



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDO LUCAS DE MELO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE COMPOSTOS
ISOLADOS DE *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach.
(MALPIGHIACEAE)**

Londrina

2004

FERNANDO LUCAS DE MELO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE COMPOSTOS
ISOLADOS DE *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach.
(MALPIGHIACEAE)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina

Orientador: Prof^a. Rosa Elisa Carvalho Linhares

Londrina

2004

FERNANDO LUCAS DE MELO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE COMPOSTOS
ISOLADOS DE *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach.
(MALPIGHIACEAE)**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Rosa Elisa Carvalho Linhares

Prof^a. Dra. Tânia Ueda Nakamura

Prof. Dr. Mario Sergio Mantovani

Londrina, 19 de fevereiro de 2004.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, Adalgiso e Miriam.

Queremos saber
o que vão fazer
Com as novas invenções
Queremos notícia mais séria
Sobre a descoberta da antimatéria
E suas implicações
Na emancipação do homem
Das grandes populações
Homens pobres das cidades
Das estepes, dos sertões
Queremos saber
Quando vamos ter
Raio laser mais barato
Queremos de fato um relato
Retrato mais sério
Do mistério da luz
Luz do disco voador
Pra iluminação do homem
Tão carente e sofredor
Tão perdido na distância
Da morada do Senhor
Queremos saber
Queremos viver
Confiantes no futuro
Por isso se faz necessário
Prever qual o itinerário da ilusão
A ilusão do poder
Pois se foi permitido ao homem
Tantas coisas conhecer
É melhor que todos saibam
O que pode acontecer
Queremos saber
Queremos saber
Todos queremos saber

(Gilberto Gil)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho, em especial:

À minha orientadora, Professora Rosa Elisa Carvalho Linhares pelo constante incentivo, sempre indicando a direção a ser tomada nos momentos de maior dificuldade. Agradeço, principalmente, pela confiança depositada durante a execução deste trabalho. Confiança que gerou liberdade e responsabilidade.

Ao Professor Carlos Nozawa, que sempre participou ativamente da minha formação científica.

À Dr^a Tânia Ueda Nakamura e ao Dr. Mario Sergio Mantovani pela participação na banca de avaliação.

À coordenação e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pela paciência e empenho na formação de profissionais qualificados.

Aos funcionários do departamento Microbiologia, especialmente a Val, pela gentileza e disposição no suporte técnico.

Aos alunos do laboratório de Virologia, Adriana, Daniel, Eduardo, Fabrício, Janaína, José Augusto, Lauretti, Newton, Rafaela, Sérgio e Valéria. Com os quais convivi e compartilhei opiniões, principalmente com Lauretti para o desespero de todos.

Aos meus amigos (todos sem exceção), que suportaram meus momentos de mau humor quando bactérias, na sua luta pela sobrevivência, contaminavam as culturas celulares.

À minha namorada, Léia Cecília, pela paciência, amizade e coragem.

E finalmente gostaria de agradecer a meus pais pelo carinho e apoio durante toda a minha vida.

MELO, Fernando. L. de. **Avaliação da Atividade antiviral de compostos isolados de *Heteropteris aphrodisiaca***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina: Londrina - Pr, 2004. 51f.

RESUMO

Nos últimos 50 anos, portanto, pesquisadores de todo o mundo empenharam-se na pesquisa e desenvolvimento de compostos antivirais contra os mais diversos tipos de vírus. Inicialmente os compostos testados eram na sua grande maioria sintéticos, recentemente os compostos isolados de plantas também têm sido alvo das pesquisas. Neste trabalho foram avaliadas a citotoxicidade e a atividade antiviral da fração aquosa, de um nitrocomposto e de dois flavonóides (astilbina e neoastilbina), derivados das raízes de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (Malpighiaceae), uma planta medicinal brasileira popularmente conhecida como Nó-de-Cachorro. A atividade antiviral foi monitorada pelo ensaio de redução de plaques, para poliovírus tipo 1 e herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). O nitrocomposto apresentou citotoxicidade nas concentrações maiores que 50 µg/ml, enquanto que a astilbina, neoastilbina e a fração aquosa apresentaram citotoxicidade apenas a 100 µg/ml. O nitrocomposto apresentou atividade antiviral, com índice de seletividade (SI) de 2,83 e 2,95 respectivamente para poliovírus e BHV-1, entretanto não foi eficiente no pré-tratamento dos vírus ou das células. A astilbina e neoastilbina não apresentaram atividade antiviral. A fração aquosa foi efetiva inibindo completamente, em todas as concentrações testadas, o aparecimento de plaques quando o vírus foi pré-tratado com os compostos.

Palavras – chave: Viriologia. *Heteropteris aphrodisiaca*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 ANTIVIRAIS SINTÉTICOS	10
2.1 PLANTAS COM ATIVIDADE ANTIVIRAL	11
2.1.1 Principais Compostos Antivirias Isolados de Plantas	14
2.2 <i>HETEROPTERIS APHRODISIACA</i> (NÓ – DE – CACHORRO)	15
3 O VÍRUS	17
3.1 POLIOVÍRUS TIPO 1	17
3.2 HERPES VÍRUS BOVINO TIPO 1	18
4 OS OBJETIVOS	19
4.1 GERAL	19
4.2 ESPECÍFICOS	19
REFERÊNCIAS	20
Artigo 1: In vitro antiviral activity of an aliphatic nitro compound isolated from <i>Heteropteris aph rodisiaca</i>	28
Artigo 2: Avaliação da atividade de antiviral da fração aquosa e compostos isolados de <i>Heteropteris aph rodisiaca</i> contra pólio e herpes vírus bovino	40
5 CONCLUSÃO	51

1 INTRODUÇÃO

As doenças virais acompanham o homem desde a formação das suas primeiras populações, o primeiro caso conhecido de varíola foi relatado em 2000 a.C, na China e leste da Ásia (Miranda., 2002), e à medida que as populações aumentaram o impacto causado pelas doenças virais também aumentou. Cerca de 40 milhões de pessoas estão infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), 25 a 35% da população sexualmente ativa do ocidente está infectada com herpes genital (HSV-2), 2 % da população mundial está infectada com o vírus da Hepatite C e 300 milhões de pessoas são portadoras do vírus da Hepatite B (Jones, 1998; WHO, 2003).

Mas, apesar da grande importância, as doenças virais permaneceram intratáveis até mais da metade do século passado. Este relativo atraso no desenvolvimento de agentes quimioterápicos eficientes para o controle das viroses é devido a dois principais fatores: (1) o isolamento de vírus *in vitro* só foi realizado em 1949 (Enders et al., 1949), antes disso os estudos eram limitados aos modelos animais e ovos embrionados; (2) os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e portanto muitas etapas de sua replicação envolvem processos celulares normais, dificultando o desenvolvimento de compostos eficientes que atuem especificamente no vírus ou na célula infectada sem alterar o funcionamento das células não infectadas.

