29
1.4.2. Paramyxoviridae	31
	X

1.4.2.1. Metapneumovírus aviário	32
1.4.3. Reoviridae	35
1.4.3.1. Reovírus aviário	36
2. OBJETIVOS	38
2.1. OBJETIVO GERAL	38
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	38
3. CAPÍTULOS	
CAPÍTULO 1	39
CAPÍTULO 2	58
4. DISCUSSÃO GERAL	77
5. CONCLUSÕES GERAIS	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE ABREVIATURA

SuHV-1	Herpevírus suíno tipo 1
BoHV-1	Herpesvírus bovino tipo 1
EHV-1	Herpesvírus equino tipo 1
ARV	Reovírus aviário
aMPV	Metapneumovírus aviário
CPE	Efeito citopático
MNCC	Maximum non-citotoxic concentration (concentração máxima não-citotóxica)
nm	Nanômetro
CC ₅₀	Concentração citotóxica a 50%
IC ₅₀	Concentração inibitória a 50%
SI	Índice de Seletividade
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-z-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]
VERO	African green monkey kidney cells
MDBK	Madin Darby kidney bovine cells
CER	Chicken embryo related cells
IBR	Rinotraqueíte infecciosa bovina
DA	Doença de Aujeszky
SHS	Síndrome da cabeça inchada
TRT	Rinotraqueíte dos perus
VII	Índice de inibição viral
µg	Micrograma

μL	Microlitro
SFB	Soro fetal bovino
MEM	Meio Eagle Mínimo
DMSO	Dimetilsulfóxido de sódio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
HCl	Ácido Clorídrico
TCID ₅₀	Dose que infecta 50% da cultura de tecido

RESUMO

Estudos de plantas medicinais com conhecimento tradicional têm sido uma fonte potencial de substâncias com atividades farmacológicas e biológicas significantes. *Guettarda angelica* Mart. ex Müll. Arg. (Rubiaceae) é uma planta medicinal no qual suas raízes são popularmente utilizadas para diversos fins terapêuticos, incluindo veterinário. Estudos antimicrobianos com raízes desta planta também relataram uma atividade in vitro contra bactérias. Como as infecções virais ainda continuam sendo um sério problema mundial, a etnofarmacologia fornece uma abordagem alternativa para descoberta de novos agentes antivirais. O objetivo do presente trabalho foi o estudo antiviral de extratos da casca das raízes, folhas e sementes de *G. angelica* frente aos herpesvírus bovino (BoHV-1), suíno (SuHV-1) e equino (EHV-1), reovírus (ARV) e metapneumovírus aviário (aMPV). A atividade antiviral foi testada in vitro em células Vero e MDBK utilizando os ensaios de redução do título viral e o ensaio quantitativo colorimétrico através do MTT. Inicialmente, a concentração máxima não-citotóxica (MNCC) dos extratos foi determinada nas células através da observação de suas alterações morfológicas. Estudos realizados através da redução dos títulos virais mostrou que apenas o extrato aquoso de sementes (AEs) apresentou uma atividade antiviral contra o BoHV-1, SuHV-1, EHV-1 e ARV. Assim, esse extrato foi posteriormente avaliado pelo método MTT para determinação do CC_{50} (concentração citotóxica a 50%), IC_{50} (concentração inibitória a 50%) e o SI (índice de seletividade). Os valores de CC_{50} do extrato AEs foram 400,60 e 920,50 para células Vero e MDBK,

respectivamente. E os valores de IC_{50} e SI foram 22, 79 e 40,39 para BoHV-1; 91,30 e 10,08 para SuHV-1; 19,95 e 20,08 para EHV-1; e 23,59 e 17,00 para ARV. Esses resultados indicam que a semente de *G. angelica* contém compostos com atividade antiviral promissora e baixa toxicidade.

ABSTRACT

Study of medicinal plants with traditional knowledge has been a potential source of substances with significant pharmacological and biological activities. *Guettarda angelica* M. (Rubiaceae) is a medicinal plant where its roots are popularly used for various therapeutic purposes including veterinary. In vitro antimicrobial studies also related antibacterial activity of these roots against bacteria. Like viral infections still remain a serious worldwide problem, the ethnopharmacology provides an alternative approach for discovery of new antiviral agents. The aim of the present work was the antiviral study of extracts from roots bark, leaves and seeds of *G. angelica* against bovine (BoHV-1), swine (SuHV-1) and equine (EHV-1) herpesviruses, avian reovirus (ARV) and metapneumovirus (aMPV). The antiviral activity was tested in vitro on Vero and MDBK cells using the viral titer assay and the quantitative colorimetric assay through MTT. Initially, the maximum non-cytotoxic concentration (MNCC) of extracts was determined in cells by observation of their morphological alterations. Studies through the reduction of viral titers showed that only the aqueous extract from seeds (AEs) presented an antiviral activity against BoHV-1, SuHV-1, EHV-1 and ARV. Then, this extract was further evaluated by MTT method to determine the CC_{50} (50% cytotoxic concentration), IC_{50} (50% inhibitory concentration) and SI (selectivity index). The values of CC_{50} of AEs extract were 400.60 and 920.60 to Vero and MDBK cells, respectively. And the values of IC_{50} and SI were 22.79 and 40.39 for BoHV-1; 91.30 e 10.08 for SuHV-1; 19.95 and 20.08 for EHV-1; 23.59 and 17.00 for ARV. These results

indicate that the seeds from *G. angelica* contain compounds with promising antiviral activity and low toxicity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. PLANTA

O gênero *Guettarda*, pertencente à família *Rubiaceae*, compreende mais de 10.000 espécies de plantas extensamente distribuídas em áreas tropicais e popularmente utilizadas na América do Sul para tratamento de ferimentos e inflamações (Barroso, 1986; Capasso et al., 1998; Mongrand et al., 2005). Em levantamento bibliográfico realizado no gênero, foi constatado o estudo de apenas nove espécies, dentre elas, as espécies brasileiras *Guettarda platypoda* DC e *Guettarda angelica* Mart. ex Müll. Arg., encontradas nas regiões nordeste e centro-oeste, utilizadas popularmente como antifebril (Sousa et al., 1984; Bhattacharyya e Almeida, 1985). Além disso, há estudos sobre a atividade antiviral de glicosídeos de *G. platypoda* sobre os vírus da estomatite vesicular e rinovírus (Aquino et al., 1989) e especificamente sobre *G. angelica*, estudos mostraram uma atividade antibacteriana (Bispo et al., 2004).

Guettarda angelica, conhecida popularmente como Angélica-do-mato, Angélica-da-terra ou Angélica-mansa, é uma planta medicinal predominante em regiões de caatinga e utilizada para diversos fins terapêuticos. A casca da raiz e seu lenho são preparados por decocção e utilizados na medicina popular para anemia, dispepsias, febre amarela, febre puerperal e febre tífica. Na medicina veterinária é empregada como vulneraria, febrífuga e adstringente, e na cura de diarréias de bovinos e equinos (Herbarium, 2011). Esta espécie foi escolhida com

base em seu potencial valor terapêutico, uma vez que, no Brasil, muitas espécies do gênero são utilizadas na medicina popular contra infecções.

A caatinga é um ecossistema predominante no nordeste do Brasil. A vegetação compreende uma área de aproximadamente 844.453 km² e se estende pela totalidade do estado do Ceará (100%), mais da metade da Bahia (54%), da Paraíba (92%), de Pernambuco (83%), do Piauí (63%) e do Rio Grande do Norte (95%); quase metade de Alagoa (48%) e Sergipe (49%); além de pequenas porções de Minas Gerais (2%) e do Maranhão (1%) (Silva e Albuquerque, 2005; IBGE, 2004).

Na caatinga encontra-se uma grande diversidade de espécies vegetais que apresentam um potencial econômico e são usadas em propriedades rurais como forrageiras, frutíferas e madeireiras para diversas finalidades. Muitas destas também apresentam uso medicinal, especialmente pelas famílias nas áreas rurais (Embrapa, 2004). Sua vegetação típica é seca, espinhosa e adaptada a solos mais estéreis devido à escassez de chuvas durante grande parte do ano. Entretanto, durante os períodos chuvosos as folhagens voltam a brotar e a paisagem fica mais verde. A vegetação da Caatinga também é alvo de grande exploração humana pela atividade agrícola desenvolvida, pelo extrativismo na extração de madeira e lenha e pelo uso da pecuária extensiva (Albuquerque et al., 2005; Moreira et al., 2006). A exploração econômica das plantas da Caatinga de maneira predatória está degradando seus recursos naturais e provocando perdas quase que irrecuperáveis de espécies vegetais e animais (Embrapa, 2004).

1.2. PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais na terapêutica é muito antigo e está intimamente relacionado com a própria evolução do homem. Dados históricos revelam a sua utilização já pelo homem de Neanderthal que usava de suas propriedades mágico-simbólicas quando se deparava com algum tipo de malefício. Para utilizarem as plantas como medicamentos, os homens antigos valiam-se de suas próprias experiências empíricas de acerto e erro, da observação do uso de plantas pelos animais e da intervenção divina para determinadas doenças. Em suma, percebe-se que mitos, lendas e tradições apontam para o emprego amplo de plantas medicinais em todos os tempos, em todas as camadas sociais e quase em toda a humanidade (Roman Jr., 2003; Oliveira et al., 2006; Turolla e Nascimento, 2006).

Nos países em desenvolvimento, o alto custo dos medicamentos sintéticos e a falta de acesso para as comunidades distantes limitam a aquisição de fármacos a uma parcela privilegiada da população e por isso o uso de plantas como medicamento vem aumentando dia a dia em todo o mundo. Por vários motivos, sejam de ordem médica, social, cultural, econômica ou filosófica, as plantas medicinais têm sido uma opção terapêutica para uma parcela crescente da população brasileira, rural ou urbana. Assim, aproximadamente 70 a 80% da população de países em desenvolvimento ainda confiam na medicina popular e utilizam algum tipo de planta na busca do alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Sendo que desse total, pelo menos 30% dá-se por indicação

médica (Yunes et al., 2001; Veiga Jr. et al., 2005; Peron et al., 2008). Outro fator que tem contribuído para o crescente interesse por terapias alternativas e o uso terapêutico de produtos naturais, especialmente os derivados de plantas, é a existência de estudos científicos para alguns produtos fitoterápicos comprovando sua eficácia clínica e segurança (Veiga Jr. et al., 2005). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica foram desenvolvidos de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais (Calixto, 2000). Vale ressaltar que a utilização de plantas medicinais traz vantagens ambientais já que são produtos biodegradáveis e seu suprimento é auto-sustentável devido à diversidade da flora medicinal (Hammond et al., 1997).

A expansão do mercado de medicamentos fitoterápicos no Brasil é bastante notória. Entre aqueles com maior número de registros de formulações se encontram os extratos de *Ginkgo biloba* L. que é eficaz no tratamento de doenças cognitivas e de *Aesculus hippocastanum* L. (castanha-da-índia) que possui atividade anti-edema e é eficaz no tratamento sintomático de pacientes que sofrem de insuficiência venosa crônica. Entre os extratos de plantas nativas ou domesticadas no Brasil, destacam-se os preparados de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco), que apresenta atividade expectorante; *Maytenus ilicifolia* Schrad (espinheira-santa), com atividade antiulcerogênica; *Paullinia cupana* Kunth (guaraná), estimulante do sistema nervoso central (SNC). Além das plantas do gênero *Passiflora* (maracujá), que apresentam atividade sedativa e ansiolítica (Ribeiro et al., 2005; Carvalho et al., 2008).

Com isso, os trabalhos de pesquisa com plantas medicinais podem originar novos medicamentos em menor tempo, mais baratos e mais acessíveis à população, do que os medicamentos sintéticos importados (Yunes e Calixto, 2001).

1.3. TERAPIA ANTIVIRAL

Os vírus são chamados de parasitas intracelulares obrigatórios porque somente se multiplicam no interior das células. Eles são partículas compostas por um cerne interno contendo DNA ou RNA recobertos por uma camada protéica protetora, denominada capsídeo. Alguns vírus possuem uma membrana externa lipoproteica, denominada envelope ou envoltório, que recobre o capsídeo (Levinson e Jawetz, 2006).

A maioria das doenças infecciosas que afetam o homem e o animal é causada por vírus. E as diversas medidas sanitárias adotadas envolvem o controle das doenças através de vacinas, o que é difícil quando a doença já está instalada ou tratamento com remédios para alívio dos sintomas e em alguns casos, o combate direto do vírus ou de seus produtos, os chamados agentes antivirais (Simoni, 2003).

O primeiro interesse, que se tem registro, no desenvolvimento de novos agentes antivirais a partir de plantas surgiu após a Segunda Guerra Mundial. Em 1952, a companhia farmacêutica Boots (Nottingham, Inglaterra) realizou uma triagem de 288 plantas à procura de alguma que apresentasse atividade anti-

influenza. Essa atividade foi encontrada para doze espécies. Desde então, muitos são os grupos de pesquisa que realizam programas com esse tipo de seleção, avaliação da atividade antiviral in vitro ou in vivo de extratos vegetais (Jassim e Naji, 2003; Mukhtar et al., 2008).

Muitos estudos já demonstraram a importância de extratos e metabólitos especiais de plantas como potentes agentes inibidores de vírus. Alguns são apontados como alternativas viáveis aos atuais antivirais empregados ou, até mesmo, como seus coadjuvantes no combate às doenças virais. Espera-se que a necessidade de novas classes de antivirais que atuem em alvos moleculares distintos ou ainda simultaneamente em mais de um alvo possa ser substituída pela diversidade estrutural dos metabólitos especiais encontrados no reino vegetal. Alguns mecanismos de ação e/ou alvos moleculares atribuídos a essas substâncias já foram elucidados e incluem: a inibição da entrada do vírus na célula, a inibição da síntese de DNA ou RNA e a inibição de enzimas da reprodução viral (Jassim e Naji, 2003; Mukhtar et al., 2008; Naithani et al., 2008).

Muitas plantas da medicina tradicional têm sido relatadas por apresentar atividade antiviral e algumas delas já são utilizadas para tratamento de infecções virais em animais e humanos. Na literatura é possível encontrar diversos estudos baseados na atividade antiviral de extratos ou compostos isolados de plantas. McCutcheon e colaboradores (1995) publicaram os resultados dos testes de extratos metanólicos de 100 espécies vegetais britânicas frente a sete vírus. Doze deles apresentaram promissoras atividades em concentrações não citotóxicas. *Rosa nutkana* Presl var. *nutkana* e *Amelanchier alnifolia* Nutt. var. *humptulipensis*

(Jones) Hitchc. foram ativas contra um coronavírus entérico; *Potentilla arguta* Pursh inibiu completamente o vírus sincicial respiratório (RSV); *Ipomopsis aggregata* (Pursh) Grant var. *aggregata* exibiu atividade contra o vírus parainfluenza tipo 3; *Lomatium dissectum* (Nutt.) Math. et Const. var. *multifidum* (Nutt.) Math. et Const. inibiu o efeito citopático do rotavírus; e os extratos preparados com as seguintes espécies foram ativos contra o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1): *Conocephalum conicum* (L.) Dum. (Conocephalaceae), *Lysichiton umericunum* Hulten et St. John (Aracaceae), *Polypodium glycyrrhizu* D.C. Eaton (Polypodiaceae) e *Verbascum thapsus* L. (Scrophulariaceae).

