



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SAMANTHA FERNANDES ESPADA

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS DE *Trichilia catigua*
NA REPLICAÇÃO DO POLIOVÍRUS, HERPES SIMPLEX E
HERPES BOVINO**

Londrina
2015

SAMANTHA FERNANDES ESPADA

**IDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS DE *Trichilia catigua* NA
REPLICAÇÃO DO POLIOVÍRUS, HERPES SIMPLEX E
HERPES BOVINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Nozawa

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

E77a Espada, Samantha Fernandes.

Atividade antiviral de extratos de *Trichilia catigua* na replicação do poliovírus, herpes simplex e herpes bovino / Samantha Fernandes Espada. – Londrina, 2015. 61 f. : il.

Orientador: Carlos Nozawa.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Agentes antivirais – Teses. 2. Vírus do herpes – Teses. 3. Poliovírus – Teses. 4. Replicação viral – Teses. 5. Produtos naturais – Teses. I. Nozawa, Carlos. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 578.7

SAMANTHA FERNANDES ESPADA

**IDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS DE *Trichilia catigua* NA
REPLICAÇÃO DO POLIOVÍRUS, HERPES SIMPLEX E HERPES
BOVINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Carlos Nozawa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Lígia Carla Faccin Galhardi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a Gilselena Kerbauy Lopes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 05 de março de 2015.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho a todos que compartilharam mais uma conquista na minha vida, em especial aos meus pais, aos meus irmãos e ao meu marido, todos que eu tanto amo. Agradeço a minha família, que nunca hesitou em me apoiar e sempre esteve ao meu lado. Agradeço em especial ao Prof^o. Nozawa e a Prof^a. Rosa Elisa pela valiosa e inestimável colaboração concedendo o espaço necessário no laboratório de Virologia, com a devida e permanente orientação profissional, com a qual este trabalho não atingiria o fim pretendido.

Agradecimento especial a todos os professores do Curso de pós-graduação em Microbiologia que fizeram parte do meu aprimoramento. Agradeço a participação na avaliação e correção pelas professoras Lígia C. Faccin Galhardi e Gilselena Kerbauy, que desempenharam um papel importante no aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos companheiros de laboratório, todos foram fundamentais no desenvolvimento desse trabalho, por todo o conhecimento compartilhado. Aos meus fiéis amigos que sempre estiveram ao meu lado quando necessário e sempre me deram motivação, descontração e força para seguir em frente. Enfim, agradeço a todos que de alguma forma acompanham meu caminhar.

Muito obrigada!

***“A mente que se abre a uma idéia jamais
voltará ao seu tamanho original.”***

Albert Einstein

ESPADA, Samantha Fernandes. **Atividade antiviral de extratos de *Trichilia catigua* na replicação do poliovírus, herpes simplex e herpes bovino**. 2015.61 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Os herpesvírus e poliovírus são responsáveis por doenças importantes em humanos e animais. Infecções por herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1) e herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) são endêmicas e cosmopolitas, cujas infecções são caracterizadas pelo estabelecimento de latência. A quimioterapia antiviral desempenha um papel importante no controle e disseminação das doenças herpéticas, entretanto, não é capaz de curar a doença. O poliovírus (PV) é agente etiológico da poliomielite, uma doença incapacitante e potencialmente fatal. Mesmo com o programa imunoprolático mundial de erradicação do vírus, a infecção continua endêmica no Afeganistão, Nigéria e Paquistão. Nenhum antiviral é licenciado para o tratamento dessa infecção. Nas últimas décadas, tem havido um grande interesse nos produtos naturais com potencial atividade antiviral. Neste contexto, os extratos vegetais têm proporcionado estas abordagens. Devido à atividade antioxidante, antimicrobiana e antiprotozoária, dentre outras, a *Trichilia catigua*, planta nativa brasileira, foi selecionada para o estudo da ação antiviral. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antiviral do extrato bruto (EB) e das frações aquosa (FAq) e acetato de etila (FAc) de *T. catigua*, na replicação do HSV-1, BoHV-1 e PV-1, em cultura de células HEp-2. As concentrações citotóxicas 50% (CC₅₀) dos extratos foram determinadas pelo teste do MTT (brometo de dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio). A atividade antiviral foi determinada com adição do extrato e das frações, nas concentrações de 1.5 a 100.0 µg/ml, antes (-2h), durante (0h) e após (1h e 2h) a infecção viral, monitorada por ensaio de redução de plaque. A atividade virucida, a inibição da adsorção viral e o índice de combinação (IC) com acyclovir (ACV), para HSV-1, foram avaliados. O EB, FAq e FAc demonstraram baixa toxicidade (CC₅₀ >400 µg/ml), associada a um alto índice de seletividade (IS) (IS=CC₅₀/IC₅₀). Em conclusão, este estudo demonstrou que o extrato e as frações de *T. catigua* apresentaram ação antiviral para os vírus, nos estágios iniciais da replicação. Todos os extratos apresentaram alto efeito sobre a partícula viral (efeito virucida) e inibição da adsorção viral aos receptores celulares. Portanto, conclui-se que os extratos de *T. catigua* são promissores para futuras pesquisas e desenvolvimento de antivirais para o controle destas infecções.

Palavras-chave: Atividade antiviral. Herpesvírus. Poliovírus. *Trichilia catigua*.

ESPADA, Samantha Fernandes. **Antiviral activity of *Trichilia catigua* extracts on replication of poliovirus, herpes simplex and herpes bovine.** 2015. 61 f
Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – State University of Londrina,
Londrina, 2015.

ABSTRACT

Herpes and poliovirus are responsible for important diseases in humans and animals. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) are endemic and cosmopolitan, whose infections are characterized by the establishment of latency. Antiviral drugs play an important role in controlling the spread of herpes diseases, however, they not cure the disease. The poliovirus (PV) is the agent of poliomyelitis, a crippling and potentially fatal disease. Even the vaccine eradication programs worldwide the disease remains endemic in Afghanistan, Nigeria and Pakistan. None antiviral is licensed for its. In recent decades, there has been increased interest in natural products with potential antiviral activity, with less adverse effect and less able to the selection of resistant strains. In this context, the plant extracts have provided these approaches. Due to the antioxidant, antimicrobial and antiprotozoal activity, among others, the *Trichilia catigua*, native Brazilian plant, was selected for the study of antiviral action. This study aimed to evaluate the antiviral activity of the crude extract (CE) and aqueous and ethyl acetate fractions (AF and EAF) from *T. catigua*, in the replication of HSV-1, BoHV-1 and PV-1 in HEp-2 cell culture. Antiviral activity was determined by adding the extract and fractions at the concentrations of 1.5 to 100.0 µg/ml, before (2H), during (0h) and after (1h and 2h) viral infection monitored by plaque reduction assay. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was determined by MTT test (thiazolyl-dimethyl-diphenyl-tetrazolium) were assayed. The virucidal activity, inhibition of viral adsorption and the combination index (CI) with ACV, for HSV-1, were also evaluated. The CE, AF and EAF showed low toxicity (CC₅₀ >400 µg/ml), associated with a high selectivity index (SI) (SI = CC₅₀/IC₅₀). In conclusion, this study demonstrated that *T. catigua* extracts and fractions presented antiviral effect for both virus at early stages of their replication. All the compounds showed virucide effect and inhibition of the adsorption. Therefore, it concluded that the *T. catigua* extracts are promising for future research and development of antivirals for the control of these infections.

Keywords: Antiviral activity. Herpesvirus. Poliovirus. *Trichilia catigua*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos herpesvírus	18
Figura 2 - Adsorção e penetração viral.....	19
Figura 3 - Receptores celulares e ligantes virais que participam da penetração viral	19
Figura 4 - Replicação dos herpesvírus	21
Figura 5 - Distribuição mundial dos casos de poliomielite	23
Figura 6 - Organização do genoma do poliovírus.....	24
Figura 7 - Replicação do poliovírus	25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.2	OBJETIVOS	11
1.2.1	Objetivo Geral.....	11
1.2.2	Objetivos Específicos	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	HERPESVÍRUS.....	13
2.1.1	Herpes Simplex Vírus	14
2.1.2	Herpevírus Bovino	16
2.1.3	Propriedades Gerais dos Herpesvírus.....	17
2.1.4	Latência	21
2.2	POLIOVÍRUS.....	22
2.2.1	Propriedades Gerais do Poliovírus	23
2.2.2	Patogenia da Infecção	25
2.2.3	Controle da Doença.....	26
2.3	ANTIVIRAIS	27
2.3.1	Produtos Naturais	28
2.3.2	Antivirais de Origem Natural.....	29
2.4	<i>TRICHILIA CATIGUA</i>	31
4	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34
	APÊNDICE	43
	APÊNDICE A.....	44

1 INTRODUÇÃO

Estudos do material genético de microrganismos mostram que eles têm desempenhado um papel importante na evolução humana, onde os vírus são particularmente relevantes. Os seres humanos têm sido expostos às doenças virais ao longo de centenas de anos, em especial por vírus das famílias *Poxviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Adenoviridae* e *Parvoviridae* (Van BLERKOM, 2003; UJVARI, 2008). Ainda hoje, estas doenças são difundidas, devido à natureza dos vírus, assim como, pelas características patogênicas e epidemiológicas das infecções. Muitas destas infecções são potencialmente fatais e dentre as mais comuns estão as síndromes gripais, varicela, herpes, gastroenterites, imunodeficiência humana adquirida, febres hemorrágicas e hepatites. Estima-se que as infecções virais são responsáveis por mais de 60% das doenças que ocorrem nos países desenvolvidos (ZHANG; CHEN; YANG, 2015).

A globalização favoreceu a disseminação de doenças virais, em particular as de transmissão pelas vias aéreas, com rápida disseminação mundial, tais como a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), que teve a sua origem na província de Guangdong, China, em 2002, e a pandemia de gripe A (H1N1) em 2009 (PAVLI; TSIODRAS; MALTEZOU, 2014). A SARS acometeu mais de 8.500 pessoas, provocou mais de 800 mortes e resultou em bilhões de dólares em perdas econômicas, em todo o mundo (BÁEZ-SANTOS; JOHN; MESECAR, 2015). O surgimento recente de outro coronavírus humano letal, agente da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) também foi motivo de muita apreensão. Relatada pela primeira vez na Arábia Saudita, em 2012, a OMS relatou, em junho de 2014, mais de 690 casos de infecções humanas, com pelo menos 209 mortes (ZHANG; CHEN; YANG, 2015). Doenças desta natureza são alertas mundiais preocupantes de que novas e letais infecções virais podem surgir a qualquer momento, com o potencial de se tornarem pandêmicas. Devemos considerar com a mesma atenção as infecções re-emergentes.

Além de outros fatores, a transmissão de doenças virais em regiões tropicais tem sido favorecida pelas rápidas mudanças climáticas, desmatamentos, migração populacional, ocupação desordenada de áreas urbanas e precariedade das condições sanitárias. No Brasil, as arboviroses têm representado um significativo

problema à saúde humana, em particular no período mais quente e úmido do ano. O vírus da dengue é um dos representantes mais importantes no país. É endêmico em mais de 110 países, resultando em 25 mil mortes, anualmente (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Recentemente, ocorreu a re-emergência do vírus Ebola (EBV), na África Ocidental, tendo sido declarada como emergência internacional de saúde pública pela OMS. Desde a primeira descrição da doença, em 1976, na República Democrática do Congo, o EBV tem causado vários surtos de pequena intensidade na África subsaariana. Até janeiro de 2015, a OMS registrou mais de 21.000 pessoas infectadas, com mais de 8.600 mortes.

Entre as infecções humanas mais onipresentes, destaca-se o herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1), cuja infecção está relacionada ao aumento da morbidade e mortalidade em recém-nascidos e em pacientes imunodeficientes. Associado às infecções orais, faríngeas, faciais, oculares e do sistema nervoso central, sua prevalência em adultos varia de 80-90% (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). O controle das infecções herpéticas é um desafio, principalmente devido à sua capacidade de estabelecer infecção latente. Característica que dificulta o desenvolvimento de uma vacina eficaz, não somente para humanos, quanto para animais; uma vez que, um dos mais importantes patógenos bovinos é outro herpesvírus conhecido como herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), cujas manifestações clínicas incluem doenças respiratórias, conjuntivite, aborto e infecções genitais, relacionadas a significativas perdas econômicas na pecuária (FINO et al., 2012).

Lamentavelmente, o desenvolvimento de uma vacina eficaz não é garantia de controle absoluto da disseminação de infecções virais. Como por exemplo, o poliovírus (PV), agente etiológico da poliomielite, uma doença incapacitante e potencialmente fatal que, apesar da campanha de vacinação, permanece endêmica em pelo menos três países (GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2014). E, como não existe tratamento para a doença, ela ainda representa um risco global.

Os medicamentos antivirais desempenhariam um papel importante nas infecções virais, porém, são poucos os quimioterápicos de ação específica, além de serem restritos a algumas poucas infecções. Para agravar este quadro, o escasso número de quimioterápicos de ação específica ainda pode suscitar a seleção de mutantes resistentes às drogas. A aprovação para uso terapêutico de novos

medicamentos antivirais tem ocorrido sistematicamente para as infecções do HIV e, esporadicamente, no combate a hepatite C (ZHANG; CHEN; YANG, 2015). Embora as dificuldades sejam enormes devido à natureza dos vírus, como anteriormente descrito, este cenário é completamente favorável ao estímulo à pesquisa e desenvolvimento de novos antivirais.

O uso de plantas medicinais, especialmente nos países em desenvolvimento, tem sido intensamente estimulado, principalmente, com base na medicina empírica de várias doenças, e tem contribuído significativamente para a atenção primária à saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). Ao contrário das drogas sintéticas, compostos antimicrobianos de origem vegetal não estão associados com muitos efeitos adversos e possuem elevado potencial terapêutico para várias doenças infecciosas (GONÇALVES; ALVES; MENEZES, 2011). Além de que, admite-se que os produtos naturais induzam em menor intensidade a seleção de agentes infecciosos resistentes.

A biodiversidade brasileira possui uma grande variedade de matéria-prima com potencial para pesquisa de novos fármacos antimicrobianos. Aproximadamente 80.000 espécies de plantas são descritas em todo o território nacional. Em torno de 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados originaram-se de plantas, sendo que de 120 são de origem natural, obtidos de, aproximadamente, 90 espécies de plantas (AGUIAR et al., 2012). Dessa forma, o desenvolvimento de novos medicamentos antivirais se justifica pela falta de vacinas e/ou terapias eficientes contra várias infecções virais. Na ausência de outras medidas para o controle destas infecções, os antivirais de origem natural seriam a alternativa para o controle de viroses de alta morbidade e mortalidade na saúde pública.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antiviral do extrato bruto e das frações aquosa e acetato de etila de *Trichilia catigua* contra herpesvírus (humano e bovino) e poliovírus, em células HEp-2.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a concentração citotóxica 50% (CC₅₀) do extrato bruto e das frações aquosa e acetato de etila de *T. catigua* em células HEp-2, através de colorimetria;
- Avaliar a atividade antiviral destes compostos pela determinação da concentração inibitória 50% (CI₅₀), através do ensaio de redução de plaques e analisar as possíveis etapas de bloqueio da replicação viral pelos compostos e informações inerentes;
- Avaliar o potencial sinérgico destes compostos ao Aciclovir, contra o herpes simplex vírus tipo 1;
- Determinar o índice de seletividade (IS) dos compostos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HERPESVÍRUS

Sabe-se que mais de 200 vírus da família *Herpesviridae* são capazes de infectar diferentes espécies, porém oito foram identificados como patogênicos para os seres humanos, sendo estes os herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2), citomegalovírus humano (HCMV), o vírus Epstein-Barr (EBV), o vírus da varicela-zoster (VZV) e os herpesvírus humano tipos 6 (HHV-6), 7 (HHV-7) e 8 (HHV-8) (NORBERG, 2010). Os vírus da família *Herpesviridae* são classificados em três subfamílias denominadas *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*, com base em suas propriedades biológicas (PELLETT; ROIZMAN, 2007).