Nos últimos 50 anos, portanto, pesquisadores de todo o mundo empenharam-se na pesquisa e desenvolvimento de compostos antivirais contra os mais diversos tipos de vírus. Inicialmente os compostos testados eram na sua grande maioria sintéticos, recentemente os compostos isolados de plantas também têm sido alvo das pesquisas.

2 ANTIVIRAIS SINTÉTICOS

O primeiro composto antiviral testado foi a tiosemicarbazona, um antimicrobiano usado para o tratamento da tuberculose, que apresentou atividade contra o vírus vaccinia (Hamre et al., 1950; Brownlee & Hamre, 1951; Thompson et al., 1951). Dois anos depois Thompson et al. (1953) demonstraram que alguns derivados da tiosemicarbazona também apresentavam atividade contra o vírus vaccinia. A partir de 1960 a metisazona, um derivado da tiosemicarbazona, passou a ser usada na profilaxia e no tratamento da varíola em humanos (Jones, 1998).

Paralelamente a idoxiuridina, um análogo de nucleotídeo, foi testada contra o vírus herpes simplex por Herrmann (1961) com excelentes resultados *in vitro*. Um ano depois Kaufman et al. (1962) demonstraram que a idoxiuridina era eficiente no tratamento da ceratite herpética em humanos, mas devido a sua toxicidade, só foi liberada para uso tópico (Weber & Cinatl, 1996).

Dois anos mais tarde Davies et al. (1964) estudaram a ação da amantadina contra o vírus influenza, obtendo resultados positivos nos testes em cultura de células, ovos embrionados e camundongos. Mais tarde este medicamento foi usado como agente profilático na infecção pelo vírus influenza A, durante a epidemia de Hong Kong (1968-1969).

Até o final da década de 70, além destas três drogas citadas acima, outras três foram liberadas para uso clínico: ribavarin, vidarabina e a isoprinosina, sendo que o ribavarin foi liberado somente no México e Brasil, e a isoprinosina na América do Sul (Huggins & Pereira, 1977; Chang & Snyderman, 1979).

A partir da década de 80, segundo Wigg (2002), devido ao elevado custo das pesquisas com agentes antivirais, os pesquisadores concentraram seus esforços nas viroses mais importantes epidemiologicamente: viroses respiratórias, doenças causadas por herpesvírus e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

Atualmente, como resultado dos esforços dos anos anteriores, cerca de 30 compostos já foram liberados e outros 10 estão em fase de liberação. A maioria destes compostos foi liberada para o tratamento de pacientes infectados pelo HIV, infecções pelo vírus da Hepatite B, herpesvírus e influenza (De Clerq, 2001).

Dentre os compostos disponíveis para o tratamento das infecções causadas por herpesvírus pode-se destacar os análogos de nucleotídeos, aciclovir, valaciclovir, penciclovir, famciclovir, ganciclovir e valganciclovir e a vidarabina (Weber & Cinatl, 1996; De Clerq, 2001; Waugh et al., 2002; Visalli & Zeijl, 2003; Brady & Bernstein, 2004). Além destes também estão disponíveis compostos que atuam em outras fases da replicação viral, como o docosanol, que inibe a fusão entre a membrana celular e o envelope do vírus herpes simplex (Brady & Bernstein, 2004), e o fomivirsen, um oligonucleotídeo antisense que inibe a transcrição de alguns genes do citomegalovírus humano (Visalli & Zeijl, 2003).

Entretanto depois destes mais de 50 anos e de um grande número de compostos antivirais disponíveis, os efeitos tóxicos ainda continuam sendo uma barreira em muitos tratamentos. O aciclovir e ganciclovir podem apresentar neurotoxicidade e pacientes tratados com ganciclovir devem ter sua função renal monitorada (Ernest & Franey, 1998; Waugh et al, 2002). Além disso o uso contínuo de alguns compostos tem favorecido o estabelecimento de mutantes resistentes, como por exemplo as drogas usadas no tratamento de infecções por herpesvirus e pelo vírus da hepatite B (Kimberlin et al., 1995; Weber & Cinatl, 1996; Zoulim, 2001).

2.1 PLANTAS COM ATIVIDADE ANTIVIRAL

Com o intuito de encontrar novas classes de antivirais, que apresentem uma menor toxicidade e que atuem de maneira alternativa aos antivirais disponíveis, diversos extratos de plantas começaram a ser testados quanto a sua atividade antiviral em todo o mundo.

De acordo com Vlietinck & Vanden Berghe (1991) as espécies a serem testadas podem ser selecionadas de acordo com quatro metodologias: (1) de maneira aleatória, (2) seleção baseada em dados etnofarmacológicos, (3) baseadas em dados da literatura ou (4) dados quimiotaxonômicos. Comparações destes métodos têm mostrado que o método baseado em dados etnofarmacológicos é 25 % mais eficiente. A maioria dos grupos seleciona as plantas baseados numa combinação destas informações. Com base nestes dados um grande número de espécies vegetais vem sendo analisadas.

O primeiro trabalho com extratos de plantas foi realizado em 1952 na Inglaterra, onde se verificou a eficácia de 228 extratos de plantas contra o vírus influenza A, sendo que destas 12 foram ativas (Chantrill et al., 1952). Na década de 70, pesquisadores canadenses relataram que algumas frutas e seus respectivos sucos apresentavam atividade antiviral contra herpes simplex (HSV), poliovírus 1, coxsackievírus B5 e echovírus 7 (Konowalchuk & Speirs, 1976a, 1976b, 1978a, 1978b).

Yip et al. (1991) estudaram o extrato etanólico de 31 espécies de plantas medicinais utilizadas na província de Yunan na China, 16 foram ativas contra citomegalovírus murino e vírus sindbis.

O extrato aquoso de 142 espécies de plantas, tradicionalmente utilizadas na China, Indonésia e Japão, no tratamento de uma variedade de doenças, foi avaliado contra herpes simplex tipo 1, poliovírus e contra o vírus do sarampo. Destes extratos, 32 foram eficientes contra herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1), 55 contra poliovírus e 30 contra o vírus do sarampo. Alguns destes extratos (12) foram eficientes em testes *in vivo* com camundongos infectados com HSV-1 (Kurokawa et al., 1993).

Estudando 100 espécies de plantas da Columbia Britânica, Canadá, McCutcheon et al. (1995) encontraram 12 extratos que inibiram o aparecimento de efeito citopático induzido por coronavírus entérico, vírus respiratório sincicial, rotavírus, parainfluenza tipo 3 e HSV-1.

Vlietinck et al. (1995), Sindambiwe et al. (1999) e Cos et al. (2002) estudaram cerca de 150 plantas medicinais da Ruanda, estas apresentaram atividade antiviral contra poliovírus, coxsackievírus, semliki forest, vírus do sarampo e HSV-1.

Espécies do Nepal apresentaram atividade antiviral contra poliovírus, HSV-1, vírus sindbis e vírus influenza (Taylor et al., 1996a; Taylor et al. 1996b; Rajbhandari et al., 2001).

