

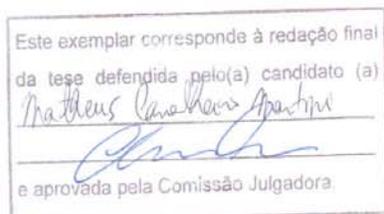
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Matheus Cavalheiro Martini

**“AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS
DE PLANTAS FRENTE AO METAPNEUMOVÍRUS AVIÁRIO
(AMPV) E VÍRUS RESPIRATÓRIO SINCICIAL BOVINO (BRSV)”**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular na área de Microbiologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Clarice Weis Arns
Co-Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Luciana Konecny Kohn

Campinas

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Si38p

Martini, Matheus Cavalheiro

Avaliação in vitro da atividade antiviral de extratos de plantas frente ao metapneumovírus aviário (AMPV) e vírus respiratório sincicial bovino (BRSV) / Matheus Cavalheiro Martini. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Clarice Weis Arns, Luciana Konecny Kohn.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Vírus sincicial respiratório bovino. 2. Metapneumovírus aviário. 3. Agentes antivirais. 4. Extrato vegetais. I. Arns, Clarice Weis, 1956-. II. Kohn, Luciana Konecny. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Título em inglês: In vitro evaluation of antiviral activity of plants extract against avian metapneumovirus (AMPV) and bovine respiratory syncytial virus (BRSV).

Palavras-chave em inglês: Bovine respiratory syncytial virus; Avian metapneumovirus; Antiviral agents; Plant extracts.

Área de concentração: Microbiologia.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Clarice Weis Arns, Jacy Gameiro, Isabela Cristina Simoni.

Data da defesa: 24/06/2010.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 24 de junho de 2010.

Campinas, 24 de junho de 2010.

BANCA EXAMINADORA

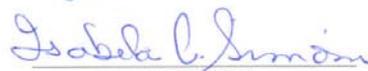
Profa. Dra. Clarice Weis Arns Orientadora


Assinatura

Profa. Dra. Jacy Gameiro


Assinatura

Dra. Isabela Cristina Simoni


Assinatura

Prof. Dr. Prof. Marcelo Brocchi

Assinatura

Dra. Jane Fraga

Assinatura

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Virologia do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP.

Agradecimentos

À minha mãe, meu amor, meu braço direito e minha maior incentivadora. Obrigado pelo exemplo de vida e por me fornecer suportes psicológico e financeiro (claro!) indispensáveis para que eu chagasse até aqui. Obrigado meu pai! Você é um exemplo para mim! Aos meus avós pelo carinho e atenção, estando perto de corpo e/ou de alma.

Agradeço à minha linda família!

À Profa. Dra. Clarice Arns, pela liberdade e confiança. Obrigada pela orientação, pelos valiosos conselhos e oportunidades, e principalmente pela generosidade (você foi uma mãe!).

À Dra. Luciana Kohn (minha querida co-orientadora), obrigado pelo exemplo, ensinamentos e companhia durante as preparações de muitas e muitas placas de cultura de células!!!

À galera do LVA... são tantos! Obrigada à Dra. Helena Lage pelo apoio indispensável durante meu projeto de mestrado. Devo um agradecimento especial à Dra. Márcia Bianchi (minha fofinha) porque esta dissertação não sairia sem a ajuda dela dentro e fora do LVA, obrigado pela companhia (e por me agüentar também!), Maria Ângela, Judite, Daniel, Paulão, Luzinha, Alyne, Marina, Marcela, e os novos estagiários Cássio e Flávio pelos bons momentos que passamos juntos no LVA. Agradeço também aos melhores funcionários da UNICAMP, Paulet (chuchuzão) e Geneci (o “G”), por toda a ajuda e risadas.

Aos meus amigos queridos de Campinas... amigos para sempre! Chuchuzão (e Teodora), Érico, Diogo, Anne e Carol (imuno). Aos amigos do LABDATA: Eduardo (um irmão, um grande amigo), Thiago, Kiko, Conrado e Fernanda. As minhas primas, que são mais que isso, são irmãs: Débora, Bianca e Paula.

Ao CPQBA/UNICAMP, pela gentileza em ceder os extratos brutos para serem avaliados. Especial agradecimento à Dra. Carmen Lúcia Queiroga, Dra. Mary Ann Foglio e Lauro Barata (IQ).

À Profa. Dra. Maria do Carmo, pela disponibilidade em auxiliar na grafia correta de todas as plantas, feito “difícil” para um veterinário.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Fundação de desenvolvimento da Unicamp (FUNCAMP) pelo apoio financeiro.

Lista de Abreviatura

aMPV	Metapneumovirus aviário
ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
BRSV	Vírus respiratório sincicial bovino
CMNT	Concentração Máxima não tóxica
DI	Densidade de inoculação
DICC	Dose Infectante para Cultivo de Células
DICT	Tissue Culture Infective Dose per mL
DNA	Ácido desoxidoribonucléico
DMSO	Dimetilsulfóxido de sódio
CER	Chicken embryo related cells
CMNT	Concentração máxima não-tóxica
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
CRIB	Bovine viral diarrhea virus-resistant clone of MDBK cells
EBDS	Extrato bruto diclorometânico obtido de planta seca
EBES	Extrato bruto etanólico obtido de planta seca
ECP	Efeito citopático
ECT	Efeito citotóxico
MEME	Meio mínimo essencial Eagle
MTT	[3 - (4,5-dimethylthiazol-z-yl) -2, 5-diphenyltetrazolium bromide]
SFB	Soro fetal bovino
SRB	Sulforrodamina B
TCA	Ácido tricloroacético
TRT	Rinotraqueíte dos perus
UBA	União Brasileira de Avicultura
USDA	United States Department of Agriculture

ÍNDICE

1. RESUMO.....	9
1.2. ABSTRACT.....	11
2. INTRODUÇÃO.....	13
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. GERAL.....	21
3.2. ESPECÍFICO.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. BOTÂNICA.....	22
4.2. PREPARO DOS EXTRATOS BRUTOS.....	22
4.3. DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE EXTRATO BRUTO.....	23
4.4. FARMACOLOGIA DAS PLANTAS SELECIONADAS.....	23
4.5. CULTIVO CELULAR.....	23
4.6. TITULAÇÃO.....	25
4.7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÁXIMA NÃO TÓXICA (CMNT)	25
4.8. ENSAIO DA SULFORODAMINA B (SRB).....	26
5. ENSAIO ANTIVIRAL.....	27
6. RESULTADOS.....	28
6.1. CULTIVO DO BRSV.....	28
6.2. CULTIVO DO aMPV.....	29
6.3. CONCENTRAÇÃO MÁXIMA NÃO TÓXICA (CMNT).....	30
6.4. ENSAIO ANTIVIRAL.....	36
7. DISCUSSÃO.....	45
8. CONCLUSÕES GERAIS.....	56
8.1. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.....	56
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
10. ANEXOS.....	66

1. RESUMO

Para avaliar a atividade antiviral dos extratos de plantas brasileiras foram eleitos o Metapneumovirus aviário (aMPV) e o vírus Respiratório sincicial bovino (BRSV) pertencentes à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Pneumovirinae*, gêneros *Metapneumovirus* e *Pneumovirus* respectivamente. Tanto o aMPV quanto o BRSV são vírus semelhantes aos que causam doenças em humanos como o vírus respiratório sincicial humano (HRSV) e metapneumovírus humano (hMPV). O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antiviral de 12 diferentes espécies de plantas: *Pterodon emarginatus* Vogel.; *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.; *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen; *Virola sebifera* Aubl.; *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn.; *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch.; *Bursera aloexylon* (Schiede ex Schlttdl.) Engl.; *Aspidosperma tomentosum* Mart.; *Copaifera langsdorffii* Desf.; *Baccharis dracunculifolia* DC.; *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B.Verl.; *Aniba rosaeodora* Ducke (Lin 3). Para realizar os estudos antivirais foi utilizada concentrações máximas não tóxicas para as diferentes linhagens celulares utilizadas frente aos dois vírus. Para os ensaios antivirais foram utilizadas a linhagens CER (Chicken embryo related cells) e CRIB (bovine viral diarrhea virus-resistant clone of MDBK cells) para o aMPV e BRSV respectivamente. Os extratos brutos com atividade antiviral foram submetidos a uma curva concentração resposta com diferentes concentrações de extrato na presença de 100 DICCC/mL de cada amostra viral através do ensaio colorimétrico MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-z-yl)-2,5 difeniltertrazolim brometo] determinando assim a concentração antiviral 50% (EC₅₀). Para determinar o mecanismo de ação dos extratos e os vírus nas células foram utilizados três diferentes tratamentos: (i) Pré-tratamento (célula tratada com extrato e posterior inoculação com a amostra viral); (ii) Pós-tratamento (célula inoculada com a amostra viral e depois tratada com o extrato); (iii) Virucida (extrato e vírus mantidos juntos e posterior inoculação na cultura celular). O extrato foi considerado ativo quando houve diminuição do título viral em 1,5 log em relação ao título viral controle. Os resultados mostraram que todos os extratos testados obtiveram concentrações não tóxicas para as diferentes linhagens celulares. Em relação à atividade antiviral o extrato da espécie *Aspidosperma tomentosum* apresentou atividade frente ao BRSV e aMPV, ambos no pré-tratamento. Os extratos das espécies *Virola sebifera*; *Arrabidaea chica*; *Gaylussacia brasiliensis* e *Aniba rosaeodora* apresentaram atividade antiviral para o aMPV no pós-tratamento. Nenhum extrato bruto apresentou

atividade de “vírus-inativação” em relação aos vírus avaliados. Os demais extratos não apresentaram atividade antiviral significativa para nenhum destas espécies virais. O ensaio antiviral deste estudo poderá continuar sendo utilizado como triagem para outras espécies em busca de substâncias com potencial medicinal. As diferentes atividades de ação dos extratos sugerem a ocorrência de mecanismo de ação distinto entre os vírus avaliados.

1. ABSTRACT

To evaluate the antiviral activity of extracts from Brazilian plants two different viruses were elected Avian metapneumovirus (aMPV) and bovine respiratory syncytial virus (BRSV) members of the family Paramyxoviridae, subfamily Pneumovirinae, Pneumovirus and Metapneumovirus genera respectively. Both viruses are similar to those that cause humans diseases such as respiratory syncytial virus (HRSV) and human metapneumovirus (hMPV). The purpose of this study was to assess the antiviral activity of 12 different plant species: *Pterodon emarginatus* Vogel; *Kielmeyera coriácea* Mart. & Zucc.; *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen; *Viola sebifera* Aubl.; *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn.; *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch. ex. Reiss; *Bursera aloexylon* (Schiede ex Schlttdl.) Engl.; *Aspidosperma tomentosum* Mart.; *Copaifera langsdorffii* Desf.; *Baccharis dracunculifolia* DC.; *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B.Verl.; *Anniba rosaeodora* Ducke. (Lin 3). To perform the antiviral assay we used non toxic maximum concentrations of the plants extracts with different cell lines used against the two viruses. The cell lines used were CER (Chicken embryo related cells) and CRIB (bovine viral diarrhea resistant clone of MDBK cells) for AMPV and BRSV, respectively. The extracts with antiviral activity were subjected to a concentration response curve with varying concentrations of extract in the presence of 100 TCID / mL of each viral sample by colorimetric MTT assay [3 - (4,5-dimethylthiazol-z-yl) -2 , 5-diphenyltetrazolium bromide] to identify the antiviral 50% concentration (EC50). To define the mechanism of action of extracts and viruses in cells three different treatments were used: (i) pre-treatment (cells treated with plants extracts and subsequent inoculation with a viral sample), (ii) Post-treatment (cells inoculated with the viral sample and afterwards treated with the extract), (iii) Virucidal (viruses and plants extracts were kept together and after that inoculated into cell cultures). The extract was considered active when there was a decrease of virus titers by 1.5 log in contrast to the control viral titer. The results revealed that all tested extracts had no toxic concentrations for the different cell lines and detected the antiviral activity of the extract of the species *Aspidosperma tomentosum* against the BRSV and aMPV, both in the pre-treatment conditions. The extracts of the species *Viola sebifera*; *Arrabidaea chica*; *Gaylussacia brasiliensis* and *Anniba rosaeodora* (Lin 3) exhibited antiviral activity for aMPV after treatment. The other extracts showed no significant antiviral activity for any of these viral species. The antiviral test of this study may still be used as screening for

other species in search for substances with medicinal potential. The varied action activities of the extracts suggest that the occurrence of distinct mechanism of action between the viruses evaluated.

2. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitas são ainda uma grande ameaça à saúde pública, apesar do enorme progresso na medicina humana. O impacto das doenças infecciosas é particularmente grande nos países em desenvolvimento devido à inacessibilidade aos medicamentos e o aparecimento da resistência a drogas disponíveis na clínica (Okeke *et al.*, 2005).

O vírus Respiratório sincicial bovino (em inglês, “Bovine Respiratory Syncytial virus” - BRSV) pertence ao gênero *Pneumovirus*, da família *Paramyxoviridae*, ordem *Mononegavirales* (Pringle, 1999). Essa ordem compreende vírus dotados de genoma composto de RNA de fita simples (“mono”) com sentido negativo (“nega”, nsRNA) (Rodhain, 1995). O BRSV está intimamente relacionado ao vírus respiratório sincicial humano (HRSV) (Alm *et al.*, 2008), bem como aos vírus respiratórios sinciciais ovino e caprino (ORSV e CRSV) (Larsen, 2000; Valentova, 2003). O BRSV possui inúmeras similaridades com o HRSV, especialmente no que se refere à organização genômica, estrutura viral e antigenicidade (Baker, 1991; Vanderpoel *et al.*, 1994; Kovarcik, 1997). BRSV e HRSV são vírus pleomórficos, envelopados, de tamanho variável: as partículas esféricas medem entre 80 e 350nm de diâmetro; as partículas filamentosas medem entre 60 e 100 nm de diâmetro com aproximadamente 1 µm de comprimento (Baker *et al.*, 1997; Larsen, 2000).

O BRSV, isolado pela primeira vez em 1967 (Paccaud & Jacquier, 1970) tem distribuição mundial e causa grave doença respiratória em bovinos jovens, caracterizada por bronquiolite e pneumonia intersticial (Larsen, 2000), de forma similar à enfermidade decorrente da infecção pelo Vírus Respiratório Sincicial Humano (HRSV) em crianças (Van der Poel *et al.*, 1994).

A transmissão do BRSV provavelmente ocorre por via aérea e contato direto entre animais infectados com animais sadios (Larsen, 2000). A infecção primária pelo BRSV induz grave doença respiratória do trato inferior em bovinos suscetíveis, tanto jovens quanto adultos; todavia, ocorrem também infecções assintomáticas (De Jong *et al.*, 1996; Larsen, 2000). Em áreas endêmicas, doença clínica é mais aparente nos animais jovens, à semelhança do que ocorre em crianças infectadas pelo HRSV (Van der Poel *et al.*, 1994).

Após infecção natural pelo BRSV, a proteção contra reinfecções é de curta duração e estas são múltiplas e comuns (Collins *et al.*, 1988; Van der Poel *et al.*, 1997). Em bovinos, sinais clínicos evidentes normalmente só são observados na primeira infecção (Van der Poel *et al.*, 1994).

Por outro lado, há o Metapneumovírus aviário (em inglês, “avian Metapneumovirus”- aMPV), que era classificado no gênero *Pneumovirus* e, foi designado como a espécie Metapneumovírus aviário dentro do gênero *Metapneumovirus* (Collins *et al.*, 2001). Divide então a mesma família e gênero com o BRSV. Estes vírus apresentam o genoma RNA, fita simples, negativa e contendo aMPV oito genes, organizados de forma diferente (Easton *et al.*, 2004). No genoma dos pneumovírus, o fragmento genômico F-M2 situa-se entre os genes G e L, enquanto que, nos metapneumovírus, esse mesmo fragmento apresenta-se em translocação e se localiza entre os genes M e SH (Collins *et al.*, 2001; Randhawa *et al.*, 1997; Pringle, 1998). Os metapneumovírus são vírus envelopados, com um genoma RNA de sentido negativo, com aproximadamente 13 Kb em extensão (Ling *et al.*, 1992; Fenner *et al.*, 1993).