Os herpesvírus evoluíram ao longo de pelo menos 400 milhões anos (NORBERG, 2010), sendo que a subfamília *Alphaherpesvirinae* divergiu há cerca de 180-210 milhões de anos (McGEOCH et al., 1995). Os membros desta subfamília foram classificados com base em uma gama de hospedeiro cujo ciclo reprodutivo é relativamente curto, rápida propagação em cultura celular, com destruição eficiente de células infectadas, e a capacidade para estabelecer infecções latentes em gânglios sensoriais (PELLETT; ROIZMAN, 2007). A subfamília *Alphaherpesvirinae* inclui os gêneros *Simplexvirus* e *Varicellovirus* que têm os mamíferos como hospedeiros, e, os gêneros *Mardivirus* e *Iltovirus* relacionados com infecções em aves.

Dos oito herpesvírus patogênicos identificados em seres humanos, três estão classificados na subfamília *Alphaherpesvirinae*: HSV-1 e HSV-2, tipicamente associados com lesões mucocutâneas, e o VZV, agente da varicela/zoster (NORBERG, 2010). A distinção entre os sorotipos HSV-1 e HSV-2 ocorreu, aproximadamente, há 50 anos (NAHMIAS; DOWDLE, 1968 apud NORBERG, 2010). A gama de doenças humanas e animais causadas por infecções por herpesvírus é bastante grande. Um importante membro da subfamília *Alphaherpesvirinae* responsável por infecção animal é o herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), pertencente ao gênero *Varicellovirus* (DAVISON, 2010).

2.1.1 Herpes Simplex Vírus

O primeiro herpesvírus humano a ser descoberto foi o herpes simplex vírus (HSV). A palavra herpes vem do grego *herpein* que significa rastejar, foi inicialmente utilizada por Hipócrates entre 460-377 a.C., ao documentar o aparecimento de vesículas na pele. Com isso a palavra passou a ser utilizada para descrever inúmeras enfermidades da pele, como a herpes febrilis, doença capaz de causar febre, pequenas vesículas e ulcerações nos lábios, conforme relatos do historiador grego, Heródoto (484-425 a.C.). O primeiro isolamento do HSV é atribuído a Lowenstein, que aprimorou os experimentos de Gruter e publicou a reprodução de lesões herpéticas de córnea humana em córneas de coelho, em 1919. Em 1930, Andrews e Carmichael, fizeram a associação entre as doenças herpéticas e suas recorrências (KNIPE; HOWLEY, 2007; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

O homem é o único hospedeiro/reservatório do HSV e a sua transmissão depende da carga viral presente em fluídos corporais (saliva, sêmen, secreções cervicais e/ou líquidos das vesículas) e de solução de continuidade na pele ou mucosa, assim como, durante o estado de higidez do contato direto (KNIPE; HOWLEY, 2007; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). A transmissão através de fômites também deve ser considerada, apesar da sensibilidade viral às condições ambientais (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007).

Dessa forma, a principal manifestação clínica do HSV-1 é a herpes orofacial, cuja infecção pode ocorrer antes dos dois anos de idade e, como regra, a sua transmissão está associada com o contato direto e através da saliva. (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008, CALDAS et al., 2010). As manifestações eruptivas da doença, eventualmente, podem ser confundidas com impetigo e estomatite aftosa (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007).

A infecção pelo HSV-2 é, normalmente, caracterizada por acometimento na área ano-genital, enquanto o HSV-1 está associado à infecções oro-labiais. Entretanto, uma maior proporção de herpes genital tem sido atribuída ao HSV-1 em várias regiões do mundo (LOOKER; GARNETT, 2005), provavelmente devido a mudanças no comportamento sexual. Em um levantamento realizado no Brasil, com uma população de 261 mulheres sexualmente ativas, entre os anos 2000 e 2003, na cidade de Natal – RN, demonstrou que a prevalência do HSV-1 em infecção genital

foi quatro vezes maior, comparativamente ao HSV-2 (PEREIRA et al., 2012). Já foi demonstrado que as mulheres são biologicamente mais suscetíveis as infecções por HSV que os homens (PEBODY et al., 2004; CUNNINGHAM et al., 2006; BRADLEY et al., 2014). Os padrões de soroprevalência são semelhantes para o HSV-1 e HSV-2 quando comparados em diferentes continentes. Em geral, os índices para o HSV-1 são mais elevados, sendo a soroprevalência para o HSV-2 maior em populações de comportamento sexual de risco e em mulheres (SMITH; ROBINSON, 2002; LOOKER; GARNETT, 2005). O HSV-2 está entre as doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) mais prevalentes no mundo e a sua transmissão está correlacionada com a infecção pelo HIV (RUSSELL et al., 2001).

No Brasil, os resultados levantados entre 1996 e 1997, demonstraram que em um grupo de 1.090 indivíduos, a soroprevalência nas regiões do Rio de Janeiro, Manaus, Fortaleza e Porto Alegre foi de 67,2% para o HSV-1 e 11,3% para HSV-2, sendo os índices mais elevados na Região Norte (CLEMENS; FARAHT, 2010).

Para o diagnóstico laboratorial do HSV, os materiais são coletados de lesões da pele ou mucosa, podendo ser analisados diretamente através de métodos de coloração citológica, com o objetivo de detecção de células gigantes multinucleadas e/ou corpúsculos de inclusão nuclear (teste de Tzanck). Porém, o método padrão-ouro é o isolamento viral em cultura de células. A reação de imunofluorescência pode ser usada isoladamente ou como complemento do isolamento viral. Pode ser realizada também a biopsia através de anatomopatologia. O uso de PCR também pode ser utilizado, embora de aplicação prática restrita, assim como o é a avaliação dos níveis de anticorpos, em testes sorológicos (FATAHZADEH; SCHWARTZ, 2007; KNIPE; HOWLEY, 2007; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008).

A prevenção da infecção por HSV, por meio de vacinação é prejudicada pela incapacidade do imunógeno não prevenir o estabelecimento da infecção latente. Experimentalmente, é possível a proteção às infecções fatais, em modelos animais, com vacinas atenuadas, inativadas ou de subunidades glicoproteicas (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). Apesar de várias tentativas em ensaios clínicos, nenhuma vacina foi suficientemente segura e eficiente para justificar seu desenvolvimento, uma vez que muitas questões relacionadas com a infecção e a imunidade do HSV são desconhecidas (CHENTOUFI et al., 2012). E, os antivirais empregados no controle das infecções herpéticas, iodo- e bromo-desoxiuridina, trifluridina, aciclovir,

penciclovir, valaciclovir, fanciclovir (análogos nucleosídicos) e o ácido fosfonofórmico (análogo de pirofosfato) (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008) limitam-se a reduzir os sintomas e o tempo da manifestação clínica.

2.1.2 Herpesvírus Bovino

Os herpesvírus também estão disseminados nos rebanhos bovinos, sendo apontados como um dos principais agentes responsáveis por grandes perdas econômicas mundiais. No Brasil, a doença foi introduzida, possivelmente, com a importação de rebanhos leiteiros dos países vizinhos (CAVALCANTE, 2000). Em 1978 ocorreu o primeiro isolamento do BoHV-1 na Bahia, à partir de pústulas vaginais de vacas infectadas (ALICE, 1978). A partir de então, sucessivos diagnósticos demonstraram a difusão do herpesvírus bovino 1 (BoHV-1) pelo país, sendo considerado um importante agente na bovinocultura. Estima-se que o BoHV-1 seja a causa de 50-90% de infecção na população de gado brasileira (HOLZ et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). O BoHV-1 é o agente etiológico da rinotraqueíte infecciosa bovina, aborto, vulvovaginite pustular infecciosa e balanopostite infecciosa. A transmissão viral ocorre de forma semelhante ao HSV, através de aerossóis ou contato direto com animais portadores, via secreções, principalmente no estágio de viremia. A infecção ocorre ainda pelo compartilhamento de água e alimentos, além de fômites e sêmen.

Na infecção pelo BoHV-1, após curto período de incubação de 2 a 4 dias, são observadas descarga nasal serosa, salivação intensa, febre e inapetência. Disseminação viral nasal é detectada por 10 a 14 dias após o início da infecção (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2010). A diminuição na produção do leite é significativa (FINO et al., 2012). Casos de endometrite podem ser observados no momento da inseminação artificial (KENDRICK; McENTREE, 1987 apud OLIVEIRA, 2006). A infecção em bezerros pode levar a quadros sistêmicos com lesões necróticas focais em algumas vísceras e, às vezes, quadros de gastroenterite. A Organização Mundial para Saúde Animal preconiza para o diagnóstico da rinotraqueíte infecciosa bovina o isolamento viral, a pesquisa de antígenos virais em materiais clínicos, além da sorologia, através do soro neutralização, reação imunoenzimática, e, mais restritamente, a PCR. O vírus pode

ser isolado a partir de esfregaços nasais ou genitais de animais suspeitos durante a fase aguda da infecção e exames anatomopatológicos em materiais de necropsia (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2010).

A prevenção e o controle da infecção pelo BoHV-1 são baseados em medidas de higiene, vacinação e remoção de animais infectados. A vacinação é recomendada em locais onde a infecção é endêmica, bem como em propriedades onde haja condições favoráveis para a transmissão viral. Com exceção da febre aftosa e da raiva, a vacinação contra os demais antígenos virais não é uma prática comum, devido à baixa imunogenicidade, aos baixos níveis de anticorpos produzidos e pela falta de uma vacina padrão, podem comprometer a proteção (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2010).

2.1.3 Propriedades Gerais dos Herpesvírus

Os componentes estruturais, assim como o genoma dos HSV-1 e BoHV-1 estão representados na Figura 1 (A) e (B). O genoma viral expressa cerca de 70 proteínas, sendo a maioria estrutural, dentre elas, 11 glicoproteínas de superfície viral, além de 15 não estruturais envolvidas em várias etapas do processo replicativo, além de desempenharem um papel importante na patogênese e imunidade (NANDI et al., 2009).

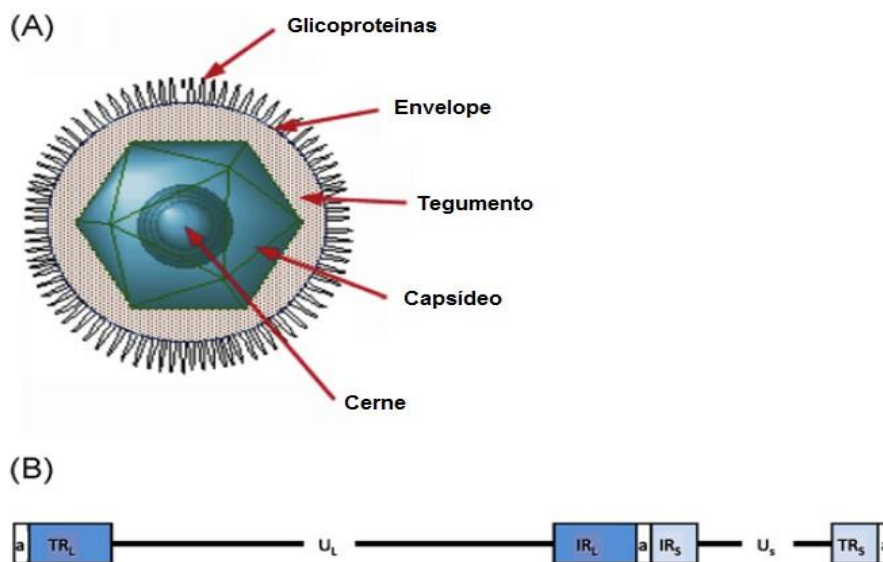
A região U_L contém genes que participam da replicação do DNA e proteínas do capsídeo, enquanto a região U_S codifica as glicoproteínas (WIGG; MIRANDA, 2008). As sequências de repetições codificam genes duplicados, que incluem a proteína reguladora multifuncional ICP0, região dos LATs (transcritos associados à latência), o gene de neurovirulência ICP34.5 e o ICP4, ativador de transcrição (KINCHINGTON et al., 2012).

O capsídeo icosaédrico é formado por 162 capsômeros e seis proteínas: VP5 (U_L19), VP26 (U_L35), VP23 (U_L18), VP24 (U_L26), VP19 (U_L38) e a proteína $U_L6.VP5$ (WIGG; MIRANDA, 2008). O tegumento contém proteínas importantes para o início da replicação viral, dentre elas a VP1-2 que participa da liberação do material genético durante a infecção (WIGG; MIRANDA, 2008; KELLY et al., 2009). A VP16 que aumenta a expressão de genes precoces imediatos fundamentais para montagem e liberação viral (KELLY et al., 2009; KINCHINGTON et al., 2012) e a

VP22 que está relacionada com capacidade de disseminação viral célula-célula (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007).

A estrutura mais externa ao capsídeo é o envelope lipídico que apresenta em sua superfície 11 glicoproteínas e poliaminas inseridas e, pelo menos, duas proteínas intrínsecas não glicosiladas (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; WIGG; MIRANDA, 2008). A aquisição dos lipídios do envelope ocorre a partir da célula hospedeira (METTENLEITER, 2002).

Figura 1 - Estrutura dos herpesvírus

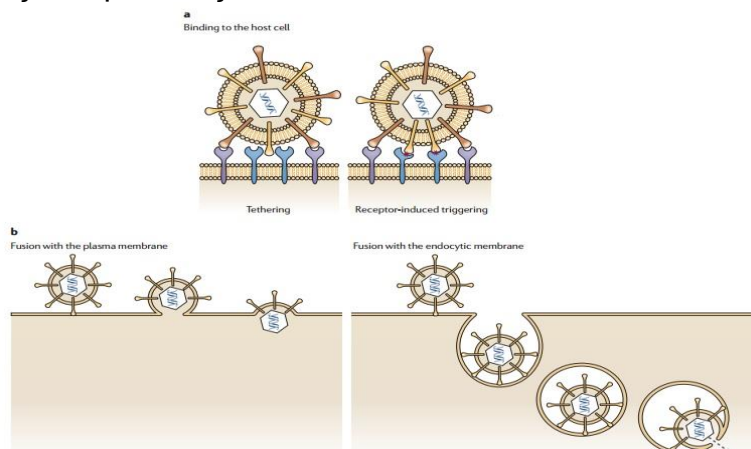


Fonte: Adaptado de Watanabe (2010).

(A) A partícula viral possui um diâmetro de cerca de 120-200 nm, composta por capsídeo icosaédrico e DNA de cadeia dupla linear. Em torno do capsídeo, há uma camada amorfa que contém proteínas estruturais e funcionais, conhecida como tegumento, que por sua vez, é envolvido por um envelope lipídico, com glicoproteínas inseridas. Em (B) está representado o genoma viral de aproximadamente 150 kb, com mais de 74 genes, composto por duas estruturas de sequências únicas, designadas Longa (U_L) e Curta (U_S), ambas flanqueadas por um par de regiões repetidas invertidas (TR_L-IR_L e IR_S-TR_S).

Estes herpesvírus possuem amplo tropismo celular, sendo capaz de infectar linfócitos, células epiteliais, fibroblastos e neurônios (CONNOLLY et al., 2011). A infecção da célula suscetível ocorre em duas etapas, inicialmente a adsorção aos receptores celulares específicos e alguns eventos desta ligação podem desencadear o início da fusão, conforme a Figura 2 (A). Na segunda etapa, pode acontecer a fusão, propriamente dita, do envelope com a membrana plasmática ou a partícula viral completa é submetida a endocitose (Figura 2 (B)) (CONNOLLY et al., 2011).

Figura 2 - Adsorção e penetração viral

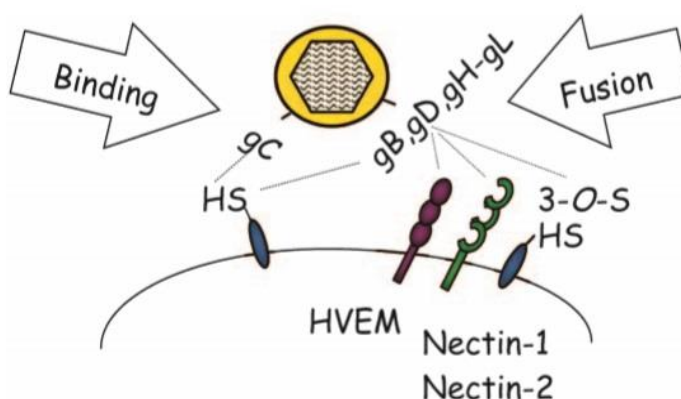


Fonte: Connolly et al. (2011).