Plantas historicamente utilizadas pela população aborígine australiana foram testadas contra citomegalovírus humano, Ross River vírus e contra poliovírus tipo 1. Duas espécies apresentaram atividade contra poliovírus, duas contra Ross River vírus e duas contra citomegalovírus humano (Semple et al., 1998).

Extratos aquosos e etanólicos de 30 plantas medicinais da Indonésia foram avaliados contra HSV-1 em testes *in vitro* e *in vivo*. Oito destes extratos apresentaram atividade

nos testes *in vitro* e apenas dois foram eficientes quando testados *in vivo* (Nawawi, et al., 1999). Outros extratos de plantas da Indonésia também foram testados por Dévéhat et al.(2002) contra HSV-1 e poliovírus em células de linhagem humana e de cobaia, apenas uma espécie apresentou atividade contra poliovírus

Diversos pesquisadores demonstraram atividade antiviral de espécies nativas da América do Sul, contra poliovírus tipo 1, HSV-1, HSV-2, vírus pseudorábico, vírus respiratório sincicial, adenovírus sorotipo 7 e vírus da estomatite vesicular (Abad et al., 1999; Betancur-Galvis et al., 1999; Kott et al., 1999; Zanon et al.,1999; Lopez et al., 2001). Ma et al. (2002) demonstraram que, dentre 44 extratos vegetais de espécies chinesas testados contra o vírus respiratório sincicial (VRS), 25 apresentaram atividade antiviral.

No Brasil os estudos com atividade antiviral de plantas medicinais ainda estão incipientes e poucas espécies estão sendo analisadas. Lagrota et al. (1987) estudaram a ação do lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil) 1,4-naftoquinona), uma substância obtida a partir de plantas da família *Bignoniaceae*, demonstrando atividade antiviral para vírus de RNA (poliovírus tipo 1 e vírus da estomatite vesicular sorotipo Alagoas).

O trabalho mais amplo realizado no Brasil foi o de Simões et al. (1999), que avaliaram a atividade antiviral de 54 plantas medicinais do sul do Brasil, contra cinco tipos diferentes de vírus (HSV-1, HSV-2, poliovírus tipo 2, adenovírus tipo 2 e VSV). Cerca 55% das plantas testadas apresentaram atividade contra um ou mais vírus.

Schmitt et al. (2001) estudaram algumas espécies do gênero *Hypericum*, e verificaram que elas apresentaram atividade antiviral contra o vírus da imunodeficiência felina, inibindo o aparecimento de efeito citopático e diminuindo a quantidade de ácido nucléico detectado por RT-PCR, no sobrenadante celular.

Esquenazi et al. (2002) estudando uma espécie da região nordeste do Brasil, *Cocos nucifera* L. (Palmae), normalmente utilizada na medicina popular contra diarreia e contra artrite, demonstraram que alguns de seus extratos apresentaram atividade contra HSV-1 resistente ao aciclovir.

2.1.1 Principais Compostos Antivirais Isolados de Plantas

As plantas apresentam uma variedade de compostos capazes de atuar na maioria das fases da replicação viral, tais como peptídeos ou polipeptídeos, terpenóides, alcalóides, taninos, flavonóides e outros (Cowen, 1999; Jassim & Naji, 2003).

Um grande número de lectinas isoladas de plantas tem apresentado atividade antiviral contra HIV-1 (Wang & Ng., 2001; López et al., 2003). Uma proteína denominada MRK29 isolada de *Momordica charantia* foi capaz de inibir a transcriptase reversa viral, reduzindo em 82% a expressão da proteína p24 em células infectadas com HIV-1, além disso ela aumentou em três vezes a atividade do fator de necrose tumoral (Jiratchariyakul et al., 2001).

Compostos terpênicos isolados de espécies de *Euphorbia* foram capazes de diminuir a replicação de HSV-2 em culturas de células (Mucsi et al., 2001). Triterpenos isolados de *Maesa lanceolata* apresentaram atividade virucida contra HSV-1 (Apers et al., 2001). Um outro triterpenóide denominado ácido oleanólico foi capaz de inibir a replicação de HIV-1 *in vitro* (Mengoni et al., 2002).

A atividade antiviral de Alcalóides também já foi descrita. Isoquinolinas isoladas de espécies do gênero *Thalictrum* foram capazes de inibir a replicação de duas cepas de Influenza A (Serkedjieva & Velcheva, 2003). Nawawi et al. (2001) relataram que um alcalóide denominado FK-3000 foi capaz de aumentar a taxa de sobrevivência de camundongos infectados com HSV-1.

Os flavonóides são compostos polifenólicos abundantemente distribuídos entre as plantas vasculares, relacionados com a resposta da planta a infecção microbiana, predação por herbívoro, ação antioxidante, pigmentação e odores característicos (Cook & Samman, 1996). Inúmeros estudos têm mostrado que flavonóides isolados de plantas apresentam atividade antiviral contra um grande número de vírus. A atividade antiviral da taxifolina, um dihidroflavonóide foi descrita por Biziagos et al. (1987) contra o vírus da hepatite A, um membro da família *Picornaviridae* e por Chu et al. (1992) contra o vírus da leucemia murina.

O flavonóide 5,6,7,-trihidroxi-flavona foi capaz de inibir a atividade da transcriptase reversa de HIV-1 (Ono et al., 1989), assim como baicaleína, quercetina, quercetagetina e miricetina (Ono & Nakane, 1990). Kitamura et al. (1998) mostraram que a

baicalina, um flavonóide isolado de *Scutellariae radix*, foi capaz de inibir a replicação de HIV-1 *in vitro* de maneira dose-dependente. Este mesmo flavonóide juntamente com a baicaleína e wogonina foram isolados de *Scutellariae baicalensis* e analisados quanto sua atividade contra o vírus da hepatite B, apenas a wogonina apresentou resultados satisfatórios (Huang et al., 1999).

Semple et al. (1999) isolaram de uma planta medicinal australiana, *Pterocaulon sphacelatum*, um flavonóide denominado crisosplenol que apresentou atividade contra poliovírus, este composto é um 4'-hidroxi-3-methoxiflavona, um grupo de compostos conhecidos por inibir a replicação de picornavírus (Vanden Berghe & Vlietinck, 1991).

2.2 HETEROPTERIS APHRODISIACA (NÓ-DE-CACHORRO)

A planta, conhecida popularmente como nó-de-cachorro, foi descrita por Hoene (1920) e posteriormente classificada e nomeada *Heteropteris aphrodisiaca* por Machado (1949). O gênero *Heteropteris* pertence à família Malpighiaceae que apresenta cerca de 70 gêneros e 1250 espécies (Lobello & Forni-Martins, 2003).

A espécie *Heteropteris aphrodisiaca* é um arbusto com cerca de um metro de altura, com raízes irregulares, com rugas e articulações, encontrado principalmente nos cerrados dos estados do Mato Grosso e Goiás (Pio Corrêa, 1984). Tradicionalmente as raízes da planta Nó-de-Cachorro, também conhecida como Nó-de-Porco e Cordão-de-São-Francisco (Pott & Pott, 1994), são utilizadas entre a população como afrodisíaco e como estimulante cerebral no tratamento de “problemas nos nervos” (Pio Corrêa, 1984; Pott & Pott, 1994).