O aMPV é classificado em quatro subtipos A, B, C e D baseado na análise de sequências de nucleotídeos e aminoácidos. Inicialmente, acreditava-se que havia apenas

um sorotipo de aMPV, contendo dois subtipos A e B diferenciados pela análise da sequência de nucleotídeos da glicoproteína ou utilizando anticorpos monoclonais (Collins *et al.*, 1993; Juhasz & Easton, 1994). Após quase 20 anos do primeiro isolamento de aMPV, o subtipo C foi descrito em perus nos Estados Unidos pelo sequenciamento dos genes das proteínas M (Seal, 1998), F (Seal, 2000; Tarpey *et al.*, 2001), N e P (Dar *et al.*, 2001). Finalmente um subtipo D, geneticamente distinto dos subtipos A, B e C, foi descrito na França (Bayon-Auboyer *et al.*, 2000), onde também foi identificada uma variante do subtipo C em patos (Toquin *et al.*, 2006). No Brasil, as amostras de aMPV isoladas e caracterizadas até 2005 são descritas como subtipo A (Dani *et al.*, 1999; D'Arce *et al.*, 2005) e apresentaram identidade de 95,8 a 99% com as sequências de nucleotídeos de outras amostras disponíveis no GenBank para este mesmo subtipo (Ferreira, 2007).

O aMPV foi relatado pela primeira vez no fim dos anos de 1970 (Buys & Du Perez, 1980) e no Brasil por Arns & Hafez (1995), é o agente etiológico da Rinotraqueíte em perus (TRT) e está associado também à Síndrome da Cabeça Inchada (SHS) em frangos e poedeiras comerciais (Gough & Jones, 2008). Inicialmente, somente dois subtipos eram reconhecidos, A e B, diferenciados pela análise da sequência de nucleotídeos de uma das glicoproteínas de superfície, a proteína G (Juhasz & Easton, 1994). Em 1996 um terceiro subtipo bastante diverso dos dois primeiros, nomeado subtipo C, foi identificado nos EUA em perus (Seal, 1998). Finalmente um quarto subtipo, chamado subtipo D, mais próximo dos subtipos A e B foi descrito na França (Bayon-Auboyer *et al.*, 2000), onde também foi identificada uma variante do subtipo C em patos (Toquin *et al.*, 2006).

A replicação do vírus ocorre nos tecidos nasais e sinusais, na traquéia e pulmões, porém ela é mais limitada ao trato respiratório superior, onde as partículas virais podem

ser detectadas mais facilmente até dez dias após a infecção (Cook, 2000; Van De Zande *et al.*, 1999).

Em perus jovens a enfermidade é caracterizada por espirros, corrimento nasal, estertores traqueais, edema dos seios infraorbital, nasal e muitas vezes frontal, com descarga ocular. O corrimento nasal pode se tornar muco purulento se houver infecção bacteriana secundária. Algumas variações são observadas na descrição dos sinais clínicos, isto é atribuído a condições precárias de manejo ou à presença de outros agentes infecciosos que frequentemente estão associados ao aMPV na TRT provocando o agravamento quadro clínico, além do aumento da morbidade e da mortalidade (Cook *et al.*, 1991; Gough, 2008).

O Brasil é o maior exportador mundial de carne bovina (ABIEC, 2010). E possui o maior rebanho bovino comercial do mundo com mais de 180, 3 milhões de cabeças de gado, segundo USDA (United States Department of Agriculture), e é o segundo país em produção mundial de carne, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (USDA, 2010). Em relação ao mercado de carne de frango, o Brasil encerrou o ano como terceiro maior produtor, mesma colocação de 2008, perdendo apenas para Estados Unidos e China, primeiro e segundo lugar no ranking mundial, respectivamente (UBA, 2009).

No decorrer dos últimos anos foi observado o aparecimento de mais de 40 novos vírus capazes de infectar humanos, algumas vezes sem importância médica conhecida como o vírus da hepatite G, mas em outros casos com conseqüências devastadoras (vírus da imunodeficiência humana- HIV). Ao mesmo tempo em que as doenças virais previamente conhecidas apresentaram episódios de recorrência, como é o caso da Ebola e da febre hemorrágica da dengue. Como resultado destas mudanças, um considerável interesse tem ocorrido na pesquisa de potenciais substâncias com atividade antiviral

(Institute of medicine, 1992; Hughes *et al.*, 1993; Mahy & Peters, 1996; Mahy. & Murphy, 1997).

Um dos grandes problemas no desenvolvimento de novos antivirais é o fato da obrigatoriedade dos vírus em utilizar a maquinaria metabólica da célula hospedeira para sua multiplicação. Esse fato é considerável para o desenvolvimento de drogas antivirais, porque a maioria das drogas que interfere na multiplicação viral pode interferir também na fisiologia da célula hospedeira podendo apresentar graves efeitos colaterais no paciente (Wagner & Hewlett, 1999; Jassim & Naji, 2003 e Abou-Karam & Shier, 1990). Além disso, o desenvolvimento de novas drogas antivirais torna-se difícil quando se levam em consideração a baixa toxicidade seletiva e a rápida seleção de variantes virais resistentes às drogas (Kott *et al.*, 1999).

Até meados do século XX, os medicamentos de origem vegetal constituíam a base da terapia medicamentosa e o desenvolvimento da síntese química introduziu rapidamente novas drogas na terapêutica. A investigação de plantas medicinais utilizadas popularmente resultou em alguns avanços terapêuticos e atualmente cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética, 25% são provenientes de plantas, isolados diretamente ou produzidos por semi-síntese, a partir de um precursor vegetal e os 25% restantes referem-se às outras fontes de produtos naturais (marinhos, microbiológicos, entre outros). Alguns exemplos de fármacos obtidos de espécies vegetais são os glicosídeos cardiotônicos (digitálicos), agentes colinérgicos (pilocarpina), anticolinérgicos (alcalóides da beladona), analgésicos (ópio), antihipertensivos (reserpina) e antimaláricos (artemisinina) (Clark, 1996; Pezzuto, 1997).

Estudar os aspectos biológicos da diversidade de plantas e relacioná-las com o seu uso tradicional como medicamento pode levar-nos a compreender como eles atuam

e para assegurar o uso racional da exploração dos recursos e seu desenvolvimento como fitoterápicos. Plantas medicinais continuam a ser utilizadas culturalmente como tratamentos para várias doenças e é de fundamental importância documentar seus usos e realizar estudos sobre suas atividades farmacológicas e toxicidade garantindo sua eficácia e segurança (Andrade-Cetto *et al.*, 2009).

Além das moléculas obtidas através da síntese química, os produtos naturais continuam a ser uma das maiores fontes de novas drogas para as diferentes patologias, incluindo as doenças infecciosas (Clardy & Walsh, 2004). Apenas uma pequena porção da biodiversidade disponível (fungos, bactérias, plantas, fauna e flora marinas) tem sido estudada, assim grandes oportunidades de se encontrar uma nova molécula são perdidas (Verpoorte *et al.*, 2005).

As plantas medicinais têm sido utilizadas há muito tempo em tratamentos de doenças infecciosas humanas em vários países. A triagem de espécies vegetais *in vitro* tem demonstrado que algumas plantas distribuídas em várias regiões do mundo apresentam atividade antiviral com baixo ou nenhum efeito colateral (McCutcheon *et al.*, 1995; Vlietinck *et al.*, 1995; Namba *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2002; Fernandez-Romero *et al.*, 2003). Vários compostos naturais presentes nessas plantas demonstram ter uma forte atividade anti-HSV e anti-RSV, tanto *in vitro* e/ou *in vivo* (Wyde *et al.*, 1993; Namba *et al.*, 1998; Kinjo *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2002; Chiang *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2002; Yaolan Li *et al.*, 2007).

O uso da etnofarmacologia, que estuda o conhecimento popular sobre plantas utilizadas por determinado grupo étnico ou social, é o caminho mais promissor na descoberta de novas drogas (Patwardhan, 2005; Cordell & Colvard, 2005). Assim, a confirmação da atividade e seu uso como uma das possíveis fontes de antivirais, têm levado à descoberta de potentes compostos inibidores do crescimento viral *in vitro*, tais

compostos são utilizados na medicina tradicional, como os compostos pertencentes aos grupos dos polissacarídeos, flavonóides, terpenos, alcalóides, fenóis e aminoácidos. (Vlietinck & Vanden, 1991; Baker *et al.*, 1995; Cos *et al.*, 2006).

É cada vez maior o número de pessoas no mundo que preferem o uso de produtos a partir de fontes naturais para tratamento e prevenção de problemas médicos. Isso tem influenciado várias companhias farmacêuticas a encontrar novos medicamentos a partir de plantas e ervas (Vlietinck & Vanden, 1991; Baker *et al.*, 1995).

Além disso, a utilização de produtos naturais para prevenir e tratar doenças em animais de produção de carne para a alimentação humana é beneficiada, possuindo maior valor e aceitação de mercado, principalmente o mercado externo.

Nos últimos anos, o Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp desenvolveu projetos de avaliação do potencial anti-câncer de espécies vegetais da Amazônia e do Cerrado do Estado de São Paulo através de projetos financiados pelo CNPq (630009/95-3), Fapesp (1995/09607-5) e verbas obtidas com a prestação de serviços. Neste projeto foram avaliados alguns dos extratos de plantas utilizados no projeto BIOTA- 04/07 943-9, que foram botanicamente identificadas e suas exsiccatas estão depositadas no herbário do Instituto de Biologia (IB-Unicamp). Os extratos foram produzidos pela Divisão de Fitoquímica do CPQBA sob a coordenação da Prof(a). Dra. Mary Ann Foglio e Prof(a) Dra. Carmem Lúcia Queiroga.

A escolha em utilizar o BRSV e o aMPV neste projeto foi determinada pela larga experiência do Laboratório de Virologia Animal - Unicamp com estes vírus e pelo fato de estarem intimamente relacionados aos vírus da mesma família e que infectam humanos, podendo assim serem utilizados como modelos (Domingues, 2002; Arns,

2003; Almeida, 2004; Almeida, 2005; Almeida, 2006; Spilki, 2006a; Spilki, 2006b;
Spilki, 2006c).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Verificar a atividade antiviral de extratos de plantas utilizando o vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) e o Metapneumovirus Aviário (aMPV).

3.2. Específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos extratos em diferentes cultivos celulares, através do Ensaio de Sulforrodamina B (SFB).
- Padronizar ensaio antiviral, através do Ensaio de MTT.
- Avaliação do tipo de inibição viral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Botânica

Para realizar este estudo, foram avaliadas as partes subterrâneas e aéreas (folhas e cascas) das plantas.

Plantas utilizadas para teste de atividade antiviral foram: *Pterodon emarginatus* Vogel; *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.; *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen; *Virola sebifera* Aubl.; *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn.; *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch.; *Bursera aloexylon* (Schiede ex Schlttdl.) Engl.; *Aspidosperma tomentosum* Mart.; *Copaifera langsdorffii* Desf.; *Baccharis dracunculifolia* DC.; *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B.Verl.; *Aniba rosaeodora* Ducke (Lin 3).

4.2. Preparo dos extratos brutos

Os extratos brutos utilizados no presente trabalho foram preparados e cedidos gentilmente pela Divisão de Fitoquímica do CPQBA pertencendo também ao projeto FAPESP – BIOTA.

Resumidamente, o material vegetal seco e moído (folhas) de *Aspidosperma tomentosum* Mart, *Virola sebifera* Aubl., *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn., *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen e *Maytenus ilicifolia* (Schrad) Planch (Celastraceae), *Pterodon emarginatus* Vogel foram extraídos com diclorometano seguido da extração com etanol 70% a frio por maceração. Utilizando diferentes solventes como, por exemplo, a acetona foi extraída de uma nova partida de material vegetal. O óleo de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae) foi retirado do tronco da árvore, o da *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) através de arraste a vapor e o da *Bursera aloexylon* (Shiede ex. Schlecht) Engler (Burseraceae) foi extraído das folhas *in natura* em aparelho tipo Clevenger por 1h.

Para a realização do processo de extração o material vegetal, *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B.Verl. foi submetido a um tratamento enzimático com xilase seguido da extração com metanol mais 3,0 g de ácido cítrico resultando no extrato com enzima (CE) e em paralelo

foi realizado a extração do material sem tratamento prévio resultando no extrato sem enzima (SE).

4.3. Diluição das Amostras de Extrato Bruto

As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido de sódio (DMSO) na concentração de 0,1b/mL resultando em soluções estoque. As soluções estoque das amostras a serem adicionadas nas placas de 96 compartimentos dos experimentos foram então diluídas 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina, sendo assim obtida a concentração ideal de DMSO na solução final para ser adicionada nas células sem toxicidade, segundo Skehan & Cols (1990). A concentração final da amostra teste nos poço da placa é 125µg/mL.

4.4. Farmacologia das Plantas Selecionadas

Muitos métodos foram desenvolvidos para o estudo de antivirais em cultivo celular, porém diferentes vírus necessitam de diferentes sistemas celulares para se replicar, dificultando a padronização de um único teste que se aplicaria para todos os vírus. O método mais utilizado é a avaliação *in vitro* da atividade antiviral baseando-se na habilidade do vírus replicar-se intracelularmente (Cos *et al.*, 2006 & Smee *et al.*, 2002).

A atividade antiviral foi avaliada inicialmente em dose única na Concentração máxima não-tóxica (CMNT) frente a diferentes concentrações virais (item 4.6). O extrato é considerado ativo quando há diminuição do título viral em 1,5 log. Para confirmação da atividade antiviral foi realizada uma curva concentração resposta com diferentes concentrações de extrato na presença de 100 DICC/mL determinado através do ensaio do MTT determinando assim a concentração antiviral 50% (EC₅₀).

4.5. Cultivo Celular

As células CRIB (bovine viral diarrhea virus-resistant clone of MDBK cells) e as células CER (Chicken embryo related cells) foram cultivadas em garrafas de 75 cm² (Corning®) com meio essencial mínimo Eagle (MEME- Cultilab®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB- Sigma Chemical Company®) com densidade inicial de 2×10^5 células/mL em estufa a 37°C, (figuras 1 e 2).

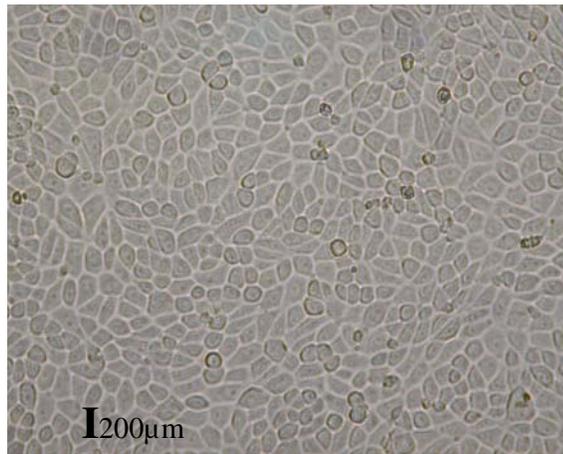


FIGURA 1: Fotomicrografia óptica, em aumento 100X, de cultura em monocamada da linhagem celular CRIB.