(A) Adsorção do vírus na célula hospedeira. (B) Vias de entrada: por fusão do envelope com a membrana celular ou por endocitose

A adsorção viral às glicosaminoglicanas da superfície celular é mediada pelas glicoproteínas virais B (gB), C (gC), D (gD) e o complexo H/L (gH/L) (Figura 3), seguida da fusão do envelope com a membrana celular. Após a penetração, o nucleocapsídeo é transportado via microtúbulos até o núcleo onde inicia-se a transcrição do DNA viral pela RNA polimerase II do hospedeiro (CARTER; SAUNDERS, 2007, WIGG; MIRANDA, 2008).

Figura 3 - Receptores celulares e ligantes virais que participam da penetração viral.



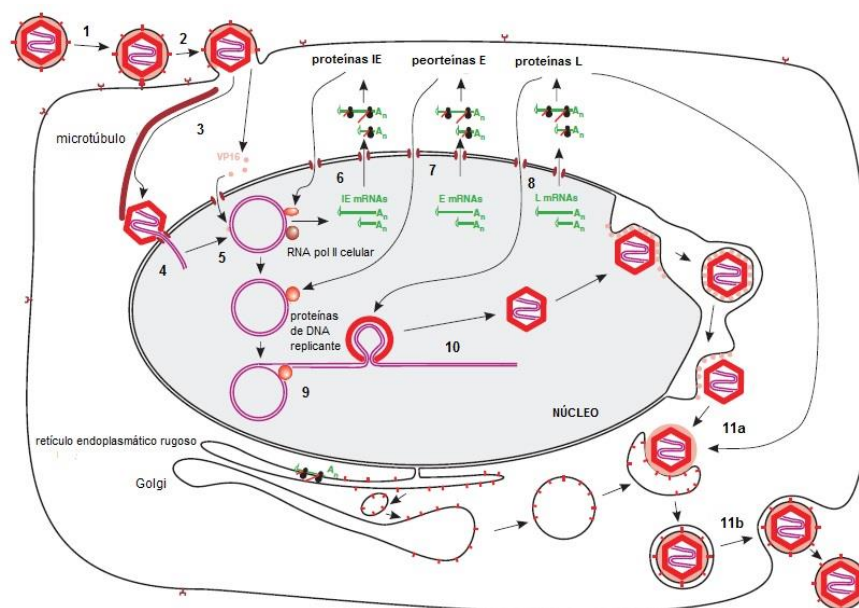
Fonte: Spear (2004).

A ligação do vírus às células pode ser mediada pelas ligações das glicoproteína B (gB) e C (gC) ao sulfato de heparan (HS) (SHUKLA; SPEAR, 2001) da célula. Este processo facilita a ligação da glicoproteína D (gD) aos receptores celulares HVEM (Herpesvirus Entry Mediator) (MONTGOMERY et al., 1996), nectinas-1 e -2 (GERAGHTY et al., 1998; LOPEZ et al., 2000) e a sítios específicos do HS. A ligação da gD a um destes receptores desencadeia a fusão do envelope com uma membrana celular (SPEAR et al., 2004), além da participação também do complexo gH/gL.

Os genes virais que participam da replicação são classificados em três grupos, de acordo com a sua expressão temporal, em genes α ou precoces imediatos (IE), genes β ou precoces (E) e genes γ ou tardios (L). Cerca de 2-4 horas pós-infecção, a transcrição dos genes α é estimulada pela proteína do tegumento VP-16 (α -TIF), codificando proteínas (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47) que desempenham papéis críticos na regulação da expressão dos genes virais (Figura 4) (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). Estas proteínas, acumuladas no citoplasma, retornam ao núcleo e estimulam a transcrição e tradução dos genes β , aproximadamente 4-8 horas pós-infecção. Muitos dos genes β têm atividade enzimática e estão envolvidos na síntese do DNA viral e precursores (NISHYIAMA, 1996). As enzimas para a replicação viral são produtos da expressão dos genes β , dentre elas estão, a DNA polimerase, complexo helicase-primase e a timidinocinase (NISHYIAMA, 1996). As proteínas dos genes γ são sintetizadas no RER, reguladas pelas proteínas α e β , e são as proteínas estruturais, tais como proteínas do capsídeo, tegumento e glicoproteínas do envelope (WIGG; MIRANDA, 2008).

A replicação viral dura aproximadamente 18 a 20 horas e a liberação da progênie ocorre na superfície da célula, onde o envelope é adquirido (Figura 4). A aquisição do envelope pode ocorrer também através da passagem do nucleocapsídeo pela carioteca ou Complexo de Golgi (METTENLEITER, 2002; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2008). A propagação da infecção também pode ocorrer através de disseminação célula-a-célula (SPEAR, 2004).

Figura 4 - Replicação dos herpesvírus



Fonte: Adaptado de Carter e Saunders (2007).

1- adsorção viral; 2 – penetração por fusão direta do envelope viral com a membrana celular; 3 – liberação e transporte do nucleocapsídeo e das proteínas virais (VP16/ α -TIF) via microtúbulos; 4 – liberação do ácido nucleico no interior do núcleo celular; 5 – circularização do DNA viral; 6 – transcrição dos genes IE (α) pela RNA polimerase II celular; 7 – transcrição dos genes E (β); 8 – transcrição dos genes L (γ); 9 – replicação do genoma viral pela DNA polimerase viral; 10 – montagem do capsídeo; 11a – saída do vírus do núcleo celular (primeiro envelopamento); 11b – liberação do vírus (segundo envelopamento).

2.1.4 Latência

Após a replicação produtiva no sítio de entrada, os herpesvírus serão transportados pelos axônios dos nervos sensoriais, em sentido retrogrado ao estímulo nervoso, até a raiz do gânglio onde se estabelece a latência, especialmente, no trigêmeo e sacral. Durante a latência, a expressão gênica viral é restrita aos transcritos associados à latência (LATs) e o seu genoma não é replicado (LACASSE; SCHANG, 2010). Nesta fase, o DNA viral circulariza-se e se mantém como epissoma não-integrado ao DNA celular.

A reativação do vírus pode ocorrer devido a situações de estresse, exposição ao calor ou frio, período menstrual, imunossupressão, entre outros. Esses estímulos podem estar associados à elevação de prostaglandinas (E e F), sintetizadas na membrana plasmática após danos tissulares, ativando a liberação de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). O AMPc por sua vez ativa proteíno-quinases que podem fosforilar proteínas responsáveis pela ativação da expressão dos genes virais

(WIGG; MIRANDA, 2008). Recentemente, foi proposta que a VP16 poderia ser indutora da reativação (PENKERT; KALEJA, 2011).

2.2 POLIOVÍRUS

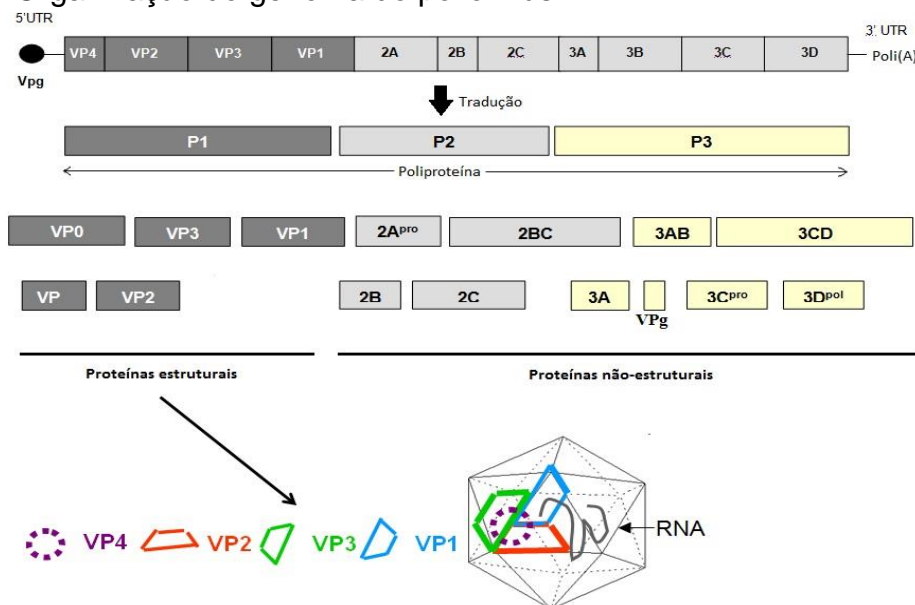
O poliovírus (PV) é o agente etiológico da poliomielite, doença incapacitante e potencialmente fatal em sua forma grave e que afeta o sistema nervoso central. Os primeiros registros, supostamente, relacionados com sua existência datam do antigo Egito, em que esculturas retratam indivíduos com atrofia dos membros inferiores. As primeiras descrições clínicas de poliomielite, em 1800, relatam casos de doenças febris com paralisia flácida dos membros (PALLANSCHI; ROSS, 2007), resultante da destruição de neurônios motores na medula espinhal (GONÇALVES et al., 2008). A maioria dos infectados (90-95%) apresentam infecção assintomática ou sintomas leves, como febre, fadiga, dor de cabeça, vômito, rigidez no pescoço e dores nos membros. O homem é o único reservatório natural do PV, sendo a principal via de transmissão por contato direto ou através de alimentos e água contaminados. Os vírus são eliminados pelos doentes, por períodos longos nas fezes, comparativamente às secreções do trato respiratório superior, caracterizando a estreita relação de sua transmissão, com as condições socioeconômicas baixas e exposição precoce ao vírus, em crianças.

Em 1988, a OMS aprovou a resolução para erradicação da poliomielite até o ano 2000, por meio do Programa Expandido de Imunização, com a vacina oral VOP/Sabin em áreas de maior incidência. A evolução da doença foi significativamente controlada com o emprego inicial da vacina administrada por via parenteral - vacina constituída de vírus inativados VIP/Salk (GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2014; STEIL et al., 2014).

No Brasil, a maior epidemia de poliomielite ocorreu em 1953, no Rio de Janeiro, com o início das ações de combate à doença, através da imunização de forma não sistemática, em 1961. Após dez anos, em 1971, foi implantado pelo Ministério da Saúde, o Plano Nacional de Controle da Poliomielite (BRASIL, 2012) com o intuito de controlar a doença através de medidas preventivas, de cunho nacional e sistemático. Os resultados positivos foram imediatos, sendo que, um ano após a introdução do Dia Nacional de Vacinação (1981) ocorreu uma redução de

sorotipos (PV-1, 2 e 3) (TAPPAREL et al., 2013). O virion possui na sua constituição 30% de ácido nucleico e 70% de proteína. Apresenta forma esferoidal com diâmetro aproximado de 30 nm, sem envelope e capsídeo de simetria icosaédrica (GONÇALVES et al., 2008). Seu genoma consiste de uma molécula de RNA de fita-simples de polaridade positiva, com um único enquadramento de leitura aberta (ORF) ladeados por longas regiões não traduzidas (UTR) que codifica uma única poliproteína. A poliproteína é clivada, dando origem a 11 proteínas distintas (Figura 6) (HOBER et al., 2013). A poliproteína é composta de três regiões designadas P1, P2 e P3, sendo que P1 codifica as proteínas estruturais VP1, VP2, VP3 e VP4 presentes no capsídeo, e P2 e P3 codificam proteínas envolvidas no processamento das proteínas e na replicação do genoma (RACANIELLO, 2007). Os polipeptídeos VP1, VP2 e VP3 são externos, sendo o P1 o mais superficial, onde se localiza o sítio antigênico, possivelmente a região de reconhecimento do receptor celular. O VP4 é o mais interno, associado ao ácido nucleico (TUTHILL et al., 2010).

Figura 6 - Organização do genoma do poliovírus.

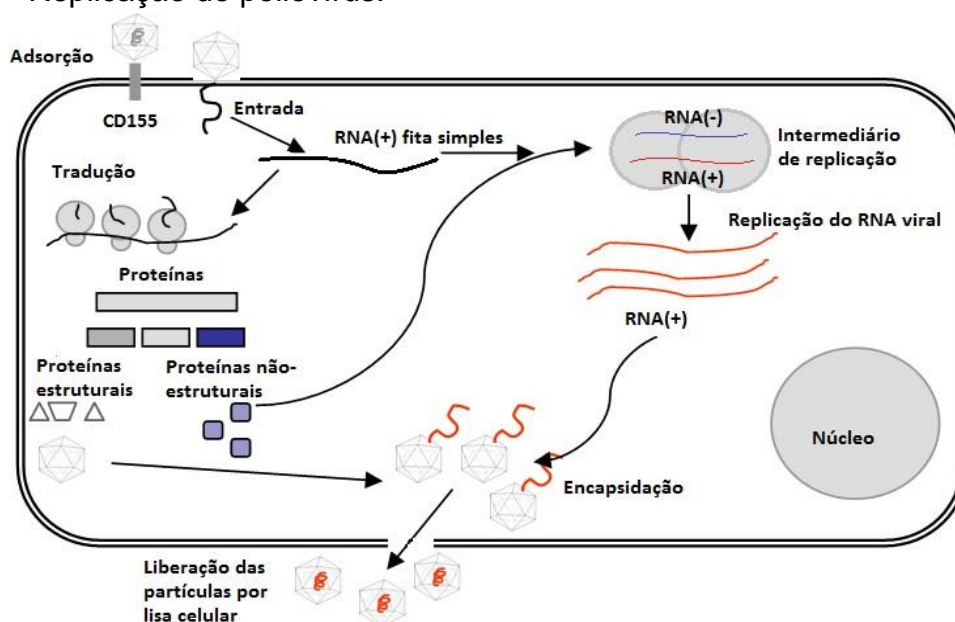


Fonte: Adaptado de Hober et al. (2013).

O genoma contém um único enquadramento de leitura aberto (ORF), flanqueado por regiões não traduzidas (UTR). Uma pequena proteína viral, VPg, está ligada covalentemente a 5'UTR e funciona como iniciador para a síntese de RNA. A região 3'UTR apresenta a cauda poli(A). A tradução do genoma resulta em uma poliproteína, que é clivada em quatro proteínas estruturais (cinza escuro) e sete proteínas não estruturais (cinza claro e bege). Cada capsômero é formado por quatro polipeptídeos estruturais (VP1, VP2, VP3 e VP4), conferindo simetria icosaédrica.

A replicação do PV ocorre inteiramente no citoplasma da célula hospedeira (Figura 7). A adsorção e internalização da partícula viral ocorrem após ligação ao receptor CD155, proteína membro da superfamília de imunoglobulina (Ig), presente somente em humanos e primatas, provável justificativa do homem ser o único hospedeiro do vírus (TUTHILL et al., 2010). Uma vez no citoplasma, a fita de RNA de polaridade positiva é submetida à tradução nos ribossomos da célula hospedeira, inicialmente de proteínas funcionais, assim como servirá de molde para a formação do RNA da progênie viral (BROOKS et al., 2012; HOBBER et al., 2013). As clivagens da poliproteína precursora são realizadas por três proteinases (2A, 3C e 3DC). Segue a encapsidação do ácido nucleico viral e a progênie é liberada pela lise da célula hospedeira. O tempo necessário para um ciclo completo varia de 5 a 10 horas.

Figura 7 - Replicação do poliovírus.



Fonte: Adaptado de Hober et al. (2013).

Após adsorção ao receptor celular específico (CD155), o RNA viral é liberado no citoplasma por desestabilização do capsídeo, com posterior clivagem do VPg. Ocorre a tradução do RNA viral de polaridade positiva, clivagem da poliproteína e produção de fitas complementares de polaridade negativa (intermediários replicativos). E, por fim, montagem do capsídeo com formação de novas partículas virais e liberação por lise celular.