Recentemente De Pieri et al. (2000) isolaram e identificaram três di-hidroflavonóides (astilbina, isoastilbina e neoastilbina). Além destes flavonóides, Roman et al. (2001) isolaram e identificaram o composto nitroso 2,3,4,6-tetra-O-(3-nitropropanoil)- β -D-glucopiranosil, que apresentou atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral, inibindo efeito citopático induzido por poliovírus tipo 1.

Estudos realizados por Mattei et al. (2001) demonstraram que o extrato BST 0298, produzido a partir das raízes de *Heteropteris aphrodisiaca*, foi capaz de reduzir o estresse

oxidativo de lipídeos cerebrais de ratos. Este mesmo extrato foi capaz de melhorar a memória e o aprendizado de ratos idosos (Galvão et al., 2002).

Em função dos dados etnofarmacológicos e biológicos já relatados anteriormente, nos propusemos a avaliar a atividade antiviral da fração aquosa do extrato BST 0298, e de três compostos isolados de *Heteropteris aphrodisisaca*.

3 O VÍRUS

3.1 POLIOVÍRUS TIPO 1

Os poliovírus estão classificados no gênero *Enterovirus* família *Picornaviridae* (Miranda, 2002). O vírion apresenta simetria icosaédrica (26 a 30 nm de diâmetro) não possui envelope, seu genoma é constituído de RNA de fita simples de polaridade positiva.e sua biossíntese ocorre inteiramente no citoplasma. Os poliovírus são considerados modelos da família *Picornaviridae*, a qual também pertence um grande número de patógenos humanos (rinovírus, echovírus, enterovírus, coxsackievírus e vírus da hepatite A).

O poliovírus tipo 1, juntamente com outros dois sorotipos (2 e 3), são os agentes etiológicos da poliomielite, doença caracterizada por um quadro clássico de paralisia flácida de início súbito. Acomete em geral os membros inferiores, de forma assimétrica, tendo como principais características: flacidez muscular, com sensibilidade conservada e arreflexia no segmento atingido. A poliomielite pode apresentar-se de maneira abortiva e não paralítica (meningite viral) (Fields, 2001).

Em 1988 os países membros Organização Mundial da Saúde resolveram propor medidas para erradicação da poliomielite, desde então progressos consideráveis têm sido obtidos na luta contra a doença. Segundo dados da OMS (WHO, 2003) o número de casos diminuiu de 350.000 em 1988 para 700 em 2003, 75% destes casos foram notificados na Índia, Nigéria e Paquistão. O Brasil não apresenta casos desta doença desde 1991.

3.2 HERPES VÍRUS BOVINO TIPO 1

O Herpes vírus bovino tipo 1 (BHV-1), antigamente denominado Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina ou da Vulvovaginite Pustular Infecciosa é o agente etiológico de uma série de enfermidades, incluindo a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), a vulvovaginite pustular infecciosa (IPV), conjuntivites, balanopostites, abortos e encefalites (Gibbs & Rweyemamu, 1977; Tikoo et al., 1995). O BHV-1 pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus* (Armstrong et al., 1961). Apresenta simetria icosaédrica, nucleocapsídeo de 95–110 nm de diâmetro, envelope lipídico e a partícula completa mede cerca de 150-200 nm (Armstrong et al., 1961). Seu genoma é constituído por uma molécula de DNA de fita dupla e sua replicação ocorre no núcleo da célula infectada (Tikoo et al., 1995).

Como os demais membros da família *Alphaherpesvirinae* o BHV-1 é capaz de estabelecer infecção latente nos neurônios sensoriais e motores (Rock, 1994). Este é o principal obstáculo aos programas de controle, pois animais teoricamente sadios quando submetidos a algum tipo de trauma, stress ou imunossupressão podem passar a eliminar o vírus no ambiente (Rock, 1994). Inúmeras vacinas com vírus atenuados têm sido desenvolvidas, porém como os vírus selvagens eles também possuem a capacidade de permanecer latentes, podendo durante a reativação sofrer mudanças passando a forma selvagem (Tikoo et al., 1995).

O BHV-1 tem distribuição ampla, estando presente em quase todos os países de bovinocultura expressiva (Gibbs & Rweyemamu 1977, Weiblen et al. 1992). Em alguns países da Europa, este vírus já se encontra em vias de erradicação. Nos Estados Unidos o controle da doença, e não a erradicação, é a política atual. No Brasil, grande parte das propriedades apresenta animais sorologicamente positivos para o BHV-1 (Lovato et al. 1995, Vidor et al. 1995).

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

O objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antiviral dos extratos e frações de *Heteropteris aphrodisiaca* (Nó-de-Cachorro) contra poliovírus e herpesvirus bovino

4.2 ESPECÍFICOS

Avaliar a citotoxicidade dos compostos isolados e fração aquosa;

Avaliar a atividade antiviral dos compostos isolados e da fração aquosa, utilizando três diferentes tratamentos, pelo ensaio de redução de plaque.

REFERÊNCIAS

Abad, M.J.; Bermejo, P.; Gonzales, E.; Iglesias, I.; Irurzun, A., Carrasco, L., 1999. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *General Pharmacology* 32, 499-503.

Apers, S.; Baronikova, S.; Sindambiwe, J.B.; Witvrouw, M.; De Clercq, E.; Vanden Berghe, D.; Van Marck, E.; Vlietinck, A.; Pieters, L., 2001. Antiviral haemolytic and molluscicidal activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata* establishment of structure-activity relationships. *Planta Medica* 67, 528-532.

Armstrong, J.A.; Pereira, H.G.; Andrewes, C.H., 1961. Observations on the virus of infectious bovine rhinotracheitis, and its affinity with the Herpesvirus group. *Virology* 14, 276-85.

Betancur-Galvis, L.A., Saez, J.; Granados, H.; Salazar, A., Ossa, J.E., 1999. Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94, 531-535.

Biziagos, E.; Crance, J.M.; Passagot, J.; Deloince, R., 1987. Effect of antiviral substances on hepatitis A virus replication *in vitro*. *Journal of Medical Virology* 22, 57-66.

Brady, R.C.; Bernstein, D.I., 2004. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Research* 61, 73-81.

Brownlee, K.A.; Hamre, D.A., 1951. Studies on chemotherapy of vaccinia virus 1. An experimental design for testing antiviral agents. *Journal of Bacteriology* 61, 127-134.
Chang, T-W.; Snyderman, D.R., 1979. Antiviral agents: action and clinical use. *Drugs* 18, 354-356.

Chantrill, B.H.; Coulthard, C.E.; Dickinson, L.; Inkley, G.W.; Morris, W.; Pyle, A.H., 1952. The action of plant extracts on bacteriophage of *Pseudomonas pyocyanea* and on influenza A virus. *Journal of General Microbiology* 6, 74-84.