Barra de escala= 200μm

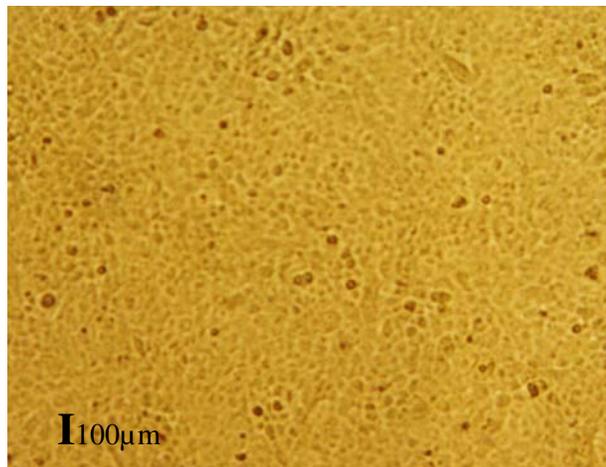


FIGURA 2: Fotomicrografia óptica, em aumento 100X, de cultura em monocamada da linhagem celular CER.

Barra de escala= 100μm

4.6. Titulação Viral:

As titulações virais foram realizadas de acordo com metodologias usuais deste laboratório. Diluições sequenciais na base 10 foram colocadas em volumes de 50µL/compartimento, em quadruplicata, em microplacas de cultivos celulares. Foram então adicionados 50µL de células com uma concentração de 1,5 a 3,0 x 10⁴ células/poço. As placas foram incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO₂. As leituras foram feitas 24, 48, 72 e horas após a inoculação, em busca do efeito citopático característico. Os títulos foram calculados com base no método de Spearman & Karber (Lorenz & Bögel, 1973).

4.7. Determinação da Concentração Máxima não tóxica (CMNT)

Para iniciar os estudos foi realizada a avaliação da citotoxicidade dos extratos frente ao cultivo celular, para determinar a concentração máxima não tóxica (CMNT), ou seja, a maior concentração do extrato a ser utilizada que não apresenta toxicidade ao cultivo celular.

Foi realizado o teste de citotoxicidade de cada extrato com base na observação do efeito citotóxico em microscópio invertido, utilizando nos cultivos celulares diferentes concentrações dos extratos diluídos em meio de cultura até atingir 250; 25; 2,5 e 0,25µg/mL, cada extrato em duplicata. A concentração máxima não tóxica foi aquela em que não causou efeito citotóxico da monocamada de cultivo celular frente aos extratos. Foram observadas diferentes concentrações máximas não tóxicas em um mesmo tipo de extrato com diferentes tipos de solventes, assim como entre extratos brutos de espécies diferentes. Foi realizado, em seguida, o ensaio sulforodamina B (SRB) para quantificar as células. As células foram cultivadas em placas de 96 compartimentos onde foram adicionados 100 µL do extrato diluído em dimetilsulfoxido

de sódio (DMSO) puro, na concentração de 0,1mg/mL. Esta solução foi diluída em meio de cultura para chegar nas concentrações de 250; 25; 2,5 e 0,25µg/mL; o volume final no poço foi de 200 µL de meio.

Após 72hs as células foram fixadas com 50µL de ácido Tricloroacético (TCA) 50% a 4°C e incubadas por 1h a 4°C. A seguir foram lavadas por quatro vezes em água destilada para remoção dos resíduos e submetidas à secagem em temperatura ambiente (Skehan & Friedman, 1985).

Após a secagem as células foram coradas por 30 minutos com SRB a 0,4% em 1% de ácido acético. Decorrido este período, o excesso de corante foi removido por inversão e as placas lavadas com ácido acético 1% por 3 vezes. Após secagem das placas o corante ligado à proteína foi solubilizado em Trisbase 10 µmM com pH 10,5 durante 5 minutos em agitador de placas ou ultra-som. A leitura da absorbância em 560nm foi realizada em espectrofotômetro.

4.8. Ensaio da Sulforrodamina B (SRB)

Ao final dos testes, as placas de 96 compartimentos foram centrifugadas por 3 minutos a 2000 rpm, e foram fixadas com 50µL de uma solução a 50% ácido tricloroacético (TCA) para as células aderidas e 80% para as células em suspensão a 4°C. Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4°C.

As placas foram então submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários e mantidos à temperatura ambiente até a secagem completa.

Em seguida, as placas foram coradas pela adição de 50µL SRB a 0,4% (peso/volume) dissolvidos em ácido acético a 1%, e mantidas a 4°C por 30 minutos. Logo, foram lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1%. O

resíduo da solução de lavagem foi removido e as placas foram novamente secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base (Sigma®) na concentração de 10 μ M e pH 10,5 por 5 minutos em ultrassom. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 560nm em um leitor de microplacas (Labsystems Multiskan®).

5. Ensaio Antiviral

A atividade antiviral dos extratos foi avaliada a partir do conhecimento prévio do título viral, calculados com base no método Spearman & Karber (Lorenz & Bogel, 1973), da determinação da concentração máxima não tóxica e do cultivo celular da linhagem CRIB.

Os extratos, utilizados de três formas distintas, são considerados eficazes contra o vírus quando a titulação apresenta diminuição de 1,5 log em relação ao título do controle, assim como o percentual de inibição (PI) do efeito citopático for de 97%.

Para analisar o possível efeito antiviral dos extratos, os mesmo foram incubados da seguinte forma: (i) pré-tratamento (preventiva), onde a mono camada celular é incubada com o extrato por uma hora em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após o tempo de incubação, as células foram infectadas com o vírus; (ii) pós-tratamento (curativo), onde a monocamada celular é incubada junta ao vírus por uma hora em estufa com 5% de CO₂ a 37°C e posteriormente foi adicionado o extrato; (iii) virucida, onde o vírus é previamente incubado junto ao extrato por uma hora em estufa com 5% de CO₂ a 37°C e após este tempo, a monocamada de células é infectada.

Para cada tratamento acima descrito foram realizadas leituras de 24-96 horas, em busca do ECP característico. Os títulos foram calculados com base no método de Spearman & Karber (Lorenz & Bögel, 1973).

6. RESULTADOS

6.1. Cultivo do BRSV

A amostra autóctone de BRSV, BRSV-25-BR, isolada de animais provenientes de casos clínicos ocorridos no Rio Grande do Sul, foi utilizada no presente trabalho (Arns *et al.*, 2003).

A linhagem CRIB, em relação à CER, se apresenta mais permissiva à infecção com diferentes isolados de BRSV, dando origem a uma eficiente replicação e aumento da infecção em título viral após três passagens em célula. Nesta linhagem, infectada pela amostra BRSV-25-BR, houve 75% de efeito citopático observado na monocamada 3-4 dias após a infecção (Spilki *et al.*, 2005). Desta forma considerou-se mais adequada a utilização da linhagem CRIB para a produção de estoques virais com a amostra BRSV-25-BR em detrimento da linhagem celular CER, inicialmente escolhida para este projeto.

A amostra viral foi multiplicada em células CRIB. As amostras virais foram inoculadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm² e quando a monocamada apresentou 70% de efeito citopático (Figura 3) característico foi procedida a raspagem da monocamada e agitação vigorosa até a dissolução dos grumos celulares; após, alíquotas de 1 a 2 mL contendo a mistura vírus-célula foram separadas em tubos de criopreservação. Estoques de vírus portando 10^{5,0} doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC₅₀) por 50µL foram estocados a -70°C para uso posterior seguindo métodos usuais (Arns *et al.*, 2003).

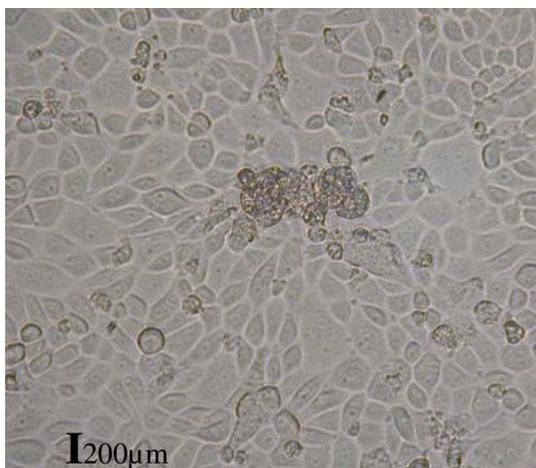


FIGURA 3: Fotomicrografia óptica, em aumento 200X, de cultura em monocamada da linhagem celular CRIB apresentando efeito citopático característico do BRSV.

Barra de escala= 200µm

6.2. Cultivo do aMPV

Foi utilizado uma estirpe aMPV designado ch/A/BR/668/03, isolada no Brasil (D'Arce *et al.*, 2005). As amostras virais foram inoculadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm² e quando a monocamada apresentou 70% de efeito citopático característico foi procedida a raspagem da monocamada e agitação vigorosa até a dissolução dos grumos celulares; após, alíquotas de 1 a 2 mL contendo a mistura vírus-célula foram separadas em tubos de criopreservação, realizado da mesma que o BRSV. Passagem do vírus foi realizada em células CER observado na monocamada 2-3 dias após a infecção, com 75% de efeito citopático (Figura 4). As células foram cultivadas a 37 ° C sob atmosfera de 5% de CO₂ em meio mínimo essencial de Eagle (MEME) livre de antibióticos e suplementado com soro bovino fetal a 10% (SFB). Estoques de vírus portando 10^{5,0} doses infectantes para 50% dos cultivos celulares

(DICC₅₀) por 50µL foram estocados a -70°C para uso posterior seguindo métodos usuais (Arns *et al.*, 2003).

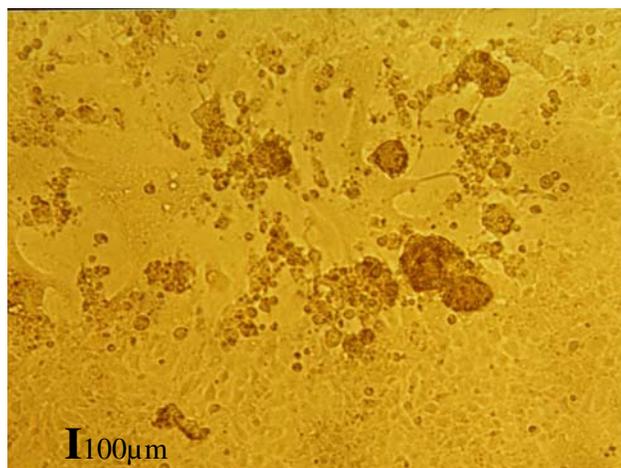


FIGURA 4: Fotomicrografia óptica, em aumento 200X, de cultura em monocamada da linhagem celular CER apresentando efeito citopático característico do BRSV.

Barra de escala= 100µm

6.3. Concentração Máxima não tóxica (CMNT)

Todos os extratos testados mostraram-se, em diferentes concentrações, não tóxicos para as células utilizadas no presente estudo. Desta forma, todos os extratos podem ser utilizados para os experimentos subsequentes para a investigação da possível atividade antiviral. Esta etapa foi fundamental para estabelecer a concentração inicial para a utilização dos diferentes extratos.

Figuras 5A – 5U: Curva concentração resposta dos diferentes extratos frente as diferentes linhagens celulares (CRFK*, MDCK*, CER e CRIB)

*As células Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) e Crandell Rees Feline Kidney (CRFK) foram acrescentadas apenas para este ensaio e serão utilizadas para estudos futuros.

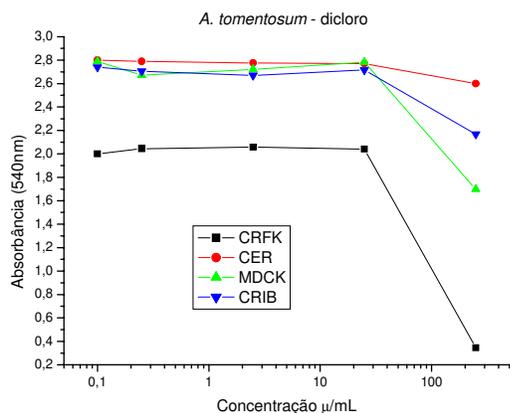


Figura 5A: Curva concentração resposta do extrato dicloro obtido da *A. tomentosum* frente as diferentes linhagens celulares. Valores em µg/mL.

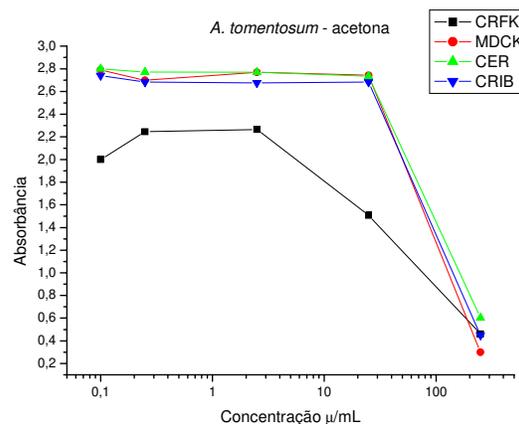


Figura 5B: Curva concentração resposta do extrato acetona obtido da *A. tomentosum* frente as diferentes linhagens celulares. Valores em µg/mL.

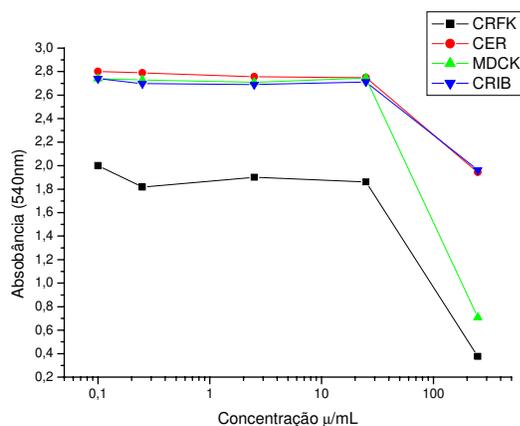


Figura 5C: Curva concentração resposta do extrato dicloro obtido da *G. brasiliense* frente as diferentes linhagens celulares. Valores em µg/mL.

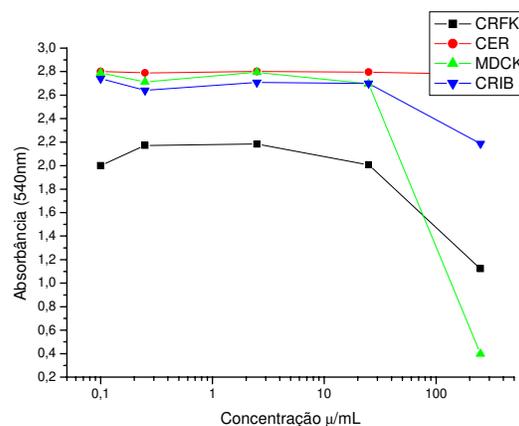


Figura 5D: Curva concentração resposta do extrato dicloro obtido da *G. brasiliense* frente as diferentes linhagens celulares. Valores em µg/mL.

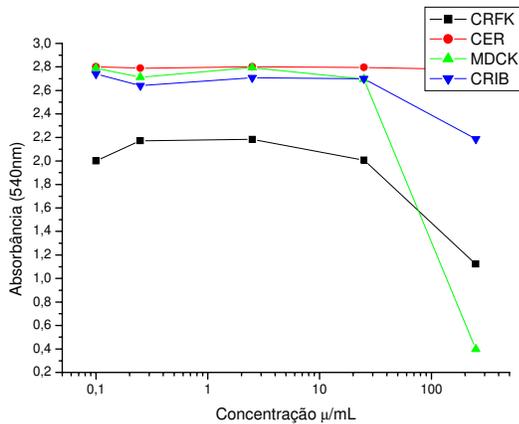


Figura 5E: Curva concentração resposta do extrato dicloro obtido da *G. brasiliense*. frente as diferentes linhagens celulares. Valores em µg/mL.

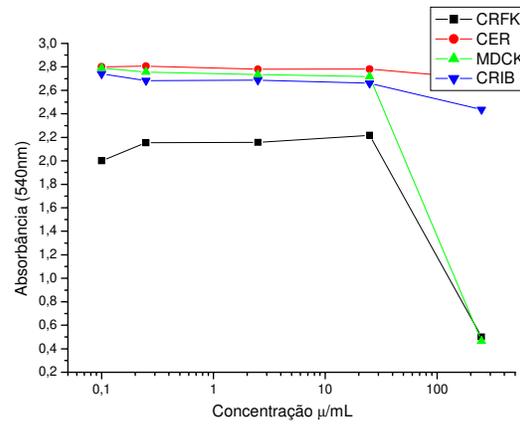


Figura 5F: Curva concentração resposta do extrato dicloro obtido da *G. brasiliense*. frente as diferentes linhagens celulares. Valores em µg/mL.