2.2.2 Patogenia da Infecção

O PV penetra no organismo do hospedeiro através da boca e vias aéreas. Nesta fase inicial da infecção, o vírus pode ser encontrado na saliva, consequência da replicação nos nódulos linfáticos cervicais e amídalas (IDA-HOSONUMA et al., 2005). Devido à resistência viral ao pH estomacal baixo, há a manutenção de sua infecciosidade (WHITTON; CORNELL; FEUER; 2005), permitindo alcançar o intestino delgado, órgão para o qual apresenta tropismo, onde ocorre a replicação principal. Há replicação nas placas de Peyer e nódulos mesentéricos profundos, podendo o vírus invadir a corrente circulatória, levando a viremia primária. Pode ocorrer replicação viral no baço e acometimento do SNC, em segunda viremia (GONÇALVES et al., 2008). De acordo com a sua evolução, a poliomielite pode ser conceituada como abortiva, não-paralítica (meningite viral) e paralítica. A forma abortiva é a mais comum e a paralítica ocorre em apenas 1% das infecções por PV selvagem (IDA-HOSONUMA et al., 2005). A eliminação do vírus ocorre via fecal por um período longo, podendo durar mais de seis semanas (RACANIELLO, 2007).

2.2.3 Controle da Doença

A evolução da doença foi significativamente controlada com o emprego inicial da vacina administrada por via parenteral - vacina constituída de vírus inativados (VIP) (Salk) e, posteriormente, com a oral - vírus atenuados (VOP) (Sabin). Ambas induzem anticorpos séricos, porém, a vantagem da VOP é de também induzir imunidade local, de mucosa (secretória), além de imunizar indiretamente os contatos não vacinados e a facilidade na sua administração. Em contraposição, a atenuação viral na VOP pode ser revertida e as cepas vacinais recobram a patogenicidade. A estimativa é de que cerca de 1 em 9 milhões de vacinados, esta reversão possa causar a doença paralítica. Desde sua introdução, aproximadamente, 65 indivíduos imunodeficientes foram identificados excretando o PV derivado da vacina, cronicamente (McKINLAY et al., 2014). Ainda há a desvantagem da competição entre as três cepas vacinais, que resulta em resposta mais forte para o sorotipo 2, mas, a adoção das vacinas monovalente (sorotipo 2) e bivalente (sorotipos 1 e 3) ajudou a superar o problema. O uso da VIP está sendo reintroduzida em associação com a VOP no sentido de contornar estas ocorrências, por recomendação da OMS,

porém, resguardando a vigilância às cepas selvagens (BRASIL, 2012; GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE, 2014; STEIL et al., 2014).

2.3 ANTIVIRAIS

O desenvolvimento de antivirais teve início a partir da década de 1950. Entretanto, atualmente, em torno de 50 compostos antivirais estão aprovados para utilização clínica, sendo a maioria voltada para o tratamento de infecções por HIV, hepatite B, influenza e herpes simplex vírus (De CLERCQ, 2001, ANTONELLI; TURRIZIANI, 2012). Ratifica-se a dificuldade no desenvolvimento de drogas antivirais pela natureza biológica dos agentes o que justifica o lento processo. Poucos são aqueles que chegam as fases de testes clínicos, devido a questão da seletividade e elevada toxicidade dos produtos (WIGG, 2008).

O início da busca por substâncias antivirais se deu com a utilização de compostos com conhecida atividade antibacteriana. As tiossemicarbazonas foram introduzidas em 1946, originalmente, como agentes antituberculose. Em 1972, Bauer e colaboradores demonstraram a ação da metil-isatina-tiossemicarbazona (metisazona, Marboran®) na profilaxia do vírus da varíola, como primeiro antiviral efetivo utilizado com êxito em epidemias, porém, com o advento da vacina a sua utilização foi interrompido (WIGG, 2008; De CLERCQ, 2010). Entretanto, o primeiro antiviral certificado para uso clínico foi a ribavirina (Varizole), em 1972, com ação sobre vírus de DNA e RNA (De CLERCQ, 1997). Seguiu-se à utilização de bases nitrogenadas halogenadas (iodo, fluor e bromo). Com o advento de antivirais seletivos foi lançado o aciclovir (ACV), um nucleosídeo sintético análogo estrutural da timidina, com atividade inibitória aos herpesvírus, incluindo HSV (1 e 2); vírus Varicella Zoster (VVZ), vírus Epstein Barr (VEB) e Citomegalovirus (CMV) (De CLERCQ, 1997). A atividade inibitória e seletiva do ACV reside na maior capacidade da timidina quinase (TK) viral monofosforilá-lo, comparativamente a enzima análoga celular. O trifosfato de aciclovir ao ser incorporado ao DNA viral nascente resulta no bloqueio e término da cadeia, e, conseqüentemente, inibe a replicação viral. Além disso, o aciclovir trifosfato liga-se, irreversivelmente, a DNA polimerase viral inativando-a (De CLERCQ, 2001; WIGG, 2008; GRIFFITHS, 2009). Resistência viral ao ACV tem sido observada ao longo de sua utilização (STRASFELD; CHOU, 2010) em particular nos indivíduos imunocomprometidos (DANVE-SZATANEK et al., 2004) e também ao ácido fosfonofórmico, no caso de resistência ao ACV. Onze mutações nos genes de TK e DNA polimerase virais que conferem resistência a estes

medicamentos foram identificados (WANG et al., 2011). O fosfonoformato (Foscarnet®) é um sal do ácido fosfonofórmico, análogo estrutural de pirofosfato. Utilizado, em especial, no tratamento de pacientes imunodeficientes acometidos com retinite por CMV (WIGG, 2008). Inibe o alongamento da cadeia do DNA viral nascente ao se ligar, de forma não competitiva, ao sítio de ligação do pirofosfato (WIGG, 2008; STRASFELD; CHOU, 2010).

Os antivirais com eficácia anti-herpética comprovada e disponíveis comercialmente para o tratamento de infecções herpéticas humanas (Aciclovir, Ganciclovir e Foscarnet), possuem aplicabilidade questionável no tratamento de infecções herpéticas em bovinos, devido a baixa eficiência de inibição viral e sobretudo pelo alto custo que teria o tratamento. Estudos *in vitro* demonstraram que são necessárias concentrações elevadas do ACV frente ao BoHV-1, para que a atividade antiviral seja evidenciada (DEZENGRINI et al., 2010).

Desde o início da década de 1960, compostos com capacidade de inibir os picornavírus, em particular, rinovírus e enterovírus têm sido experimentalmente, analisadas, tais como os derivados de benzoimidazóis, porém a maioria de ação insuficiente ou seletividade limitada. Compostos como o pleconaril (inibidor de adsorção viral), pocapavir e o V-7404, inibidores de proteases virais têm sido avaliados com potencial atividade anti-polio (McKINLAY et al., 2014).

2.3.1 Produtos Naturais

A utilização de plantas no tratamento empírico de muitas doenças são relatadas desde a origem da civilização humana (MUKHTAR et al., 2008; SILVEIRA et al., 2009). Atualmente, em torno de 70-95% da população mundial utiliza plantas medicinais nos cuidados primários à saúde, especialmente nos países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Estima-se que 25% dos medicamentos são derivados, direta ou indiretamente, de plantas, e esta relação aumenta para 60% com os medicamentos antitumorais e antimicrobianos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

Nas últimas décadas, tem havido grande interesse nos produtos de origem natural, com base na etnofarmacologia com potencial atividade antimicrobiana e antiviral. Até o ano 2000, mais de 13.000 plantas tinham sido alvos de estudos

(DAHANUKAR; KULKARNI; REGE, 2000). No Brasil, devido a extensa biodiversidade e potencialidade, tem havido significativo estímulo ao desenvolvimento de fitoterápicos. Cartaxo, Souza e Albuquerque (2010) registraram que, de 119 espécies de plantas, 92 estavam relacionadas ao tratamento empírico de várias doenças, em comunidades rurais do Ceará. Em consolidação a importância e ao grande interesse da comunidade, o Ministério da Saúde lançou em 2008, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápico, para garantir o acesso seguro e o uso racional e sustentável da biodiversidade brasileira (BRASIL, 2009). Atualmente, 12 fitoterápicos pertencem a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais, que incluem: *Aloe vera* (babosa); *Cynara scolymus* (alcachofra), *Glycine max* (soja), *Harpagophyllum procumbens* (garra-do-diabo), *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa), *Mentha piperita* (hortelã), *Mikania glomerata* (guaco), *Plantago ovata* (plantago), *Rhamnus purshiana* (cáscara-sagrada), *Salix alba* (salgueiro), *Schinus terebinthifolius* (aroeira-da-praia) e *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato) (BRASIL, 2014).

Produtos de origem natural são fontes inesgotáveis de compostos com promissoras atividades biológicas e, por extensão, com atividades antivirais. As atividades biológicas destes compostos estão relacionadas com a presença de compostos como os terpenos, flavonoides, benzofenóis, taninos, saponinas, polissacarídeos, entre outros (KOOCHAK; SEYYEDNEJAD; MOTAMED, 2010).

2.3.2 Antivirais de Origem Natural

O interesse comercial pelo estudo medicinal de plantas como agentes antivirais teve início com a empresa farmacêutica Boots (Nottingham, Inglaterra), com o intuito de pesquisar a atividade anti-influenza em cerca de 300 espécies de plantas (CHANTRILL et al., 1952). Um grande número de estudos foi publicado demonstrando a inibição do HSV a partir de derivados de plantas (KHAN et al., 2005). Estudos realizados com 54 extratos hidrometanólicos de plantas medicinais do sul brasileiro avaliaram a ação contra HSV-1, HSV-2, poliovírus-2, adenovírus-22 e o vírus da Estomatite Vesicular e mais de 40% dos extratos apresentaram atividade contra HSV-1 e HSV-2 e 26% contra o poliovírus (SIMÕES et al., 1999). Extrato de

U. tomentosa (Unha-de-gato) foi relatado no tratamento tópico de herpes labial com eficácia, suplantando o efeito do ACV (CALDAS et al., 2010).

A atividade antiviral contra herpesvírus e poliovírus foi descrita a partir de polissacarídeos extraídos de diferentes fontes naturais, tais como: *Agaricus brasiliensis* (FACCIN et al., 2007; YAMAMOTO et al., 2013), *Azadirachta indica* (SAHA et al., 2010; FACCIN-GALHARDI et al., 2012), *Lentinula edodes* (RINCÃO et al., 2012), *Caesalpinia ferrea* (LOPES et al., 2013) e *Adenantha pavonina* (GODOI et al., 2014).

Dentre os componentes vegetais aos quais têm sido atribuídas importantes atividades biológicas, incluindo antiviral, além dos polissacarídeos estão os polifenóis (taninos, flavonóides, cumarinas), saponinas e terpenos. Fukuchi et al. (1989 apud OKUDA, 2005) descreveram a capacidade de taninos hidrolizáveis monoméricos e diméricos como inibidores do HSV. Kilkuskie et al. (1992 apud MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005) e Lü et al. (2004) sugerem a atividade de taninos complexos contra a replicação do HIV. Um composto polifenólico de *Punica granatum* foi capaz de inibir a replicação do vírus influenza como virucida e apresentou efeito sinérgico ao Oseltamivir (HAIDARI et al., 2009). Esse mesmo composto também inibiu a replicação do Enterovírus 71 (YANG et al., 2012). Cecílio et al. (2012) relataram a inibição de rotavírus por extratos de *Byrsonima verbascifolia*, *Myracrodruon urundeuva*, *Eugenia dysenterica* e *Hymenaea courbaril* em cujas plantas foram descritas a presença de polifenóis, saponinas e terpenos. Ueda et al. (2013) demonstraram que taninos de *Diospyros kaki* inibem vírus envelopados e não-envelopados (vírus influenza, HSV, PV, adenovírus, rotavírus e norovírus). Taninos de *Hamamelis virginiana* foram capazes de inibir o vírus influenza, assim como impediram a hemaglutinina e neuraminidase de se ligarem à células (THEISEN et al., 2014). Efeito semelhante já havia sido descrito para influenza A (H1N1), sensíveis e resistentes a Amantadina e Oseltamivir, com extrato de *Psidium guajava* (SRIWILAIJAROEN et al., 2012). Polifenólicos de *Quercus robur* inibiram a replicação de HSV-1 e HSV-2 resistentes ao ACV, com efeito sinérgico à droga (VILHELMOVA-ILIEVA et al., 2014). Tem sido sugerido que os compostos fenólicos interagem com as proteínas virais, causando a sua precipitação (HASLAM, 1996; SARNI-MANCHADO; CHEYNIER; MOUTOUNET, 1999; FRAZIER et al., 2010; LI; PENG, 2013; THEISEN et al., 2014) ou pela inibição

da adsorção (FRAZIER et al., 2010). Gescher et al. (2011) demonstraram o efeito inibidor de uma proantocianidina de *Myrothamnus flabellifolia* na penetração do HSV-1.

Portanto, considerando a importância das viroses, dada a peculiaridade do agente causal, da ocorrência de cepas resistentes aos antivirais licenciados, número restrito de antivirais disponíveis e a inexistência, na maioria dos casos, de medidas imunoproláticas, a busca pelos antivirais eficientes deve ser prioritário, com base na etnofarmacologia e em função da biodiversidade disponível.

2.4 *TRICHILIA CATIGUA*

Planta nativa do território brasileiro, a *Trichilia catigua* A. Juss (*Meliaceae*) está concentrada no sul do país, porém pode ser encontrada no interior baiano, além de ser encontrada na Argentina, Paraguai e Bolívia (SOUZA et al., 2001; LAGOS; MIGUEL; DUARTE, 2007). É popularmente conhecida como catuaba. Quando adulta, pode chegar a quatro metros de altura, apresenta folhas verde-escuras e o caule de madeira vermelha é envolto por uma casca parda escura (SILVA, 2004). A casca da planta é bastante utilizada e, depois de triturada e submetida à infusão apresenta coloração vermelha, sabor amargo e adstringente (SILVA, 2004). Contem taninos, saponinas, flavonoides, esteroides/triterpenos/sesquiterpenos, antracênicos, cinchonina Ia e Ib, catequinas e epicatequinas (PIZZOLATTI et al., 2002; LAGOS; MIGUEL; DUARTE, 2007; OLIVEIRA et al., 2011; GARCEZ et al., 1997 apud OLIVEIRA et al., 2011; LONNI et al., 2012; LONGHINI et al., 2013).

Quanto aos efeitos terapêuticos destacam-se o digestivo, antifadiga, antiestresse, para a memória, insônia, estimulante do sistema nervoso, ansiolíticos, antioxidante, anti-inflamatórios, afrodisíaco e para impotência sexual (CALIXTO; CABRINI, 1997; CAMPOS et al., 2005; ALBRECHT et al., 2007; VIANA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Estas propriedades foram relacionadas, principalmente, aos extratos acetato de etila e extratos hidroalcoólicos da casca de *T. catigua* e a presença de compostos polifenólicos e flavonoides. Além das atividades citadas, foram descritos os efeitos antimicrobiano (*B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*) e antiprotozoário (trypanosoma) atribuídos a cinchonina Ia e Ib (PIZZOLATTI et al., 2002, 2003). Entretanto, a atividade antiviral nunca foi relatada.

Dessa forma, considerando a importância das doenças virais e a necessidade de novos medicamentos, a *Trichilia catigua*, devido à presença de substâncias com atividade antioxidante e antimicrobiana torna-se uma fonte promissora com potencial emprego no estudo de ação antiviral.