O uso de plantas medicinais também se aplica na área veterinária para tratamento de doenças como, por exemplo, para a Doença de Newcastle, mas nem sempre com respaldo científico (Waihenya et al., 2002). Plantas como *Melia azedarach*, *Cedrela tubiflora*, *Acanthospermum hispidum* e o óleo de *Minthostachys verticillata* apresentaram atividade antiviral para o herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1) (Descalzo e Coto, 1989; Cordoba et al., 1991; Summerfield et al., 1997; Zanon et al., 1999; Primo et al., 2001) enquanto que *Acanthospermum hispidum*, *Phyllanthus orbicularis* e *Stryphnodendron adstringens* apresentaram atividade antiviral para o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) (Summerfield et al., 1997; del Barrio e Parra, 2000; Felipe et al., 2006). Lupini et al. (2009), estudou três diferentes extratos de castanhas (*Castanea* spp.) a partir de madeira e um Quebracho (*Schinopsis* spp.) também extraído desta maneira, todos contendo taninos e atualmente utilizado na indústria de alimentação animal, apresentaram

atividade antiviral in vitro contra reovírus aviário (ARV) e metapneumovírus aviário (aMPV).

Uma grande estratégia para a ação antiviral é o desenvolvimento e o uso de fármacos capazes de prevenir uma infecção ou de combatê-la, uma vez começada. No entanto, apesar de quase 50 anos de pesquisa, o arsenal de fármacos antivirais permanece pequeno, em contraste com a enorme quantidade de medicamentos antibacterianos e antifúngicos disponíveis (Flint et al., 2000). Esses fármacos ainda apresentam graves restrições de uso, tais como reduzido espectro de atividade, utilidade terapêutica limitada e vários graus de toxicidade (De Clercq, 2004; Arora et al., 2009). Desta forma, ainda é de extrema necessidade validar as pesquisas com plantas medicinais, desenvolver novas tendências tecnológicas para assegurar uma terapêutica mais segura e conseqüentemente buscar novas alternativas terapêuticas efetivas para doenças virais, à base de substâncias com potente atividade, com um mínimo de efeitos colaterais e, preferivelmente, com mecanismos de ação diferentes daqueles dos medicamentos já existentes (Galina, 2003).

1.4. FAMÍLIAS HERPESVIRIDAE, PARAMYXOVIRIDAE E REOVIRIDAE UTILIZADAS COMO MODELOS PARA OS TESTES DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Guettarda angelica* Mart. ex Müll. Arg.

1.4.1. HERPESVIRIDAE

Os herpesvírus são vírus que contêm uma molécula de DNA linear, fita dupla, circundados por uma substância amorfa, o tegumento, possuem um capsídeo icosadeltahédrico de aproximadamente 100 nm de diâmetro contendo 162 capsômeros e um envelope glicoprotéico. A replicação ocorre no núcleo, formando inclusões intranucleares, e são os únicos vírus que adquirem o envelope mediante brotamento pela membrana nuclear. Os herpesvírus são muito importantes devido à sua capacidade de causar infecções latentes no sistema nervoso do hospedeiro após a infecção aguda. A infecção latente persiste por toda a vida do animal, podendo ser reativada natural e/ou experimentalmente, resultando em excreção e transmissão de vírus (Levinson e Jawetz, 2006).

As doenças causadas pelos herpesvírus pertencentes ao gênero *Varicellovirus*, família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, são as mais comumente observadas em humanos e animais (Levinson e Jawetz, 2006). Em animais, os principais representantes desta subfamília são os herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), suíno tipo 1 (SuHV-1) e equino tipo 1 (EHV-1).

1.4.1. 1. Herpesvírus bovino

Os herpesvírus são responsáveis por uma ampla gama de condições em ruminantes, incluindo doenças neurológica, respiratória, genital e fetal. As infecções podem ser de natureza inaparente a fatal. Existem cinco diferentes grupos de herpesvírus bovino que são classificados como: BoHV-1, BoHV-2, BoHV-3, BoHV-4 e BoHV-5 (Ardans, 2003). O BoHV-1 é um dos agentes virais mais importantes no rebanho bovino podendo causar diversas manifestações como: doença respiratória, conhecida como rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR); vulvovaginite pustular infecciosa (IPV); balanopostite pustular infecciosa (IPB); conjuntivite; reabsorção embrionária; abortos; infertilidade temporária; nascimento de animais fracos; queda brusca na produção de leite; e infecções sistêmicas resultando em meningoencefalite (Cerqueira et al., 2000; Vieira et al., 2003).

A IBR tem sido identificada na África do Sul, Austrália, Canadá, Estados Unidos, Nova Zelândia, Reino Unido e Europa, apresentando-se mais comumente em rebanhos confinados e em grandes fazendas de criação (Cavalcante, 2000; Straub, 2001). A infecção pelo vírus BoHV-1 vem causando sérias perdas econômicas em rebanhos leiteiros e tem sido alvo de estudos em várias partes do mundo devido justamente a este impacto extremamente negativo da infecção por esse vírus na pecuária bovina (Junqueira et al., 2006).

No Brasil, os coeficientes de soropositividade variam de 10,6% a 96% (Lage et al., 1996; Melo et al., 1997; Vieira et al., 2003) porém, apesar da grande variação relatada, a maioria dos estudos foi realizada ou com número pequeno de

amostras englobando poucos municípios ou, muitas vezes, com populações específicas ou ambas as situações (Anunciação et al., 1989; Vieira et al., 2003; Barbosa et al., 2005). Outra questão a ressaltar é que, no Brasil, há uma deficiência de pesquisas que abordem fatores de risco para esta infecção.

As vacinas previnem o desenvolvimento de sintomas clínicos e reduzem a eliminação de partículas virais, no entanto, não impedem a infecção viral e latência (Ackermann et al., 1982; Osório, 1998). Países europeus com baixa prevalência do BoHV-1 não permitem o uso de vacinas e erradicam a enfermidade utilizando sorodiagnóstico e eliminação dos animais reagentes (Ackermann et al., 1990a; Ackermann et al., 1990b; Straub, 1991). Quando a prevalência do BoHV-1 é elevada, a erradicação torna-se onerosa pelo custo dos descartes, sendo mais viável, neste caso, a vacina com marcador genético que permite a diferenciação entre animais infectados e vacinados utilizando um teste ELISA (Van Oirschot et al., 1996), porém a comercialização desta vacina não está autorizada no Brasil (Fava et al., 2003).

1.4.1. 2. Herpesvírus suíno

O herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1), causador da Doença de Aujeszky (DA) ou pseudo-raiva, se constitui em um importante obstáculo à exploração e ao comércio internacional de suínos em todo o mundo. A DA é uma virose altamente contagiosa, que acomete principalmente a espécie suína, que é considerada o principal reservatório do vírus e o seu mais importante disseminador. A sua

ocorrência em outras espécies como ruminantes, felinos, caninos e roedores é consequência do contato com suínos infectados (Sobestiansky et al., 1999; Santos et al., 2008).

A DA tem uma distribuição mundial e no Brasil, a dornça foi diagnosticada pela primeira vez em 1912 e, posteriormente, foi identificada em todos os estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, além da Bahia e Ceará. Nos últimos anos, a infecção tem sido mais frequentemente relatada em Santa Catarina (SC), o que fez com que fosse implementado um programa estadual de erradicação. A partir deste programa, desde julho de 2004, a DA não é mais identificada em SC (Franco e Roehe, 2007). A DA é uma enfermidade de importância sanitária e econômica na suinocultura e de notificação anual obrigatória (Groff et al., 2005).

A DA pode provocar diversos sinais clínicos como: transtornos reprodutivos, respiratórios e do sistema nervoso central, causando altas taxas de morbidade e mortalidade de leitões, redução da performance dos reprodutores e redução do desenvolvimento dos animais em crescimento e terminação (Mettenleiter, 2000; Silva et al., 2005, Franco e Roehe, 2007). Os sinais clínicos da infecção pelo SuHV-1 variam de acordo com fatores epidemiológicos como endemicidade e suscetibilidade dos indivíduos. A ocorrência da DA em áreas endêmicas é associada a manifestações reprodutivas. A introdução do vírus em rebanhos livres resulta em sinais clínicos característicos, que variam de acordo com a faixa etária. Em animais jovens predominam sinais neurológicos com a taxa de mortalidade aproximando-se dos 100%. Os animais adultos ou em gestação apresentam febre, taxas variáveis de aborto, reabsorção fetal, dificuldade respiratória e,

eventualmente, vômitos. A mortalidade nessa faixa etária é geralmente baixa (Groff et al., 2005; Zanella et al., 2007).

Devido à capacidade deste vírus causar infecção latente, os animais soropositivos constituem-se em reservatórios e fonte potencial de disseminação do vírus da DA na qual é transmitido por contato direto ou indireto de animais susceptíveis com secreções contaminadas ou animais infectados (Groff et al., 2005; Franco e Roehe, 2007).

As estratégias de combate ao SuHV-1 variam de acordo com a situação epidemiológica da infecção nas áreas alvo. Em todas as situações, o papel dos portadores latentes se reveste de importância fundamental e deve permear a planificação e adoção das medidas adequadas. Em geral, as estratégias são baseadas em uma combinação de vacinação, identificação e descarte de soropositivos, além de medidas gerais de prevenção (Groff et al., 2005; Franco e Roehe, 2007).

1.4.1. 3. Herpesvírus equino

Existem cinco diferentes grupos de herpesvírus equino que são classificados como: EHV-1, EHV-2, EHV-3, EHV-4 e EHV-5. O EHV-1 tem sido associado a aborto em éguas; doença do trato respiratório superior em cavalos jovens que vem acompanhada de aumento do volume de linfonodos locais e descarga nasal serosa, que pode se tornar mucopurulenta como consequência de infecções secundárias bacterianas; e doença neurológica ocasional. A

equideocultura constitui importante segmento do agronegócio brasileiro. Além de sua ligação com a pecuária comercial, a atividade possui uma forte inter-relação com setores ligados ao lazer, à cultura, ao esporte e ao ecoturismo (Ardans, 2003; Groff et al., 2005).

O EHV-1 é um vírus cosmopolita, distribuindo-se nas diferentes populações de cavalos de vários países (Crabb e Studdert, 1995). No Brasil, o EHV-1 foi detectado pela primeira vez em 1964 (Corrêa e Nilsson, 1964) sendo posteriormente isolado em estados do sul e sudeste (Nilsson e Corrêa, 1966; Weiblen et al., 1994; Moreira et al., 1998). No seu conjunto, as informações disponíveis indicam que o EHV-1 está circulando de forma significativa nas populações de equinos do Sul e do Sudeste brasileiro. O alto índice de animais sorologicamente positivos, em contraste com um número baixo de sinais clínicos reportados, parece indicar a importância das infecções assintomáticas no ciclo do EHV-1 (Cunha et al., 2002).

A infecção pelo EHV-1 é enzoótica na maioria das populações de equinos e uma parcela significativa dos animais de áreas endêmicas apresenta anticorpos contra o agente. Entretanto, a maioria dos testes sorológicos não é capaz de diferenciar anticorpos contra EHV-1 e EHV-4, devido à extensa reatividade cruzada entre os dois vírus. O EHV-1 é transmitido de forma horizontal, por contato direto e indireto entre animais susceptíveis e que estão excretando o vírus. O vírus é excretado durante a infecção aguda e durante episódios de reativação da infecção latente (Ardans, 2003; Franco e Roehe, 2007).

A vacinação continua até hoje como uma importante estratégia para combater a infecção por EHV-1, em combinação com medidas de gestão. O principal tipo de vacina comercialmente disponível é a vacina inativada de EHV-1, que oferece diferentes níveis de proteção contra a doença através da indução de anticorpos. A eficácia da vacinação contra infecções causadas pelos EHV-1 ainda é limitada em intensidade e duração. Mesmo entre animais vacinados pode haver a disseminação sistêmica dos vírus, atribuída aos mecanismos de escape viral do sistema imune, mas os sinais clínicos tendem a ser mais brandos. Tratamentos, incluindo o uso de antibióticos de amplo espectro, são recomendados para minimizar o quadro clínico e prevenir infecções secundárias (Franco e Roehle, 2007; Paillot et al., 2009).

Programas de manejo adequados ainda se constituem na melhor forma de prevenção e controle para o EHV-1. Entre outros, o material derivado de abortos deve receber atenção especial, sendo recomendável o correto descarte do feto, placenta e camas através da incineração ou enterro (Moreira et al., 1998; Gilkerson et al., 1999).

1.4.2. PARAMYXOVIRIDAE

Os vírus da família *Paramyxoviridae* incluem importantes patógenos do trato respiratório de humanos e animais. A família é constituída por vírus envelopados que contém genoma RNA de fita simples não segmentado e de polaridade negativa (Arns et al., 2007).

Os paramixovírus são responsáveis por algumas enfermidades de grande relevância na Medicina Veterinária, tanto por sua prevalência como pelo impacto econômico na produção animal. Dentre estes destaca-se o metapneumovírus aviário (aMPV).

1.4.2.1. Metapneumovírus aviário

O metapneumovírus aviário (aMPV), anteriormente classificado no gênero *Pneumovirus*, foi reclassificado dentro do gênero *Metapneumovirus* por apresentar o genoma com oito genes organizados em uma ordem diferente dos outros 10 gêneros de pneumovírus de mamíferos. Esses vírus não apresentam atividade hemaglutinante e de neuraminidase, sendo incapazes de aglutinar eritrócitos de mamíferos e aves. Todas as fases da replicação dos metapneumovírus ocorrem no citoplasma e este é constituído de quatro subgrupos distintos (A, B, C e D), sendo os tipos A e B os mais prevalentes. O subgrupo C foi identificado apenas nos Estados Unidos da América e o subgrupo D surgiu isoladamente em um surto de rinotraqueíte em perus na França (Lamb e Kolakofsky, 1996; Arns et al., 2007)

Os primeiros relatos da presença do aMPV em produções avícolas de galinhas e perus foram realizados no final dos anos 70, na África do Sul (Buys e Du Preez, 1980; Buys et al., 1989). No Brasil, seu isolamento foi realizado a partir de material proveniente de matrizes antes da introdução da vacina no país (Arns e Hafez, 1995). Embora não existam dados disponíveis sobre a circulação do aMPV

em diversas áreas geográficas, dois países se declararam livres destes vírus: Austrália (Bell e Alexander, 1990) e Canadá (Heckert e Myers, 1993).

O aMPV é o agente etiológico da rinotraqueíte em perus (TRT) e está associado à síndrome da cabeça inchada (SHS) em aves comerciais (Dani et al., 1999). Este agente causa uma doença aguda e altamente contagiosa do trato respiratório em aves comerciais e populações de aves silvestres em todas as partes do mundo (Munir e Kapur, 2003).