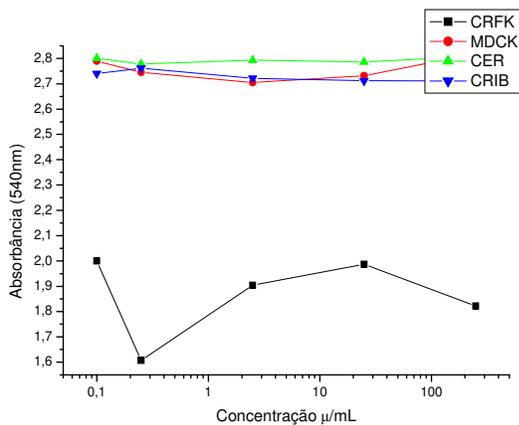


Figura 5G: Curva concentração resposta do extrato acetona obtido da *G. brasiliense*. frente as diferentes linhagens celulares. Valores em µg/mL.

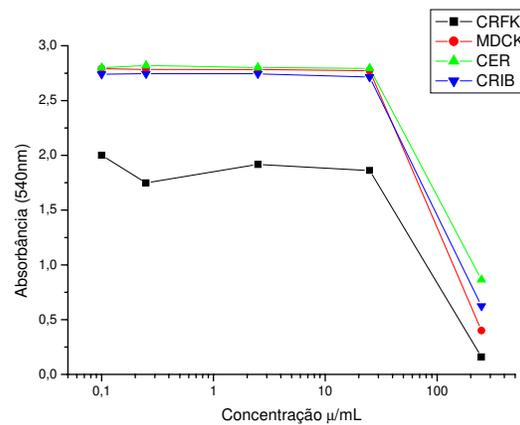


Figura 5H: Curva concentração resposta do extrato acetato obtido da *G. brasiliense*. frente as diferentes linhagens celulares. Valores em µg/mL.

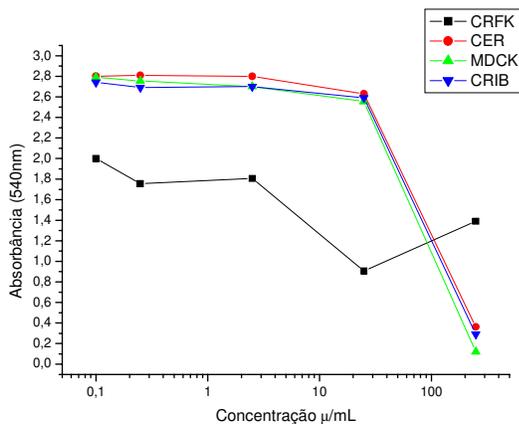


Figura 5I: Curva concentração resposta do extrato acetato obtido da *Pterodon emarginatus* frente as diferentes linhagens celulares. Valores em µg/mL.

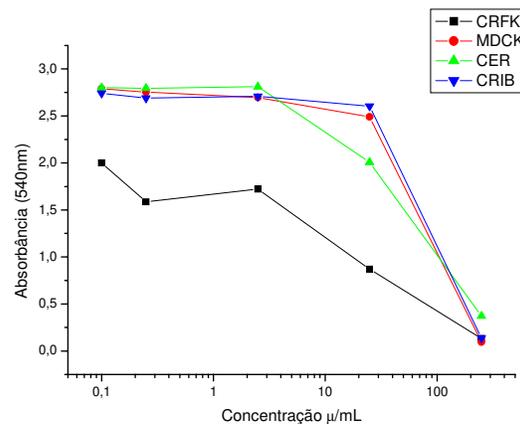


Figura 5J: Curva concentração resposta do extrato acetato obtido da *Pterodon emarginatus* frente as diferentes linhagens celulares. Valores em µg/mL.

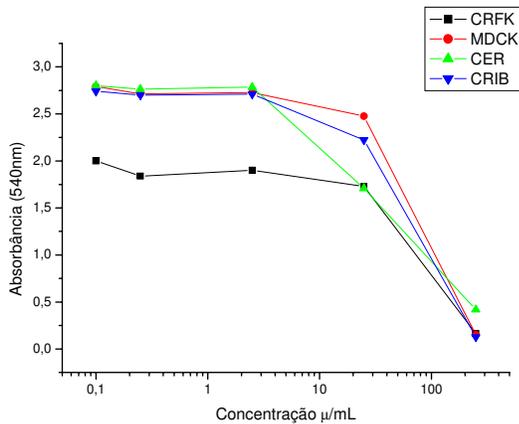


Figura 5K: Curva concentração resposta do extrato percolato obtido da *Pterodon emarginatus* frente as diferentes linhagens celulares. Valores em $\mu\text{g/mL}$.

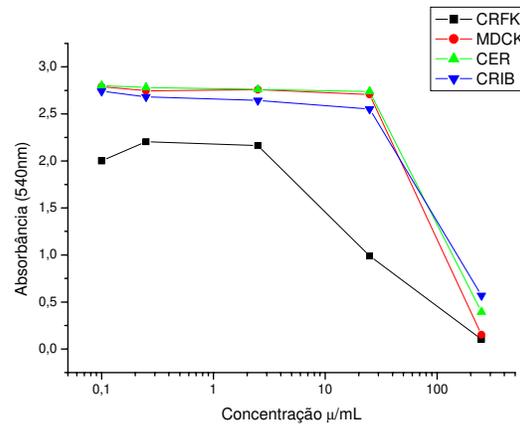


Figura 5L: Curva concentração resposta do extrato acetato obtido da *Pterodon emarginatus* frente as diferentes linhagens celulares. Valores em $\mu\text{g/mL}$.

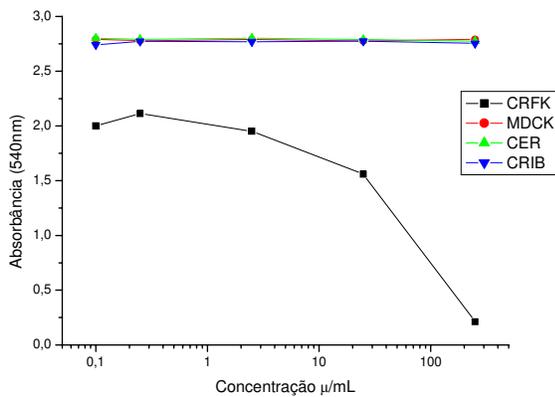


Figura 5M: Curva concentração resposta do extrato dicoro obtido da *Virola sebifera* frente as diferentes linhagens celulares. Valores em $\mu\text{g/mL}$.

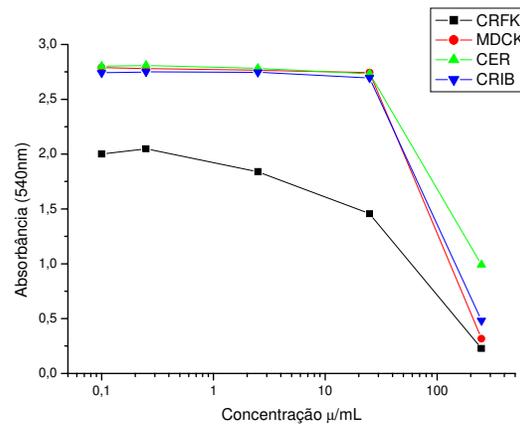


Figura 5N: Curva concentração resposta do extrato etanólico obtido da *Virola sebifera* frente as diferentes linhagens celulares. Valores em $\mu\text{g/mL}$.

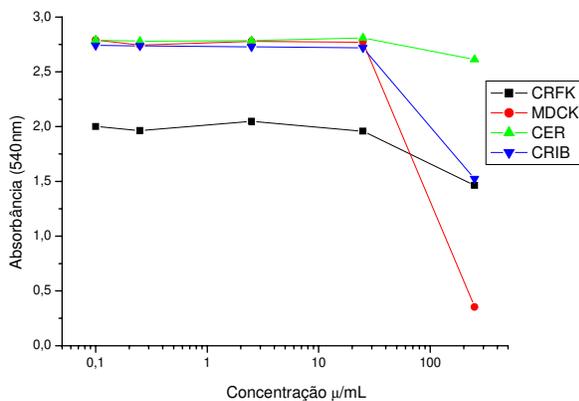


Figura 5O: Curva concentração resposta do extrato obtido da *Baccharis dracunculifolia* frente as diferentes

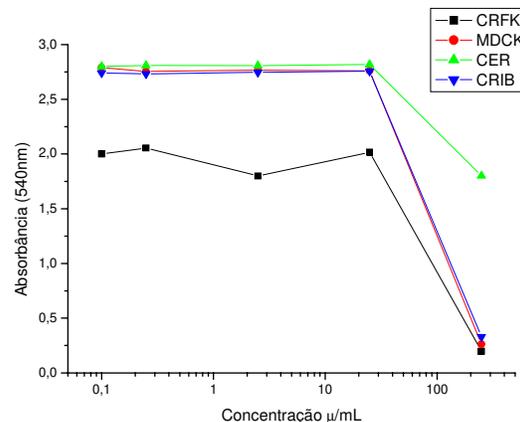


Figura 5P: Curva concentração resposta do extrato obtido da *Bursera aloexylon* frente as diferentes linhagens

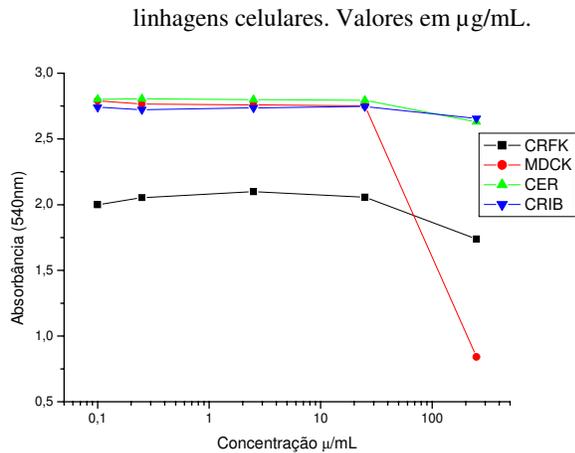


Figura 5Q: Curva concentração resposta do extrato obtido da *Copaifera langsdorff* frente as diferentes linhagens celulares. Valores em $\mu\text{g/mL}$.

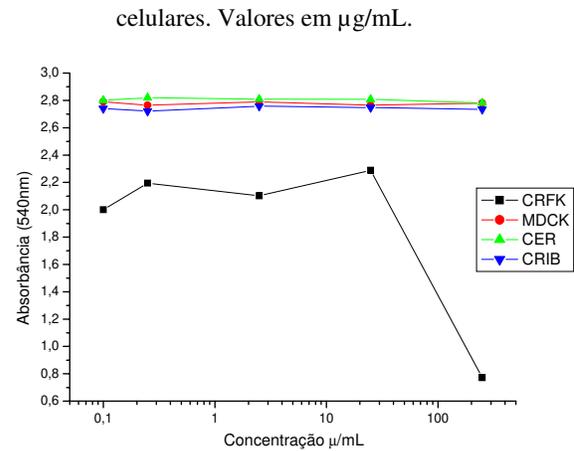


Figura 5R: Curva concentração resposta do extrato obtido da *Maytenus ilicifolia* frente as diferentes linhagens celulares. Valores em $\mu\text{g/mL}$.

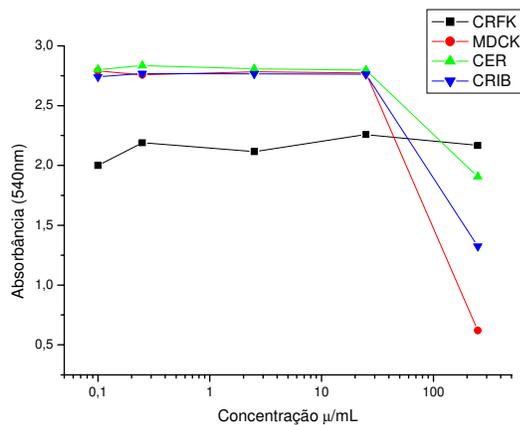


Figura 5S: Curva concentração resposta do extrato obtido da *P. paniculata* frente as diferentes linhagens celulares. Valores em $\mu\text{g/mL}$.

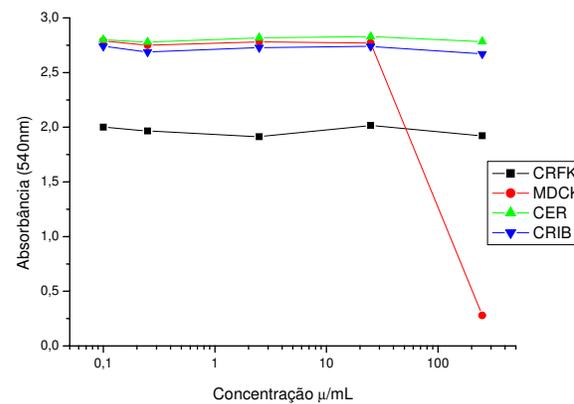


Figura 5T: Curva concentração resposta do extrato obtido da *P. glomerata* frente as diferentes linhagens celulares. Valores em $\mu\text{g/mL}$.

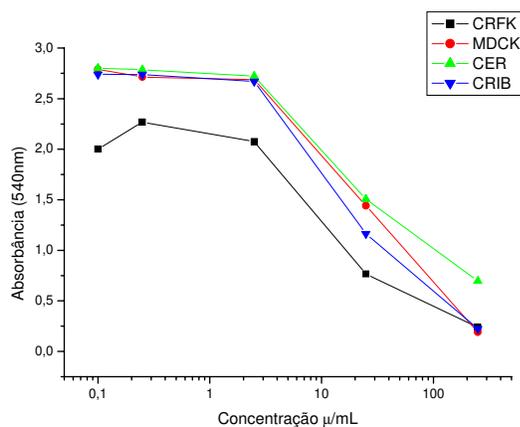


Figura 5U: Curva concentração resposta do extrato dicloro obtido da *Kielmeyera coriacea* frente as diferentes linhagens celulares. Valores em $\mu\text{g/mL}$.

A análise destes gráficos permitiu determinar as concentrações que foram utilizadas nos ensaios antivirais, escolheu-se aquela que não apresentava nenhum efeito tóxico, ou seja, utilizando a maior concentração não tóxica. Todas as placas foram visualizadas ao microscópio ótico e as diferentes concentrações estão listadas na tabela 1.

Tabela 1. Concentração Máxima Não Tóxica para todas as espécies vegetais avaliadas em relação aos cultivos de células CER e CRIB. Valores em µg/mL.

Espécies Vegetais	CER	CRIB
<i>Aspidosperma tomentosum</i>	25 µg/mL	25 µg/mL
<i>Pterodon emarginatus</i>	2,5 µg/mL	2,5 µg/mL
<i>Kielmeyera coriacea</i>	0,25 µg/mL	0,25 µg/mL
<i>Virola sebifera</i>	2,5 µg/mL	2,5 µg/mL
<i>Gaylussacia brasiliensis</i>	25 µg/mL	25 µg/mL
<i>Pfaffia glomerata</i>	250 µg/mL	250 µg/mL
<i>Bursera aloexylon</i>	250 µg/mL	25 µg/mL
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	250 µg/mL	25 µg/mL
<i>Maytenus ilicifolia</i>	250 µg/mL	25 µg/mL
<i>Copaifera langsdorff</i>	250 µg/mL	25 µg/mL
<i>Arrabidaea chica</i>	2,5 µg/mL	2,5 µg/mL
<i>Aniba rosaeodora</i>	25 µg/mL	25 µg/mL

6.4. Ensaio Antiviral

Foram testadas 12 espécies de plantas, algumas com diferentes solventes e ou métodos de extração, a saber: *Sucupira* estreito; *Sucupira* percolato; *Sucupira* elomar; *Sucupira* cariona; *Pfaffia glomerata*; *Aspidosperma tomentosum* acetato; *Aspidosperma tomentosum* diclorometano; *Aspidosperma tomentosum* acetona; *Arrabidaea chica* Verlot.; *Gaylussacia brasiliensis* 7:3; *Gaylussacia brasiliensis* 6:4; *G. brasiliensis* acetato, *G. brasiliensis* acetona e *G. brasiliensis* diclorometano; *Kielmeyra coriacea*; *Viola sebifera* diclorometano; *Viola sebifera* ETOH; *Bursera aloexylon*; *Baccharis dracunculifolia*; *Maytenus ilicifolia*, *Copaifera langsdorff*; *Mili* ETOH e *Aniba rosaeodora* Ducke. (Lin3). Os resultados utilizando os extratos acima não apresentaram atividade antiviral ou a diferença entre o título viral apresentado foi muito baixo em relação ao título viral do controle (títulos que variaram de 0,25 a 1,25) e, portanto não foram considerados ativos contra o BRSV e o aMPV nas condições aqui estipuladas.