4 CONCLUSÃO

A grande dificuldade no desenvolvimento de antivirais está na descoberta de substâncias que sejam capazes de agir nos vírus sem gerar danos às células. Os testes *in vitro* são potentes indicadores de atividade antiviral. Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho inserem tanto o extrato bruto, quanto as frações aquosa e acetato de etila de *T. catigua*, como candidatos em potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antivirais e no controle de infecções herpéticas, humana e bovina, e infecções por poliovírus; infecções de significativo impacto não só econômico quanto na saúde humana e animal. Uma vez que estes extratos demonstraram baixa toxicidade, significativa seletividade, inibição nos estágios iniciais da replicação viral e, para as frações aquosa e acetato de etila, o potencial sinérgico ao Aciclovir, o extrato bruto e suas frações são merecedores de futuras investigações, com novas abordagens para melhor compreensão do efeito antiviral, à medida que a purificação e a caracterização dos princípios ativos envolvidos forem processadas e elucidadas.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J. S. et al. Antimicrobial, antiproliferative and proapoptotic activities of extract, fractions and isolated compounds from the stem of *Erythroxylum caatingae* plowman. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, n. 4, p. 4124-4140, Mar. 2012.
- ALBRECHT, I. et al. Avaliação da atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas de cascas de *Trichilia catigua* a Juss por DPPH. In: CONGRESSO DE FARMÁCIA DE MARINGÁ, 1., 2007, Maringá. **Revista ArqMudi**, Maringá, v. 11, n. 1, p. 159, 2007.
- ALICE, F. J. Isolamento do vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) no Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 4, p. 919-920, 1978.
- ANTONELLI, G.; TURRIZIANI, O. Antiviral therapy: old and current issues. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 95-102, Aug. 2012.
- BÁEZ-SANTOS, Y. M.; JOHN, S. E.; MESECAR, A. D. The SARS-coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 115, p. 21-38, Mar. 2015.
- BRADLEY, H. et al. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and 2 - United States, 1999–2010. **The Journal of Infectious Diseases**, London, v. 209, n. 3, p. 325-33, 2014.
- BRASIL. **Informe técnico da introdução da vacina inativada poliomielite (VIP)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
- _____. Portal da Saúde. **Medicamentos e insumos fitoterápicos. 2014**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/465-sctie-raiz/daf-raiz/ceaf-sctie/fitoterapicos-cgafb/l1-fitoterapicos/11542-fitoterapia-no-sistema-unico-de-saude>>. Acesso em: 13 nov. 2014.
- _____. **Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
- BROOKS, G. F. et al. **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 25. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- CALDAS, L. Q. A. et al. *Uncaria tomentosa* in the treatment of the herpes labialis: randomized double-blind trial. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 57-59, 2010.
- CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A. Herbal medicine catuama induces endothelium-dependent and –independent vaso relaxant action on isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. **Phytotherapy Research**, London, v. 11, n. 1, p. 32-38, Feb. 1997.

CAMPOS, M. M. et al. Antidepressant-like effects of *Trichilia catigua* (Catuaba) extract: evidence for dopaminergic-mediated mechanisms. **Psychopharmacology**, Oxford, v. 182, n. 1, p. 45-53, 2005.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 131, n. 2, p. 326-342, 2010.

CARTER, J. B.; SAUNDERS, V. A. Herpesviruses. In: _____. **Virology**: principles and applications. England: John Wiley & Sons, Ltd, 2007. p. 121-134.

CAVALCANTE, F. A. **Rinotraqueíte infecciosa bovina (nariz vermelho), diagnóstico e controle**. Rio Branco: Embrapa CPAF-AC, 2000.

CECÍLIO, A. B. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavírus. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 141, n. 3, p. 975- 981, Jun. 2012.

CHANTRILL, B. H. et al. The action of plant extracts on a bacteriophage of *Pseudomonas pyocyanea* and on influenza a virus. **Journal of General Microbiology**, London, v. 6, n. 1, p. 74-84, Feb. 1952.

CHENTOUFI, A. A. et al. Towards a rational design of an asymptomatic clinical Herpes vaccine: the old, the new, and the unknown. **Clinical and Developmental Immunology**, Abingdon, v. 2012, p. 1-16, 2012.

CLEMENS, S. A. C.; FARHAT, C. K. Soroprevalência de anticorpos contra vírus herpes simples 1-2 no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 726-34, 2010.

CONNOLLY, S. A. et al. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 9, n. 5, p. 369-381, May 2011.

CUNNINGHAM, A. L. et al. Prevalence of infection with herpes simplex virus types 1 and 2 in Australia: a nationwide population based survey. **Sexually Transmitted Infections**, London, v. 82, n. 2, p. 164-168, 2006.

DAHANUKAR, S. A.; KULKARNI, R. A.; REGE, N. N. Pharmacology of medicinal plants and natural products. **Indian Journal of Pharmacology**, Mumbai, v. 32, p. 81-118, 2000.

DANVE-SZATANEK, C. et al. Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 1, p. 242-249, Jan. 2004.

DAVISON, A. J. Herpesvirus systematics. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 143, n. 1, p. 52-69, Jun. 2010.

De CLERCQ, E. Antiviral drugs: current state of the art. **Journal of Clinical**

Virology, Amsterdam, v. 22, n. 1, p. 73-89, Aug. 2001.

_____. Historical perspectives in the development of antiviral agents against Poxviruses. **Viruses**, Basel, v. 2, n. 6, p. 1322-1339, Jun. 2010.

_____. In search of a selective antiviral chemotherapy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 4, n. 10, p. 674-693, Oct. 1997.

DEZENGRINI, R. et al. Atividade de três drogas antivirais sobre os herpesvírus bovino tipos 1, 2 e 5 em cultivo celular. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 10, p. 855-860, out. 2010.

FACCIN, L. G. et al. Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 24-28, Jul. 2007.

FACCIN-GALHARDI, L. C. et al. The in vitro antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 142, n. 1, p. 86-90, 2012.

FATAHZADEH, M.; SCHWARTZ, R. A. Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 57, n. 5, p. 737-763, Nov. 2007.

FINO, T. C. M. et al. Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Humana e Animal**, Belo Horizonte, v. 36, n. 2, p. 122-127, 2012.

FRAZIER, R. A. et al. Interactions of tea tannins and condensed tannins with protein. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 490-495, Jan. 2010.

GERAGHTY, R. J. et al. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. **Science**, New York, v. 280, n. 5369, p. 1618-1620, Jun. 1998.

GESCHER, K. et al. Proanthocyanidin-enriched extract from *Myrothamnus flabellifolia* Welw. Exerts antiviral activity against herpes simplex virus type 1 by inhibition of viral adsorption and penetration. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 134, n. 2, p. 468-474, Mar. 2011.

GLOBAL POLIO ERADICATION INITIATIVE. **Data and monitoring**. 2014. Disponível em: <<http://www.polioeradication.org/Dataandmonitoring.aspx>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

_____. **The vaccines**. 2010. Disponível em: <<http://www.polioeradication.org/Polioandprevention/Thevaccines.aspx>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

GODOI, A. M. Antiviral activity of sulfated polysaccharide of *Adenanthera pavonina* against poliovirus in HEp-2 Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Thousand, v. 2014, p. 1-6, 2014.

GONÇALVES, A. L.; ALVES, A. F.; MENEZES, H. Antimicrobial effects of some brazilian medicinal plants against intestinal disorders. **Revista Saúde e Pesquisa**, Maringá, v. 4, n. 2, p. 153-160, maio/ago. 2011.

GONÇALVES, J. L. et al. Viroses do sistema nervoso central. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. v. 1, p. 357-398.

GRIFFITHS, P. D. A perspective on antiviral resistance. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 3-8, Sep. 2009.

HADARI, M. et al. Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with Oseltamivir. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 16, n. 12, p. 1127-1136, Dec. 2009.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 59, n. 2, p. 205-215, Feb. 1996.

HOBER, D. et al. Viruses and type 1 diabetes: focus on the enteroviruses. In: ESCHER, A. P.; LI, A. (Ed.). **Type 1 diabetes**. Croácia: Intech, 2013. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/type-1-diabetes/viruses-and-type-1-diabetes-focus-on-the-enteroviruses>>. Acesso em: 2 dez. 2014.

HOLZ, C.L. et al. Soroprevalência de herpesvírus bovinos tipos 1 e/ou 5 no Estado do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 9, p. 767-773, 2009.

IDA-HOSONUMA, M. et al. The alpha/beta interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. **Journal of Virology**, Washington, v. 79, n. 7, p. 4460-4469, Apr. 2005.

KELLY, B. J. et al. Functional roles of the tegument proteins of herpes simplex virus type 1. **Virus Research**, Amsterdam, v. 145, n. 2, p. 173-186, Nov. 2009.

KHAN, M. T. H. et al. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viroses. **Antiviral Research**, Netherlands, v. 67, n. 2, p. 107-119, Aug. 2005.

KINCHINGTON, P. R. et al. Herpes simplex virus and varicella zoster virus, the house guests who never leave. **Herpesviridae**, London, v. 3, n. 1, p. 5, Jun. 2012.

KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

KOCHAK, H.; SEYYEDNEJAD, S. M.; MOTAMEDI, H. Preliminary study on the antibacterial activity of some medicinal plants of Khuzestan (Iran). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Haikou, v. 3, n. 3, p. 180-184, Mar. 2010.

LACASSE, J. J.; SCHANG, L. M. During lytic infections, herpes simplex virus type 1 DNA is in complexes with the properties of unstable nucleosomes. **Journal of Virology**, Washington, v. 84, n. 4, p. 1920-1933, 2010.

LAGOS, J. B.; MIGUEL, O. G.; DUARTE, M. R. Caracteres anatômicos de catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 26, n. 2, p. 185-190, 2007.

LI, T.; PENG, T. Traditional chinese herbal medicine as a source of molecules with antiviral activity. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 97, n. 1, p. 1-9, 2013.

LONGHINI, R. et al. Development and validation studies for determination of phenylpropanoid-substituted flavan-3-ols in semipurified extract of *Trichilia catigua* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 36, n. 7, p. 1247-1254, Apr. 2013.

LONNI, A. A. S. G. et al. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 16, n. 719, p. 57-60, Mar. 2012.

LOOKER, K. J.; GARNETT, G. P. A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2. **Sexually Transmitted Infections**, London, v. 81, n. 2, p. 103-107, Apr. 2005.

LOPES, N. et al. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 60, p. 93-99, Sep. 2013.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 5, n. 3, p. 55-64, set. 2014.

LOPEZ, M. et al. Nectin2 α (PRR2 α or HveB) and Nectin2 δ are low-efficiency mediators for entry of herpes simplex virus mutants carrying the Leu25Pro substitution in Glycoprotein D. **Journal of Virology**, Washington, v. 74, n. 3, p. 1267-1274, 2000.

LÜ, L. et al. Tannins inhibits HIV-1 entry by targeting gp41. **Acta Pharmacologica Sinica**, Beijing, v. 25, n. 2, p. 213-218, Feb. 2004.

McGEOCH, D. J. et al. Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 247, n. 3, p. 443-458, Mar. 1995.

McKINLAY, M. A. et al. Progress in the development of poliovirus antiviral agents and their essential role in reducing risks that threaten eradication. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 210, supl. 1, p. 447-53, Nov. 2014.

METTENLEITER, T. C. Herpesvirus assembly and egress. **Journal of Virology**, Washington, v. 76, n. 4, p. 1537-1547, 2002.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MONTGOMERY, R. I. et al. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. **Cell**, Cambridge, v. 87, n. 3, p. 427-436, 1996.

MUKHTAR, M. et al. Antiviral potentials of medicinal plants. **Virus Research**, Amsterdam, v. 131, n. 2, p. 111-120, Feb. 2008.

NANDI, S. et al. Bovine herpes virus infections in cattle. **Animal Health Research Reviews**, Wallingford, v. 10, n. 1, p. 85-98, Jun. 2009.

NISHYIAMA, Y. Herpesvirus genes: molecular basis of viral replication and pathogenicity. **Nagoya Journal of Medical Science**, Nagoya, v. 59, n. 3, p. 107-119, Dec. 1996.

NORBERG, P. Divergence and genotyping of human α -herpesviruses: an overview. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 14-25, Jan. 2010.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH - OIE. Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. In: _____. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2014**. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: 28 out. 2014.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, London, v. 66, n. 17, p. 2012–2031, Sep. 2005.

OLIVEIRA, G. D. R. **Caracterização molecular de herpesvirus bovinos por análise da região codificadora da glicoproteína G**. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

OLIVEIRA, K. P. et al. Análise farmacognóstica comparativa de dois lotes de cascas de *Trichillia catigua* Adr. Juss. (Meliaceae), a catuaba da Bahia. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 2-8, 2011.

PALLANSCHI, M.; ROSS, R. *Enteroviruses*: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. Chapter 6.

PAVLI, A.; TSIODRAS, S.; MALTEZOU, H. C. Middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): prevention in travelers. **Travel Medicine and Infectious Disease**, Amsterdam, v. 12, p. 602-608, Oct. 2014.

PEBODY, R. G. et al. The seroepidemiology of herpes simplex virus type 1 and 2 in Europe. **Sexually Transmitted Infections**, New York, v. 80, p. 185-191, 2004.

PELLETT, P. E.; ROIZMAN, B. The family *Herpesviridae*: a brief introduction. In:

KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. ini-fin.

PENKERT, R. R.; KALEJTA, R. F. Tegument protein control of latent herpesvirus establishment and animation. **Herpesviridae**, London, v. 2, n. 1, p. 3, Feb. 2011.

PEREIRA, V. S. S. et al. Herpes simplex virus type 1 is the main cause of genital herpes in women of Natal, Brazil. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 161, n. 2, p. 190-193, Apr. 2012.

PIZZOLATTI, M. G. et al. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian atlantic rain forest plant species. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 10, n. 5, p. 422-426, 2003.

PIZZOLATTI, M. G. et al. Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. **Zeitschrift für Naturforschung**, Berlin, v. 57, n. 5, p. 483-488, 2002.

RACANIELLO, V. R. *Picornaviridae*: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 795-838

RINCÃO, V. P. et al. Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. **Virology Journal**, London, v. 9, p. 1-6, Feb. 2012.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M.; WHITLEY, R. J. Herpes simplex virus. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 2503-2601.

RUSSELL, D. B. et al. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and 2 in HIV-Infected and uninfected homosexual men in a primary care setting. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 305-313, Oct. 2001.

SAHA, S. et al. Water-extracted polysaccharides from *Azadirachta indica* leaves: Structural features, chemical modification and anti-bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 47, n. 5, p. 640-645, Dec. 2010.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à virologia Humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SARNI-MANCHADO, P.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Interactions of Grape Seed Tannins with Salivary Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, n. 1, p. 42-47, Jan. 1999.

SHUKLA, D.; SPEAR, P. G. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. **The Journal of Clinical Investigation**, London, v. 108, n. 4, p. 503-510, Aug. 2001.

SILVA, A. J. Seção farmacognosia tradicional – estudo botânico e químico da catuaba (Erythroxylaceae Catuaba do Norte) – Parte I. **Revista Brasileira de**

Farmacognosia, Maringá, v. 14, n. 1, p. 67-77, 2004.

SILVEIRA, L. M. S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009.

SIMÕES, C. M. O. et al. Antiviral activity of South Brazilian medicinal plant extracts. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 6, n. 3, p. 205-214, Jul. 1999.

SMITH, J. S.; ROBINSON, N. J. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 15, n. 1, p. S3-S28, Oct. 2002.

SOUZA, L. A. et al. Morphology and anatomy of the flowers of *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. and *T. pallida* Sw. (Meliaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 44, n. 4, p. 383-394, Dec. 2001.

SPEAR, P. G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 5, p. 401-410, May 2004.

SRIWILAIJAROEN, N. et al. Antiviral effects of *Psidium guajava* Linn. (guava) tea on the growth of clinical isolated H1N1 viruses: Its role in viral hemagglutination and neuraminidase inhibition. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 94, n. 2, p. 139-146, May 2012.

STEIL, B. P. et al. A mucosal adjuvant for the inactivated poliovirus vaccine. **Vaccine**, Amsterdam, v. 32, n. 5, p. 558-563, Jan. 2014.

STRASFELD, L.; CHOU, S. Antiviral drug resistance: mechanisms and clinical implications. **Infectious Disease Clinics of North American**, Philadelphia, v. 24, n. 2, p. 809-833, Jun. 2010.

TAPPAREL, C. et al. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 14, p. 282-293, Mar. 2013.

THEISEN, L. L. et al. Tannins from *Hamamelis virginiana* bark extract: characterization and Improvement of the antiviral efficacy against Influenza A virus and human papillomavirus. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. 1-14, Jan. 2014.

TUTHILL, T. J. et al. Picornaviruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 343, p. 43-89, 2010.

UEDA, K. et al. Inactivation of pathogenic viruses by plant-derived tannins: strong effects of extracts from persimmon (*Diospyros kaki*) on a broad range of viruses. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2013.

UJVARI, S. C. A história da disseminação dos microrganismos. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 22, n. 64, p. 171-182, 2008.

VAN BLERKOM, L. M. Role of viruses in human evolution. **American Journal of Physical Anthropology**, Hoboken, v. 46, supl. 37, p. 14-46, 2003.