A TRT é caracterizada por espirros, estertores traqueais, edema dos seios infraorbital, nasal e muitas vezes frontal, com descarga ocular. A descarga nasal pode se tornar mucopurulenta devido infecção bacteriana secundária. Apesar da replicação dos vírus ocorrer na traquéia e pulmões, ela é muito mais limitada ao trato respiratório superior, onde as partículas virais podem ser detectadas mais facilmente (Cook, 2000). A forma mais grave da doença em galinhas é causada, provavelmente, pela associação do aMPV com infecções bacterianas secundárias (Gough, 2003). A SHS é caracterizada por apatia, edema de face e seios infraorbitais. Além disso, desorientação cerebral, torcicolo e opistótono frequentemente são relatados com a progressão da doença (O'brien, 1985; Hafez, 1993). Em poedeiras e matrizes de perus, a infecção pelo aMPV provoca queda na qualidade e na produção de ovos (Stuart, 1989; Cook et al., 1996).

A transmissão do aMPV ocorre por contato direto ou indireto entre aves, por aerossóis e através de ração, água e cama contaminados. Em condições de baixa umidade, má ventilação, calor intenso e poeira, a disseminação da doença entre galinhas criadas em cama é rápida (cerca de 24 horas). No caso de aves criadas

em gaiolas, em boxes ou galpões separados, a disseminação da doença pode ser lenta (cerca de 1 a 2 semanas) (Arns et al., 2007).

Em galinhas, a morbidade pode chegar a 10%, a produção de ovos de matrizes é frequentemente afetada e a mortalidade raramente excede 2%. A SHS é relatada tanto em frangos de corte como em matrizes e, nessas últimas, a evidência do papel do aMPV como agente etiológico primário da enfermidade é maior (Cook, 2000). Porém, ele não é o único causador associado à SHS, outros agentes também foram descritos, como o vírus da bronquite infecciosa (VBI) (Morley e Thomson, 1984) e *Escherichia coli* (Droual e Woolcock, 1994). Em contrapartida, a morbidade em perus é elevada, podendo chegar a 100% e a mortalidade é variável, dependendo da presença de infecções bacterianas secundárias (Arns et al., 2007).

As boas práticas de manejo e biossegurança são importantes para prevenir e minimizar os efeitos da infecção pelo aMPV. Embora a infecção por este vírus não possa ser tratada diretamente, a utilização de antibióticos é importante para controlar infecções bacterianas secundárias (Stuart, 1989; Hafez e Weiland, 1990). A forma de utilização dos antibióticos empregados pela indústria avícola tem mudado consideravelmente na última década devido, principalmente, às preocupações sobre as possíveis consequências negativas à saúde humana causadas pela sua utilização excessiva (Singer e Hofacre, 2006; Arns et al., 2007).

As infecções pelo aMPV podem ser prevenidas pela vacinação. As vacinas oferecem uma excelente proteção em perus e também em galinhas quando administradas corretamente. Uma única vacinação pode oferecer proteção aos

perus durante toda a vida. Entretanto, pode ocorrer reinfecção na fase tardia da vida. Por isso, em alguns casos, os perus são revacinados depois de aproximadamente 10-12 semanas (Cook, 2000). Em frangos, a proteção durante toda a vida também pode ser obtida com uma única dose de vacina. Em galinhas, a administração de vacina inativada oferece uma redução dos efeitos da infecção pelo aMPV na produção de ovos. Desta forma, recomenda-se a primovacinação com vacinas vivas atenuadas, para estimular clones de células de memória, obtendo assim uma resposta mais efetiva. A revacinação deve ser realizada com uma vacina inativada. Embora a vacina não proteja completamente os animais, os sinais respiratórios serão mais brandos em caso de infecção. As vacinas contra os subtipos A e B oferecem uma excelente proteção cruzada entre eles (Cook et al., 1995; Eterradossi et al., 1995; Toquin et al., 1996). Além disso, estas vacinas também oferecem proteção contra o isolado Colorado, subtipo C (Cook et al., 1999) e contra os isolados do subtipo D (Toquin et al., 1999). No Brasil, são utilizadas vacinas contra os subtipos A e B.

1.4.3. REOVIRIDAE

A família *Reoviridae* é composta por vírus que infectam uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo invertebrados, plantas e vertebrados. As infecções de vertebrados afetam principalmente o trato gastrointestinal e respiratório. Esta família é constituída por vírus que apresentam um genoma RNA fita dupla segmentado, ausência de envelope glicoprotéico, simetria icosaédrica e

capsídeo duplo. Esses vírus realizam o seu ciclo replicativo no citoplasma das células hospedeiras (Alfieri et al., 2007).

A família *Reoviridae* é formada por 15 gêneros, porém apenas cinco infectam vertebrados (*Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus* e *Aquareovirus*). Destes gêneros, destacam-se os *Orthoreovirus* que apresentam uma importância na área veterinária, provocam perdas econômicas para a indústria avícola e foram denominados genericamente como reovírus (Alfieri et al., 2007; ICTV, 2009).

1.4.3.1. Reovírus aviário

O gênero *Orthoreovirus* é subdividido em duas espécies: ortoreovírus (reovírus) de mamíferos e ortoreovírus (reovírus) aviário. Os reovírus aviários se caracterizam pela especificidade de hospedeiro, diversidade antigênica e pela ausência antigênica de atividade hemaglutinante, o que contrasta com a característica hemaglutinante dos reovírus dos mamíferos. Dentre os reovírus aviários, são descritos 11 sorotipos distintos que, de acordo com a distribuição geográfica, espécie aviária e material clínico de origem, podem apresentar considerável reatividade sorológica cruzada devido à presença de antígenos comuns (Alfieri et al., 2007).

O Reovírus aviário (ARV) foi isolado pela primeira vez em 1954, por Fahey e Crawley em frangos com problema respiratório crônico sendo posteriormente caracterizado por Petek et al. (1967). No Brasil, o primeiro isolamento desse vírus

foi realizado por Bottino et al. (1975) a partir de aves reprodutoras com processos inflamatórios articulares. O ARV já foi descrito em várias espécies aviárias destacando-se entre elas frango de corte, galinha de postura, peru, codorna e ganso (Georgieva e Jambazova, 2003).

As infecções por ARV têm sido associadas com uma variedade de doenças, destacando principalmente a tenosinovite ou artrite viral que provoca lesões de caráter inflamatório crônico na articulação tibiotársica, ocasionando dificuldade de locomoção. Além disso, outras manifestações também estão associadas, como doenças respiratórias e entéricas, miocardite, hepatite, anemia, osteoporose, hidropericárdio, empastamento da cloaca, mortalidade de pintinhos, síndrome da refugagem e síndrome de má absorção. Geralmente, a mortalidade das aves ocorre devido à inanição e desidratação (Jones, 2000; Vasconcelos et al., 2001; Alfieri et al., 2007). A transmissão do vírus ocorre tanto vertical como horizontalmente e está relacionado a uma série de fatores que vão desde a grande resistência da partícula viral ao ambiente até a rota de transmissão. O controle dessa enfermidade é difícil, a taxa de morbidade pode chegar a 100% e a taxa de mortalidade é relativamente baixa (em média 5%) (Jones, 2000; Alfieri et al., 2007).

A vacinação de reovírus de criadores pode ser feita com vacinas vivas ou inativadas ou combinações de ambas. As vacinas inativadas são muito mais eficientes se precedida pela vacinação com vacinas vivas (Van der Heide, 1996; Rosenberger, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar in vitro a atividade antiviral de extratos da planta *Guettarda angelica* Mart. ex Müll. Arg. frente a vírus animais de importância na medicina veterinária.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

a) Avaliar a citotoxicidade de extratos e frações de *G. angelica* frente à linhagem celular de rim de macaco verde africano (Vero) e de rim bovino (MDBK).

b) Avaliar a atividade antiviral de extratos e frações de *G. angelica* em concentrações não-citóticas frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1), herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1), metapneumovírus aviário (aMPV) e reovírus aviário (ARV).

c) Avaliar os extratos inibidores pelo ensaio colorimétrico (MTT) e obter os índices de seletividade.

CAPÍTULO 1

Evaluation of antiviral potential of *Guettarda angelica* against animal herpesviruses

Alyne Vieira Barros, Lorena Mendes Araújo, Fernando Faustino de Oliveira, Aline
Oliveira da Conceição, Isabela Cristina Simoni, Maria Judite Bittencourt
Fernandes, Clarice Weis Arns

(Artigo submetido para publicação, Research in Veterinary Science, Maio de 2011)

Evaluation of antiviral potential of *Guettarda angelica* against animal herpesviruses

Alyne Vieira Barros^{a,c}, Lorena Mendes Araújo^b, Fernando Faustino de Oliveira^b,
Aline Oliveira da Conceição^b, Isabela Cristina Simoni^a, Maria Judite Bittencourt
Fernandes^a, Clarice Weis Arns^{c*}

^aCentro de P&D de Sanidade Animal, Instituto Biológico, São Paulo, CP 12898, SP, Brazil

^bUniversidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, CP 45662-000, BA, Brazil

^cUniversidade Estadual de Campinas, Campinas, CP 6109, SP, Brazil

**Corresponding author at: Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia Unicamp, – UNICAMP, Campinas, Brazil. P.O. Box 6109, CEP 13081-970, Campinas, SP, Brazil. Phone: +55 19 3521-6267, E-Mail address: clarns@gmail.com*

ABSTRACT

Many medicinal plants have been screened for their antiviral properties in order to find novel and alternative antiviral agents. *Guettarda angelica* is a plant from Brazilian Caatinga region which roots are popularly used for various therapeutic purposes including veterinary. These roots also demonstrated an in vitro antibacterial activity. The aim of this work was to investigate the in vitro antiviral activity of root barks, leaves, and seeds from *G. angelica* against the bovine (BoHV-1), swine (SuHV-1) and equine (EHV-1) herpesviruses. Firstly, extracts of plant parts were screened through the virus yield reduction assay. Only the aqueous extract from seeds (AEs) showed a significant antiviral activity ($p < 0.01$) against all herpesviruses. Thus, the selectivity index (SI) of this extract was determined by colorimetric MTT assay by calculating the ratio CC_{50} (50% cytotoxic concentration) over IC_{50} (50% viral inhibitory concentration). AEs showed no cytotoxic effect at the inhibitory concentrations ($IC_{50} = 91.30 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$, $22.79 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ and $19.95 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ for BoHV-1, SuHV-1 and EHV-1, respectively) with CC_{50} values of $400.60 \pm 0.20 \mu\text{g/mL}$ for Vero cells and $920.50 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$ for MDBK cells. The SI values were 10.08 (SuHV-1), 20.08 (EHV-1), and 40.39 (BoHV-1). Considering these results, *G. angelica* seeds are promising as antiviral source encouraging further investigation.

Key-words: *Guettarda angelica*; bovine herpesviruses 1; swine herpesviruses 1; equine herpesvirus 1; antiviral activity; MTT method.

Introduction

The therapeutic use of plants is known since the beginning of the civilization and even today medicinal plants are used for peoples all over the world. Many times, they are the only accessible remedy source in developing countries and considered as an important source of drugs discovery (Rates, 2001; Agra et al., 2008; Brandão et al., 2010). The selection of plants by the ethnopharmacological criteria increases the probability to find new substances with significant pharmacological and biological activities (Rates, 2001; Chattopadhyay & Naik 2007). Thus, in this context, Brazil takes advantage due to its wide biodiversity and ethnological diversity.

Even though advances on medical strategies to control viral infections have been taking place, these agents are still a cause of concern and represent a risk for public health. The synthetic antiviral drugs that are available in the market are often of high costs and unsatisfactory with restricted range and adverse effects (Martim & Ernst, 2003; Cos et al., 2006; Chattopadhyay & Naik, 2007; Agra et al., 2008). Also, mutant viruses resistant to the existing antiviral agents arise upon treatment (Rates, 2001; Cos et al., 2006). Therefore, higher plants may serve as promising sources of novel antiviral compounds (Cowan, 1999; Rates, 2001; Jassim & Naji, 2003).

In the veterinary field, the herpesviruses are responsible for important diseases in almost all domestic animal species and like all members of the Herpesviridae family, they establish latent, life-long infections. Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) is the major pathogen of cattle and can cause serious economic losses in dairy herds. Among diverse diseases, this virus is responsible for the infectious bovine rhinotracheitis (IBR) as well as abortions and neonatal systemic infections (Murphy, 1999; Muylkens, 2007). The swine herpesvirus 1 (SuHV-1) causes a disease in pigs, known as Aujeszky's disease being pigs reservoir for other secondary host species as bovine. Its economic impact on the pig industry worldwide is due the high rates of morbidity and mortality leading to restrictions on

international trade of swine products. The virus affects the nervous system of young animals and also causes abortion, fetal loss, mummification, and stillbirth (Murphy, 1999). Equine herpesvirus 1 (EHV-1) is an important ubiquitous enzootic equine pathogen. The infected horses may exhibit either milder clinical respiratory signs or serious neurological illness and abortion in pregnant mares (Murphy, 1999; Ostlund, 1993).

Guettarda angelica Mart. ex Müll. Arg. belonging to the Rubiaceae family is found in “Caatinga” region of the northeast of Brazil and is known as Angélica do mato, Angélica da terra, or Angélica mansa (The New York Botanical Garden, 2006; Agra et al., 2008). The medicinal use of its roots includes the treatment of anemia, dyspepsia, pains and fever, and in veterinary medicine it is used against fever and to “cure” bovine and equine diarrhea (Bispo et al., 2007; Agra et al., 2008). Diverse plants of this family are also used in Brazilian traditional medicine (Agra et al., 2008). Furthermore, *Guettarda platypoda*, other species of this genus, and *Uncaria tomentosa*, other genus of this family, exhibited in vitro antiviral effect (Aquino et al., 1989). In our previous studies, methanolic and aqueous extracts from *G. angelica* roots bark showed in vitro antibacterial activity against Gram positive bacteria (Bispo et al., 2007).

The antiviral studies with plant extracts have increased in the last decades and the results have shown that plants are potential sources of compounds that are able to inhibit and/or decrease the viral infection (Cowan, 1999; Jassim & Naji, 2003; Martim & Ernst, 2003; Brandão et al., 2010). Thus, herein, we reported the evaluation of in vitro antiviral activity of *Guettarda angelica* extracts on bovine, swine, and equine herpesviruses 1.

Material and Methods

Plant material

The root barks, leaves and seeds of *Guettarda angelica* Mart. ex Müll. Arg. (Rubiaceae) were collected at Lomanto small beach, in the region of Jequié (13° 51' S, 40° 14' W), Bahia State, Brazil, in December, 2003. The voucher specimen was deposited on Herbarium of the Centro de Pesquisa do Cacau (BA) and identified as NY Specimen ID 1015301.