Entretanto, o extrato *Aspidosperma tomentosum* em dois diferentes solventes utilizados (acetato e diclorometano) foram ativos para o BRSV e aMPV. As espécies vegetais *Viola sebifera* Aubl.; *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B.Verl.; *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. e *Anniba rosaeodora* Ducke (Lin 3) apresentaram atividade antiviral para o aMPV no pós-tratamento, conforme demonstrado nas tabelas abaixo.

Em relação à tabela 2, podemos verificar a atividade antiviral de 97% de inibição do efeito citopático em relação ao controle de células não tratadas com o extrato. Esse efeito ocorreu no pré-tratamento, onde as células CRIB já estabelecidas na microplaca de cultura em uma monocamada confluyente receberam a diluição máxima não tóxica do extrato *A. tomentosum* – solvente acetato e acetona e depois decorrido o tempo de 1 hora foi inoculado a amostra viral de BRSV.

Tabela 2. Avaliação da atividade antiviral da espécie *Aspidosperma tomentosum* frente ao BRSV utilizando os resultados da CMNT.

Concentração CMNT		Amostra/solvente	BRSV		
			Leitura		
			3° dia	5° dia	7° dia
2,5µg/mL	<i>A.tomentosum</i>	acetato	10 ³ /90*	10 ^{3,25} /94	10 ^{3,25} /97
		acetona	10 ³ /90	10 ^{3,25} /94	10 ^{4,25} /68
		diclorometano	10 ³ /90	10 ^{3,25} /94	10 ^{3,25} /97
		Controle do vírus (título viral DICC ₅₀ /mL)	10 ⁴	10 ^{4,5}	10 ^{4,75}

* título do vírus na presença do extrato/porcentagem de inibição, no tratamento: E+V (pré tratamento). Os resultados marcados **em amarelo** foram considerados ativos.

Em relação à tabela 3, podemos verificar a atividade antiviral de 4 espécies de plantas com inibição do efeito citopático em relação ao controle de células não tratadas com o extrato. Esse efeito ocorreu no pós-tratamento, onde as células CER já estabelecidas na microplaca de cultura em uma monocamada confluyente receberam a amostra viral aMPV 668 e depois de 1 hora foram colocados o extrato nas diluições máximas não tóxicas dos extratos *A. tomentosum* – solvente acetona; *V. sebifera* – Etanol 70%; *G. brasiliensis* em três diferentes solventes e da espécie *Arabidea chica*.

Tabela 3: Avaliação da atividade antiviral das espécies vegetais frente ao aMPV utilizando os resultados da CMNT.

Concentração CMNT	Amostra/Solvente		aMPV 668		
			1º dia	2º dia	3º dia
2,5µg/mL	<i>A.tomentosum</i>	acetato	10 ^{3,5} /0*	10 ^{4,5} /90	10 ^{4,5} /83
		diclorometano	10 ^{2,5} /83	10 ^{5,5} /44	10 ^{5,25} /0
		acetona	10 ^{2,5} /83	10 ⁴ /97	10 ^{4,5} /83
	<i>V. sebifera</i>	Dicloro	10 ^{2,5} /83	10 ⁵ /68	10 ⁵ /44
		Etanol 70%	10 ^{3,5} /0	10 ^{3,5} /99	10 ⁵ /44
	<i>G. brasiliensis</i>	Etanol 70%	10 ^{2,5} /83	10 ^{4,5} /90	10 ^{4,25} /90
		6:4 Etanol :água	10 ^{2,5} /83	10 ^{3,25} /99	10 ^{4,0} /94
		Acetato de etila	0/100	10 ^{3,5} /99	10 ^{3,5} /98
		diclorometano	0/100	10 ^{3,25} /99	10 ^{3,75} /97
		acetona	10 ^{2,5} /83	10 ^{3,25} /99	10 ^{4,25} /90
	<i>Arabidea chica</i>	SE	10 ^{2,75} /68	10 ^{3,25} /99	10 ^{4,75} /68
CE		10 ^{3,5} /0	10 ^{4,75} /83	10 ^{4,75} /68	
25µg/mL	<i>M. ilicifolia</i>	Etanol 70%	10 ^{2,5} /83	10 ^{4,25} /94	10 ^{4,5} /44
	<i>B. aloexylon</i>	óleo	10 ^{2,5} /83	10 ^{4,75} /83	10 ^{4,75} /68
	<i>A.rosaeodora</i>	óleo	10 ^{2,5} /83	10 ^{4,75} /83	10 ⁵ /83
2,5µg/mL	<i>B.dracunculifolia</i>	óleo	10 ^{1,5} /98	10 ^{4,25} /94	10 ^{4,25} /90
25µg/mL	<i>P. Glomerata</i>	Etanol 70%	10 ^{2,25} /90	10 ^{4,25} /94	10 ^{4,75} /68
0,25µg/mL	<i>P. pubenses</i>	diclorometano	10 ^{3,5} /0	10 ^{5,0} /68	10 ⁵ /44
		diclorometano	10 ^{2,5} /83	10 ^{4,5} /90	10 ^{4,5} /83
		percolação	10 ^{2,75} /68	10 ^{4,5} /90	10 ^{4,75} /68
	<i>K. coreacea</i>	diclorometano	10 ^{3,0} /44	10 ^{4,5} /90	10 ^{4,75} /68
	<i>P. pubenses</i>	diclorometano	10 ^{3,0} /44	10 ^{4,75} /83	10 ^{4,75} /68
	Controle do vírus (título viral DICC ₅₀ /mL)		10 ^{3,25}	10 ^{5,5}	10 ^{5,25}

* título do vírus na presença do extrato/porcentagem de inibição, nos diferentes tratamentos : E+V (pré tratamento), V+E (pós tratamento) e VE (vírus Inativação)
Os resultados marcados em amarelo foram considerados ativos

A figura 6 correlaciona os títulos virais obtidos com os tratamentos com as diferentes espécies vegetais (*Maytenus ilicifolia*, *Bursera aloexylon* (*Bur*), *Baccharis*

dracunculifolia (Bacc), *Aniba rosaedora* (Lin), *Gaylussacia brasiliensis* (gl e *Copaifera langsdorff* (Cop); controle do título viral), nas suas respectivas CMNT sendo que apenas o extrato bruto obtido da *Aniba roseadora* (Lin) apresentou atividade antiviral com porcentagem de inibição viral de 98% frente ao aMPV.

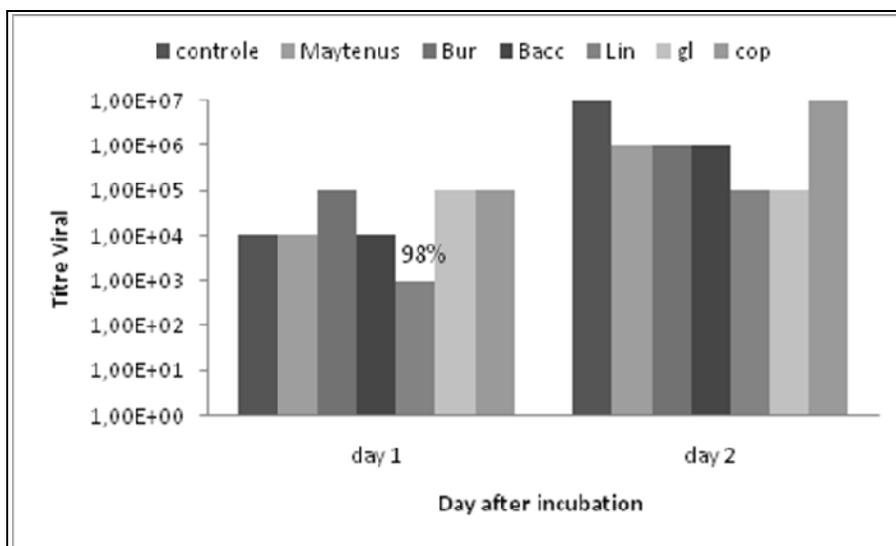


Figura 6: Atividade Antiviral de amostras vegetais frente ao aMPV no Pós tratamento. No 1º e 2º dia a pós a inoculação. Plantas: *Maytenus ilicifolia*; *Bursera aloexylon*; *Baccharis dracunculifolia*; *Aniba rosaedora*; *Pfaffia glomerata*; *Copaifera langsdorffii*; Inibição de 1,5 log do título viral em células tratadas com extrato em relação ao título viral controle, ou seja, diminuição de 97% do efeito citopático do vírus no primeiro dia pós inoculação. Controle: título viral DICC₅₀/mL.

A figura 7 correlaciona os títulos virais obtidos com os tratamentos com os diferentes solventes na espécie vegetal *Aspidosperma tomentosum*; (controle do título viral), nas suas respectivas CMNT sendo que a atividade antiviral ocorreu no extrato

bruto com os solventes acetato e acetona para o vírus BRSV e acetona para aMPV com porcentagem de inibição viral de 97% para todos.

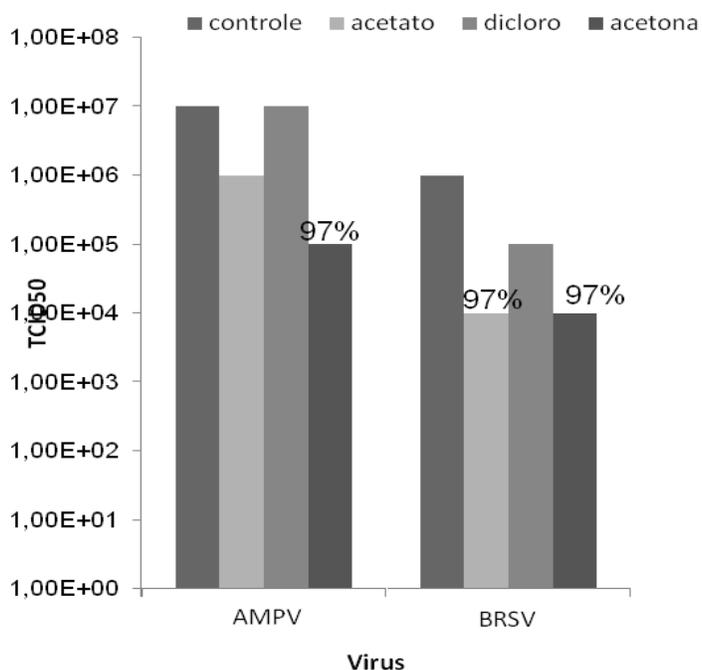


Figura 7: Atividade Antiviral *Aspidosperma tomentosum* (solventes: acetato; dicloro; acetona) frente ao aMPV e BRSV. Inibição de 1,5 log do título viral em células tratadas com extrato em relação ao título viral controle, ou seja, diminuição de 97% do efeito citopático do vírus. Controle: título viral DICC₅₀/mL.

A figura 8 correlaciona os títulos virais obtidos com os tratamento com as diferentes espécies vegetais (*Maytenus ilicifolia*, *Bursera aloexylon* (*Bur*), *Baccharis dracunculifolia* (*Bacc*), *Aniba rosaedora* (*Lin*), *Gaylussacia brasiliensis* (*gl*) e *Copaifera langsdorff* (*Cop*); controle do título viral), nas suas respectivas CMNT sendo que apenas o extrato bruto obtido da *Aniba roseadora* (*Lin*) apresentou atividade antiviral com porcentagem de inibição viral de 98% frente ao aMPV.

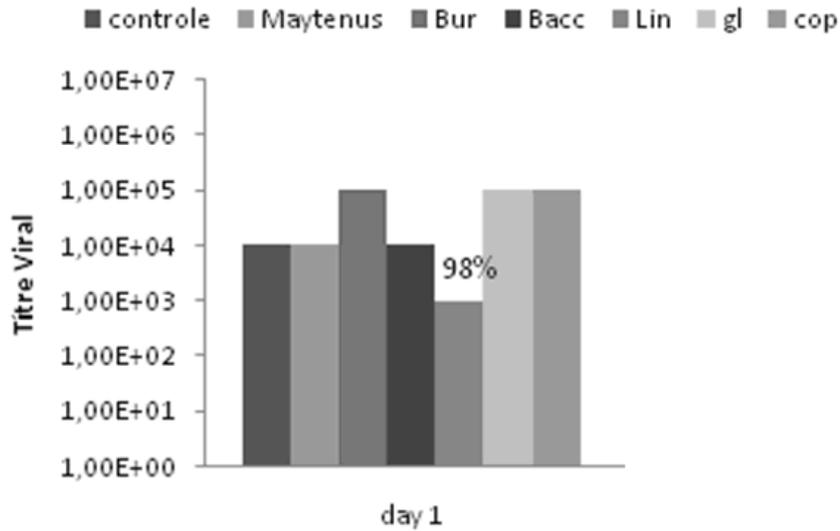


Figura 8: Atividade Antiviral da espécie vegetal *Aniba rosaeodora* frente ao aMPV, inibição maior que 1,5 log do título viral em células tratadas com extrato em relação ao título viral controle, ou seja, diminuição de 98% do efeito citopático do vírus no 1º dia pós inoculação. Controle: título viral DICC₅₀/mL.

A figura 9 correlaciona os títulos virais obtidos com os tratamentos com os diferentes solventes na espécie vegetal *Virola sebifera*; (controle do título viral), nas suas respectivas CMNT sendo que a atividade antiviral ocorreu no extrato bruto com o solvente etanol para o vírus aMPV com porcentagem de inibição viral de 97%.

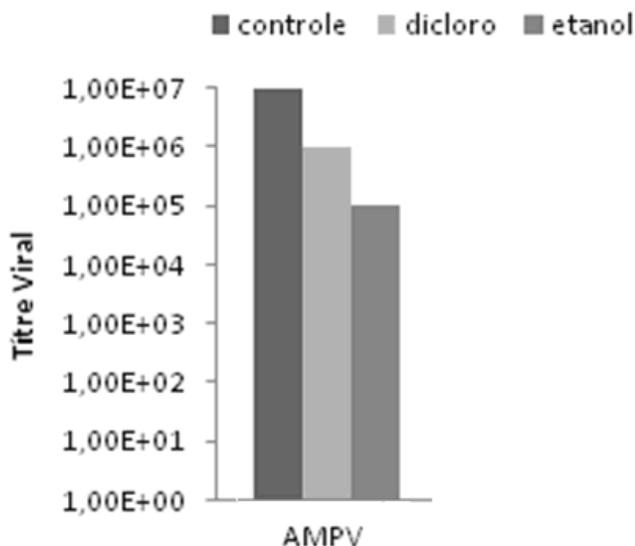


Figura 9: Atividade Antiviral da espécie vegetal *Virola sebifera* (nos solventes: dicloro e etanol) frente ao aMPV. Inibição de 1,5 log do título viral em células tratadas com extrato em relação ao título viral controle, ou seja, diminuição de 97% do efeito citopático do vírus. Controle: título viral DICC₅₀/mL.