Chu, S.C.; Hsieh, Y.S.; Lin, J.Y., 1992. Inhibitory effects of flavonóides on Moloney murine virus reverse transcriptase activity. *Journal of Natural Products* 55, 179-183.

Cos, P.; Hermans, N.; De Bruyne, T.; Apers, S.; Sindambiwe, J.B; Vanden Berghe; D Pieters, L.; Vlietinck, A.J., 2002. Further evaluation of Rwandan medicinal plant extract for their antimicrobial and antiviral activities. *Journal of Ethnopharmacology* 79,155-163.

Cowan, M.J., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 564-582.

Davies, W.L; Grunert, R.R.; Haff, R.T.; McGahen, J.W.; Neumayer, E.M.; Paulshock, M.; Watts, J.C.; Wood, T.R.;Hermann, E. C.; Hoffmann, C.E., 1964. Antiviral activity of 1-adamantanamine (amantadine). *Science* 144, 862-863.

De Clercq, E., 2001. Antiviral drugs: current state of the art. *Journal of Clinical Virology* 22, 73–89.

De Pieri, C.; Rabelo e Silva, P.E.; Mundo, S.R.; Borges, J.C.; Cardoso, M.L.C.; Marques, L.C & Mello, J.C.P., 2000. Análise farmacognóstica e identificação de dihidroflavonóis em liofilizado de *Heteropterys aphrodisiaca*. *Anais do XVI Simpósio de Plantas medicinais do Brasil, Recife, Pernambuco*. p.183.

Dévéhat, F. L-L.; Bakhtiar, A.; Bézivin, C.; Amoros, M. & Boustie, J., 2001. Antiviral and citotoxic ctivities of some Indonesian plants. *Fitoterapia* 73, 400–405.

Enders, J.F., Weller, T. H., Robbins, F.C., 1949. Cultivation of the Lansing strain of poliovirus in culture of various human embryonic tissues. *Science* 109, 85-87.

Ernst, M.E., Franey, R.J., 1998. Acyclovir- and ganciclovir-induced neurotoxicity. *Annals of Pharmacotherapy* 32, 111-113.

Esquenazi, D., Wigg. M.D., Miranda, M.M.F.S., Rodrigues, H.M., Tostes, J.B.F., Rozentel, S., Silva, A.J.R., Alviano, C.S., 2002. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology* 153, 647-652.

Galvão, S.M.P.; Marques L.C.; Oliveira, M.G.M; Carlini, E.A. 2002. *Heteropterys aphrodisiaca* (extract BST0298): a Brazilian plant that improves memory in aged rats. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 305–311.

Gibbs E.P.J.; Rweyemamu M.M., 1977. Bovine herpesviruses. Part. I. Bovine herpesvirus 1. *Veterinary Bulletin* 47, 317-343.

Gonçalves, J.L.S.; von Hubinger, M.G.; Wermelinger, M.C.M.W., 2002. Viroses do sistema nervoso central. p. 157-175. *In*: Santos, N.S.O.; Romanos, M.T.; Wigg, M.D.(eds), *Introdução a Virologia Humana*, 3^a.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Hamre, D.; Bernstein, J.; Donovan, R., 1950. Activity of p-aminobenzaldehyde, 3-thiosemicarbazone on vaccinia virus in the chick embryo and in the mouse. *Proceedings Of The Society For Experimental Biology And Medicine* 73, 275-278.

Herrmann, E.C., 1961. Plaque inhibition test for detection of specific inhibitions of DNA containing viruses. *Proceedings Of The Society For Experimental Biology And Medicine* 107, 142-145.

Hoehne, F.C., 1920. *O que Vendem os Hervanários da Cidade de São Paulo*. Casa Duprat, São Paulo.

Huang, R.L.; Chen, C.C.; Huang, H.L.; Chang, C.G.; Chen, C.F.; Chang, C.; Hsieh, M.T., 2000. Anti-hepatitis B virus effects of wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis*. *Planta Medica* 66, 694-698.

Huggins, D., Pereira, G.J.M., 1977. O emprego do virazole como medida terapêutica da hepatite aguda por vírus. *Revista Brasileira de Medicina* 34, 1-14.

Jassim, S.A.A., Naji, M.A., 2003. Novel antiviral agents from plants. *Journal of Applied Microbiology* 95, 412-427.

Jiratchariyakul, W.; Wiwat, C.; Vongsakul, M.; Somanabandhu, A.; Leelamanit, W.; Fujii, I.; Suwannaroj, N.; Ebizuka, Y., 2001. HIV inhibitor from Thai bitter melon. *Planta Medica* 67, 350-353.

Jones, P.S., 1998. Strategies for antiviral drug discovery. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 9, 285-302.

Kaufman, H.E.; Gainesville, Fla; Martola, E.L.; Dohiman, C., 1962. Use of 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU) in treatment of herpes simplex keratitis. *Archives of Ophthalmology* 62, 235-239.

Kimberlin, D.W.; Whitley, R.J., 1995. Antiviral resistance an emerging problem. *Antiviral Research*, 26: 365-368.

Kitamura, K., Honda, M., Yoshizaki, H., Yamamoto, S., Nakane, H., Fukushima, K., Tokunaga, T., 1998. Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production in vivo. *Antiviral Research* 37, 131-140.

Konowalchuk, J.; Speirs, J.I., 1976a. Virus inactivation by grapes and wines. *Applied and Environmental Microbiology* 32, 757-763.

Konowalchuk, J.; Speirs, J.I., 1976b. Antiviral activity of fruit extracts. *Journal of Food Science* 41, 1013-1017.

Konowalchuk, J.; Speirs, J.I., 1978a. Antiviral effect of apple beverages. *Applied and Environmental Microbiology* 36, 798-801.

Konowalchuk, J.; Speirs, J.I., 1978b. Antiviral effect of commercial juices and beverages. *Applied and Environmental Microbiology* 35, 1219-1220.

Kott, V.; Barbini, L.; Cruaños, M.; Muñoz, J. D.; Vivot, E.; Cruaños, J.; Martino, V.; Ferraro, G.; Cavallaro, L.; Campos, R., 1999. Antiviral activity in Argentine medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 79-84.

Kurokawa, M.; Ochiai, H.; Nagasaka, K.; Neki, M.; Xu, H.; Kadota, S.; Sutardjo, S.; Matsumoto, T.; Namba, T.; Shiraki, K., 1993. Antiviral traditional medicines against herpes simplex virus (HSV-1), poliovirus, and measles virus *in vitro* and their therapeutic efficacies for HSV-1 infection in mice. *Antiviral Research* 22, 175- 88.

Lagrota, M.H.C.; Wigg, M.D.; Aguiar, A.N.S.; Pinto, A.V.; Pinto, C.F.R., 1987. Antiviral activity of naphthoquinones. I. Lapachol derivatives against enterovirus. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 29, 15-20.