VIANA, A. F. et al. Antinociceptive activity of *Trichilia catigua* hydroalcoholic extract: new evidence on its dopaminergic effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2011, p. 1-8, 2009.

VILHELMOVA-ILIEVA, N. et al. Ellagitannins as synergists of ACV on the replication of ACV-resistant strains of HSV 1 and 2. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 110, p. 104-114, Oct. 2014.

WANG, Y. et al. Identification and characterization of acyclovir-resistant clinical HSV-1 isolates from children. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 107-112, Oct. 2011.

WATANABE, D. Medical application of herpes simplex vírus. **Journal of Dermatological Science**, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 75-82, Feb. 2010.

WHITTON, J. L.; CORNELL, C. T.; FEUER, R. Host and virus determinants of Picornavirus pathogenesis and tropism. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 10, p. 765-776, Oct. 2005.

WIGG, M. D. Antivirais. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 117-146.

WIIG, M. D.; MIRANDA, M. M. F. S. Viroses dermatológicas. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 177-211.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine**. Geneva: WHO, 2001.

_____. **Traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva: WHO, 2011.

YAMAMOTO, K. et al. Antiherpetic activity of an *Agaricus brasiliensis* polysaccharide, its sulfated derivative and fractions. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 52, p. 9-13, Jan. 2013.

YANG, Y. et al. Antiviral activity of punicalagin toward human enterovirus 71 *in vitro* and *in vivo*. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 20, n. 1, p. 67-70, Dec. 2012.

ZHANG, M. Z.; CHEN, Q.; YANG, G. F. A review on recent developments of indole-containing antiviral agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 7, n. 89, p. 421-441, Jan. 2015.

APÉNDICE

APÊNDICE A

Current Pharmaceutical Biotechnology

Antiviral activity of *Trichilia catigua* bark extracts for herpesvirus and poliovirus

Samantha Fernandes Espada^a; Lígia Carla Faccin-Galhardi^a; Vinicius Pires Rincão^a; Ana Letícia Scaldelai Bernardi^a; Nayara Lopes^a; Renata Longhini^b; João Carlos Palazzo de Mello^b; Rosa Elisa Carvalho Linhares^a; Carlos Nozawa^{a*}.

^a Departamento de Microbiologia, CCB, Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brazil.

^b Departamento de Farmácia, CCS, Universidade Estadual de Maringá, CEP 87020900, Maringá, Paraná, Brazil.

*Corresponding author at: Departamento de Microbiologia/CCB/UEL, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Londrina, Paraná, Brazil. Tel.: +55 43 3714617; fax: +55 43 33715728.
E-mail address: cnoz@uel.br (Carlos Nozawa).

ABSTRACT

Herpesvirus and poliovirus are responsible for important diseases in human and animal. *Trichilia catigua* a Brazilian native plant known as catiguá has several medicinal properties among them antimicrobial for bacteria and protozoa, however, no antiviral activity has been reported yet. This study evaluated the antiviral activity of the crude extract (CE) and aqueous and ethyl acetate fractions (AF, EAF) obtained from *T. catigua* in the replication of the Herpes simplex virus (HSV-1), bovine herpesvirus (BoHV-1) and poliovirus (PV-1). The cytotoxicity was analyzed by MTT assay and the antiviral effect was determined by the addition of extracts (0.25 to 100.0 µg/ml), before (-2h and -1h), during (0h) and after (1h and 2h) the viral infection, by plaque reduction assay, in HEp-2 cell culture. The virucidal activity and inhibition of viral adsorption were also evaluated. In addition, the combination index (CI) with Acyclovir (ACV - reference drug) was determined for HSV-1. CE, AF and EAF showed a low toxicity ($CC_{50} > 400 \mu\text{g/ml}$) and low inhibitory concentration (IC_{50}), ranging from 2.44 – 34.25 µg/ml for herpesvirus and 0.67 to 1.8 µg/ml for PV-1, associated with high selectivity index. The tested compounds showed high virucidal effect and high ability to inhibit viral adsorption, for all virus. The CI demonstrated a synergic effect ($CI < 1$) for AF and EAF comparatively to acyclovir (ACV). Our study demonstrated that the extract and fractions of *T. catigua* is promising for future antiviral drug design with economically feasible production.

Keywords: *Trichilia catigua*; Antiviral activity; Herpes simplex virus; Bovine herpesvirus; Poliovirus.

1 INTRODUCTION

Herpes simplex virus 1 (HSV-1) and bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) classified,

respectively, under the genera *Simplexvirus* and *Varicellovirus* of the family *Herpesviridae* are enveloped and double-stranded DNA virus [1]. The former is primarily associated with oral, pharyngeal, facial, ocular and central nervous system infections, largely transmitted by oral secretions [2]. The disease is among the most ubiquitous human infections and the prevalence in adults ranges from 80-90%. Increased morbidity and mortality are reported in neonates and patients with immunodeficiency, including HIV infection or transplant-associated infection [3] and [4]. Both share many biological properties and their distribution is worldwide, being the latter the most important pathogens of cattle. BoHV-1 causes significant economic losses to the livestock industry and the clinical manifestations include respiratory disease, conjunctivitis, abortion and genital infections [5]. The control of both virus is a challenge, mostly due to their ability to establish latent infection, a setback for the development of an efficient vaccine. Inactivated and attenuated live vaccines are available to BoHV-1 with partial protection and markedly reduce the subsequent shedding of field virus [6]. Acyclovir (ACV) and its derivatives are the drugs of choice to treatment of HSV-1 infections highlighted by their selective mechanism of action. However, ACV-resistant HSV strains have been naturally selected mainly in patients undergoing long-term ACV treatment and in immunocompromised [7]. Poliovirus (PV), the etiologic agent of poliomyelitis, is a non-enveloped and positive single-stranded RNA virus, belonging to the genus *Enterovirus* and *Picornaviridae* family [8]. Poliomyelitis is a crippling and potentially fatal disease and despite de vaccination campaign the disease remains endemic in at least three countries - Afghanistan, Nigeria and Pakistan with 407 cases reported in 2013 [9]. There is no treatment for the disease and the strategy to eradicate poliovirus is therefore based on preventing infection by immunization in childhood. Therefore, the disease still represents a real global risk. Medicinal plants are progressively being explored as alternative sources, under the ethnopharmacological grounds, for the development of new drugs. It is estimated that 70–95% of the developing world population rely on medicines empirically for primary care [10]. The pharmacologic activity of these products may be related to the presence of compounds like polysaccharides, terpenes, alkaloids, carbohydrates, flavonoids, phenols, tannins, proteins and peptides [11]. Antimicrobial activity has been attributed to many plant extracts, including antiviral effect [12], [13], [14], [15], [16],

[17], [18], [19] and [20]. *Trichilia catigua* A. Juss. (*Meliaceae*) is a native tree of Brazil, commonly known as catiguá and its bark has been used in popular medicine as purgative, insecticide, anti-rheumatic, physical and mental tonic and as aphrodisiacs [21]. Some of popular uses of *T. catigua* have been confirmed experimentally, such as, antidepressant, antioxidant, antinociceptive, anti-inflammatory, antibacterial and protozoa activity [22], [23], [24], [25], [26], [27], [28], [29], [30], [31] and [32]. This study investigated the *in vitro* antiviral activity of *T. catigua* bark extracts in the replication of herpes simplex virus 1 (HSV-1), bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and poliovirus (PV).

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Cells and Virus

HEp-2 cells (human larynx carcinoma epithelial cells, ATCC CCL-23) were used throughout and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Invitrogen, BR) and treated with 100 µg/ml streptomycin (Gibco BRL, USA), 100 IU/ml of penicillin (Novafarma Ind. Farm., BR) and 2.5 µg/ml of amphotericin B (Meizler Biopharma S/A, BR). Herpes simplex 1 (HSV-1) and the bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) were provided by IMPPG/UFRJ and DMVP/UEL, BR, respectively, and poliovirus 1 (PV-1 - vaccine strain - ATCC/VR-58) by IMPPG/UFRJ. The virus strains were titered by plaque assay and stored at -20 °C in 10% glycerol.

2.2 Plant extracts

The *T. catigua*, identified by Dr. Gerdt Hatschbach, was harvested in Caetité, Bahia, Brazil (voucher no. 306253 - Curitiba, Paraná, Brazil). The extraction procedure was performed as described in [33]. Briefly, dried and pulverized *T. catigua* bark was extracted with acetone–water (7:3, v/v) by turbo-extraction. Filtered, concentrated and lyophilized product yielded the crude extract (CE). The CE dissolved in water and partitioned with ethyl acetate resulted in aqueous (AF) and ethyl acetate fractions (EAF), respectively. The CE, AF and EAF dissolved in DMEM were treated with antimicrobials and stored at -20 °C.

2.3 Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of the extract was determined by the dimethyl-thiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT). Briefly, cell cultures at approximately 70% confluence in 96-well microplates (TPP, CH) were treated with varying concentrations of the extracts (12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0 e 400.0 $\mu\text{g/ml}$) and incubated for 72h at 37 °C with 5% CO_2 . The medium was replaced with 10 μl of the MTT reagent (1.25 $\mu\text{g/ml}$) and incubated for 2h. The solubilizer agent (10% Triton X-100 in acidic isopropanol) was added and the absorbance read at 570 and 690 nm, after 15 min. The 50% cytotoxic concentration (CC_{50}) was calculated as the concentration of the test substance capable of reducing the OD of the MTT product by 50% in comparison to the controls by linear regression analysis.

2.4 Antiviral Activity

The antiviral activity was evaluated by plaque reduction assay (PRA), as previously [18]. Briefly, cell monolayers grown in 24-well plates (TPP, CH) were infected with 30–100 PFU and treated with extracts (12.5 - 100.0 $\mu\text{g/ml}$) at different times (time-of-addition assay), before (-1h and -2h), during (0h) and after (+1h and +2h) the infection. Cultures were overlaid with nutrient agarose (DMEM 2x/1.8% agarose [v/v]) containing 25 mM MgCl_2 . After 40h incubation, cells were fixed with 10% formaldehyde in PBS, pH 7.3, for 24h and stained with 0.5% crystal violet in 20% ethanol. The percent of viral inhibition (%VI) was calculated as: $\%VI = 1 - (\text{PFU in treated cells}/\text{PFU in control cells}) \times 100$ [34]. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated as the amount of the extracts capable to reduce in 50% the number of the plaques. The relative safety of the extracts was determined by the selectivity index ($\text{SI} = \text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$). Human alfa-2B interferon (Meizler Biopharma S/A, BR) was used as positive control for BoHV-1 and PV, and ACV (Zynvir®, Novafarma Ind. Farm., BR) for HSV-1.

2.4.1 Virucidal assay

Varying concentrations of the test extracts were incubated with virus suspension (v/v) at 37 °C for 1h followed by PRA [35].

2.4.2 Inhibition of adsorption assay

The cell cultures were pre-incubated at 4 °C for 1h and submitted to the treatment to varying concentrations of the extracts simultaneously with infection. The cells were incubated at 4 °C for 1h followed by PRA [20].

2.4.3 Combination index (CI) with ACV for HSV-1

Briefly, the extracts and ACV were tested separately at the following doses: $0.25 \times IC_{50}$, $0.5 \times IC_{50}$, $1.0 \times IC_{50}$ and $2.0 \times IC_{50}$. The mixture of varying concentrations of each compound and ACV in a given dose, *v.g.*, $0.25 \times IC_{50}$ of each compound combined with $0.25 \times IC_{50}$ of ACV was added concomitantly to infection and submitted to PRA. The combination index was calculated by $CI = C_A/IC_{50A} + C_B/IC_{50B}$, where, C_A and C_B are the concentrations of the substances A (test compound) and B (ACV) used in combination to achieve 50% effect, and IC_{50A} and IC_{50B} are the inhibitory concentrations of each compound and ACV to cause the same effect. A CI less than, equal to or greater than 1 indicates: synergism, additivity and antagonism, respectively [36].

2.5 Statistical analysis

Anova followed by Tukey's test (BioEstat 5.0 for Windows XP, 2008) were used to determine the difference among experiments with the extracts of *T. catigua* and control groups. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

3 RESULTS

The CC_{50} of the *T. catigua* extracts (CE, AF and EAF) was $>400 \mu\text{g/ml}$ (Table 1). The maximum inhibitory effect was found when the extracts were added simultaneously with virus (time 0h). In this protocol, some of the extracts inhibited viral replication over 50% at four concentrations initially tested (12.5-100 $\mu\text{g/ml}$), though concentrations as low as $0.25 \mu\text{g/ml}$ were used for the determination of IC_{50} (Table 1). The AF and EAF also showed antiviral effect similarly to that of the CE, again, with best results with treatment at the time 0h of infection. However, the EAF was more effective than AF demonstrating the lowest IC_{50} for HSV-1 (11.1 $\mu\text{g/ml}$), BoHV-1 (2.72 $\mu\text{g/ml}$) and PV (1.1 $\mu\text{g/ml}$) and the highest SI from 35.9 to >363.6 in

comparison to AF from 11.67 to >222.2 (Table 1).

Table 1 - Antiviral activity of *T. catigua* crude extract (CE), aqueous fraction (AF) and ethyl-acetate fraction (EAF) against HSV-1, BoHV-1 and PV-1 by the plaque reduction assay, in HEP-2 cells. Cell cultures were treated with the extracts (12.5–100 µg/ml) at the time of the infection (time 0 h).

	CC ₅₀ ^a	HSV-1		BoHV-1		PV-1	
		IC ₅₀ ^b	SI ^c	IC ₅₀ ^b	SI ^c	IC ₅₀ ^b	SI ^c
CE	>400	4.59	>87.15	4.62	>86.6	0.67	>597
AF	>400	12.5	>32	34.25	>11.67	1.8	>222.2
EAF	>400	11.1	>35.97	2.72	>147	1.1	>363.6

a – Fifty percent cytotoxic concentration (CC₅₀) for HEP-2 cells (µg/ml)

b – Fifty percent inhibitory concentration (IC₅₀) (µg/ml)

c – Selectivity index (CC₅₀/IC₅₀)

3.1 Antiherpesvirus activity

The time-of-addition assay (Fig. 1) showed that the CE, AF and EAF were more effective when added simultaneously with the HSV-1 infection (time 0h). The CE exhibited the maximum inhibition performance, except at the concentration of 12.5 µg/ml, nevertheless the inhibition was over 90% (Fig. 1a). The lower concentrations tested presented a dose-response curve with 93.7% of VI at 12.5 µg/ml, 74.3% at 6.25 µg/ml, 30.3% at 3.12 µg/ml and 4.8% at 1.56 µg/ml. This inhibition curve was also observed for AF, as shown in Fig. 1b with an initial inhibition of 49.4% at 12.5 µg/ml up to 90.8% at 100 µg/ml. On the other hand, the EAF showed an inhibition of 42.37% at 12.5 µg/ml, 94.7% at 25 µg/ml and 100% at the concentrations of 50 and 100 µg/ml (Fig. 1c). In the post-treatment assay (times +1h and +2h), the highest inhibition, about 20%, was detected only for CE, at 100 µg/ml. In the pre-treatment assay, at the times -2h and -1h, the CE %VI were 44.5% and 20.2%, respectively (Fig. 1a), and for AF 28% and 32.9%, respectively (Fig. 1b), at 100 µg/ml. In parallel, we showed that in virucidal assay the EAF presented the highest inhibitory activity at 100 µg/ml, 50 µg/ml and 25 µg/ml (Table 2). EAF also inhibited the adsorption by 96.4%, 95.4% and 84.2% at 100 µg/ml, 50 µg/ml and 25 µg/ml, respectively (Table 3). The AF showed the least virucidal and inhibition of adsorption effects compared to the other extracts (Table 2 and 3). ACV used as positive control to HSV-1, showed a CC₅₀ of 2550 µg/ml, the IC₅₀ was 2100 µg/ml and the SI 1.21. By the CI, in comparison to ACV, we demonstrated that CE showed antagonistic effect to ACV

(CI>1), however, AF and EAF demonstrated synergic effect (CI<1), as shown in Fig 3. The effect of CE, AF and EAF for BoHV-1 similar to that of HSV-1 is shown in Fig. 2. The CE and EAF showed maximum anti-BoHV-1 activity when used at time 0h for all tested concentrations (12.5-100 µg/ml) (Fig. 2a and 2c). At lower concentrations, the CE inhibited 64.9% of viral replication at 6.25 µg/ml, 28.7% at 3.12 µg/ml and 0.1% at 1.56 µg/ml. At the same concentrations, the EAF inhibited, respectively, 94.7%, 86.2 and 9.7%. For the AF, 100% VI was found only at the greatest concentration (100 µg/ml), followed of 50.0%, 48.6% and 5.5% for 50 µg/ml, 25 µg/ml and 12.5 µg/ml, respectively (Fig. 2b). The CE and EAF virucidal and inhibition of adsorption activities were maximum from 93.4% - 100% (Table 2 and 3). BoHV-1 was completely inhibited by interferon at 1000 U/ml.