A figura 10 correlaciona os títulos virais obtidos com os tratamentos com os diferentes solventes na espécie vegetal *Arrabidaea chica*; (controle do título viral), nas suas respectivas CMNT sendo que a atividade antiviral ocorreu no extrato bruto com o solvente *se* (sem tratamento enzimático) para o vírus aMPV com porcentagem de inibição viral de 97%.

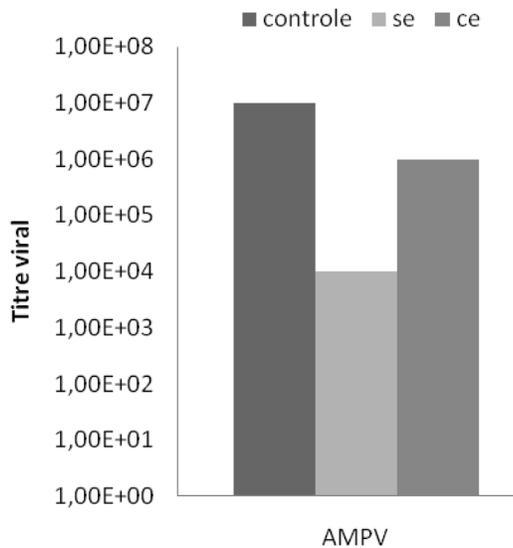


Figura 10: Atividade Antiviral da espécie vegetal *Arrabidaea chica* (em duas amostras diferentes: sem enzima e com enzima xilase) frente ao aMPV. Inibição de 1,5 log do título viral em células tratadas com extrato em relação ao título viral controle, ou seja, diminuição de 97% do efeito citopático do vírus. Controle: título viral $DICC_{50}mL$.

A figura 11 correlaciona os títulos virais obtidos com os tratamentos com os diferentes solventes na espécie vegetal *Gaylussacia brasiliensis*; (controle do título viral), nas suas respectivas CMNT sendo que a atividade antiviral ocorreu nos extratos brutos com os solventes/diluições: 7:3; 6:4; acetato; dicloro e acetona para o vírus aMPV com porcentagem de inibição viral de 99%.

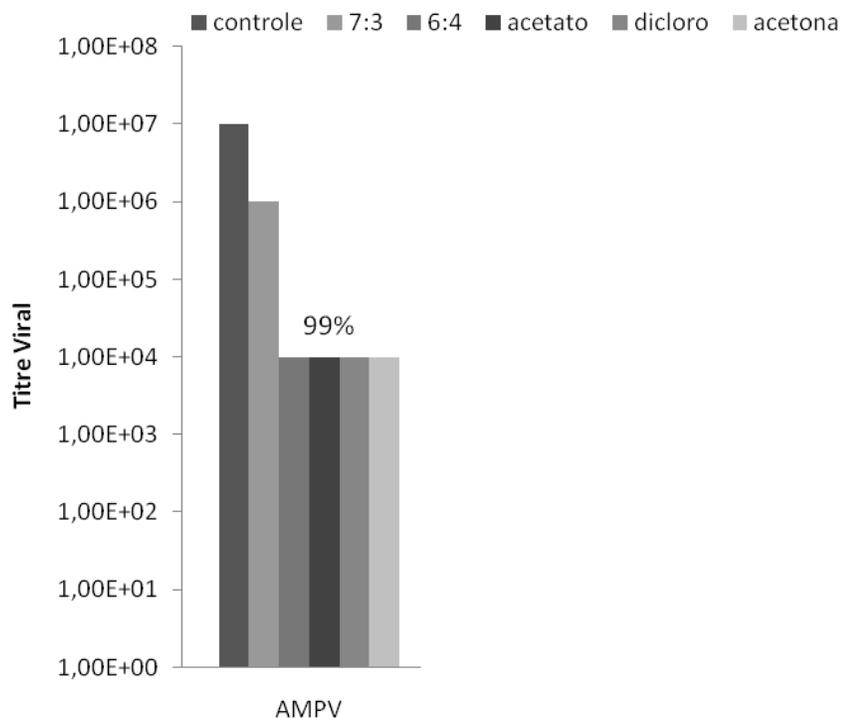


Figura 11: Atividade Antiviral da espécie vegetal *Gaylussacia brasiliensis* nas diluições dos solventes 7:3 (70% etanol:30% água); 6:4 (60% etanol: 40% água); acetato; dicloro e acetona frente ao aMPV. Inibição de 2 log do título viral em células tratadas com extrato em relação ao título viral controle, ou seja, diminuição de 99% do efeito citopático do vírus.

7. DISCUSSÃO

O Brasil é considerado como um dos países de maior biodiversidade no mundo, pois se calcula que nada menos do que 10% de toda a biota terrestre encontram-se no país (Mittermeier *et al.*, 1997 *apud* Debprasad, 2009). Embora as estimativas de riqueza variem enormemente, o universo das espécies de conhecidas para os principais grupos taxonômicos já é suficiente para colocar o país no primeiro lugar mundial em termos de espécies. Além do tamanho, o isolamento geográfico observado no passado remoto e a grande variação de ecossistemas seriam as razões que explicam tal diversidade.

O uso de produtos naturais como matéria prima para a síntese de substâncias bioativas, especialmente fármacos, tem sido amplamente relatado ao longo do tempo. A própria evolução dos conceitos de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos traduzem esse desenvolvimento, que levou a uma abordagem interdisciplinar no estudo de vegetais como fornecedores de matérias primas de interesse terapêutico (Simões *et al.*, 2003).

Cerca de 25% das drogas prescritas no mundo vem de plantas, 121 como compostos ativos em uso corrente. Das 252 drogas consideradas como essenciais e básicas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são de origem exclusivamente de plantas e um número significativo é de drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (Rates, 2001).

A maioria das plantas, como por exemplo, a *Aspidosperma tomentosum* e *Arrabidaea chica*, utilizadas neste trabalho, é oriunda do cerrado brasileiro, maior região de savana na América e ocupava cerca de 2.000.000 km², principalmente no Planalto Central Brasileiro (Silberbauer, 2006). Áreas disjuntas também ocorrem nos limites do sul de seu domínio, como no estado de São Paulo (Durigan *et al.*, 2003). O cerrado tem um clima sazonal e experiências de uma estação seca pronunciada

(Silberbauer, 2006). Os solos são ácidos e pobres em nutrientes com capacidade de troca de cátions baixos e altos níveis de saturação de alumínio (Silberbauer, 2006). O cerrado também sofre freqüentes incêndios que consomem principalmente a camada de solo gramado, prejudicando o desenvolvimento de mudas de espécies lenhosas (Silberbauer, 2006). Apesar destas limitações ambientais, no entanto, o cerrado apresenta uma das floras mais ricas dos trópicos (Mittermayer *et al.*, 1999). Esta rica flora do cerrado é espacialmente distinta e heterogênea, com mais da metade de suas espécies arbóreas, sendo encontrado em províncias florísticas restrito (Bridgewater *et al.*, 2004). Assim, compreender a riqueza florística do cerrado repousa, em parte, a compreensão da estrutura filogenética das comunidades de cerrado local.

Por este motivo, o cerrado tem despertado nos últimos anos um grande interesse nas pesquisas científicas (Simoni *et al.*, 2007). O cerrado é um tipo de vegetação confinado ao Brasil, com apenas algumas extensões que alcançam a Bolívia e o Paraguai. O cerrado trata-se de uma vegetação savânica muito antiga e altamente diversificada, com um número estimado de 10.000 espécies de plantas superiores (Durigan *et al.*, 2004). Segundo Vila Verde *et al.* (2003) o bioma Cerrado possui uma das maiores floras vegetais do mundo.

Recentemente, foi relatada uma série de compostos com ação antiviral isolados de plantas, que estão sendo utilizados na medicina tradicional incluído polissacarídeos, flavonóides, terpenos, alcalóides, fenóis e aminoácidos, observando inibição da replicação de alguns vírus tais como: Herpes simples (HSV), imunodeficiência humana (HIV), Hepatite B (HBV) e a Síndrome respiratória aguda severa (SARS) (Cos *et al.*, 2006; Mukhtar *et al.*, 2008; Búfalo *et al.*, 2009).

O objetivo dos testes antivirais é parar a replicação viral antes que esta seja muito extensa e sem causar danos às células sobreviventes. Para isto, agentes antivirais

efetivos devem penetrar na célula e prevenir a multiplicação viral, sem interferir nos mecanismos normais de defesa da célula contra a infecção viral. Estes devem complementar a imunidade celular e a resposta humoral. Os testes antivirais devem especialmente o de triagem, empregar uma metodologia que apresenta relativa simplicidade, mas com procedimento confiável, e gerar informações úteis sobre um extrato escolhido, a fim de realizar estudos mais elaborados. O principal enfoque é escolher um extrato que reduz ou inativa a replicação viral numa concentração que não seja tóxica (Hu & Hstiung, 1989; Simoni, 2003).

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho mostraram-se permissivas aos extratos testados, chegando a concentrações não tóxicas para serem utilizadas nos testes antivirais. A linhagem celular CER demonstrou menos sensibilidade a toxicidade dos extratos em relação a linhagem celular CRIB. O maior número de resultados considerados positivos, ou seja, extratos que inibem ou diminuem atividade antiviral foi obtido através de ensaios em células CER, uma vez que houve a potencialização desta ação antiviral pelo uso de maiores concentrações do extrato. Destaca-se *Pfaffia glomerata*, espécie que apresentou menor toxicidade ao cultivo celular, e *Kielmeyera coriacea*, espécie que apresentou a maior toxicidade ao cultivo celular.

A metodologia de triagem *in vitro* utilizada neste trabalho, com algumas modificações, e preconizada pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos permite a avaliação das substâncias-teste em diversas linhagens celulares, possibilitando a descoberta de novas drogas. Outra vantagem é sua rapidez, eficiência e reprodutibilidade dos resultados (Monks *et al.*, 1991 & Shehan *et al.*, 1990).

Para o desenvolvimento deste trabalho, inicialmente foi realizada a padronização das linhagens celulares através do perfil de crescimento de cada uma delas, com finalidade de determinar o tempo correto para inoculação dos diferentes vírus utilizado

no experimento. Esta determinação é fundamental, já que as células devem estar confluentes e apresentarem a monocamada homogênea na placa de cultura celular para a montagem dos ensaios antivirais, uma vez que o vírus utiliza a maquinaria metabólica da célula para replicar seu material genético e formar a progênie viral. Esta densidade de inoculação foi definida através de um experimento utilizando cada linhagem celular, sendo selecionada aquela densidade que fornecesse os melhores resultados. Todas as linhagens celulares testadas mostraram-se permissíveis e resistentes aos extratos no ensaio de citotoxicidade.

Os vírus são ultramicroscópicos, acelulares, partículas nucleoproteicas metabolicamente inertes contendo “fitas” de gene RNA ou DNA, com ou sem envelope lipídico (Chattopadhyay *et al.*, 1999). Os vírus possuem numerosas estratégias de invasão e cada espécie tem sua própria e única configuração de moléculas de superfície (Wagner & Hewlett, 1999; Chattopadhyay & Bhattacharya, 2008), permitindo-lhes entrar nas células hospedeiras pois necessita adsorção de suas moléculas de superfície com as moléculas da célula-alvo. Por exemplo, o vírus que causa febre de Lassa e AIDS se espalha facilmente, rapidamente e matam, não tem cura ou vacina. Cada isolado do vírus é único em sua estrutura de superfície antigênica, seus receptores nas células e seu ciclo de vida. Como consequência da variação genética, a variedade no modo de transmissão, replicação e eficiente capacidade de persistir no hospedeiro, os vírus têm-se adaptado a todas as formas de vida e de ter ocupado numerosos nichos ecológicos, resultando em doenças comuns em seres humanos, animais e plantas (Wagner & Hewlett, 1999; Chattopadhyay, 2007).

A descoberta de novos medicamentos antivirais exige grandes esforços. Existem várias opiniões que foram publicadas nos últimos anos, indicando descoberta de novas

drogas contra diferentes infecções virais a partir de espécies vegetais (Khan *et al.*, 2005; Naithani *et al.*, 2008).

A espécie vegetal que apresentou atividade antiviral, tanto para aMPV quanto para BRSV, neste trabalho foi a *Aspidosperma tomentosum* Mart., selecionada após triagem de espécies provenientes do cerrado brasileiro, em um projeto de pesquisa financiado pela FAPESP (Processo nº 95/09607-5).

Os resultados mostraram que todos os extratos testados obtiveram concentrações não tóxicas para as diferentes linhagens celulares. Os extratos brutos obtidos das espécies vegetais utilizadas neste trabalho foram submetidos aos três diferentes ensaios antivirais *in vitro* utilizando as linhagens celulares CER para o aMPV e CRIB para o BRSV. A análise dos resultados demonstrou que a espécie *A. tomentosum* Mart. apresentou atividade antiviral, nas determinadas linhagens celulares, com PI de 98% para o aMPV no pós-tratamento (solvente acetona) e, PI de 97% para o BRSV no pré-tratamento (solventes acetato de etila e dicloro metano), ou seja, quando o extrato bruto é adicionado junto às células e mantido por 1 hora em estufa a 37°C com 5% CO₂ e após é adicionado o vírus. Além disso, *V. sebifera* L. (solvente etanol), *A. chica* Verlot., *G. brasiliensis* Meisn. (nos solventes: 6:4; acetato; dicloro e acetona) e *A. rosaeodora* Ducke. (óleo) foram ativas com PI de 98% para o aMPV no pós-tratamento, ou seja, a linhagem celular CER é inoculada com o vírus e mantida por 1 hora em estufa a 37°C com 5% CO₂ e após é adicionado o extrato bruto.

Na tentativa de elucidar qual componente do extrato foi responsável pela diminuição do título viral nas células tratadas, em relação ao controle do vírus, os extratos foram fracionados e as frações comparadas em um novo ensaio, porém, os testes não demonstraram atividade antiviral significativa (tabela 12). Tendo em vista a sazonalidade da produção de metabólitos secundários das plantas, a falta de atividade

antiviral neste ensaio pode ser explicada pelas diferentes datas de coleta da planta, que influenciam a produção destes metabólitos secundários (que provavelmente são os responsáveis pela atividade antiviral).

Entretanto, as demais espécies testadas não apresentaram, ou apresentaram menor, em relação atividade antiviral para os vírus em questão, sendo, portanto não considerados ativos. Nenhum extrato bruto apresentou atividade de “vírus-inativação” em relação aos vírus avaliados.

Paula-Junior *et al.*, (2006) testaram o extrato hidroetanólico das folhas de *Caryocar basiliense* (Caryocaraceae), uma planta muito encontrada no cerrado brasileiro. Como resultado foram identificadas atividade antimicrobiana, antioxidante e leishmanicida. Além disso, o trabalho relata a utilização dos frutos dessa planta na culinária por conter grande quantidade de vitaminas e a aplicação do óleo dos frutos no tratamento da influenza e doenças pulmonares. No presente estudo, a planta *Aspidosperma tomentosum*, que também possui atividade antimicrobiana e leishmanicida, apresentou atividade antiviral. Este resultado demonstra que plantas com potenciais terapêuticos dividem atividades tanto antibacteriana, antiviral e antiparasitária, simultaneamente.

Em 2007, Simoni *et al.*, realizaram um estudo explorando plantas presentes na região do cerrado. Nesse trabalho foi testada a atividade antiviral de 16 espécies de plantas e obtiveram-se resultados promissores contra o herpesvírus de bovino tipo 1 (BoHV-1) e o reovírus aviário.

As plantas produzem a maioria dos compostos essenciais à sua sobrevivência e desenvolvimento pelo metabolismo primário. Além desses, elas produzem uma grande variedade de metabólitos secundários, porém em pouca quantidade, os quais são os principais responsáveis pelas atividades farmacológicas. Esses compostos apresentam

uma ampla diversidade de estruturas e tamanhos, sendo distribuídos e encontrados por todo o reino vegetal. A maioria deles, tais como alcalóides, terpenóides, antocianinas, esteróides, flavonóides, quinonas e ligninas têm aplicações comerciais como fármacos, corantes, aroma, entre outros (Lourenço, 2003).