Preparation of extracts

The crude aqueous extracts from seeds (AEs) and leaves (AEI) were prepared by grinding of dried materials in a mixer, followed by addition of distilled water (10%, w/v) and maintenance at 4°C for 8 h (AEs) and 24 h (AEI). To prepare the aqueous extract from the root barks (AEr), the material was boiled for 15 minutes. All aqueous extracts were filtered on filter paper and freeze-dried. The methanolic extract from the root barks (MeOHEr) and its subsequently partition with organic solvents obtaining the hexane (HexF), ethyl acetate (AcOEtF) and aqueous (AqF) fractions were also prepared. Briefly, 5 g of each powdered root barks was initially soaked in 50 mL of methanol for 24 h being soaked again for another 24 h. The resultant extract was filtered and concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure at a temperature of 30°C. Organic extracts were solubilised at a 45% proportion of dimethyl sulfoxide (DMSO; Merck) and freeze-dried. The preparation of extracts and fractions of *G. angelica* is schematized in Fig. 1.

LOCAL – FIGURE 1

All freeze-dried fractions and extracts were solubilised in equal parts of distilled water and Earle minimum essential medium (MEM-Vitrocell) twice concentrated to reach a concentration of 5,000 µg/mL excepting for the EAr (4,000

µg/mL). After that, they were sterilized by filtration (0.22 µm filter) and stored at -20°C.

Viruses and cell lines

The Los Angeles strain of BoHV-1 and Nova Prata strain of SuHV-1 were propagated in Madin Darby bovine kidney cells - MDBK (ATCC-CCL 22). The A4/72 strain of EHV-1 was propagated in African green monkey kidney cells – Vero (ATCC-CL 81). The MDBK and Vero cells were maintained in MEM with 10% fetal calf serum. To perform the tests, the cells were seeded in 96 sterile microplates at 3×10^4 cells/well and incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Cytotoxicity assay by cell morphology analysis

After 24 h of cell seeding, the medium was removed and the cells were exposed to 100 µL of increasing concentrations of plant fractions and extracts, ranging from 5.0 to 2,500 µg/mL except for AEr (4.0 to 2,000 µg/mL), in triplicate. Controls consisted of cells incubated with MEM only. In order to determine the maximum non-cytotoxic concentration (MNCC), the cell morphology alterations were observed until 96 h after the treatment by inverted light microscopy.

Antiviral assay

Antiviral screening was based in viral yield reduction technique (Cos et al., 2006). Briefly, 24 h after cell seeding and withdrawal of the medium, the cells were treated with 100 µL of extracts or fractions at dilutions corresponding to each MNCC. After 1h of incubation, 50 µL of logarithmic dilutions of each virus were added, in triplicate, and the microplates were incubated again. Controls consisted of untreated infected cells (virus titer), untreated non-infected cells (cell control) and the positive antiviral control (Acyclovir - SQRFB). The cells were observed for

the presence of cytopathic effect (CPE) every day, up to 4-6 days after treatment. The viral titers were determined by 50% infective dose in tissue culture-TCID₅₀ (Reed & Muench, 1938). The antiviral activity was determined by the difference of the viral titers between treated-infected cells and untreated-infected cells and expressed as viral inhibition index (VII). A plant extract was considered inhibitor when the VII was ≥ 1.5 (Simoni et al., 2007). ANOVA followed by Tukey test was used to evaluate the difference between the VII values. A *p* value of less 0.01 was considered statistically significant. The inhibitor extracts were further assessed by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide-Sigma) colorimetric method.

MTT colorimetric assay

Both cell viability and antiviral activity were evaluated by MTT technique described in Zandonai et al. (2010) with minor modifications. For the cell viability assay, after 24 h of cell seeding and withdrawal of the medium, the cells were incubated with 100 μ L/well of increasing concentrations of plant extracts, in quadruplicate. After 48-72 h, the medium was removed and 50 μ L of MTT solution (1 mg/mL, Sigma) prepared in MEM was added to each well. After incubation of 4 h, the MTT solution was removed and 100 μ L of sodium dodecyl sulfate (SDS-Merck) in 10% HCl 0.001N was added to dissolve formazan crystals. The microplates were incubated overnight and the intensity of the color (absorbance) was automatically measured using the spectrophotometer (Spectra Max Plus 384) and a wavelength of 540 nm. Controls consisted of cells incubated with MEM only. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was defined as the material concentration that reduced the cell viability by 50% when compared to untreated controls.

This same procedure was used to obtain the minimal concentration of extracts required to inhibit 50% of viral growth except by addition of viral suspension containing 200 TCID/100 μ L after putting the extract dilutions. Viral

controls consisted of the cells incubated with MEM and virus. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was defined as the concentration of the material that inhibited 50% of viral replication when compared to virus control.

The CC_{50} and IC_{50} were obtained from nonlinear regression analysis of concentration-effect curves by GraphPad Prism 5 Demo program and represent the mean \pm standard deviation of three independent experiments. The selectivity index (SI) was calculated from the ratio CC_{50}/IC_{50} .

Results

The maximum non-cytotoxic concentration (MNCC) of the each plant extract and fraction from *G. angelica* is shown in Table 1. In MDBK cells, the MNCC for aqueous extracts from the leaves (AEI), seeds (AEs) and roots (AEr) was 800 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$ and 250 $\mu\text{g/mL}$, respectively; meanwhile, the MNCC for the methanolic extract from roots (MeOHEr) was 200 $\mu\text{g/mL}$. In Vero cells, these values were 1,250 $\mu\text{g/mL}$ (AEI), 625 $\mu\text{g/mL}$ (AEs), 500 $\mu\text{g/mL}$ (AEr) and 312 $\mu\text{g/mL}$ (MeOHEr). The fractions of MeOHEr: AqF, and AcOEtF, showed the highest values of MNCC and equals for both cells, corresponding to a low cytotoxicity (1,600 $\mu\text{g/mL}$ for MDBK cells and 1,250 $\mu\text{g/mL}$ for Vero cells). On the other hand, the HexF fraction presented a higher cytotoxicity with MNCC of 80 $\mu\text{g/mL}$ (Vero cells) and 50 $\mu\text{g/mL}$ (MDBK cells).

LOCAL TABLE 1

The antiviral screening of plant extracts and fractions was carried out in MDBK cells infected with BoHV-1 and SuHV-1, and in Vero cells infected with EHV-1. As can be seen in Table 1, AEs had an antiviral activity against the three viruses showing VII of 2.30 (BoHV-1), 2.72 (SuHV-1) and 1.57 (EHV-1). Unlike, the remaining extracts and fractions obtained VII lower than 1.5 and without antiviral

effect on any viruses. The three virus strains were resistant to acyclovir (data not shown).

As the AEs extract was the only to present significant antiviral activity in the screening assays, the selectivity index (SI) was calculated only for it (Table 2). The IC₅₀ values were 22.79 µg/mL for BoHV-1, 91.30 µg/mL for SuHV-1, and 19.95 µg/mL for EHV-1. AEs showed no cytotoxic effect at these inhibitory concentrations with CC₅₀ values of 400.60±0.20 µg/mL for Vero cells and 920.50±0.19 µg/mL for MDBK cells. The SI values obtained from these data were 40.39, 10.08 and 20.08 for BoHV-1, SuHV-1, and EHV-1, respectively.

LOCAL TABLE 2

Discussion

The initial strategy of the present work was based on ethnopharmacology approach of *G. angelica* focusing on the antiviral activity of different parts of this plant against animal herpesviruses. The antiviral screenings are made firstly using cell cultures to measure cytotoxic and antiviral effects (Jassim & Naji, 2003; Cos et al., 2006). Firstly, the MNCC of extracts and fractions from *G. angelica* were established through cellular morphological alterations (Özcelik et al., 2005; Simoni et al., 2007). Comparatively, it could be attributed a higher degree of toxicity to HexF fraction, however for application purposes in antiviral field, no matter the kind of extraction we have but the antiviral activity obtained from a nontoxic concentration. The data reported here show for the first time the in vitro toxic effect of *G. angelica* on cells.

After obtaining the MNCC of each material, the antiviral screening was done based on the viral yield reduction assay. This assay as well as other techniques options as plaque reduction/inhibition assay (Felipe et al., 2006; Cos et al., 2006), inhibition of virus-induced cytopathic effect (Özcelik et al., 2005; Cos et al., 2006), and endpoint titration technique (Cos et al., 2006) have been reported for in vitro

determination of antiviral activity of plant extracts or compounds. The ACV was used as positive control in this screening. However, all herpesvirus strains showed a resistance to this drug. Reports describe either a resistance or a susceptibility of BoHV-1 and SuHV-1 to this antiviral (De Clercq 1982; Thiry et al. 1983); Garré et al. (2007) related an in vitro moderate effect of ACV against EHV-1. Therefore, other nucleoside analogues should be used as positive control in future antiviral assays. Anyway, the ACV has been used on a limited basis in veterinary medicine. In this context, the researches on antiviral compounds from plant origin that overcome the conventional antiviral agents against ACV-resistant viral strains are worth.

Early studies using the root barks from *G. angelica* demonstrated a potential in vitro antimicrobial action showing antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Salmonella* spp validating its specific traditional therapeutic use against bacterial diseases (Bispo et al., 2007). Other studies using the roots from another species of *Guettarda*, *G. platypoda* showed antiviral activity against vesicular stomatitis virus and rhinovirus (Aquino et al., 1989). Also, recent studies reported the antiviral activity of roots or stem barks of some other Brazilian plants against the BoHV-1 (Felipe et al., 2006) and SuHV-1 (Melo et al., 2008; Hsuan et al., 2009). Leaves extracts of other plant families presented promissory antiviral results on the bovine and swine herpesviruses (Summerfield et al., 1997; del Barrio & Parra, 2000; Ikuno et al., 2003; Hsuan et al., 2009). However all these reports revealed the potential of either roots or herpesvirus susceptibility to plant products, in our initial screening, neither roots nor leaves extracts of *G. angelica* showed antiviral activity against the animal herpesviruses.

Otherwise, the aqueous extract of the *G. angelica* seeds (AEs) demonstrated antiviral activity against the three animal herpesviruses. This could be attributed to the presence of compounds such as proteins and peptides and flavonoids, known for their antiviral properties (Cowan, 1999; Jassim & Naji, 2003). As regard the antiviral activity specifically from seed extracts, many studies have been published both on human and other animal viruses (Wei et al., 2004;

Gonçalves et al., 2005; Özcelik et al., 2005; Soltan & Zaki, 2009). Against the herpesviruses studied here, Lombardo et al. (2004) described an inhibition of BoHV-1 by proteins extracted from seeds of *Senna occidentalis*. Camargo Filho et al. (2008) isolated a peptide from *Sorghum bicolor* with virucidal activity against diverse viruses including BoHV-1.

The results obtained with the seeds of *G. angelica* were promising in the first level and moved us to continue their studies. AEs was also evaluated by MTT method in order to obtain its SI. The SI is fundamental to discard any possible toxic effect of the extract on the cells that could be confused with an antiviral activity. According with the SI value, it can conclude that the antiviral activity of a plant extract is true and not a result of its cytotoxic effect on cells, so expresses a safety index of the material tested. Moreover, an antiviral activity is relevant when the extract tested has IC₅₀ values bellow 100 µg/mL (Cos et al., 2006). Taken together the IC₅₀ and SI values of AEs extract are in accordance with these data encouraging its further bioassay-guided fractionation to identify the compounds responsible for its antiviral effects.

Conclusion

This is the first description of antiviral activity of *G. angelica*. The inhibition of the three animal herpesviruses by its seed extract demonstrate a broad antiherpesviral spectrum and makes of this plant a promising source of antivirals.

Acknowledgments

The authors are thankful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for the fellowship to Alyne V. Barros. We also thank Dra. Luciana K. Kohn for technical assistance in MTT assay.

References

- Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PFF, Barbosa-Filho JM 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 18 (3): 472-508.
- Aquino R, De Simone F, Pizza C, Cobti C, Stein ML 1989. Plant metabolites. Structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. *J Nat Prod* 52 (4): 679-685.
- Bispo NJ, Francisco NMC, Schmitt AC 2007. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato metanólico da planta *Guettarda angelica* sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas. *Laes and Haes* 4: 164-169.
- Brandão GC, Kroon EG, dos Santos JR, Stehmann JR, Lombardi JA, de Oliveira AB 2010. Antiviral activities of plants occurring in the state of Minas Gerais, Brazil. Part 2. Screening Bignoniaceae species. *Rev Bras Farmacogn* 20 (5): 742-750.
- Camargo Filho I, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP 2008. Antiviral activity and mode of action of a peptide isolated from *Sorghum bicolor*. *Phytomedicine* 15: 202-208.
- Chattopadhyay D, Naik TN 2007. Antivirals of ethnomedicinal origin: structure-activity relationship and scope. *Mini Rev Med Chem* 7: 275-301.
- Cos P, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D, Maesa L 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol* 106: 290-302.
- Cowan MM 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12 (4): 564-582.
- De Clercq E 1982. Specific targets for antiviral drugs. *Biochem J* 205: 1-13.
- del Barrio G, Parra F 2000. Evaluation of the antiviral activity of an extract from *Phyllanthus orbicularis*. *J Ethnopharmacol* 7: 317-322.

Felipe AMM, Rincão VP, Benati FJ, Linhares REC, Galina KJ, Toledo CEM, Lopes GC, Mello JCP, Nozawa C 2006. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on Poliovirus and Bovine Herpesvirus. *Biol Pharm Bull* 29 (6): 1092-1095.

Garré B, Van Der Meulen K, Nugent J, Neyts J, Croubels S, De Backer P, Nauwynch H 2007. In vitro susceptibility of six isolates of equine herpesvirus 1 to acyclovir, ganciclovir, cidofovir, adefovir, PMEDAP and foscarnet. *Vet Microbiol* 122: 43-51.

Gonçalves JL, Lopes RC, Oliveira DB, Costa SS, Miranda MM, Romanos MT, Santos NS, Wigg MD 2005. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. *J Ethnopharmacol* 99 (3): 403-407.

Hsuan SL, Chang SC, Wang SY, Liao TL, Jong TT, Chien MS, Lee WC, Chen SS, Liao JW 2009. The cytotoxicity to leukemia cells and antiviral effects of *Isatis indigotica* extracts on pseudorabies virus. *J Ethnopharmacol* 123: 61-67.

Ikuno AA, Braggio MM, Haraguchi M 2003. Antiherpes activities of fractions from *Sesbania virgata* leaves. *Arq Inst Biol* 70 (2): 183-185.

Jassim SAA, Naji MA 2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J Appl Microbiol* 95: 412-427.

Lombardo M, Ikuno AA, Ferreira VCA, Kiyota S 2004. Cytotoxicity and antiviral activities of protein or peptide toxins present in the purification products of active protein fraction from *Senna occidentalis* seeds extracts. *Arq Inst Biol* 71 (supl): 466-469.

Martim KW, Ernest E 2003. Antiviral agents from plants and herbs: a systematic review. *Antiviral Ther* 8 (2): 77-90.

Melo FL, Benati FJ, Roman Jr WAR, Mello JCP, Nozawa C, Linhares REC 2008. The in vitro antiviral activity of an aliphatic nitro compound from *Heteropteris aphrodisiaca*. *Microbiol. Res* 163: 136-139.

Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ 1999. Herpesviridae. In: _____ (eds.) *Veterinary virology*, 3 ed., Academic Press. p.301-325.

Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E 2007. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res* 38: 181-209.

Ostlund E 1993. The equine herpesviruses. *Vet Clin North Am: Equine Pract* 9: 283-94.

Özcelik B, Aslan M, Orhan I, Karaoglu T 2005. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophilic extracts of *Pistacia vera*. *Microbiol Res* 160 (2): 159-164.

Rates SMK 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39: 603-613.

Reed LJ, Muench H 1938. A simple method of estimating fifty per cent and point. *Am J Hyg* 27: 493-497.

Simoni IC, Manha APS, Scilessere L, Hoe VMH, Takinami VH, Fernandes MJB 2007. Evaluation of the antiviral activity of Brazilian cerrado plants against animal viruses. *Virus Rev Res* 12 (1-2): 25-31.

Soltan MM, Zaki AK 2009. Antiviral screening of forty-two Egyptian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 126: 102-107.

Summerfield A, Keil GM, Mettenleiter TC, Rziha HJ, Saalmüller A 1997. Antiviral activity of an extract from leaves of the tropical plant *Acanthospermum hispidum*. *Antiviral Res* 6: 55-62.

The New York Botanical Garden, Rubiaceae. <http://sweetgum.nybg.org/vh/specimen.php?irn=10215> acesso em Novembro 2006.

Thiry E, Vindevogel H, Leroy P, Pastoret PP, Schwers A, Brochier B, Anciaux Y, Hoyois P 1983. In vivo and in vitro effect of acyclovir on pseudorabies virus,

infectious bovine rhinotracheitis virus and pigeon herpesvirus. *Ann Rech Vet* 14 (3): 239-245.

Wei F, Ma SC, Ma LY, But PP, Lin RC, Khan IA 2004. Antiviral flavonoides from seeds of *Aesculus chinensis*. *J Nat Prod* 67 (4): 650-653.

Zandonai RH, Coelho F, Ferreira J, Mendes AKB, Biavatti MW, Niero R, Filho VC, Bueno EC 2010. Evaluation of the proliferative activity of methanol extracts from six medicinal plants in murine spleen cells. *Braz J Pharm Sci* 46 (2): 323-33.

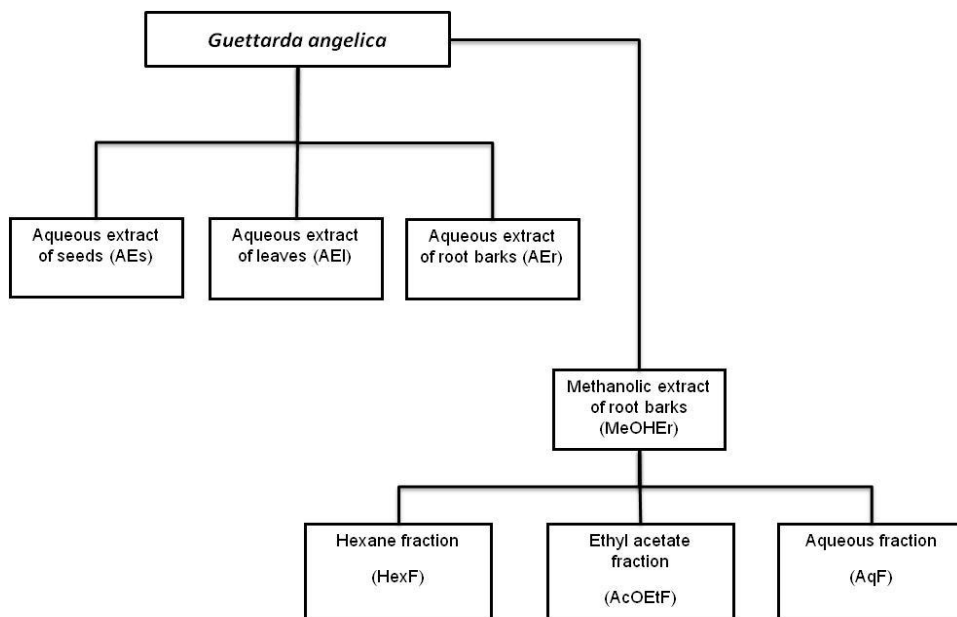


Figure 1. Preparation of extracts and fractions from *Guettarda angelica*.

Table 1. Cytotoxicity of *Guettarda angelica* extracts and fractions and their antiviral activity against bovine (BoHV-1), swine (SuHV-1) and equine (EHV-1) herpesviruses 1.

Extracts	MNCC ($\mu\text{g/mL}$)		VII*		
	Vero Cells	MDBK Cells	BoHV-1	SuHV-1	EHV-1
AEr	500	250	0.57	0.11	0.69
MeOHEr	312	200	0	0.62	0.60
AqF	1,250	1,600	0.50	0.50	0.50
AcOEtF	1,250	1,600	1.13	0	0.56
HexF	80	50	0	0	0.13
AEI	1,250	800	0.63	0.24	1.13
AEs	625	400	2.30	2.72	1.60

AEr: aqueous extracts from root barks; MeOHEr: ethanolic extract from root barks; AqF(aqueous), AcOEtF (ethyl acetate), and HexF(hexane) fractions from MeOHEr fractionation; AEI: aqueous extracts from leaves; AEs: aqueous extracts from seeds. MNCC: maximum non-cytotoxic concentration; VII: viral inhibition index; * $p < 0.01$ by Anova followed by Tukey test.

Table 2. Selectivity index (SI), and cytotoxic and antiviral activities of aqueous extract from *Guettarda angelica* seeds (AEs) against bovine (BoHV-1), swine (SuHV-1) and equine (EHV-1) herpesviruses 1 by MTT assay.

Extract	Vero cells	MDBK cells	BoHV-1		SuHV-1		EHV-1	
	CC ₅₀ (µg/mL) ^a		IC ₅₀ (µg/mL) ^b	SI ^c	IC ₅₀ (µg/mL)	SI	IC ₅₀ (µg/mL)	SI
AEs	400.60 ±	920.50 ±	22.79 ± 0.04	40.39	91.30 ± 0.03	10.08	19.95 ± 0.01	20.08

^a50% cytotoxic concentration; ^b50% inhibitory concentration; ^c ratio of CC₅₀ to IC₅₀.

CAPÍTULO 2

Antiviral evaluation of *Guettarda angelica* Mart. ex Müll. Arg.

(*Rubiaceae*) on avian viruses

Alyne Vieira Barros, Aline Oliveira da Conceição, Isabela Cristina Simoni, Marina Aiello Padilla, Maria Judite Bittencourt Fernandes, Clarice Weis Arns

(Artigo em preparação)

**Antiviral evaluation of *Guettarda angelica* Mart. ex Müll. Arg.
(*Rubiaceae*) on avian viruses**

Alyne Vieira Barros^{a,c}, Aline Oliveira da Conceição^b, Isabela Cristina Simoni^a,
Marina Aiello Padilla^{a,c} Maria Judite Bittencourt Fernandes^a, Clarice Weis Arns^{c*}

^aCentro de P&D de Sanidade Animal, Instituto Biológico, São Paulo, CP 12898, SP, Brazil

^bUniversidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, CP 45662-000, BA, Brazil

^cUniversidade Estadual de Campinas, Campinas, CP 6109, SP, Brazil

**Corresponding author at: Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia Unicamp, – UNICAMP, Campinas, Brazil. P.O. Box 6109, CEP 13081-970, Campinas, SP, Brazil. Phone: +55 19 3521-6267, E-Mail address: clarns@gmail.com*

ABSTRACT

Natural products, specially plants, are an inexhaustible source of compounds with promising biological activities, including antiviral action. The cytotoxic and antiviral activities of root barks, leaves and seeds from *Guettarda angelica* Mart. ex Müll. Arg. (*Rubiaceae*) were evaluated against two avian viruses: reovirus (ARV) and metapneumovirus (aMPV). Initial studies by reduction method of viral titer demonstrated that only the aqueous extract from seeds (AEs) showed an antiviral activity against the ARV. From this, the AEs extract was further evaluated by quantitative colorimetric MTT method to determine the 50% cytotoxic concentration (CC_{50}), 50% inhibitory concentration (IC_{50}) and the selectivity index (SI) (CC_{50}/IC_{50}). The CC_{50} , IC_{50} and SI values of AEs extract were 400.60, 23.59 and 17.00, respectively. These results demonstrated that the seeds from *G. angelica* inhibited to ARV infection with low toxicity. Studies more detailed should be continued in order to elucidate the mechanism of action and to isolate the active principle responsible for this activity.

Key-words: *Guettarda angelica*; avian reovirus; avian metapneumovirus; antiviral activity; MTT method.

1. Introduction

The use of natural products began there thousands of years with the purpose to treat several diseases and as an alternative or complement to synthetic drugs. Particularly the plants have an important role in global health and despite advances in modern medicine is estimated that about 25% to 30% of all drugs evaluated as therapeutic agents are derived from natural products (Cordell, 1995; Rates, 2001, Newman *et al.* 2003; Calixto, 2000; Veiga Jr. and Mello, 2008).

Guettarda angelica Mart. ex Müll. Arg. known as “Angélica do mato” is a member of Rubiaceae family and found in Caatinga regions of the northeast of Brazil (Flora Brasiliensis, 2011). The traditional therapeutic usage of its root barks includes the treatment of anemia, dyspepsia, typhoid, yellow and puerperal fevers; in veterinary medicine, it is used against fever and to “cure” bovine and equine diarrhea (Herbarium, 2011). Specifically, in our previous studies it showed an antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Salmonella* spp (Bispo *et al.*, 2007) and their seeds presented an antiviral activity against animal herpesviruses (Barros *et al.*, 2011).

The viral infections are associated with considerable economic losses and animal welfare problems in commercial turkey and chicken flocks. Avian reovirus (ARV), member of the *Reoviridae* family, *Orthoreovirus* genus, is an RNA virus and an important pathogen of birds (Rosenberger *et al.*, 1989; Attoui *et al.*, 2000; Mertens, 2004). This virus was initially discovered as pathogenic agent that induced viral arthritis syndrome or tenosynovitis in young chickens. Subsequently, it was found to be ubiquitous among poultry flocks causing in the most asymptomatic infections. ARV has also been associated with a variety of others illness including enteric and respiratory diseases, myocarditis, hepatitis and the malabsorption syndrome. Meanwhile, a direct relation between the presence of the virus and the disease has only been conclusively demonstrated for the tenosynovitis (Jones, 2000; van der Heide, 2000).

Avian metapneumovirus (aMPV), also called turkey rhinotracheitis virus, is classified in the *Paramyxoviridae* family, *Pneumovirinae* subfamily, within the new genus *Metapneumovirus* (Fauquet et al., 2005). The aMPV, an RNA virus, causes an upper respiratory tract infection in turkeys and in some other avian species is involved in the etiology of multi-factorial disease such as swollen head syndrome of chickens (Gough and Jones, 2008). The infection for aMPV is also associated to egg drop in turkeys and ducks (Gough, 2003).

The most effective strategy to prevention of viral diseases is vaccination, which can provides resistance to infections, as well as synthetic antiviral drugs. However, there is still great need to develop new antiviral drugs that can substitute for or complement therapy with currently available drugs (Cos *et al.*, 2006; Chattopadhyay and Naik, 2007; Orhan *et al.*, 2009). Therefore, new types of antiviral agents from natural sources, especially those that have high efficacy on resistant mutant viral strains and low toxicity to host, are considered to be most promising (Cordell, 1995; Cowan, 1999; Rates, 2001; Jassim and Naji, 2003).

Thus, the present investigation was the antiviral evaluation of *Guettarda angelica* Mart. against avian reovirus and metapneumovirus.

2. Material and Methods

2.1 Plant material

Guettarda angelica Mart. ex Müll. Arg. was collected on December 2003, in Jequié, State of Bahia, Brazil. The voucher specimen was deposited in the Herbarium of the Centro de Pesquisa do Cacau, in the state of Bahia (NY Specimen ID: 1015301).

2.2 Preparation of extracts

The preparation of crude aqueous extracts from seeds (AEs), leaves (AEI) and root barks (AEr) from *Guettarda angelica* as well as its methanolic extract from the root barks (MeOHEr) and respective fractions: hexane (HexF), ethyl acetate (AcOEtF) and aqueous (AqF) are described in Barros *et al.* (2011).

Finally, all freeze-dried fractions and extracts were solubilised in equal parts of distilled water and Earle minimum essential medium (MEM-Vitrocell) twice concentrated to obtain a final concentration of 5 mg/mL excepting for the EAR which was solubilised at 4 mg/mL. After that, they were sterilized by filtration (0.22 µm filter) and stored at -20 °C.

2.3 Cell line and Viruses

African green monkey kidney cells – Vero - were maintained in Eagle's medium (MEM) enriched with 10% fetal calf serum. To perform the tests, the cells were seeded in 96 sterile microplates at 3×10^4 cells/well and incubated at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere for 24 h. The S1133 strain (Biovet) of avian reovirus (ARV) and SHS-BR-121 strain of avian metapneumovirus (aMPV).

2.4 Cytotoxicity assays

After 24 h of cell monolayer, the medium was removed and the Vero cells were treated with 100 µL of decreasing concentrations of plant extracts and fractions, ranging from 2.5 to 0.005 mg/mL except for AEr which was from 2.0 to 0.004 mg/mL. The toxicity of the extracts and fractions was tested by two methods.

1. Morphological changes were observed until 96 h after the treatment by inverted light microscopy for the purpose of determine the maximum non-citotoxic concentration (MNCC) (Simoni *et al.*, 2007). 2. MTT assay was performed as previously described by Mosmann (1983) and Zandonai *et al.* (2010), with minor modifications. Briefly, between 48 to 72h of incubation of extracts and fractions in Vero cells, the medium was removed and 50 μ L of MTT solution (1 mg/mL, Sigma) prepared in MEM was added to each well of microplate and it was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 4 hours. This solution was converted by mitochondrial succinate dehydrogenase enzyme into insoluble formazan. The MTT solution was removed and replaced with 100 μ L of Sodium dodecyl sulfate (SDS - Merck®) in 10% HCl 0.001N to dissolve formazan crystals. After overnight incubation at 37 $^{\circ}$ C, the absorbance was measured at 540 nm by using spectrophotometer (Spectra Max Plus 384), indicating the metabolic activity of the cells. The 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) was defined as the material concentration which caused a 50% reduction in the number of viable cells (Cos *et al.*, 2006). The controls to both methods consisted of the cells incubated with MEM only.

2.5 Antiviral activity assays

2.5.1 Viral titer reduction assay

The antiviral activity of plant extracts was performed by evaluating the cytopathic effect (CPE). Briefly, 24 h after cell monolayer, the medium was replaced by 100 μ L of extracts at dilutions corresponding to each MNCC and the microplates were incubated for 1 h. After this period, 50 μ L of logarithmic dilutions of each virus were added in triplicate and the microplates were incubated again. Controls consisted of untreated infected (virus titer) and untreated non-infected (cell control) cells. The cells were observed for the presence of CPE every day up to 4-6 days after treatment. The viral titers were determined by 50% infective dose

in tissue culture-TCID₅₀ (Reed and Muench, 1938) and the antiviral activities expressed as viral inhibition index (VII) were calculated by the difference between the viral titer in treated infected cells (T) and control infected cells (C). The plant extract was considered inhibitor when the VII was ≥ 1.5 (Simoni *et al.*, 2007).