Lopez, A.; Hudson, J.B.; Towers, G.H.N., 2001. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 77, 189-196.

Lopez, S.; Armand-Ugon, M.; Bastida J.; Viladomat, F.; Este, J.A.; Stewart, D.; Codina, C., 2003. Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity of lectins from *Narcissus* species. *Planta Medica* 69, 109-112.

Lovato L.T., Weiblen R., Tobias F.L., Moraes M.P. 1995. Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1): inquérito soro-epidemiológico no rebanho leiteiro no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* 25, 425-430.

Machado, O. X. B. 1949. Nova espécie do gênero *Heteropterys* Kunth. *Rodriguésia* 11, 113–119.

Mattei, R.; Barros, M.P.; Galvão, S.M.P., Bechara, E.J.H.; Carlini, E.A. 2001. *Heteropteris aphrodisiaca* O. Machado: Effects of extract BST 0298 on the oxidative stress of young and old rat brains. *Phytotherapy Research* 15, 604-607.

McCutcheon, A.R.; Roberts, T.E.; Gibbons, E.; Ellis, S. M.; Babiuk, L.A.; Hancock, R.E.W. & Towers, G.H.N., 1995. Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 49, 101-110.

Mengoni, F.; Lichtner, M.; Battinelli, L.; Marzi, M.; Mastroianni, C.M.; Vullo, V.; Mazzanti, G., 2002. In vitro anti-HIV activity of oleanolic acid on infected human mononuclear cells. *Planta Medica* 68, 111-114.

Miranda, M.M.F.S., 2002. Propriedades gerais dos vírus. p. 1-10. *In*: Santos, N.S.O.; Romanos, M.T.; Wigg, M.D.(eds), *Introdução a Virologia Humana*, 3^a.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Mucsi, I.; Molnar, J.; Hohmann, J.; Redei, D., 2001. Cytotoxicities and anti-herpes simplex virus activities of diterpenes isolated from *Euphorbia* species. *Planta Medica* 67, 672-4.

Nawawi, A.; Nakamura, N.; Hattori, M.; Kurokawa, M.; Shiraki, K., 1999. Inhibitory effects of Indonesian medicinal plants on the infection of herpes simplex virus type 1. *Phytotherapy Research* 13, 37-41.

Nawawi, A.; Nakamura, N.; Meselhy, M.R.; Hattori, M.; Kurokawa, M.; Shiraki, K.; Kashiwaba, N.; Ono, M., 2001. In vivo antiviral activity of *Stephania cepharantha* against herpes simplex virus type-1. *Phytotherapy Research* 15, 497-500.

Ono K.; Nakane, H.; Fukushima, M.; Chermann, J.C.; Barre-Sinoussi, F., 1989. Inhibition of reverse transcriptase activity by a flavonoid compound, 5,6,7-trihydroxyflavone. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 160, 982-987.

Ono, K.; Nakane, H., 1999. Mechanisms of inhibition of various cellular DNA and RNA polymerases by several flavonoids. *Journal of Biochemistry* 108, 609-613.

Pio Corrêa, M., 1984. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, vol. 5. Ministério da Agricultura/Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, p. 293.

Pott, A.; Pott, V.J, 1994. *Plantas do Pantanal*. EMBRAPA–SPI, Corumbá, p. 101.

Rajbhandari, M.; Wegner, U.; Jülich, M.; Schöpke, T.; Mentel, R., 2001. Screening of Nepalese medicinal plants for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology* 74, 251-255.

Rock, D.L, 1994. Latent infection with bovine herpesvirus type 1. *Seminars in Virology* 5, 233-240

Roman Jr, W.A.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P; Nakamura, T.U.; Linhares, R.E.C., Mello, J.C.P., 2001. Atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral de nitrocomposto isolado de *Heteropterys aphrodisiaca*. *Anais do III Simpósio Brasileiro de Farmacognosia*, Curitiba, PR. p.AO-3

Schmitt, A.C.; Ravazzolo, A.P.; Von Poser, G. L., 2001. Investigation of some *Hipericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology* 77, 239-245.

Semple, S.J., Nobbs, S.F, Pyke, S.M., Reynolds, G.D., Flower, R.L.P., 1999. Antiviral flavonoid from *Pterocaulon sphacelatum*, an australian abiriginal medicine. *Jornal of Ethnopharmacology* 68, 283-288.

Semple, S.J.; Reynolds, D.D.; O’Leary, M.C.; Flower, R.L.P., 1998. Screening of Australian medicinal plants for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology* 60, 163-172.

Serkedjieva, J.; Velcheva, M., 2003. In vitro anti-influenza virus activity of isoquinoline alkaloids from thalictrum species. *Planta Medica* 69, 153-154.

Simões, C.M.O., Falkenberg, M., Mentz, L.A., Schenkel, E.P., Amoros, M., 1999. Antiviral activity of South Brazilian medicinal plant extract. *Phytomedicine* 6, 205-214.

Sindambiwe, J.B; Calomme, M.; Cós, P.; Totté, J.; Pieters, L.; Vlietinck, A.; Vanden Berghe, D., 1999. Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. *Journal of Ethnopharmacology* 65, 71-77.

Taylor, R. S. L.; Hudson, J. B.; Manandhar, N. P. Towers, G. H. N., 1996b. Antiviral activities of medicinal plants of southern Nepal. *Journal of Ethnopharmacology* 53, 97-104.

Taylor, R.L.S.; Manandhar, N. P.; Hudson, J.B., Towers, G.H.N., 1996a. Antiviral activities of Nepalese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 52, 157-163.

Thompson, R.L; Minton, S.A.; Offcer, J.E., Hitchings, G.H., 1953. Effects of heterocyclic and other thiosemicarbazones on vaccinia infection in the mouse. *Journal of Immunology* 70, 229-234.

Thompson, R.L; Price, M.L.; Minton, S.A., 1951. Protection of mice against vaccinia virus by administration of benzaldehyde thiosemicarbazone (18957). *Proceedings Of The Society For Experimental Biology And Medicine* 78, 11-13.

Tikoo, S.K.; Campos, M.; Babiuk, L.A., 1995. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Advances in Virus Research* 45, 191-223.

Vidor T., Halfen D.C., Leite T.E.; Coswig L.T., 1995. Herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1). I. Sorologia de rebanhos com problemas reprodutivos. *Ciência Rural* 25, 421-424.

Visalli, R.J.; van Zeiljl, M., 2003. DNA encapsidation as a target for anti-herpesvirus drug therapy. *Antiviral Research* 59, 73-87.

Vlietinck, A. J., Vanden Berghe, D. A., 1991. Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? *Journal of Ethnopharmacology* 32, 141-153.

Vlietinck, A.J.; Van hoof, L.; Totté, J.; Lasure, A.; Vanden Berghe, D.; Rwangabo, P.C.; Mvukiyumwami, J., 1995. Screening of hundred Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. *Journal of Ethnopharmacology* 46, 31-47.