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

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

Ainda que centenas de plantas que tenham potencial como agentes antivirais estejam sendo estudadas, existem inúmeras plantas medicinais potencialmente úteis esperando para serem avaliadas e exploradas na aplicação terapêutica contra diversas famílias virais (Esimone *et al.*, 2005). Uma vez que não há registros de atividade antiviral de *A. tomentosum* os dados obtidos incentivam a descoberta de outros compostos que, em sinergismo, intensificam sua atividade antiviral; além de estudos para a determinação dos mecanismos de ação envolvidos nesta atividade.

No entanto, o extrato bruto natural geralmente possui "efeito sinérgico" e, frequentemente, o fracionamento causa a perda da atividade (Cos *et al.*, 2006). O interesse crescente na procura de novas abordagens para o controle de metapneumovirose aviária é evidente ao olhar para algumas publicações recentes por Munir *et al.*, (2006) e Ferreira *et al.*, (2007). Os resultados estão de acordo com esta

tendência de investigação confirmando que alguns extratos vegetais naturais contendo terpenos tem atividade antiviral *in vitro* contra aMPV. À luz desta evidência pode-se supor que a sensibilidade do aMPV à terpenos podem ser estendida a outros membros da família *Paramyxoviridae*, como Vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV), abrindo novas aplicações, economicamente relevantes de extratos naturais. Além disso, os resultados *in vitro* sugerem que complementar a dieta de aves de poedeiras com extratos naturais que contêm terpenos poderia contribuir para o controle de infecções entéricas de aves por outros vírus. Devido a complexidade do trato digestório de aves, mais estudos são necessários para confirmar em ensaios *in vivo* assim como a atividade antiviral observada *in vitro*, e para encontrar a concentração dos compostos necessários para acrescentar a dietas das aves para ter eficácia antiviral.

Embora não haja evidência de que essas plantas têm sido usadas como agentes antivirais, várias plantas medicinais pertencentes ao gênero têm sido muito utilizadas na medicina popular (Pio Correa, 1978; DerMarderosian & Beutler, 2002). Antes da avaliação da atividade antiviral, os efeitos citotóxicos dos extratos selecionados / frações em CER e células CRIB foram investigados. Para este propósito, o ensaio colorimétrico MTT foi utilizado, e para cada material testado um valor CC50 após 96h de incubação foi calculado. Este ensaio tem várias vantagens: é de fácil execução, as avaliações são objetivas, que pode ser automatizado usando um computador pessoal e da avaliação da citotoxicidade pode ser feita em paralelo com a avaliação da atividade antiviral (Takeuchi *et al.*, 1991; Andrighetti Frohner *et al.*, 2005; Palomino *et al.*, 2005).

As estruturas químicas mais encontradas de muitos dos agentes antivirais naturais pertencem a metabólitos de plantas superiores, incluindo às classes mono / di /, sesquiterpenos, alcalóides, saponinas, cardenolides, fenólicos, quinonas, flavonóides, taninos e outros (Colegate & Molyneux, 1993). Os inquéritos fitoquímicos anteriores

das plantas mais ativas relataram a presença de óleos voláteis, taninos, monoterpênicos e lactonas sesquiterpênicas em *Achillea fragrantissima* (Batanouny, 1999; Al Gaby, 2000; Al Samarrai *et al.*, 2003). A interessante atividade antiviral de *Aspidosperma tomentosum* contra o aMPV e BRSV que foi aqui relatado pode ser atribuído ao seu conteúdo de (tipo do extrato: óleo, EB), que é tradicionalmente utilizado como anti-séptico e tem propriedades relaxantes, por exemplo.

Outros trabalhos com plantas medicinais afirmam alta atividade antiviral, como por exemplo, as espécies *Arabica Globularia* e *Tanacetum sinaicum* que possuem atividade antiviral contra poliomielite, mas são espécies raras, dificultando assim a coleta para pesquisas futuras (DerMarderosian & Beutler, 2002).

Tanto quanto se sabe, até agora, este é a primeira pesquisa de atividade antiviral das espécies analisadas. Devido aos resultados da atividade antiviral das espécies de plantas e seus usos correspondentes na medicina popular, há necessidades de fazer novos estudos fitoquímicos de monitoramento por fracionamento antiviral biomonitorado seguido pelo isolamento e identificação afim de alcançar novas substâncias naturais com atividade antiviral a partir de novas espécies de plantas.

Há estudos que demonstram a atividade antiviral contra HSV-1 e o HSV-2 a partir do óleo essencial, obtido da espécie *A. arborescens*. Experimentos apresentaram uma inibição do título viral, na CMNT, quando os vírus foram expostos ao óleo essencial, antes de adsorção (vírus inativação), e adicionados em monocamadas de células, indicando que a atividade antiviral de *A. arborescens* é essencialmente devido aos efeitos diretos sobre o virion (Saddi *et al.*, 2007). Entretanto, não houve atividade antiviral, neste modo de tratamento nas espécies testadas em relação ao aMPV e ao BRSV.

Segundo Lupini *et al.* (2009); há evidências que sugerem que um extrato natural, contendo taninos, pode ser eficaz contra infecções virais entérica em aves. Além disso, estudos anteriores demonstraram que os taninos vegetais podem ter atividade antiviral contra vírus humano. Com base neste conhecimento, 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).

De forma geral, analisando a literatura podemos concluir que a triagem de plantas medicinais é de enorme importância na descoberta de novas drogas para o combate de agentes antivirais, assim como antibacterianos, antiprotozoários e antifúngicos. As plantas medicinais podem apresentar atividade para inúmeros vírus em diferentes sistemas celulares, sendo assim, estudos buscando essa atividade nestes diferentes sistemas são de fundamental importância, tendo em vista a grande biodiversidade de espécies vegetais presentes em nosso país.

A citotoxicidade dos extratos frente às diferentes linhagens celulares provavelmente esta relacionada diretamente com a diferença dos resultados obtidos no que diz respeito à investigação antiviral. A linhagem celular CRIB apresentou uma maior porcentagem de extratos podendo ser utilizados em uma concentração máxima não-tóxica de até 25mg/mL mostrando de certa forma alguma sensibilidade aos extratos-brutos das plantas. Por outro lado, a célula CER demonstrou ser mais eficiente nos testes antivirais visto que apresentou menor sensibilidade em relação a CRIB para os extratos testados, podendo ser utilizados na concentração máxima, desta forma potencializando assim o efeito antiviral.

O ensaio antiviral padronizado para o Laboratório de Virologia Animal - LVA/Unicamp poderá ser utilizado como triagem para outras espécies em busca de substâncias com potencial medicinal. As diferentes atividades de ação dos extratos sugerem a ocorrência de mecanismo de ação distinto entre os vírus avaliados. A continuidade deste trabalho terá como objetivo o isolamento das substâncias presentes nos extratos vegetais, assim como a identificação daquela(s) responsável(is) pela atividade antiviral.

8. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados sugerem atividade antiviral das espécies: *Aspidosperma tomentosum* Mart. frente ao BRSV e aMPV, ambos no pré-tratamento; *Virola sebifera* Aubl.; *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B.Verl.; *Gaylussacia brasiliensis* (Spreng.) Meisn. e *Anniba rosaeodora* Ducke (Lin 3) apresentaram atividade antiviral para o aMPV no pós-tratamento. Os demais extratos não apresentaram, ou apresentaram pouca, atividade antiviral significativa para os vírus em questão.

8.1. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- Este foi o primeiro estudo realizado utilizando estas espécies vegetais para esses dois diferentes vírus;
- Para todos os extratos testados obteve-se uma concentração não citotóxica para cada cultivo celular;
- O ensaio antiviral padronizado pode ser utilizado como triagem em busca de plantas com potenciais substâncias medicinais;
- A relação entre o ensaio antiviral e o ciclo replicativo do vírus sugere uma idéia sobre o mecanismo de ação desses extratos.

9. REFERÊNCIAS

- ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes – Disponível na página eletrônica <http://www.abiec.com.br/41_exportacao_ano.asp>. Acesso em 14/07/2010.
- Alm, K.; Koskinen, E.; Vahtiala, S.; Andersson, M. Acute BRSV Infection in Young AI Bulls: Effect on Sperm Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, **10**: 1439-1451, 2008.
- Andrade-Cetto, A. Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. **Journal of Ethnopharmacology**, **122**: 163-71. 2009.
- Anon. Roche., Avian Pneumovirus Workshop. **Roche Animal Nutrition and Health**. St Cloud, USA, 10: 1998.
- Arns, C.W.; Hafez, H.M. Isolation and identification of Avian Pneumovirus from broiler breeder flocks in Brazil. **44st Western Poultry Diseases Conference Sacramento, California, USA, 124-125**, 1995.
- Bäyon-Auboyer, M.H., Jestin, V. Comparison of F-, G- and N-based RTPCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. **Archives of Virology**, **144**:1091-109, 1999.
- Bäyon-Auboyer, M.H. ; Arnould, C. ; Toquin, D.; Eterradossi, N. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. **Journal of General Virology**, **81**: 2723-2733, 2000.
- Baker, J. C. Human and Bovine Respiratory Syncytial Virus - Immunopathological Mechanisms. **Veterinary Quarterly**, **13**: 47-59, 1991.
- Baker, J.C.; Ellis, J.A.; Clark, E.G. Bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice**. **13**: 425-6, 1997.
- Búfalo, M.C.; Candeias, J.M.; Sforcin, J.M. In vitro Cytotoxic Effect of Brazilian Green Propolis on Human Laryngeal Epidermoid Carcinoma (HEp-2) Cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, **6**: 483-7, 2009.
- Buys, S.B. ; Du Preez, J.H. A preliminary report on the isolation of virus causing sinusitis in turkeys in South Africa and attempts to attenuate the virus. **Turkeys**, **28**: 36-46, 1980.
- Bruce S.S., Holly S.S., Richard J.M. Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates. **Virus Research**, **66**: 139-47, 2000.

- Chattopadhyay, D.; Sem, M.R.; Aryya, N.C. Viruses, the acellular parasites of cellular hosts: biology and pathology with special reference to HIV. **Indian Journal Pathology Microbiology**, **20**: 54–60, 1999.
- Chattopadhyay, D.; And Bhattacharya, S.K.; Ethnopharmacology: a new search engine for the development of antivirals from naturaceuticals. In **Handbook of Ethnopharmacology**, 129–197, 2008.
- Chattopadhyay, D.; Naik, T.N. Antivirals of ethnomedicinal origin: structure–activity relationship and scope. **Mini Reviews of Medicinal Chemistry**, **7**: 275–301, 2007.
- Clark, A.M. Natural Products as a resource for new drugs. **Pharmaceutical Research**, **8**: 1133-44, 1996.
- Clardy, J., Walsh, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, **432** : 829–837, 2004.
- Collins, J.K. ; Teegarden, R.M. ; MacVean, D.W.; Smith, G.H.; Frank, G.R. Prevalence and specificity of antibodies to bovine respiratory syncytial virus in sera from feedlot and range cattle. **American Journal Veterinary Research**, **49**: 1316-9, 1988.
- Collins, P.L.; Chanock, R.M.; Murphy, B.R. Respiratory syncytial virus. In: Knipe DM, Howley thedn. Lippincott-Williams and Wilkns, Philadelphia PM. **Journal of Virology**, **4**: 1443-1486, 2001.
- Collins, M.S.; Gough, R.E.; Alexander, D.J. Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. **Avian Pathology**, **22**: 469-479, 1993.
- Cook, J.K.; Ellis, M.M.; Huggins, M.B. The pathogenesis of turkey rhinotracheitis virus in turkey poults inoculated with the virus alone or together with two strains of bacteria. **Avian Pathology**, **201**: 55-156, 1991.
- Cook, J. K. Avian Pneumovirus Infections of Turkeys and Chickens. **The Veterinary Journal**, **160**: 118-125, 2000.
- Cordell, G.A., Colvard, M.D. Some thoughts on the future of ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, **100**: 5–14, 2005.
- Cos, P.; Vanden Berghe D.; De Bruyne T.; Vlietinck, A.J. Plant substances as antiviral agents: an update. **The Biochemical Journal**, **7**: 1163–1180, 2003.
- Dani, M.A., Durigon, E.L. ; Arns, C.W. Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates: comparison between immunochemiluminescent Southern blot and nested PCR. **Journal of Virological Methods**, **2**: 237-41, 1999.

- Dar, A.; Tune, M.K.; Munir, S.; Panigrahy, B.; Goyal, S.M.; Kapur, V. PCR-based detection of an emerging avian pneumovirus in US turkey flocks. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, **13**: 201-5, 2001.
- D'Arce, R. C., Coswig, L.T. Almeida, R.S.; Trevisol, I.M.; Monteiro, M.C.; Rossini, L.I.; Di Fabio, J.; Hafez, H.M.; Arns, C.W. Subtyping of new Brazilian avian metapneumovirus isolates from chickens and turkeys by reverse transcriptase-nested-polymerase chain reaction. **Avian Pathology**, **34**: 133-136, 2005.
- Debprasad, C.; Mamta Chawla, S.; Tapan, C.; Rakhi, S. D.; Paromita, B.; Sekhar, C. and Mahmud, T.H.K. Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products. **New Biotechnology**, **25**: 5, 2009.
- De Jong, M.C.; Van Der Poel, W.H.; Kramps, J.A.; Brand, A.; Van Oirschot, J.T. Quantitative investigation of population persistence and recurrent outbreaks of bovine respiratory syncytial virus on dairy farms. **American Journal of Veterinary Research**, **57**: 628-33, 1996.
- Durigan, G.; Baitello, J.B.; Franco, G.A.D.C.; Siqueira, M.F. Plantas do Cerrado Paulista: Imagens de uma paisagem ameaçada. São Paulo. Páginas & Letras Editora e Gráfica. 2004.
- Easton, A.J.; Domachowske, J.B.; Rosenberg, H.F. Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, **17**: 390-412, 2004.
- Esimone, C.O.; Grunwald, T.; Wildner, O.; Nchinda, G.; Tippler, B.; Proksch, P.; Überla, K. In vitro pharmacodynamic evolution of antiviral medicinal plants using a vector-based assay technique. **Journal of Applied Microbiology**, **99**: 1346-1355, 2005.
- Fernandez-Romero, J.A.; Del Barrio-Alonso, G.; Romen-Alvarez, B.; Gutierrez, Y.; Valdes, V.S.; Parra, F. In vitro antiviral activity of *Phyllanthus orbicularis* extracts against herpes simplex virus type 1. **Phytotherapie Research**, **17**: 980-982, 2003.
- Fenner, F.J.; Gibbs, E.P.J.; Fenner, W.R.; Krakowka, S. Paramyxoviridae. **Veterinary Virology**, **20**: 1993.
- Ferreira, H.L. Estudo do efeito da interferência por RNA (RNAi) na replicação do metapneumovirus aviário (aMPV) subtipo A (Doctoral thesis). Campinas (BR): Universidade Estadual de Campinas. 2007.
- Gong, Y.; Matthews, B.; Cheung, D.; Tam, T.; Gadawski, I.; Leung, D.; Holan, G.; Raff, J.; Sacks, S. Evidence of dual sites of action of dendrimers: SPL-2999 inhibits

- both virus entry and late stages of herpes simplex virus replication. **Antiviral Research**, **55**: 319 – 329, 2002.
- Gough, R. E.; Jones, R.C.; Saif, Y.M. Avian metapneumovirus. In ‘Diseases of Poultry’, **Blackwell Publishing**, **17**: 101-110, 2008.
- Goris, K.; Uhlenbruck, S.; Schwegmann-Wessels, C.; Köhl, W.; Niedorf, F.; Stern, M.; Hewicker-Trautwein, M.; Bals, R.; Taylor, G.; Braun, A.; Bicker, G.; Kietzmann, M.; Herrler, G. Differential sensitivity differentiated epithelial cells to respiratory viruses reveals different viral strategies of host infection. **Journal of Virology**, **83**: 1962-08, 2008.
- Hu, J.M.; Hsiung, G.D. Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. **Antiviral Research**, **11**: 217-232, 1989.
- Hughes, J.M., Peters, C.J., Cohen, M.L., Mahy, B.W.J. Hantavirus pulmonary syndrome: an emerging infectious disease. **Science**, **262**: 850–851, 1993.
- Jones R. C. Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections and IB): problems of vaccine control. *XVI World Veterinary Poultry Association Congress*, Marrakesh, Morocco, 35-44. 2009.
- Juhasz, K.; Easton, A. J. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. **Journal of General Virology**, **75**: 2873-80, 1994.
- Khan, M.T.H.; Ather, A.; Thompson, K.D.; Gambari, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral Research**, **67**: 107–119, 2005.
- Kaiser, L.; Cough, R.B.; Galasso, G.J.; Glezen, W.P.; Webster, R.G.; Wright, P.F.; Hayden, F.G. First international symposium on influenza and other respiratory viruses: summary and overview. **Antiviral Research**, **42**: 149–176, 1999.
- Kott, V.; Barbini, L.; Cruaños, M.; Muñoz, J.D.; Vivot, E.; Cruaños, J.; Martino, V.; Ferraro, G.; Cavallaro, L.; Campos, R. Antiviral Activity in Argentine Medicinal Plants. **Journal Ethnopharmacology**, **64**: 79-84, 1999.
- Kovarcik, K. Respiratory syncytial virus: Properties of the virus and epizootology of the disease. **Veterinarni Medicina**, **42**: 253-263, 1997.
- Larsen, L.E. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review. **Acta Veterinary Scand**, **41**: 1-24, 2000.