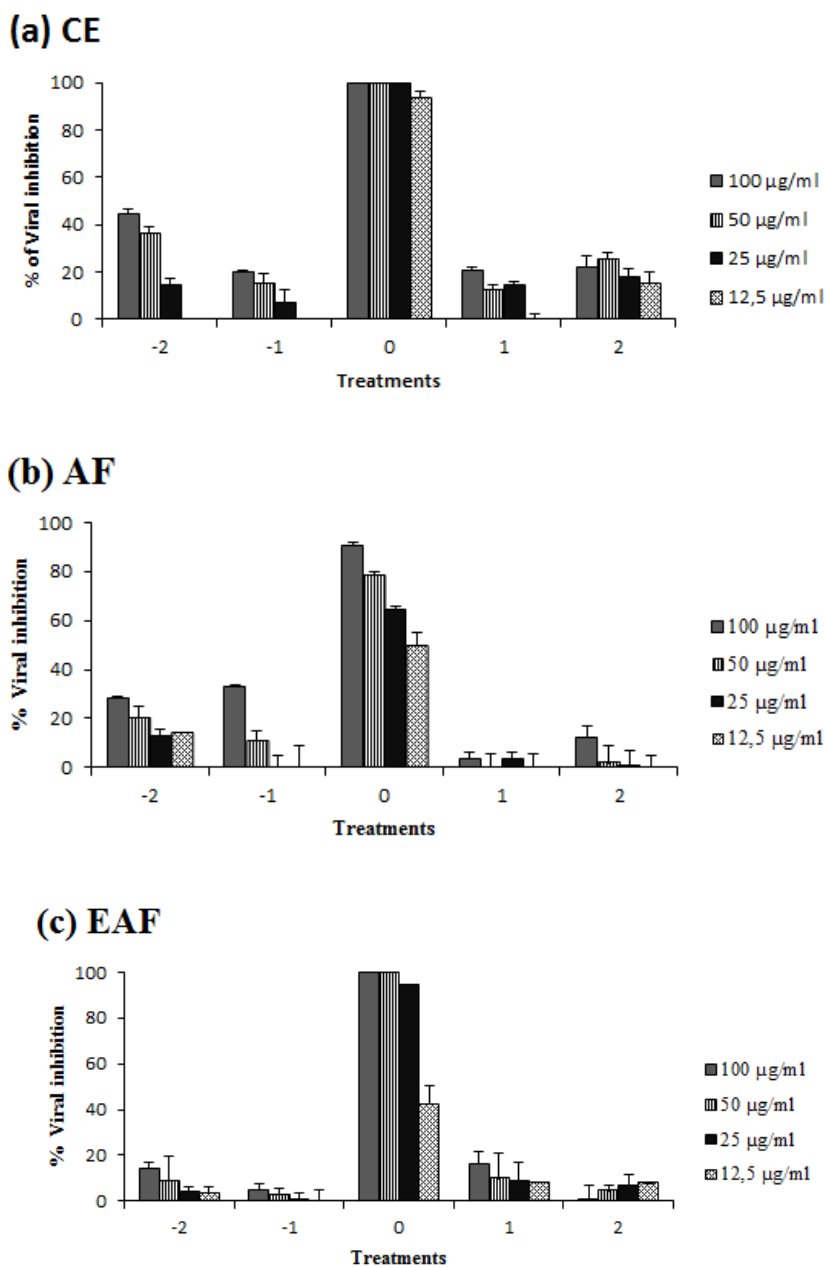


Fig. (1). The inhibition of HSV-1 by *T. catigua* (a) crude extract (CE), (b) aqueous fraction (AF) and (c) ethyl-acetate fraction (EAF) for the protocols time-of-addition (-2 to +2) in HEP-2 cell cultures by plaque reduction assay, at the indicated concentrations. The percentage of viral inhibition (%VI) was determined in comparison to controls and the results are expressed as mean \pm SD of triplicate independent experiments.

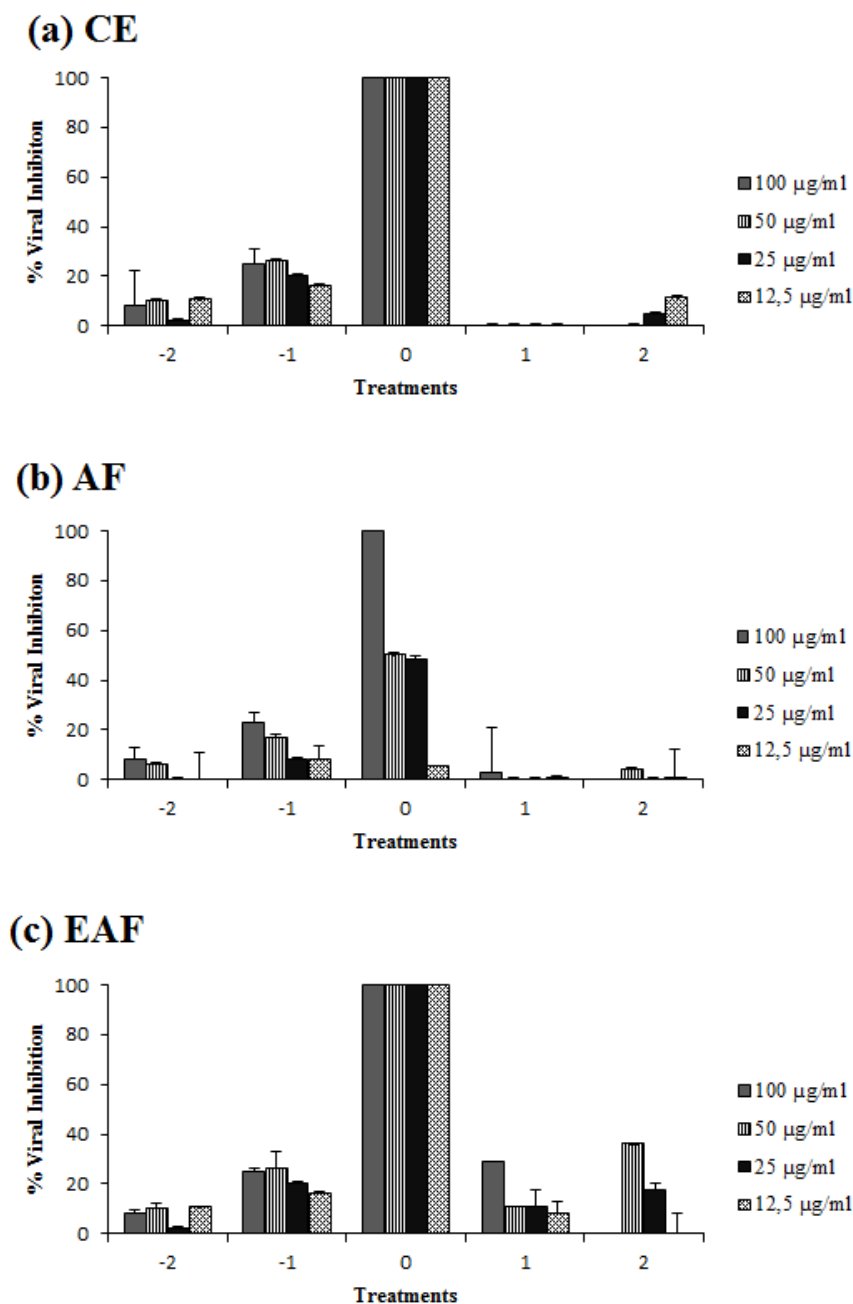


Fig. (2). The inhibition of BoHV-1 by *T. catigua* (a) crude extract (CE), (b) aqueous fraction (AF) and (c) ethyl-acetate fraction (EAF) for the protocol of the time-of-addition (-2 to +2) in HEP-2 cell cultures by plaque reduction assay, at the indicated concentrations. The percentage of viral inhibition (%VI) was determined in comparison to controls and the results are expressed as mean \pm SD of triplicate independent experiments.

Table 2 - Virucidal effect of *T. catigua* crude extract (CE), aqueous fraction (AF) and ethyl-acetate fraction (EAF) against HSV-1, BoHV-1 and PV-1, in HEp-2 cells by plaque reduction assay. The %VI was determined in comparison to controls and the results are expressed as mean \pm SD of triplicate independent experiments.

(µg/ml)	Viral Inhibition (%)								
	HSV-1			BoHV-1			PV-1		
	CE	AF	EAF	CE	AF	EAF	CE	AF	EAF
12.5	93.1±1.41	0.89±3.4	61.25±2.08	100.0	37.01±12.73	100.0	34.7±1.0	100.0	95.65±1.71
25.0	94.83±0.71	67.86±3.56	100.0	100.0	59.06±1.41	100.0	66.0±1.0	100.0	98.02±0.5
50.0	98.28±0.71	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	97.36±0.0
100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.42±1.15

Table 3 - Inhibition of adsorption effect of *T. catigua* crude extract (CE), aqueous fraction (AF) and ethyl-acetate fraction (EAF) against HSV-1, BoHV-1 and PV-1, in HEp-2 cells by plaque reduction assay. The %VI was determined in comparison to controls and the results are expressed as mean \pm SD of triplicate independent experiments.

(µg/ml)	Viral Inhibition (%)								
	HSV-1			BOHV-1			PV-1		
	CE	AF	EAF	CE	AF	EAF	CE	AF	EAF
12.5	34.35±4.35	10.17±4.58	75.13±4.93	100.0	5.99±9.81	93.4±0.96	100.0	100.0	96.97±0.58
25.0	42.17±4.27	25.12±4.86	84.26±1.53	100.0	17.71±5.72	93.9±4.69	100.0	100.0	98.27±0.58
50.0	57.39±0.58	17.21±2.08	95.43±2.0	100.0	32.55±3.3	99.5±0.5	100.0	100.0	98.7±0.0
100.0	73.48±3.86	39.53±1.29	96.45±2.08	100.0	81.77±6.86	99.5±0.5	100.0	100.0	100.0

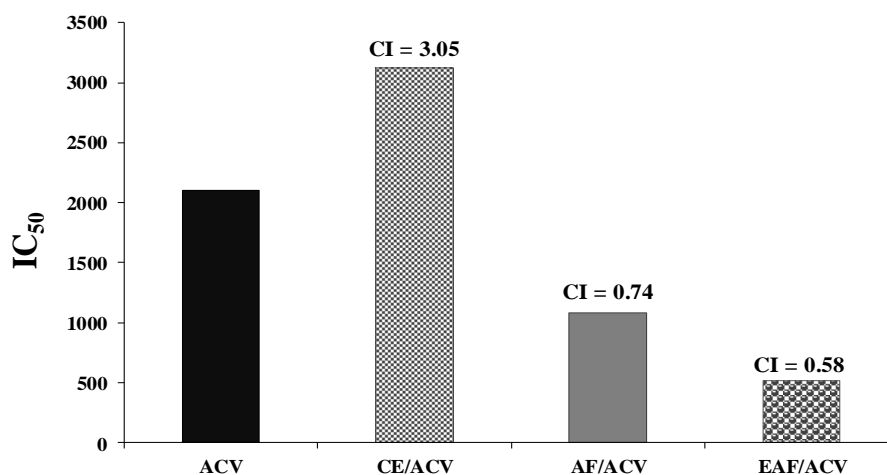


Fig. (3). The combination index (CI) of *T. catigua* crude extract (CE), aqueous and ethyl-acetate fractions (AF and EAF) with ACV, for HSV-1.

3.2. Anti-poliovirus activity

The Fig. 4 presents the time-of-addition assay of the tested extracts that also showed better antiviral effect when added simultaneously (time 0h) with poliovirus infection. Maximum inhibition (100%) was found up to the concentration of 3.12 µg/ml for CE and EAF. At lower concentrations (1.5, 0.78 and 0.39 µg/ml) the %VI of 73%, 58.7% and 12% for CE and 56.2%, 31.6% and 19.2% for EAF were found, respectively. Whereas for AF, the VI of 100% was found for the concentrations of 12.5 - 100 µg/ml, followed of 94.6%, 70.9%, 44.2% and 32.7% for 6.25 µg/ml, 3.12 µg/ml, 1.56 µg/ml and 0.78 µg/ml, respectively. Under post-infection treatment assay (+ 1h), the CE inhibited 100%, 25% and 26% at 100 µg/ml, 50 µg/ml and 25 µg/ml, respectively and EAF 65.7%, 62.1% and 24.6% (Fig. 4a and 4c). The EAF also showed inhibition in the pre-treatment assay ranging from 24.5 – 51.3% for the time - 2h, and about 17% for the time -1h, at all tested concentrations (Fig. 4c). In the virucidal and the inhibition of adsorption assays (Table 2 and 3), the AF presented maximum activity at all the concentrations. Similarly, the EAF presented about 97% inhibition in both tests. The CE showed maximum inhibition at all the concentrations in the inhibition of adsorption assay (Table 3). However, under virucidal protocol, the CE showed the highest activity at 100 µg/ml and 50 µg/ml, followed by 66% at 25 µg/ml and 34.7% at 12.5 µg/ml. Interferon inhibited 100% of PV-1 at the concentration of 10,000 U/ml.

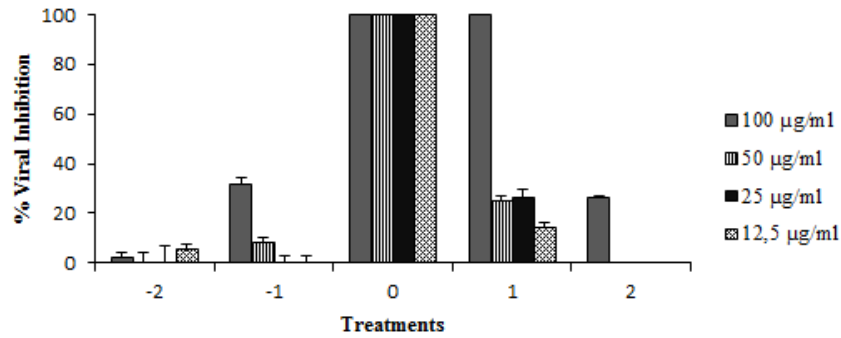
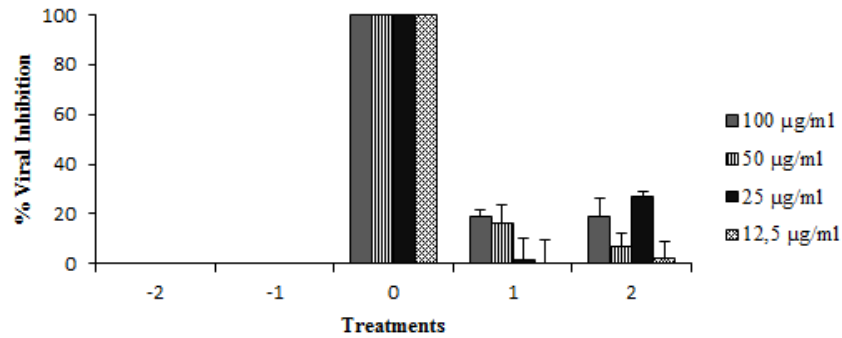
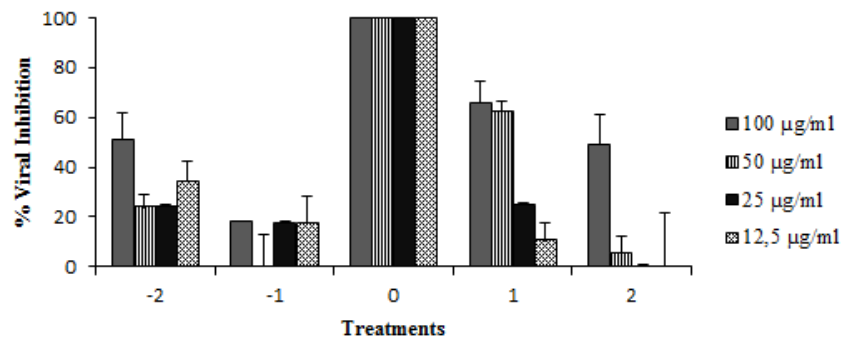
(a) CE**(b) AF****(c) EAF**

Fig. (4). The inhibition of PV-1 by *T. catigua* (a) crude extract (CE), (b) aqueous fraction (AF) and (c) ethyl-acetate fraction (EAF) for the protocol of the time-of-addition (-2 to +2) in HEP-2 cell cultures by plaque reduction assay, at the indicated concentrations. The percentage of viral inhibition (%VI) was determined in comparison to controls and the results are expressed as mean \pm SD of triplicate independent experiments.