Wang, H.X.; Ng, T.B., 2001. Examination of lectins.; polysaccharopeptide.; polysaccharide.; alkaloid.; coumarin and trypsin inhibitors for inhibitory activity against human immunodeficiency virus reverse transcriptase and glycohydrolases. *Planta Medica* 67, 669-672.

Waugh, S.M.; Pillay, D.; Carrington, D.; Carman, W.F., 2002. Antiviral prophylaxis and treatment (excluding HIV therapy). *Journal of Clinical Virology* 25, 241-66.

Weber, B.; Cinatl, J., 1996. Antiviral therapy of herpes simplex virus infection: recent developments. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 6:112-126.

Weiblen R. 1992. Doenças víricas que interferem na produção leiteira, p. 45-62. In: Charles T.P.; Furlong J. (ed.) *Doenças dos Bovinos de Leite Adultos*. Embrapa-CNPGL, Coronel Pacheco, MG.

WHO, 2003. *The world health report 2003 - shaping the future*. WHO Geneva.

Wigg, M.D., 2002. Antivirais. p. 47-58. *In: Santos, N.S.O.; Romanos, M.T.; Wigg, M.D.(eds), Introdução a Virologia Humana, 3ª.ed.* Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Yip, L.; Pei, S.; Hudson, J.B.; Towers, G.H.N., 1991. Screening of medicinal plants from Yunnan Province in southwest China for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 34: 1-6.

Zanon, S.M.; Ceriatti, F.S.; Rovera, M.; Sabini, L.J.; Ramos, B.A., 1999. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 41, 59-62.

Zoulim, F., 2001. Detection of hepatitis B virus resistance to antivirals. *Journal of Clinical Virology*, 21: 243-253

Artigo 1: *In vitro* antiviral activity of an aliphatic nitro compound isolated from *Heteropteris aphrodisiaca*

Fernando Lucas de Melo^a, Fabricio José Benati^a, Walter Antonio Roman Junior^b, João Carlos Palazzo de Mello^{b,c}, Carlos Nozawa^a e Rosa Elisa Carvalho Linhares^{a*}

^aDeptº de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. ^bPPG em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, SP. ^c PPG em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR. Brazil.

*Corresponding author:

Prof^a. Rosa Elisa Carvalho Linhares

Deptº de Microbiologia/CCB

Universidade Estadual de Londrina

Caixa Postal 6001

CEP 86051-990

Londrina – Paraná

Brazil.

Phone: 55-4333714617

Fax: 55-4333714207

E-mail: relin@uel.br

ABSTRACT

We investigated the antiviral activity of an aliphatic nitro compound isolated from *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (Malpighiaceae), a Brazilian medicinal plant. The nitro compound was tested for its antiviral activity against poliovirus and bovine herpes virus type 1 by plaque reduction assay in cell culture. The nitro compound showed antiviral activity against poliovirus and BHV-1 in HEp-2 cells, the 50 % inhibitory concentration (IC₅₀) was 22.01 (SI=2.83) and 21.10 (SI=2.95) µg/ml respectively. The pre-treatment of cells or virus did not inhibit the plaque formation. This is the first report of antiviral activity of this type of compound.

Keywords: *Heteropteris aphrodisiaca*. Medicinal plant. Aliphatic nitro compound. Antiviral. Plaque assay.

1 INTRODUCTION

Fifty years after the beginning of the work with antiviral agents, the viral diseases remain as an important worldwide problem, due in part to the toxicity of many drugs (Ernest and Franey, 1998; De Clercq, 2001) and rapid emergence of drug resistant virus strains (Gilbert et al., 2002; Field, 2001; Zoulim, 2001). In order to find new alternatives and efficient antiviral compounds, many traditional medicinal plants have been screened (Vlietinck and Vanden Berghe, 1991; Jassim and Naji, 2003), including Brazilian medicinal plants (Simões et al., 1999; Schmitt et al., 2001; Esquenazi et al., 2002). A great diversity of compounds isolated from plants show antiviral activity including flavonoids, tannins, proteins, polysaccharides, alkaloids and others (Jassim and Naji, 2003).

Heteropteris aphrodisiaca O. Mach. (Malpighiaceae) is a plant, endemic to the Brazilian scrubland regions, traditionally used in folk medicine as an aphrodisiac, stimulant and in the treatment of nervous weaknesses (Pott and Pott, 1994). It was recently demonstrated by Mattei et al. (2001) that the extract BST0298 reduced the oxidative stress in young and old rat brains. Galvão et al. (2002) found out that the treatment with the same extract improved learning and memory deficits in aged rats.

In this work we reported the antiviral activity of a nitro compound, isolated from *H. aphrodisiaca*, against poliovirus type 1 and bovine herpesvirus type 1.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 PLANT MATERIAL AND ISOLATION OF THE NITRO COMPOUND

Roots of *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (Malpighiaceae) were collected in October 2000, in Santo Antônio do Leverger, Mato Grosso State, Brazil, and identified by Prof. Dr. Miramy Macedo (Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT). A voucher specimen (UFMT-22181) was deposited at the UFMT Central Herbarium in Cuiabá, Mato Grosso.

The roots (500 g) were macerated with acetone for 1 week at room temperature. The extract was filtered and the solvent evaporated under vacuum affording of crude extract (13 g). One portion of the extract (10 g) was chromatographed on silica gel by Vacuum Liquid Chromatography using toluene and then CHCl₃/MeOH (97:3; 19:1; 9:1; 17:3; 1:1) to yield 6 fractions. Fractions (200 ml) were collected and checked by Thin-Layer Chromatography [silica gel 60 F₂₅₄ plates, using solvent systems: n-BuOH:CHCl₃:MeOH (55:40:5)]. Fraction 4 (1.0 g) was crystallized with methanol:water to yield pure compound 2,3,4,6-tetra-*O*-(3-nitropropanoyl)-*O*-β-D-glucopyranoside (200 mg) (Fig. 1).

2.2 CELLS AND VIRUS

HEp-2 cells were cultured at 37°C, with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 µg/ml) and amphotericin B (0.25 µg/ml).

The clinical isolate of BHV-1 was donated by Dr. Amauri Alfieri, Laboratório de Virologia Animal, DMVP-UEL. The poliovirus type 1 was provided by Departamento de Virologia, IMPPG-UFRJ. Both viruses were propagated in HEp-2 cells, aliquoted and stored at -80°C. The virus titre was determined by plaque assay.

2.3 CYTOTOXICITY

The cytotoxicity of the nitro compound was measured by two methods: (1) alteration of normal cell morphology and (2) Trypan blue exclusion method. For the first test, HEp-2 cells were grown in 96-well culture plates at 37°C in 5% CO₂ atmosphere, when the monolayer was confluent the culture medium was replaced by medium containing the compound at different concentrations (2 fold dilutions) and the cells were incubated as described. Then, the destruction of the cell morphology was investigated by microscopic examination. For Trypan blue method, the HEp-2 cells were seeded at a concentration of 2.5×10^4 cells/well in 24-well plates and grown at 37° in 5% CO₂ for 1-2 days. The culture medium was replaced by medium containing the compound at different concentrations. After 48 hours the monolayers were treated with trypsin and the cell numbers were counted. The percentage of viable cells were calculated: Viability (%) = (viable cell number/total cell number) x 100.