2.5.1 MTT assay

After 24 h cell monolayer, the medium was replaced by 100 μ L of decreasing concentrations of plant extracts and 100 μ L of virus suspension (200 TCID), in quadruplicate. After that, the microplates were incubated for 48 h. Viral control consisted of the cells incubated with MEM and virus. Cell viability was evaluated by MTT colorimetric assay as described above for the cytotoxicity assay. The IC₅₀ (50% inhibitory concentration) was defined as the concentration of the material that inhibited 50% of viral replication when compared to virus control. The SI (selectivity index) was calculated from the ratio CC₅₀/IC₅₀ (Cos *et al.*, 2006).

2.6 Data analysis

All data were analyzed using the GraphPad Prism 5 to obtaining of the CC₅₀ and IC₅₀ values. These values were obtained from nonlinear regression analysis of concentration-effect curves and represent mean \pm standard deviation of three independent experiments.

3. Results

3.1 Cytotoxicity

The assays to evaluate the cytotoxic concentration of the extracts and fractions were performed before the antiviral activity assay. In Table 1 is described the values of the maximum non-cytotoxic concentration (MNCC) of the each plant extract and fraction of *G. angelica* that was established by cell morphological alterations. The HexF fraction showed a higher toxicity to Vero cells, with MNCC in the values of 80 µg/mL, when compared to other extracts and fractions of *G. angelica*. Meanwhile, the AEI extracts and the AqF and AcOEtF fractions presented a lower toxicity to cells with MNCC of 1,250 µg/mL. The remainder of the extracts (AEr, MeOHEr and AEs) showed MNCC varying from 625 µg/mL to 312 µg/mL. Only AEs extract was also analyzed by MTT method in which obtained CC₅₀ of 400.60 to Vero cells (Table 2).

3.2 Antiviral activity assays

The antiviral activity evaluation of plant extracts and fractions of *G. angelica* was held in Vero cells infected with ARV and aMPV. The screening test illustrated in Table 1 showed that only AEs extract presented an antiviral activity against ARV with VII of 3.24. The remaining extracts and fractions obtained VII lower to 1.5 for ARV and aMPV (Table 1). Therefore, the AEs extract was evaluated by MTT method. This extract was effective against ARV with IC₅₀ and SI values of 23.59 µg/mL and 17.00, respectively (Table 2).

4. Discussion

In research of biological activity of plants extracts or fractions should be included a preliminary study of toxicity to ensure its use therapeutic. The factors of quality, safety and efficacy of the material tested are essential requirements and of extreme importance.

The antiviral screenings are made firstly in cell cultures. The cells are great tools that allow a detailed study of viral diseases (Jassim and Naji, 2003; Cos et al., 2006). In this work, the metapneumovirus avian (aMPV) that is usually propagated in the CER cells, was adapted in Vero cells in order to standardization assay the viruses strains (ARV and aMPV) in the same cell line. Both virus strains used were successfully propagated to the Vero cell line featuring the characteristic CPE of each virus (Robertson and Wilcox, 1986; Goyal *et al.*, 2000; Cook, 2000; Easton *et al.*, 2004). Thus, we established the MNCC values of extracts and fractions from *G. angelica* in Vero cell cultures. The MNCC value of HexF was lower than the others materials. Comparatively, it could be attributed high degree of toxicity to this fraction, but for application purposes, the most important is to use an extract or fraction in a concentration below its toxic concentration regardless of which it is.

The antiviral activity screening of this study was based on inhibition of CPE by inverted light microscopy to determine the viral inhibition index (VII) through of the difference between the viral titers (Koseki *et al.*, 1990; Özcelik *et al.*, 2006; Simoni *et al.*, 2007). None root barks and leaves materials from *G. angelica* presented an antiviral activity against the ARV and aMPV although the roots have presented an antibacterial activity against Gram-positive bacteria (Bispo *et al.*, 2007). There are few reports in literature of the antiviral activity of roots or stem barks and leaves of other plant families against the ARV and aMPV. Meyer *et al.* (1997) studying in vitro antiviral activity of galangin, a compound isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*, verified an inhibition of ARV. Simoni *et al.* (2007) observed an antiviral activity against ARV of aqueous extracts of leaves

from *Lithraea molleoides* and *Gochnatia polymorpha*. Three different Chestnut (*Castanea* spp.) and one Quebracho (*Schinopsis* spp.) wood extracts were tested for antiviral activity against ARV and aMPV. All compounds had an extracellular antiviral effect against both viruses and Quebracho extracts had also intracellular anti-ARV activity (Lupini *et al.*, 2009).

Unlike, the AEs (aqueous extracts of seeds) from *G. angelica* only showed an antiviral activity against ARV. Thus, the study of EAs extract was continued in order to elucidate the CC₅₀ (the 50% cytotoxic concentration) and IC₅₀ (the 50% inhibitory concentration) values and consequently the determination of the selectivity indexes (SI= CC₅₀/IC₅₀). When comparing the results of cytotoxicity between the microscopic visualization and MTT assays was observed small differences in values, but not significant. Although the assay of microscopy is a subjective test, it is appropriate in the screening tests. The MTT, tetrazolium salt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), assay is a more accurate and sensitive method for the quantification of cell viability and evaluation of the antiviral activity. This assay involves the ability of viable cells to convert a soluble tetrazolium salt into an insoluble formazan precipitate (Slater *et al.*, 1963; Mosmann, 1983). The AEs extract obtained IC₅₀ ≤ 25 µg/mL and SI ≥ 17 against ARV. According to Amoros *et al.* (1992) and Cos *et al.* (2006), a relevant and selective antiviral activity of natural products relates to IC₅₀ values below 100 µg/mL for extracts and SI > 4 for extracts. So, this study demonstrated that the results are in accordance with these data and the AEs extract is promising for future studies more detailed like the mechanisms of action, fractionation techniques to isolate and purify the active principle, etc.

In our previous paper (Barros *et al.*, 2011), the aqueous extracts of seeds from *G. angelica* presented effective antiviral activity against other animal viruses as bovine, swine and equine herpesviruses type 1. Many reports on the effect of compounds and extracts from the seed of diverse plant families against viral infections have been published (Tailor *et al.*, 1997; Shahat *et al.*, 2001; Özçelik *et al.*, 2005; Gonçalves *et al.*, 2005; Camargo Filho *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009;

Javed *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011). However, there are no reports of the antiviral activity of seeds of other plants against ARV and aMPV. Therefore, the seeds from *G. angelica* could be promising source of new antiviral agents since it showed antiviral activity against the DNA or RNA viruses, enveloped or not enveloped.

Acknowledgements

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for the fellowship to Alyne Vieira Barros, and to Dra. Luciana K. Kohn by technical assistance in MTT assay.

5. References

- Attoui, H., Billoir, F., Biagini, P., de Micco, P. & de Lamballerie, X. 2000 Complete sequence determination and genetic analysis of Banna virus and Kadipiro virus: proposal for assignment to a new genus (Seadornavirus) within the family Reoviridae. *J. Gen. Virol.* 81, 1507–1515.
- Bispo, N.J., Francisco, N.M.C., Schmitt, A.C. 2007 Atividade antimicrobiana in vitro do extrato metanólico da planta *Guettarda angelica* sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas. *Laes and Haes* 4, 164 - 169.
- Calixto, J.B. 2000 Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 179-189.
- Camargo Filho, I., Cortez, D.A.G., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P. 2008 Antiviral activity and mode of action of a peptide isolated from *Sorghum bicolor*. *Phytomedicine* 15, 202-208.
- Chattopadhyay, D. and Naik, T.N. 2007 Antivirals of ethnomedicinal origin: structure-activity relationship and scope. *Mini Rev. Med. Chem.* 7, 275-301.
- Chen, Q.J., Ouyang, M.A., Tan, Q.W., Zhang, Z.K., Wu, Z.J., Lin, Q.Y. 2009 Constituents from the seeds of *Brucea javanica* with inhibitory activity of Tobacco mosaic virus. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 11(6), 539-547.
- Cook, J.K.A. 2000 Avian Pneumovirus infections of turkeys and chickens. *Vet. J.* 160, 118-125.
- Cordell, G.A. 1995 Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry* 40, 1585-612.

- Cos, P., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D., Maesa, L. 2006 Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J. Ethnopharmacol.* 106, 290–302.
- Cowan, M.M. 1999 Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiological Review* 12 (4), 564-582.
- Easton, A.J.; Domachowske, J.B.; Rosenberg, H.F. 2004 Animal Pneumoviruses: Molecular Genetics and Pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 17(2), 390–412.
- Fauquet, C.M.; Mayo, M.A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball, L.A. Virus taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam: Elsevier Academic, 2005. 1162p.
- Flora Brasiliensis, A Obra. Vol. VI, Part V, Fasc. 84 Coluna 21 – 22. http://florabrasiliensis.cria.org.br/search?taxon_id=10814. Accessed March, 15th, 2011.
- Gonçalves, J.L., Lopes, R.C., Oliveira, D.B., Costa, S.S., Miranda, M.M., Romanos, M.T., Santos, N.S., Wigg, M.D. 2005 In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. *J. Ethnopharmacol.* 99 (3), 403-407.
- Gough, R.E. Avian pneumoviruses. In: SAIF, Y.M. Diseases of poultry. Ames: Iowa State, 2003. p.92-99.
- Gough, R. E. and Jones, R. C. Avian metapneumovirus. In Saif Y.M. Diseases of Poultry. 12th ed. Blackwell. 2008. P. 100-110.
- Goyal, S.M.; Chiang, S.J.; Dar, A.M.; Nagaraja, K.V.; Shaw, D.P.; Halvorson, D.A.; Kapur, V. 2000 Isolation of avian pneumovirus from an outbreak of respiratory illness in Minnesota turkeys. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12, 166-168.

Herbarium. Available on: http://www.coluna-da-sal.com/herbarium/herba_1a_2.htm.
Accessed March, 15th, 2011.

Jassim, S.A.A. and Naji, M.A. 2003 Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J. Appl. Microbiol.* 95, 412-427.

Javed, T., Ashfaq, U.A., Riaz, S., Rehman, S., Riazuddin, S. 2011 In-vitro antiviral activity of *Solanum nigrum* against Hepatitis C Virus. *Viol. J.* 95, 412-427.

Jones, R.C. 2000 Avian reovirus infections. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 19, 614-625.

Koseki, I., Simoni, I.C., Nakamura, I.T., Noronha, A.B., Costa, S.S. 1990 Antiviral activity of plant extracts against aphthovirus, pseudorabies virus and pestivirus in cell cultures. *Microbios Letters* 44, 19-30.

Lee, J.B., Yamagishi, C., Hayashi, K., Hayashi, T. 2011 Antiviral and Immunostimulating Effects of Lignin-Carbohydrate-Protein Complexes from *Pimpinella anisum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75 (3), 459-465.

Lupini, C., Cecchinato, M., Scagliarini, A., Graziani, R., Catelli, E. 2009 In vitro antiviral activity of chestnut and quebracho woods extracts against avian reovirus and metapneumovirus. *Research in Veterinary Science* 87, 482-487.

Mertens, P. 2004 The dsRNA viruses. *Virus Res* 101, 3–13.

Meyer, J.J.M., Afolayan, A.J., Taylor, M.B., Erasmus, D. 1997 Antiviral activity of galangin isolated from the aerial parts of *Helichrysum aureonitens*. *Journal of Ethnopharmacology* 56 (2), 165-169.

Mossmann, T. 1983 Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.

Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. 2003 Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66, 1022-1037.

- Orhan, G., Orhan, I., Subutay-Oztekin, N., Ak, F., Sener, B. 2009 Contemporary anticholinesterase pharmaceuticals of natural origin and their synthetic analogues for the treatment of Alzheimer's disease. *Recent. Pat. CNS. Drug. Discov.* 4, 43-51.
- Özçelik, B., Aslan, M., Orhan, I., Karaoglu, T. 2005 Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophylic extracts of *Pistacia vera*. *Microbiol. Res.* 160 (2), 159-164.
- Özçelik, B., Orhan, I., Toker, G. 2006 Antiviral and antimicrobial assessment of some selected flavonoids. *Z. Naturforsch.* 61c, 632-638.
- Rates, S.M.K. 2001 Plants as source of drugs. *Toxicon.* 39, 603-613.
- Reed, L.J. and Muench, H. 1938 A simple method of estimating fifty per cent and point. *Am. J. Hyg.* 27, 7-493.
- Robertson, M.D. and Wilcox, G.E. 1986 Avian reovirus. *Vet. Bull.* 56,155-174.
- Rosenberger, J. K.; Sterner, F.J.; Botts, S.; Lee, K.P.; Margolin, A. 1989 Pathogenicity and antigenic relatedness of several avian reovirus isolates: in vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. *Avian Diseases* 33, 535-544.
- Shahat, A.A., Pieters, L., Apers, S., Nazeif, N.M., Abdel-Azim, N.S., Berghe, D.V., Vlietinck, A.J. 2001 Chemical and biological investigations on *Zizyphus spina-christi* L. *Phytother. Res.* 15 (7), 593-7.
- Simoni, I.C., Manha, A.P.S., Sciessere, L., Hoe, V.M.H., Takinami, V.H., Fernandes, M.J.B. 2007 Evaluation of the antiviral activity of Brazilian cerrado plants against animal viruses. *Virus Rev. Res.* 12 (1-2), 25-31.
- Slater, T.F., Sawyer, B., Strauli, U. 1963 Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim. Biophys. Acta.* 77, 383.

- Taylor, R.H., Acland, D.P., Attenborough, S., Cammue, P.A., Evans, I.J., Osborn, R.W., Ray, J.A., Rees, S.B., Broekaert, W.F. 1997 A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from single precursor protein. *J. Biol. Chem.* 272 (39), 24480-24487.
- Van der Heide, L. 2000 The history of Avian Reovirus. *Avian Diseases* 44, 638-641.
- Veiga Junior, V.F., Mello, J.C.P. 2008 As monografias sobre plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18, 464-471.
- Zandonai, R.H., Coelho, F., Ferreira, J., Mendes, A.K.B., Biavatti, M.W., Niero, R., Filho, V.C., Bueno, E.C. 2010 Evaluation of the proliferative activity of methanol extracts from six medicinal plants in murine spleen cells. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 46 (2), 323 – 333.

Table 1. Cytotoxicity of *Guettarda angelica* extracts and fractions and their antiviral activity against avian reovirus (ARV) and metapneumovirus (aMPV).

Extracts and Fractions	MNCC ($\mu\text{g/mL}$)	VII	
	Vero Cells	ARV	aMPV
AEr	500	0.26	0.42
MeOHEr	312	0.76	0.42
AqF	1,250	0.76	0.30
AcOEtF	1,250	0.76	0.17
HexF	80	0	0.67
AEI	1,250	0	0.29
AEs	625	3.24	0.67

Maximum non-citoxic concentration (MNCC); viral inhibition index (VII); Aqueous extracts from seeds (AEs); aqueous extracts from leaves (AEI); aqueous extracts from root barks (AEr); ethanolic extract from root barks (MeOHEr); hexane (HexF), ethyl acetate (AcOEtF), and aqueous(AqF) fractions from MeOHEr fractionation.