4 DISCUSSION

Several medicinal properties of the *T. catigua* have been shown, including the antimicrobial activity for bacteria and protozoa, however, none has been done concerning antiviral activity. In this experiment we showed that *T. catigua* bark extracts (CE, AF and EAF) inhibited the enveloped/DNA herpesvirus, HSV-1 and BoHV-1, and the non-enveloped/RNA virus, PV-1, indicating a potential antiviral activity. We demonstrated that *T. catigua* CE, AF and EAF showed a low toxicity ($CC_{50} > 400 \mu\text{g/ml}$), associated with high selectivity index, which makes the extracts potentially promising. Overall, we showed that maximum inhibitory effect in the replication of the three virus strains was found when CE, AF and EAF were used at the moment of the infection, simultaneously with virus (time 0h). Similar effect was also shown when either virus strains (virucidal assay) or cells (inhibition of the adsorption assay) were treated with the extracts, separately, before infection. These results suggest that active principle in CE, AF and EAF interferes with virus surface structures, cell receptor or both, much more than in the subsequent steps, after virus entry. This assumption is more evident for both herpesvirus, as the time-of-addition assay shows, in post-infection treatment. Phenolic compounds are the main constituents of *T. catigua* barks [37] and some of them are the basis for medicinal purposes. Particularly in *T. catigua* EAF, condensed tannins, such as, procyanidin B2, epicatechin, chinchonins Ia, Ib, IIa, IIb, catechin and chlorogenic acid were found in high concentration [33]. Tannins present in plants are mainly related to their protection against microorganisms supposedly by their protein precipitating mechanism of action [38]. It has been suggested that phenolic compounds can interact directly with viral surface proteins causing their precipitation [39] or in the early stage of adsorption thereby inhibiting penetration into susceptible cells [40]. A proanthocyanidin of *Myrothamnus flabellifolia* was shown to prevent HSV-1 entry into the host cell by blocking viral attachment and penetration, and also by the oligomerisation of the HSV envelope glycoprotein D [41]. Ueda *et al.* [42] demonstrated that tannins inhibited both enveloped and non-enveloped viruses, among them, influenza virus, herpes simplex, poliovirus, adenovirus, rotavirus and norovirus, by the aggregation of virus surface proteins. The effect of tannin-rich extract of *Hamamelis virginiana* was shown to inhibit influenza virus from binding

neuraminidase and hemagglutinin on to cell receptors [43]. We showed that *T. catigua* CE, AF and EAF presented better inhibitory results at the time 0h – in the time-of-addition assay, as well as, in virucidal and inhibition of adsorption assays, for the three stains, accordingly. Therefore, we also suggest the antiviral effect could be attributed to polyphenolic compounds, such as, tannins present in high concentration in *T. catigua* barks. Differences in the antiviral activities between the extracts for both virus strains could be due to the tannin properties. The ability to precipitate proteins and the binding affinity depend on the tannins molecular weight, as well as, viral protein size, structure, pH, temperature, solvent and time of exposure [40], [43], [44] and [45]. The CI for anti-HSV activity in comparison to ACV showed that CE presented antagonistic effect, unlikely AF and EAF that were synergistic.

5 CONCLUSION

We demonstrated that *T. catigua* extracts exhibited antiviral effect for HSV-1, BoHV-1 and PV-1, inhibiting virus particles directly (virucide) and virus attachment step. In conclusion, besides of being the first time *T. catigua* extracts were used as antiviral, we suggest these extracts are promising for drug design and for further studies to get insight into their mechanism of action.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work is part of S.F.Espada MSc manuscript and the authors thank to CAPES, CNPq and Fundação Araucária for financial support.

REFERENCES

- [1] Davison, A.J. Herpesvirus systematics. *Vet Microbiol*, **2010**, *143*, 52–69.
- [2] Roizman, B.; Knipe, D.M.; Whitley, R.J. *In: Fields Virology*; Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 5 ed., **2007**, Vol. 1, pp. 2503-2601.
- [3] Brodoefel, H.; Vogel, M.; Spira, D.; Faul, C.; Beck, R.; Claussen, C.D.; Horger, M. Herpes-Simplex-Virus 1 pneumonia in the immunocompromised host: High-resolution CT patterns in correlation to outcome and follow-up. *Eur J Radiol*, **2012**, *81*, e415–e420.
- [4] Caviness, A.C. Neonatal herpes simplex virus infection. *Clin Pediatr Emerg Med*, **2013**, *14*(2), 135-145.

- [5] Fino, T.C.M.; Melo, C.B.; Ramos, A.F.; Leite, R.C. Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. *Rev Bras Reprod Anim*, **2012**, 36(2),. 122-127.
- [6] World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals 2013. [setting/terrestrial-manual/access-online/](http://www.oie.int/setting/terrestrial-manual/access-online/) (Accessed March 28, **2014**).
- [7] Evans, C.M.; Kudesia, G.; McKendrick, M. Management of herpesvirus infections. *Int J Antimicrob Ag*, **2013**, 42, 119– 128.
- [8] Racaniello, V.R. *In: Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 5 ed., **2007**, Vol. 1, pp. 796-838.
- [9] Global Polio Eradication Initiative. polioeradication.org (Accessed May 14, **2014**).
- [10] World Health Organization. *Traditional medicines: global situation, issues and challenges*, 3rd ed.; WHO press, Geneva, **2011**.
- [11] Sayed, K.A. Natural products as antiviral agents. *Stud Nat Prot Chem*, **2000**, 24, pp. 473–572.
- [12] Souza, G.C.; Haas, A.P.S.; Von Poser, G.L.; Schapoval, E.E.S.; Elisabetsky, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharmacol*, **2004**, 90, pp. 135–143.
- [13] Khan, M.T.H.; Ather, A.; Thompson, K.D.; Gambari, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antivir Res*, **2005**, 67, pp. 107–119.
- [14] Felipe, A.M.M.; Rincão, V.P.; Benati, F.J.; Linhares, R.E.C.; Galina, K.J.; Toledo, C.E.M.; Lopes, G.C.; Mello, J.C.P.; Nozawa, C. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on poliovirus and bovine herpesvirus. *Biol Pharm Bull*, **2006**, 29(6), pp. 1092-1095.
- [15] Saha, S.; Galhardi, L.C.F.; Yamamoto, K.A.; Linhares, R.E.C.; Bandyopadhyay, S.S.; Sinha, S.; Nozawa, C.; Ray, B. Water-extracted polysaccharides from *Azadirachta indica* leaves: Structural features, chemical modification and anti-bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) activity. *Int J Biol Macromol*, **2010**, 47, pp. 640–645.
- [16] Melo, F.L.; Benati, F.J.; Roman Jr., W.A; Mello, J.C.P.; Nozawa, C.; Linhares, R.E.C. The in vitro antiviral activity of an aliphatic nitro compound from *Heteropteris aphrodisiaca*. *Microbiol Res*, **2008**, 163, pp. 136-139.
- [17] Mukhtar, M.; Arshad, M.; Ahmad, M.; Pomerantz, R.J.; Wigdahl, B.; Parveen, Z. Antiviral potentials of medicinal plants. *Virus Res*, **2008**, 131, pp. 111-120.
- [18] Faccin-Galhardi, L.C.; Yamamoto, K.A.; Ray, S.; Ray, B.; Linhares, R.E.C.; Nozawa, C. The in vitro antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. *J Ethnopharmacol*, **2012**, 142, pp. 86–90.

- [19] Moura-Costa, G.F.; Nocchi, S.R.; Ceole, L.F.; Mello, J.C.P.; Nakamura, V.C.; Dias Filho, B.P.; Temponi, L.G.; Ueda-Nakamura, T. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. *J Ethnopharmacol*, **2012**, *143*, pp. 631–638.
- [20] Yamamoto, K.A.; Galhardi, L.C.F.; Rincão, V.P.; Soares, S.A.; Vieira, I.G.P.; Ricardo, N.M.P.S.; Nozawa, C.; Linhares, R.E.C. Antitherpetic activity of an *Agaricus brasiliensis* polysaccharide, its sulfated derivative and fractions. *Int J Biol Macromol*, **2013**, *52*, pp. 9–13.
- [21] Lagos, J.B.; Miguel, O.G.; Duarte M.R. Caracteres anatômicos de catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae). *Lat Am J Pharm*, **2007**, *26*(2), pp. 185-90.
- [22] Vaz, Z.R.; Mata, L.V.; Calixto, J.B. Analgesic effect of the herbal medicine Catuama in thermal and chemical models of nociception in mice. *Phytother Res*, **1997**, *11*, pp. 101–106.
- [23] Antunes, E.; Gordo, W.M.; Oliveira, J.F.; Teixeira, C.E.; Hyslop, S.; Nucci, G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal medicine Catuama® and its constituents. *Phytother Res*, **2001**, *15*, pp. 416–421.
- [24] Pizzolatti, M.G.; Venson, A.F.; Smânia Jr, A.S.; Smânia, E.F.A.; Braz-Filho, R. Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. *Z Naturforsch*, **2002**, *57c*, pp. 483-488.
- [25] Pizzolatti, M.G.; Koga, A.H.; Grisard, E.C.; Steindel, M. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomedicine*, **2003**, *9*, pp. 422–426.
- [26] Campos, M.M.; Fernandes, E.S.; Ferreira, J.; Santos, A.R.S.; Calixto, J.B. Antidepressant-like effects of *Trichilia catigua* (Catuaba) extract: evidence for dopaminergic-mediated mechanisms. *Psychopharmacology*, **2005**, *182*, pp. 45–53.
- [27] Albrecht, I.; Ito, L.A.; Resende, F.O.; Mello, J.C.P. Avaliação da atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas de cascas de *Trichilia catigua* a Juss por DPPH. I Congresso de Farmácia de Maringá – Arquivos do Mudi, Maringá, **2007**, *11*, p. 159.
- [28] Quintão, N.L.M.; Ferreira, J.; Beirith, A.; Campos, M.M.; Calixto, J.B. Evaluation of the effects of the herbal product Catuama® in inflammatory and neuropathic models of nociception in rats. *Phytomedicine*, **2008**, *15*, pp. 245–252.
- [29] Chassot, J.M.; Longhini, R.; Gazarini, L.; Mello, J.C.P.; Oliveira, R.M.W. Preclinical evaluation of *Trichilia catigua* extracts on the central nervous system of mice. *J Ethnopharmacol*, **2011**, *137*, pp. 1143–1148.
- [30] Viana, A.F.; Maciel, I.S.; Motta, E.M.; Leal, P.C.; Pianowski, L.; Campos, M.M.; Calixto, J.B. Antinociceptive activity of *Trichilia catigua* hydroalcoholic extract: new evidence on its dopaminergic effects. *Evid Based Complement Alternat Med*, **2011**, *2011*, pp. 1-8.

- [31] Bonassoli, V.T.; Chassot, J.M.; Longhini, R.; Milani, H.; Mello, J.C.P.; Oliveira, R.M.W. Subchronic administration of *Trichilia catigua* ethyl acetate fraction promotes antidepressant-like effects and increases hippocampal cell proliferation in mice. *J Ethnopharmacol*, **2012**, *143*, pp.179–184.
- [32] Kamdem, J.P.; Olalekan, E.O.; Hassan, W.; Kade, I.J.; Yetunde, O.; Boligon, A.A.; Athayde, M.L.; Souza, D.O.; Rocha, J.B.T. *Trichilia catigua* (Catuaba) bark extract exerts neuroprotection against oxidative stress induced by different neurotoxic agents in rat hippocampal slices. *Ind Crop Prod*, **2013**, *50*, pp. 625– 632.
- [33] Longhini, R.; Klein, T.; Bruschi, M.L.; Silva Jr, W.V.; Rodrigues, J.; Lopes, N.P.; Mello, J.C.P. Development and validation studies for determination of phenylpropanoidsubstituted flavan-3-ols in semipurified extract of *Trichilia catigua* by highperformance liquid chromatography with photodiode array detection. *J Sep Sci*, **2013**, *36*, pp. 1247–1254.
- [34] Nishimura, T.; Toku, H.; Fukuyasu, H. Antiviral compounds. XII Antiviral activity of amidinohydrazones of alkoxyphenyl-substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and in mice. *Kitasato Arch Exp Med*, **1977**, *5*, pp. 39-46.
- [35] Rincão, V.P.; Yamamoto, K.A.; Ricardo, N.M.P.S.; Soares, S.A.; Meirelles, L.D.P.; Nozawa, C.; Linhares, R.E.C. Polysaccharide and extracts from *Lentinula edodes*: structural features and antiviral activity. *Virology*, **2012**, *9(37)*, pp. 1-6.
- [36] Lopes, N.; Faccin-Galhardi, L.C.; Espada, S.F.; Pacheco, A.C.; Ricardo, N.M.P.S.; Linhares, R.E.C.; Nozawa, C. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplexvirus and poliovirus. *Int J Biol Macromol*, **2013**, *60*, pp. 93– 99.
- [37] Lonni, A.A.S.G.; Longhini, R.; Lopes, G.C.; Mello, J.C.P.; Scarminio, I.S.. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. *Anal Chim Acta*, **2012**, *719*, pp. 57– 60.
- [38] Rocha, W.S.; Lopes, R.M.; Silva, D.B.; Vieira, R.F.; Silva, J.P.; Agostini-Costa, T.S. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. *Rev Bras Fruticultura*, **2011**, *33(4)*, pp. 1215-1221.
- [39] Li, T.; Peng, T. Traditional Chinese herbal medicine as a source of molecules with antiviral activity. *Antivir Res*, **2013**, *97*, pp. 1–9.
- [40] Frazier, R.A.; Deaville, E.R.; Green, R.J.; Stringano, E.; Willoughby, I.; Plant, J.; Mueller-Harvey, I. Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *J Pharmaceut Biomed*, **2010**, *51*, pp. 490–495.
- [41] Gescher, K.; Kühn, J.; Lorentzen, E.; Hafezi, W.; Derksen, A.; Deters, A.; Hensel, A. Proanthocyanidin-enriched extract from *Myrothamnus flabellifolia* Welw. Exerts antiviral activity against herpes simplex virus type 1 by inhibition of viral adsorption and penetration. *J Ethnopharmacol*, **2011**, *134*, pp. 468–474.

- [42] Ueda, K.; Kawabata, R.; Irie, T.; Nakai, Y.; Tohya, Y.; Sakaguchi, T. Inactivation of pathogenic viruses by plant-derived tannins: strong effects of extracts from Persimmon (*Diospyros kaki*) on a broad range of viruses. *PLoS ONE*, **2013**, *8*(1), p. e55343.
- [43] Theisen, L.L.; Erdelmeier, C.A.J.; Spoden, G.A.; Boukhallouk, F.; Sausy, A.; Florin, L.; Muller, C.P. Tannins from *Hamamelis virginiana* bark extract: characterization and improvement of the antiviral efficacy against influenza A virus and human papillomavirus. *PLoS ONE*, **2014**, *9*(1), p. e88062.
- [44] Haslam, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J Nat Prod*, **1996**, *59*, pp. 205-215.
- [45] Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *J Agr Food Chem*, **1999**, *47*, pp. 42-47.