- Larsen, L.E.; Tjornehoj, K.; Viuff, B. Extensive sequence divergence among bovine respiratory syncytial viruses isolated during recurrent outbreaks in closed herds. **Journal of Clinical Microbiology**, **38**: 4222-4227, 2000.
- Ling, R.; Easton, A.J.; Pringle, C.R. Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses. **Journal of General Virology**, **73**: 1709-15. 1992.
- Lourenço, M.V. Biotecnologia de plantas medicinais: produção de biomoléculas. *In: Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo. Ciclo de Palestras de Produtos Naturais. São Paulo: Biológico, v.65, n.1/2, p.63-65. 2003*
- Lorenz, R.J.; Bögel, K. Methods of calculation. *In: Kaplan, M.M.; Koprowsky, H. (Eds). Laboratory Techniques In Rabies. Geneva : World Health Organization, App.I, p.321-335, 1973.*
- Ma, S.C.; Du J. ; Deng, X.L.; Zhang, Y.W.; Ooi, V.E.; Xu, H.X.; Lee, S.H.; Lee, S.F. Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus. **Journal of Ethnopharmacol** , **79**: 203–211, 2002.
- Maggon, K.; Barik, S. New drugs and treatment for respiratory syncytial virus. **Review Medicinal Virology**, **14**: 149–168, 2004.
- Mahy, B.W. J.; Murphy, F.M. Emergence and reemergence of virus infection. *In: Mahy, B.W.J., Collier, L.J. Virology. Topley and Wilson's Microbial Infections*, **56**: 122-32, 1997.
- Mahy, B.W.J.; Peters, C.J. Current problems with viral haemorrhagic fevers. *In: Koprowski, H., Oldstone, M.B.A. (Eds.), Microbe Hunters: Then and Now. Medicinal -Ed Press, Bloomington*, **27**: 257–266. 1996.
- McCutcheon, A.R., Roberts, T.E., Gibbons, E., Ellis, S.M., Babiuk, L.A., Hancock, R.E.W., Towers, G.H.N. Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, **49**:101–110, 1995.
- Mittermeier, R.A.; Rodríguez-Luna, E.; Rylands, A.B. Conservation of Neotropical Primates: Threatened Species and An Analysis of Primate Diversity by Country and Region. **Folia Primatologica**, **68**: 134-160, 1997.
- Mittermeier, R.A.; Gil, P.R. Megadiversity: Earth's biologically wealthiest nations. **CEMEX**, México City, México. 1997.
- Morley, A.J. & Thomson, D.K. Swollen head syndrome in broiler chickens. **Avian Diseases**, **28**:338-343, 1984.

- Mukhtar, M.; Arshad, M.; Ahmad, M.; Pomerantz, R.J.; Wigdahl, B.; Parveen, Z. Antiviral potentials of medicinal plants. **Virus Research**, **131**: 111-20, 2008.
- Munir, S. & Kapur, V. Regulation of host cell transcriptional physiology by the avian pneumovirus provides key insights into host-pathogen interactions. **Journal of Virology**, **77**:4899-4910, 2003.
- Munir, S., Kuljeet K., Viver K. Avian metapneumovirus phosphoprotein targeted RNA interference silences the expression of viral proteins and inhibits virus replication. **Antiviral Research**, **69**:46-51, 2006.
- Naithani, R., Huma, L.C., Holland, L.E., Shukla, D., McCormick, D.L., Mehta, R.G., Moriarty, R.M. Antiviral activity of phytochemicals: a comprehensive review. **Mini Rev. Med. Chem**, **8**:1106–1133, 2008.
- Namba, T.; Shiraki, K.; Kurokawa, M. Development of antiviral agents from traditional medicines. In *Towards Natural Medicine Research in the 21st Century*, Ageta H, Aimi N, Ebizuka Y, Fujita T, Honda G. **Elsevier Science**, **67–87**, 1998.
- O'brien, J.D. Swollen head syndrome in broiler breeders. **Veterinary Record**, **117**:619-620, 1985.
- Okeke, I.N., Laxmaninarayan, R., Bhutta, Z.A., Duse, A.G., Jenkins, P., O'brien, T.F., Pablos-Mendez, A., Klugman, K.P. Antimicrobial resistance in developing countries. Part 1: recent trends and current status. **Lancet Infectious Diseases**, **5**: 481–493, 2005.
- Paccaud, M. F.; Jacquier, C. A Respiratory Syncytial Virus of Bovine Origin. **Archiv Fur Die Gesamte Virusforschung**, **30**: 327, 1970.
- Patwardhan, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology**, **100**: 50–52, 2005.
- Paula-Junior, W.; Rocha, F. H.; Donatti, L.; Fadel-Picheth, C.M.T.; Weffort-Santos, A.M. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **16**: 625-630, 2006.
- Pezzuto, J.M. Plant Derives Anticancer Agents. **Biochemical Pharmacology**, **53**: 121-33, 1997.
- Pringle C.R. Virus taxonomy. **Archives of Virology**, **143**:1449-1459. 1998.
- Pringle, C.R. Virus taxonomy The Universal System of Virus Taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during. **Archives of Virology**, **144**:421-429, 1999.

- Randhawa, J.S., Marriott, A.C., Pringle, C.R., Easton, A.J. Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus. **Journal of Virology**, **71**: 9849-54, 1997.
- Rates, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, **39**: 603-613, 2001.
- Rodhain, F. Classification and Nomenclature of Viruses - 5Th Report of the International-Committee-for-Virus-Taxonomy - French - Francki,Rib, Fauquet,Cm, Knudson,DI, Brown,F. **Parasite-Journal De La Societe Francaise De Parasitologie**, **2**: 95-95, 1995.
- Seal, B.S. Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. **Virus Research**, **58**: 45-52, 1998.
- Seal, B.S. Avian pneumoviruses and emergence of a new type in the United States of America. **Animal health Research Reviews**, **1**: 67-72, 2000.
- Saddi M., Sanna A., Cottiglia F., Chisu L., Casu L., Bonsignore L., De Logu A. Antiherpevirus activity of *Artemisia arborescens* essential oil and inhibition of lateral diffusion in Vero cells. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, **6**: 10, 2007.
- Simões, C. M. O; Schenkel, E. P; Gosmann, G, Mello, J. C. P, Mentz, L. A. and Petrovick, P. R; **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**, 5^a ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora: Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS. 1102, 2003.
- Simoni, I.C. Tratamentos Antivirais. **Biológico**, **65**: 41-44, 2003.
- Simoni, I.C., Manha, A.P.S., Sciessere, L., Hoe, V.M.H., Takinami, V.H., Fernandes, M.J.B. Evaluation of the antiviral activity of Brazilian Cerrado plants against animal viruses. **Virus Reviews & Research**, **12**: 25-31, 2007.
- Schmidtke, M., Karger, A., Meerbach, A., Egerer, R., Stelzner, A. And Makarov, V. Binding of a N,N'-bisheteryl derivative of dispirotriperazine to herparan sulfate residues on the cell surface specifically prevents infection of viruses from different families. **Virology**. **311**: 134-143, 2003.
- Spilki, F.R., Almeida, R.S., Campalans J., Arns, C.W. Susceptibility of different cell lines to infection with bovine respiratory syncytial virus. **J. Viral Methods**, **131**: 130-3, 2005.
- Spilki, F.R.; Almeida, R.S.; Domingues, H.G.; D'arce, R.C.F.; Ferreira, H.L.; Campalans, J.; Costa, S.C.B.; Arns, C.W. Phylogenetic relationships of Brazilian

- bovine respiratory syncytial virus isolates and molecular homology modeling of attachment glycoprotein. **Virus Research**, **116**: 30-37, 2006.
- Tarpey I.; Huggins M.B., Davis P.J., Shilleto R., Orbell S.J., Cook J.K.A. Cloning, expression and immunogenicity of the avian pneumovirus (Colorado isolate) F protein. **Avian Pathology**, **30**: 471-474, 2001.
- Toquin D., Guionie O., Jestin V., Zwingelstein F., Allee C., Eterradosi N. European and American subgroup C isolates of avian metapneumovirus belong to different genetic lineages. **Virus Genes**, **32**: 97-103, 2006.
- UBA - União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual 2010. Design by Cyber1 do Brasil. Disponível na página eletrônica <<http://www.uba.org.br/>>. Acesso em 08/08/2010.
- USDA - United States Department of Agriculture. Disponível na página eletrônica <<http://www.usdabrazil.org.br/home/august-brazil.asp/>>. Acesso em 25/07/2010.
- Valentova, V. The antigenic and genetic variability of bovine respiratory syncytial virus with emphasis on the G protein. **Veterinarni Medicina**, **48**: 254-266, 2003.
- Van Der Poel, W.H.M., Brand, A., Kramps, J.A., Van Oirschot, J.T. Respiratory syncytial virus infections in human beings and in cattle. **Journal of Infectivity Disease**, **29**:215-28, 1994.
- Van Der Poel, W.H.M., Langedijk, J.P.M., Kramps, J.A., Middel, W.G.J., Brand, A., Van Oirschot, J.T. Serological indication for persistence of bovine respiratory syncytial virus in cattle and attempts to detect the virus. **Archives of Virology**, **142**: 1681-1696, 1997.
- Van de Zande S., Nauwynck H., De Jonghe S., Pensaert M. Comparative pathogenesis of a subtype A with a subtype B avian pneumovirus in turkeys. **Avian Pathology**, **28**: 239-244, 1999.
- Verpoorte, R., Choi, Y.H., Kim, H.K. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. **Journal of Ethnopharmacology**, **100**: 53-56, 2005.
- Villarreal, E. C.. Current and potential therapies for the treatment of herpesvirus infections. In **Antiviral Agents: Advances and Problems**, **187**: 228, 2001.

- Vlietinck, A.J.; Vanden Berghe, D.A. Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, **32**: 141-53, 1991.
- Vlietinck, A.J; Hoof L.V., Totte J. Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. **Journal of Ethnopharmacology**, **46**: 31-47, 1995.
- Wagner, E.K.; Hewlett M.J. Basic Virology (1st ed.), **Blackwell Science**, **1**: 4051-0346-9, 1999.

10. ANEXOS

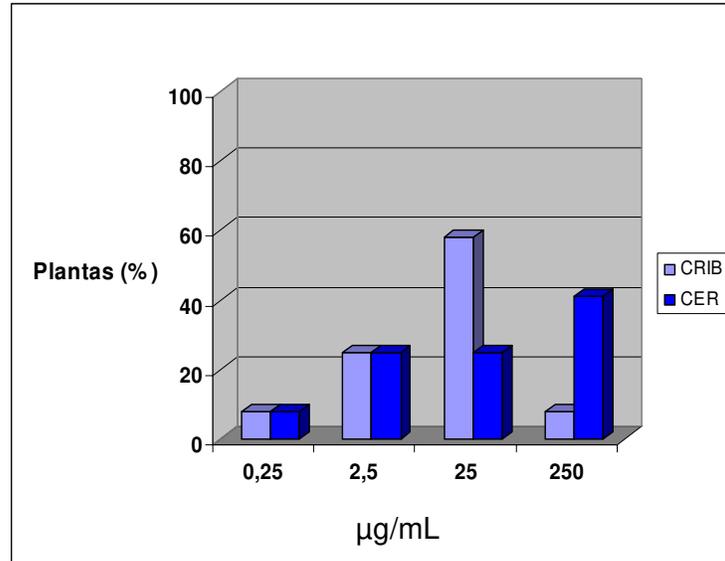
10.1. Anexo 1: Tabela da Concentração Máxima Não Tóxica nas diferentes linhagens celulares.

10.2. Anexo 2: Gráfico da Atividade Espécies Vegetais Testadas.

10.3. Anexo 3: Tabela dos Resultados Finais do Estudo Avaliando Atividade Antiviral de Espécies Vegetais.

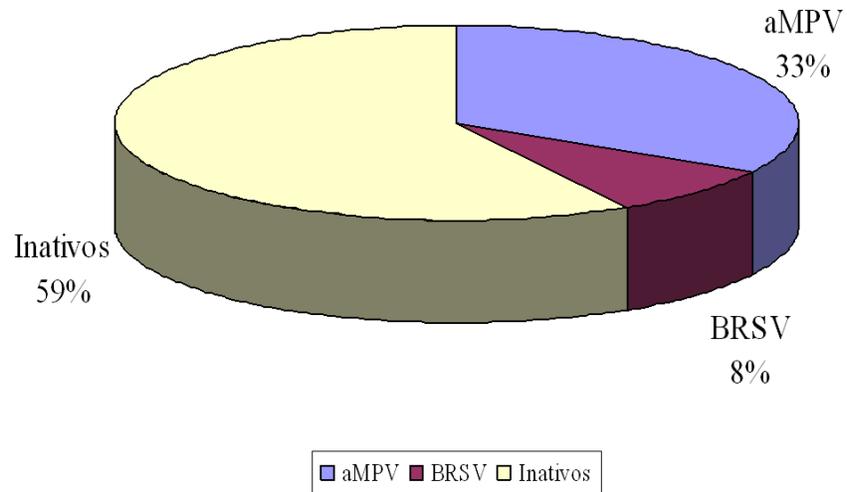
ANEXO 1

Tabela da Concentração Máxima Não Tóxica nas diferentes linhagens celulares.



ANEXO 2

Atividade das Espécies Vegetais Testadas



ANEXO 3

Tabela dos Resultados Finais do Estudo Avaliando Atividade Antiviral de Espécies Vegetais.

Plantas	aMPV	BRSV	Índice Inibição Viral/ Porcentagem de Inibição
<i>Pterodon emarginatus</i>			
<i>Kielmeyera coriacea</i>			
<i>Pfaffia glomerata</i>			
<i>Viola sebifera</i>	ATIVO		1,5/ 97%
<i>Gaylussacia brasiliensis</i>	ATIVO		2/ 99%
<i>Maytenus ilicifolia</i>			
<i>Bursera aloexylon</i>			
<i>Aspidosperma tomentosum</i>	ATIVO	ATIVO	1,5/ 97%
<i>Copaifera langsdorffii</i>			
<i>Baccharis dracunculifolia</i>			
<i>Arrabidaea chica</i>	ATIVO		1,5/ 97%
<i>Aniba rosaeodora</i>	ATIVO		1,5/ 97%
Total: 12 espécies	33% Ativas	8% Ativas	