Table 2. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀), the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) and selectivity index (SI) of aqueous extract of seeds from *Guettarda angelica* against avian reovirus by MTT method.

<i>Guettarda angelica</i>	
Aqueous extract of seeds (AEs)	
CC ₅₀ (µg/mL)	400.60 ± 0.11*
IC ₅₀ (µg/mL)	23.59 ± 0.04*
SI (CC ₅₀ /IC ₅₀)	17.00

*represent mean ± standard deviation values of three experiments

4. DISCUSSÃO GERAL

O Brasil possui uma medicina popular rica e original, na qual o uso de plantas ocupa lugar de destaque. Isto se deve ao fato do país ser detentor da maior biodiversidade do planeta, com aproximadamente 20-22% de todas as plantas e microorganismos existentes, além da assimilação dos conhecimentos indígenas, integrado às contribuições trazidas pelos escravos e imigrantes (Simões et al., 1999; Guerra et al., 1998). Esta ampla biodiversidade, combinada com a introdução de modelos biológicos in vitro em grande escala, propiciaram avanços significativos no estudo de novos fármacos (Houghton, 2000; Nielsen, 2002).

As doenças infecciosas de origem viral representam um importante problema de saúde mundial tanto na área humana como animal. Embora a procura por novos fármacos antivirais seja intensa e de extrema importância, os avanços são insuficientes, já que a maioria destes possui aplicações limitadas e pouco satisfatórias, e podem produzir efeitos colaterais adversos. Além disso, pode ocorrer o surgimento de resistência aos medicamentos antivirais disponíveis, portanto é indispensável pesquisas com o intuito de descobrir novas alternativas terapêuticas efetivas para doenças virais humanas e veterinárias à base de compostos naturais com potente atividade antiviral e baixa toxicidade (Hasui et al., 1995; Benencia e Courreges, 1999; Reborá, 2002).

Para os testes da atividade antiviral, foi necessário primeiramente determinar a citotoxicidade dos extratos e frações de *Guettarda angelica*, pois esta pode ser

confundida com uma falsa atividade antiviral, uma vez que ambas levam à morte celular. Isso permitiu que o teste de atividade antiviral fosse realizado em concentrações subtóxicas determinando-se a CC_{50} (concentração citotóxica a 50%) e também a MNCC (concentração máxima não citotóxica) para cada material testado. A partir disso, os extratos e frações obtidos da espécie *G. angelica* foram avaliados quanto a sua atividade antiviral frente a cinco vírus de grande importância na medicina veterinária (BoHV-1, SuHV-1, EHV-1, ARV e aMPV), levando-se em consideração o grau de alteração da monocamada celular nas células Vero e MDBK.

Na literatura é possível observar diversos trabalhos científicos evidenciando a ação antiviral de extratos brutos e frações obtidas a partir de plantas, e componentes isolados contra estes herpesvírus animais e para humanos também; e alguns para determinados vírus aviários (reovírus e metapneumovírus). Dos extratos e frações de *G. angelica* analisados no presente estudo, apenas o extrato aquoso de semente (AEs) apresentou uma atividade antiviral significativa para os vírus BoHV-1, SuHV-1, EHV-1 e ARV. Além disso, este extrato se mostrou com baixa toxicidade, variando entre 400-625 $\mu\text{g/mL}$, para as linhagens celulares Vero e MDBK.

As raízes de *Guettarda angelica* apesar de não apresentarem atividade antiviral para os vírus estudados neste trabalho, são descritas na literatura como um possível agente antimicrobiano. Araújo (2006) observou que raiz de *G. angelica* apresenta uma atividade antibacteriana. E no gênero *Guettarda* há

também estudos sobre a atividade antiviral de glicosídeos isolados da raiz de *G. platypoda* frente aos vírus da estomatite vesicular e rinovírus (Aquino et al., 1989).

Segundo Ikuno et al. (2003), frações obtidas do extrato etanólico das folhas de *Sesbania virgata* apresentaram um efeito antiherpético contra herpesvírus bovino e suíno. Um trabalho desenvolvido por Ahamd et al. (1996) demonstrou que o extrato da planta *Opuntia streptacantha* inibiu significativamente a replicação intracelular dos herpesvírus animais EHV-1 e SuHV-1. Além disso, este extrato também apresenta uma atividade antiviral satisfatória frente aos herpesvírus humanos, como o Citomegalovírus e Vírus sincicial respiratório. Segundo Lupini et al. (2009), extratos de castanhas (*Castanea spp.*) e Quebracho (*Schinopsis spp.*) apresentam uma atividade antiviral significativa in vitro frente a reovírus aviário (ARV) e metapneumovírus aviário (aMPV). Os demais materiais testados também não apresentaram atividade antiviral.

As sementes de uma variedade de plantas apresentam diversos compostos ativos, como: proteínas e peptídeos, flavonóides, alcalóides, entre outros.

Um número crescente de peptídeos e antimicrobiano tem sido isolado das plantas e em particular da semente (Tailor et al., 1997). Os flavonóides têm recebido muita atenção devido a sua excelente atividade antioxidante e anti-radical. Estudos têm revelado que os flavonóides são bons “limpadores” de radicais livres, e conseqüentemente, eles são usados muito em indústrias farmacêutica e de alimento. Mas os flavonóides têm também uma gama de outras atividades como antiinflamatória, antialérgica, antimutagênica, antitumoral e inclusive antiviral (Kazazic, 2004). A atividade antiviral de flavonóides naturais é de

conhecimento a mais de 40 anos e muitas pesquisas vêm sendo realizadas. Flavonóides isolados de Rutaceae foram testados frente a vírus DNA e RNA (Simões et al., 1990). Estudos de fracionamento biodirecionados de folhas de *Persea americana* frente à doença de Aujeszky (SuHV-1) indicaram que as frações ricas em flavonóides foram as mais ativas (Almeida et al., 1998). Em Wei et al. (2004), foi possível o fracionamento de extrato etanólico de sementes de *Aesculus chinensis* para isolar dois novos flavonóides que apresentaram uma atividade antiviral frente ao vírus sincicial respiratório e parainfluenza tipo A.

Estes trabalhos mostram a importância deste tipo de pesquisa e corroboram os nossos resultados. A busca por produtos naturais que apresentam atividade antiviral é um dos métodos alternativos, tendo em vista a problemática da terapia antiviral atualmente disponível, principalmente no que consiste ao desenvolvimento de resistência, e as pesquisas nesta área vêm crescendo nas últimas décadas na busca de substâncias bioativas. E as sementes de *G. angelica* são promissoras como fonte de novos agentes antivirais uma vez que se mostrou ativa contra vírus DNA e RNA, envelopados e não envelopados.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- a) Os extratos e frações testados mostraram uma maior toxicidade frente à linhagem celular MDBK quando comparados com a linhagem celular Vero.

- b) Dentre os materiais estudados, extrato aquoso da semente de *Guettarda angelica* apresentou uma atividade antiviral para os três herpesvírus (BoHV-1, SuHV-1, EHV-1) e reovírus aviário.

- c) Os índices de seletividade do extrato aquoso de sementes para os vírus BoHV-1, SuHV-1, EHV-1 e ARV foram maiores que 4 indicando que são promissores como agentes antivirais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackermann MP, Eterhans E, Wyler R. DNA of the bovine herpesvirus type 1 in the trigeminal ganglia of latently infected calves. *Am. J. Vet. Res.* 1982; 43 (1): 36-40.
- Ackermann M, Elak BS, Itsch BV, Dwards ES, Moussa A, Rockborn G. et al. Round table on infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginites virus infection diagnosis and control. *Vet. Microbiol.* 1990a; 23 (1-4): 361-363.
- Ackermann M, Muller HK, Bruchner L, Kihm U. Eradication of infectious bovine rhinotracheitis in Switzerland: review and prospects. *Vet. Microbiol.* 1990b; 23 (1-4): 365-370.
- Ahmad A, Davies J, Randall S, Skinner GR. Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha*. *Antiviral Research.* 1996, 30: 75–85.
- Albuquerque UP, Silva ACO, Andrade LHC. Use of plant resources in a seasonal dry Forest (northeastern Brazil). *Acta Bot. Brasília* 2005, 19: 27-38.
- Alfieri AA, Alfieri AF, Takirichii E, Lobato ZIP. Reoviridae. In: Flores EF. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Ed. UFSM; 2007. p.775-805.
- Almeida AP, Miranda MMFS, Simoni IC, Wigg MD, Lagrota MHC, Costa SS. Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea Americana* (Lauraceae) leaf Infusion. *Phytother. Res.* 1998, 12: 562-567.

Anunciação AVM, Antonio VM, Leite RC, Moreira EC, Reis R. Presença de anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos nos Estados de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro através da prova de hemoaglutinação passiva. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 1989; 41 (5): 433-441.

Aquino, R., De Simone, F., Pizza, C., Cobti, C., Stein, M.L.. Plant metabolites. Structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. *Journal of natural products*. 1989; 52 (4): 679-685.

Ardans AA. Herpesviridae. In: HIRSH DC, ZEE YC. *Microbiologia Veterinária*. São Paulo: Guanabara; 2003. p.330-335.

Arns CW e Hafez HM. Isolation and identification of Avian Pneumovirus from broiler breeder flocks in Brazil. In: M.M. Jensen (Ed) *Proceedings of the 44st Western Poultry Diseases conference*, 1995. Sacramento, California; 1995. p.124-125.

Arns CW, Spilki FR, Almeida RS. Paramyxoviridae. In: Flores EF. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Ed. UFSM; 2007. p.679-682.

Arora P, Dixit NM. Timing the emergence of resistance to anti-HIV drugs with large genetic barriers. *PLoS Comput Biol*. 2009; 3: 305-10.

- Barbosa ACV, Brito WMD, Alfaia B.T. Seroprevalencia and risk factors to the infectious by bovine herpesvirus 1 in Góias state Brasil. *Ciência Rural* 2005; 35 (6): 1368-1373.
- Barroso, G.M. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Vol 3. Minas Gerais: Editora UFV; 1986. 326p.
- Bell IG, Alexander DJ. Failure to detect antibodies to turkey rhinotracheitis vírus in Australian poultry flocks. *Australian Veterinary Journal* 1990; 67: 232-233.
- Benencia F, Courreges MC. Antiviral activity of sandalwood oil against herpes simplex -1 and -2. *Phytomedicine*. 1999, 6 (2): 119-123.
- Bhattacharyya J, Almeida MZ. Isolation of the constituents of the root-bark of *Guettarda platypoda*. *J Nat Prod*. 1985; 48: 148-149.
- Bispo NJ, Costardi NMA, Schmitt AC. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato metanólico da planta *Guettarda angelica* sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas. In *Anais do VII Simpósio de Biologia do Sul da Bahia e V Workshop de Biomedicina*, 2004. Ilhéus, Bahia; 2004.
- Bottino JA, Hipolito D, July JR, Pinto AA. Agente viral isolado de casos de artrite em Frangos de corte e em galinhas de postura. *O Biologico*. 1975, 41: 168-169.

- Buyts SB, Du Preez JH. A preliminary report on the isolation of a virus causing sinusitis in turkey in South Africa and attempts to attenuate the virus. *Turkeys* 1980; 28: 36-46.
- Buyts SB, Du Preez JH, Els HJ. Swollen head syndrome in chickens: a preliminary report on the isolation of a possible aetiological agent. *Journal of South African Veterinary Association* 1989; 60: 221-222.
- Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2000; 33: 179-189.
- Capasso A, Balderrama L, Sivila SC, De Tommasi N, Sorrentino L, Pizza C. Phytochemical and pharmacological studies of *Guettarda acreana*. *Planta Medica*, 64 (4): 348-352, 1998.
- Carvalho ACB, Balbino EE, Maciel A, Perfeito JPS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2008; 18 (2): 314-319.
- Cavalcante FA. Rinotraqueíte infecciosa bovina (Nariz vermelho), diagnóstico e controle. *Embrapa Brasileira de Pesquisa Agropecuária* 2000; 28: 1-2.
- Cerqueira RB, Carminati R, Silva JM, Soares GC, Meyer R, Sardi S. Serological survey for bovine herpesvirus 1 in cattle from different regions in the state of Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2000; 37 (6): 1-8.

- Cook JKA. Avian Pneumovirus Infections of Turkeys and Chickens. *The Veterinary Journal* 2000; 160: 118-125.
- Cook JKA, Huggins MB, Wood MA, Orbell SJ, Mockett APA. Protection provided by a commercially available vaccine against different strains of turkey rhinotracheitis virus. *Veterinary Record*. 1995; 136 (15): 392-393.
- Cook JKA, Huggins MB, Orbell SJ, Senne DA. Preliminary antigenic characterization of an avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA. *Avian Pathology* 1999; 28: 607-617.
- Cook JKA, Orthel F, Orbell S, Woods MA, Huggins MB. An experimental turkey rhinotracheitis (TRT) infection in breeding turkeys and the prevention of its clinical effects using live-attenuated and inactivated TRT vaccines. *Avian Pathology* 1996; 25: 231-243.
- Córdoba MA, Cotto CE, Damonte EB. Virucidal activity in aqueous extract obtained from *Cedrela tufiflora* leaves. *Phytotherapy Research* 1991; 5: 250-253.
- Corrêa WM, Nilsson MR. Observações preliminares sobre o aborto eqüino a vírus no Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico* 1964; 31: 13-15.
- Crabb BB, Studdert MJ. Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis vírus) and 1 (equine abortion vírus). *Advances in Virus Research*. 1995, 45: 153-190.

Cunha EMS, Ferrari CIL, Lara MCCSH, Silva LHQ. Presença de anticorpos contra o herpesvírus eqüino 1 (HVE-1) em eqüinos no noroeste do Estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico* 2002; 69: 1-5.

Dani MA, Durigon EL, Arns CW. Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates: comparison between immunochemiluminescent Southern blot and nested PCR. *Journal of Virological Methods* 1999; 79: 237-241.

De Clercq E. Antivirals and antiviral strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2: 704-720.

del Barrio G, Parra F. Evaluation of the antiviral activity of an extract from *Phyllanthus orbicularis*. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 7: 317-322.

Descalzo AM, Coto C. inhibición del virus de pseudorrabia (Suid herpesvirus 1) por acción de un antiviral aislado de hojas de *Melia azedarach*. *Revista Argentina de Microbiologia* 1989; 21: 338-341.

Droual R, Woolcock PR. Swollen head syndrome associated with E. coli and infectious bronchitis virus in the Central Valley of California. *Avian Pathology* 1994; 23: 733-742.

Embrapa. Pesquisador defende planejamento para preservar a caatinga. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2003/maio/bn.2004-11->

25.1034191543/?searchterm=caatinga. Acesso em: 03/05/2011 às 11:38h.
2004.

Etteradossi N, Toquin D, Guittet M, Bennejean G. Evaluation of different turkey rhinotracheitis viruses used as antigens for serological testing following live vaccination and challenge. Zentralbl Veterinarmed B. 1995; 42 (3): 175-186.

Fahey JE, Crawley, JF. Studies on chronic respiratory disease of chickens. II. Isolation of a virus. Canadian Journal of Comparative Medicine. 1954, 18: 13-21.

Fava CDel, Arcaro JRP, Pozzi CR, Arcaro Júnior I, Fagundes H, Pituco EM et al. Manejo sanitário para o controle de doenças da reprodução em um sistema leiteiro de produção semi-intensivo. Arq. Inst. Biol. 2003; 70 (1): 25-33.

Felipe AMM, Rincão VP, Benati FJ, Linhares REC, Galina KJ, de Toledo CEM et al. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on Poliovirus and Bovine Herpesvirus. Biological & Pharmaceutical Bulletin 2006; 29 (6): 1092-1095.

Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM. Principles of virology: molecular, biology, pathogenesis and control. Washington: ASM; 2000. 804p.

Franco AC, Roehe PM. Herpesviridae. In: Flores EF. Virologia Veterinária. Santa Maria: Ed.UFSM; 2007. p.435-485.

- Galina KJ. *Guazuma ulmifolia* Lam., *Sterculiaceae*: Estudo Botânico, Químico e Microbiológico. [tese-Mestrado]. Araraquara (São Paulo): Universidade Estadual de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2003.
- Georgieva MV, Jambazova N. Serological surveys on broiler breeder flocks for antibodies against chicken infectious anaemia virus and avian reoviruses. Institute of Experimental. Pathology and Parasitology. 2003, 40 (6): 84-86.
- Gilkerson JR, Whalley JM, Drummer HE, Studdert MJ, Love DN. Epidemiological studies of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in Thoroughbred foals: a review of studies conducted in the Hunter Valley of New South Wales between 1995 and 1997. *Veterinary Microbiology* 1999; 68: 15-25.
- Goren E. A 'new disease' in chickens; diagnostic findings. *Tijdschr Diergeneeskd* 1985; 15: 1076-1077.
- Gough RE. Avian Pneumoviruses. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW. *Diseases Of Poultry*. Ames: Iowa University Press; 2003. p.92-100.
- Groff, F.H. S.; Merlo, M.A.; Stoll, P.A.; Stepan, A.N.; Weiblen, R.; Flores, E.F. Epidemiology and control of pseudorabies outbreaks in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, 2003. *Pesq. Vet. Bras.* 2005; 25 (1): 25 – 30.
- Guerra MP, Nodari RO, Reis MS, Schimidt W. Agriculture, Biodiversity, and “Appropriate Biotechnologies” in Brazil. *Ciência e Cultura.* 1998, 50: 408-416.

Hafez HM. The role of pneumovirus in swollen head syndrome of chickens: review
Archiv für Geflügelkunde 1993; 57: 181-185.

Hafez HM, Weiland F. Isolation of turkey rhinotracheitis virus from turkeys.
Tierärztliche Umschau. 1990; 45: 103-111.

Hammond JA, Fielding D; Bishop SC. Prospects for plant anthelmintics in tropical
veterinary medicine. Veterinary Research Communications 1997; 21 (3):
213-28.

Hasui M, Matsuda M, Okutani K. *In vitro* antiviral activities of sulfated
polysaccharides from a marine microalga (*Cochlodinium polykrikoides*)
against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses.
International Journal of Biological Macromolecules. 1995, 17: 293-297.

Heckert RA, Myers DJ. Absence of antibodies to avian pneumovirus in Canadian
poltry. Veterinay Record 1993; 132: 172.

Herbarium. Available on: http://www.coluna-da-sal.com/herbarium/herba_1a_2.htm. Accessed March, 15th, 2011.

Houghton P. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from
natural sources. Phytotherapy Research. 2000, 14: 419-423.

IBGE. IBGE lança o Mapa de Biomas do Brasil e o Mapa de Vegetação do Brasil,
em comemoração ao Dia Mundial da Biodiversidade. Disponível em:

http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169. Acesso em: 03/05/2011 às 11:32h. 2004.

ICTV. Virus Taxonomy 2009: Release. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>. Acesso em: 05/09/2011.

Ikuno AA, Braggio MM, Haraguchi M. Antiherpes activities of fractions from *Sesbania virgata* leaves. Arq. Inst. Biol. 2003, 70 (2): 183-185.

Jassim SAA, Naji MA. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. Journal of Applied Microbiology 2003; 95: 412-427.

Jones RC. Avian reovirus infections. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2000, 19: 614-625.

Junqueira JRC, Freitas JC, Alfieri AF, Alfieiri AA. Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BoHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo*. Semina. Ciências Agrárias 2006; 27(3): 471-480.

Kazazic SP. Antioxidative and antiradical activity of flavonoids. Arh. Hig. Rada. Toksikol. 200, 55 (4): 279-290.

Lage AP, Castro RS, Melo MI, Aguiar PH, Barreto Filho JB, Leite RC. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais State,

- Brazil. Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux. 1996; 49 (3): 195-197.
- Lamb RA, Kolakofsky D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In:____. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. p.1177-1204.
- Levinson W, Jawetz E. Virologia básica. In:____. Microbiologia médica e Imunologia. 7.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p.183-187.
- Lupini C, Cecchinato M, Scagliarini A, Graziani R, Catelli E. In vitro antiviral activity of chestnut and quebracho woods extracts against avian reovirus and metapneumovirus. Research in Veterinary Science, 2009, 87: 482-487.
- McCutcheon AR, Roberts TE, Gibbons E, Ellis SM, Babuik LA, Hancock REW, Towers GHN. Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 1995, 49: 101-110.
- Melo CB, Oliveira AM, Figueiredo HCP. Prevalência de anticorpos contra Herpesvírus bovino-1, vírus da diarréia bovina e vírus da leucose enzoótica bovina em bovinos do Estado de Sergipe, Brasil. Revista Brasileira de Reprodução Animal 1997; 21 (2): 160-161.
- Mettenleiter TC. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis-state of the art. Veterinary Record 2000; 31: 99-115.

- Mongrand S, Badoc A, Patouille B, Lacomblez C, Chavent M, Bessoule JJ. Chemotaxonomy of the Rubiaceae family based on leaf fatty acid composition *Phytochemistry* 2005; 66 (5): 549-59.
- Moreira JN; Lira MA; Santos MVF; Ferreira MA; Araújo GGL; Ferreira RLC; Silva GC. Caracterização da vegetação de Caatinga e da dieta de novilhos no Sertão de Pernambuco. *Pesq. Agropec. Bras.* 2006; 41 (11): 1643-1651.
- Moreira N, Kruger ER, Warth JFG, Biesdorf SM, Goularte MMM, Weiss RR. Aspectos etiológicos e epidemiológicos do aborto esquino. *Arch. Vet. Scienc.* 1998; 3 (1): 25-30.
- Morley AJ, Thomson DK. Swollen head syndrome in broiler chickens. *Avian Diseases* 1984; 28: 338-343.
- Mukhtar M, Arshad M, Ahmad M, Pomerantz RJ, Wighdahl B, Parveen Z. Antiviral potentials of medicinal plants. *Virus Res.* 2008; 131: 111-120.
- Munir S, Kapur V. Regulation of host cell transcriptional physiology by the avian pneumovirus provides key insights into host-pathogen interactions. *Journal of Virology* 2003; 77: 4899-4910.
- Naithani R, Huma LC, Holland LE, Shukla D, McCormick DL, Mehta RG, Moriarty RM. Antiviral activity of phytochemicals: a comprehensive review. *Mini Rev. Med. Chem.* 2008; 8: 1106-1133.

- Nielsen J. Combinatorial synthesis of natural products. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2002, 6: 297-305.
- Nilsson MR, Corrêa WM. Isolamento do vírus do aborto eqüino no estado de São Paulo. *Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo* 1966; 33: 23-25.
- O'brien JD. Swollen head syndrome in broiler breeders. *Veterinary Record* 1985; 117: 619-620.
- Oliveira MJR, Simões MJS, Sassi CRR. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2006; 8 (2): 39-41.
- Osório, F.A. Latency of Bovine Herpesvirus -1. In: Simpósio Internacional Herpesvírus bovino e Diarréia viral bovina, 1998. Santa Maria (RS); 1998. p.117-126.
- Paillot R, Sharp E, Case R, Nugent J. Herpes virus infection in Equid species. In: Gluckman TR. *Herpesviridae viral structure, life cycle and infections*. New York: Nova Science Publishers; 2009. p.17-85.
- Peron AP, Marcos MC, Cardoso SC, Vicentini VEP. Avaliação do potencial citotóxico dos chás de *Camellia sinensis* L. e *Cassia angustifolia vahl* em sistema teste vegetal. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*. 2008; 12 (1): 51-54.
- Petek M, Felluga B, Borghi G, Baroni A. The Crawley agent: An avian reovirus. *Arch. Ges. Virusforsch.* 1967, 21: 413-424.

- Primo V, Rovera M, Zanon S, Oliva M, Demo M, Daghero J, Sabini L. Determination of the antibacterial and antiviral activity of the essential oil from *Minthostachys verticillata* (Griseb.) Epling. *Revista Argentina de Microbiologia* 2001; 33 (2): 113-117.
- Ribeiro AQ, Leite JPV, Dantas-Barros AM. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2005; 15 (1): 65-70.
- Rebora A. Antiviral drugs: unapproved uses, dosages, or indications. *Clinics in Dermatology.* 2002, 20: 474-480.
- Roman Júnior WA. Identificação de nitrocomposto e Di-Hidroflavonóis, atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral de substâncias isoladas dos extratos liofilizados das raízes de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach., Malpighiaceae, Nó-decachorro. [Tese-Mestrado]. Araraquara (SP): Universidade Estadual de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2003.
- Rosenberguer JK. Reovirus Infeccion. In: Safe YM. *Disease of Poultry.* 11. ed. Ames, Iowa State: University Press; 2003. p. 283-293.
- Santos WRM, Inforzato GR, Massei RA, Piccinin A, Lot RFE. Doença de Aujeszky: Revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária* 2008; VI (10): 1-5.

- Silva ACO, Albuquerque UP. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). *Acta Bot. Bras.* 2005; 19 (1): 17-26.
- Silva AD'ávila, Sortica VA, Braga AC. Antigenic and molecular characterization of eight samples of Aujeszky's disease virus isolated in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, in 2003. *Pesq. Vet. Bras.* 2005; 25 (1): 21-24.
- Simões CMO, Falkenberg M, Aulermentz L, Schenkel EP, Amoroso M, Girre L. Antiviral activity of south Brazilian medicinal plant extracts. *Phytomedicine.* 1999, 6 (3): 205-214.
- Simoni IC. Tratamentos Antivirais. *Arquivo Instituto Biológico* 2003; 65 (1-2): 41–44.
- Singer RS, Hofacre CL. Potential impacts of antibiotic use in poultry production. *Avian Diseases* 2006; 50: 161-172.
- Sobestiansky J, Barcellos DESN, Moraes N, Carvalho LFOS, Oliveira SJ, Moreno AM, Roehe PM. *Clínica e Patologia Suína*. 2ª Ed. Goiânia; 1999. 464p.
- Sousa MP, Matos MEO, Machado MIL, Braz-Filho R, Vencato I, Mascarenhas YP. Triterpenoids from *Guettarda angelica*. *Phytochemistry* 1984; 23: 2589-2592.
- Straub OC. Advances in BHV1 (IBR) Research. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 2001; 108: 419-422.

- Stuart JC. Rhinotracheitis: turkey rhinotracheitis (TRT) in Great Britain. In: Recent Advances in Turkey science, Poultry Science Symposium, 1989. London, Butterworth; 1989. p.217-224.
- Summerfield A, Keil GM, Mettenteiter TC, Rziha HJ, Saalmuller A. Antiviral activity of an extract from leaves of the tropical plant *Acanthospermum hispidum*. Antiviral Research 1997; 36: 55-62.
- Tailor RH, Acland DP, Attenborough S, Cammue PA, Evans IJ, Osborn RW, Ray JA, Rees SB, Broekaert WF. A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from single precursor protein. J. Biol. Chem. 1997, 272 (39): 24480-24487.
- Toquin D, Eterradosi N, Guittet M. Use of a related ELISA antigen for efficient TRT serological testing following live vaccination. Veterinary Record. 1996; 139: 71-72.
- Toquin D, Bâyon-Auboyer MH, Jestin V, Eterradosi N. Réponse sérologique et protection croisée vis-à-vis de l'infection par une souche non-A non-B du virus de la rhinotrachéite infectieuse de la dinde. In: Comptes-rendus des 3^e Journées de la recherche avicole, 1999. St Malo, France; 1999. p.223-224.
- Turolla MSR, Nascimento ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas 2006; 42 (2): 289-306.

- Van der Heide L. Introduction on avian reovirus. Proc. International Symposium on Adenovirus and Reovirus Infection in Poultry. Rauschholzhausen, Germany. 1996. 138142.
- Van Oirschot JT, Kaashoek MJ, Rijsewijk FAM. Advances in development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. Vet. Microbiol. 1996; 53 (1/2): 43-54.
- Vasconcelos SBS, Bottino JA, Guerra JL, Jerez JÁ. Lesões articulares em frangos de corte (*Gallus gallus*) na infecção experimental pelo reovírus aviário. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. 2001, 38: 80-83.
- Veiga Júnior FV, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: Cura segura?. Química nova 2005; 28 (3): 519-528.
- Vieira S, Brito WMED, Souza WJ, Alfaia BT, Linhares DCL. Anticorpos para o herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em bovinos do Estado de Goiás. Ciência Animal Brasileira 2003; 4 (2): 131-137.
- Waihenya RK, Mtambo MMA, Nkwengulila G. Evaluation of the efficacy of the crude extract of *Aloe secundiflora* in chickens experimentally infected with Newcastle disease virus. Journal of Ethnopharmacology 2002; 79: 299-304.
- Wei F, Ma SC, Ma LY, But PP, Lin RC, Khan IA. Antiviral flavonoides from seeds of *Aesculus chinensis*. J. Nat. Prod. 2004, 67 (4): 650-653.

Weiblen R, Rabuske M, Rebelatto MC, Nobre VMT, Canabarro TF. Abortion due to equine herpesvirus in southern Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1994; 27: 1317- 1320.

Yunes RA, Calixto JB. *Plantas medicinais sob ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, 2001.

Yunes RA, Pedroso RC, Cechinel Filho V. Farmácos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*. 2001, 24: 147-152.

Zanella JC, Morés N, Sobestiansky J. Doença De Aujeszky. In: Reis AT, Moreno AM, Silva CA, Mallmann CA, Driemeier D, Barcellos DESN et al *Doenças dos Suínos*. Goiânia: Cãnone Editorial; 2007. p.228 – 238.

Zanon SM, Ceriatti FS, Rovera M, Sabini LJ. Ramos, B.A. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Cordobra, Argentina. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 1999; 41 (2): 59-62.