2.4 PLAQUE REDUCTION ASSAY

Confluent monolayers of cells in 24-well plates were inoculated with 50-100 PFU of virus and after adsorption for 1 hour at 37°C they were washed with PBS and overlaid with DMEM containing 0.75% agarose and 2-fold dilutions of compound, it was added 25 mM MgCl₂ for poliovirus (Wallis et al., 1966). After 48 hours at 37°C, the monolayers were fixed with 10% formaldehyde in PBS, agarose layer removed, the cells stained with 0.5% crystal violet in 20% ethanol and the number of plaques was counted under a dissecting microscope. The antiviral activity was determined as the percent plaque inhibition of the control: %Plaque inhibition = [1-(Number of plaque drug treated/Number of plaque control) X 100].

2.6 Interactions of nitro compound with virus and cells

The effects of the compound on the virus infectivity, for both BHV-1 and poliovirus, were investigated under extracellular conditions. The virus stock suspension ($> 10^6$

PFU/ml) was mixed with equal volumes of DMEM with the compound at 2-fold dilutions, and incubated for 1 hour at 37°C. The control virus sample was incubated with DMEM only. After incubation, the virus titres were determined by plaque assay.

To evaluate the effect of pre-treatment of cells with the compound, confluent monolayers in 24-well plates were incubated during 1 hour at 37°C in presence of 2-fold dilutions of compound or without. The compound were removed, the cells were washed with DMEM and infected as described above for plaque reduction assay.

2.5 STATISTICS

All samples were performed in quadruplicate. The data were analysed by ANOVA followed by Dunnett's test. $P \leq 0.05$ values were considered significant. The CC_{50} and IC_{50} were calculated by regression analysis of the dose-response curves generated from the data.

3 RESULTS AND DISCUSSION

In this study, we evaluated the antiviral activity a nitro compound isolated from *Heteropteris aphrodisiaca*, against poliovirus, a RNA virus, and BHV-1, a DNA virus. The cytotoxicity was first evaluated by alterations on HEp-2 cell morphology. At 50 $\mu\text{g/ml}$ the cells showed granules and some vacuoles, at concentrations lower than 50 $\mu\text{g/ml}$ the cell morphology was not altered. To exclude the possibility that the antiviral activity was due to a reduction in the number of viable cells, we investigated the cell viability by Trypan blue method. The concentration required for 50% reduction in cell viability (CC_{50}) was 66.29 $\mu\text{g/ml}$ (Table1).

The antiviral activity against poliovirus and BHV-1 was evaluated at concentrations below 40 $\mu\text{g/ml}$ by a plaque reduction assay. The IC_{50} and SI values are shown in Table 1. The nitro compound showed a moderate antiviral activity with selectivity index, defined as the CC_{50}/IC_{50} , of 2.83 and 2.95 against poliovirus and BHV-1 respectively. The dose-response curves are shown in Figure 2. No effect was observed when the virus and cells were pre-treated with the compound (data not shown), suggesting that the reduction observed in virus plaque was due to an interference with the virus replication cycle. Further experiments are required to elucidate the mechanism of action for this compound. This is the first report of the antiviral activity of an aliphatic nitro compound.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank to Dr. Miramy Macedo for identification of plant material. CAPES, CNPq and CPG/UEL for financial support. This work is part of F.L.M. M.Sc. manuscript who was recipient of scholarship granted by CNPq.

REFERENCES

- De Clercq, E., 2001. Antiviral drugs: current state of the art. *Journal of Clinical Virology* 22, 73–89.
- Ernst, M.E., Franey, R.J., 1998. Acyclovir- and ganciclovir-induced neurotoxicity. *Annals of Pharmacotherapy* 32, 111-113.
- Esquenazi, D., Wigg, M.D., Miranda, M.M.F.S., Rodrigues, H.M., Tostes, J.B.F., Rozental, S., Silva, A.J.R., Alviano, C.S., 2002. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology* 153, 647-652.
- Field, H.J., 2001. Herpes simplex virus antiviral drug resistance - current trends and future prospects. *Journal of Clinical Virology* 21, 261-269.
- Galvão, S.M.P., Marques, L.C., Oliveira, M.G.M, Carlini, E.A., 2002. *Heteropterys aphrodisiaca* (extract BST0298): a Brazilian plant that improves memory in aged rats. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 305–311.
- Gilbert, C., Bestman-Smith, J., Boivin, G., 2002. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms. *Drug Resistance Updates* 5, 88-114.
- Jassim, S.A.A., Naji, M.A., 2003. Novel antiviral agents from plants. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 412-427.
- Mattei, R., Barros, M.P., Galvão, S.M.P., Bechara, E.J.H., Carlini, E.A., 2001. *Heteropteris aphrodisiaca* O. Machado: Effects of extract BST 0298 on the oxidative stress of young and old rat brains. *Phytotherapy Research* 15, 604-607.
- Pott, A., Pott, V.J., 1994. Plantas do Pantanal. EMBRAPA–SPI, Corumbá, p. 101.
- Schmitt, A.C., Ravazzolo, A.P., Von Poser, G.L., 2001. Investigation of some *Hipericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology* 77, 239-245.

Simões, C.M.O., Falkenberg, M., Mentz, L.A., Schenkel, E.P., Amoros, M., 1999. Antiviral activity of South Brazilian medicinal plant extract. *Phytomedicine* 6, 205-214.

Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D.A., 1991. Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 32: 141-153.

Wallis, C., Morales, F., Powell, J., Melnick, J.L., 1966. Plaque enhancement of enteroviruses by magnesium chloride, cysteine and pancreatin. *Journal of Bacteriology* 91, 1932-1935.

Zoulim, F., 2001. Detection of hepatitis B virus resistance to antivirals. *Journal of Clinical Virology* 21, 243–253.

LEGEND

Figure1. Chemical structure of 2,3,4,6-tetra-*O*-(3-nitropropanoyl)-*O*- β -D-glucopyranoside.

Figure 2. Dose-response curves of inhibition of the plaque formation of poliovirus type 1 (A) and bovine herpes virus type 1 (B) in HEp-2 cells by an aliphatic nitro compound, isolated from *Heteropteris aphrodisiaca*, at different concentrations. The data are expressed as mean \pm S.D. ($n=4$). ** $P \leq 0.01$, no treatment vs. different concentrations of nitro compound.

Table 1. The cytotoxicity (CC_{50}) and antiviral activity (IC_{50}) of a nitro compound isolated from *Heteropteris aphrodisiaca* against bovine herpes virus type 1 and poliovirus type 1 in HEp-2 cells by plaque reduction assay.

TABLE 1

Virus	CC ₅₀ (µg/ml) ^a	IC ₅₀ (µg/ml) ^b	SI (CC ₅₀ /IC ₅₀)
Poliovirus	62.29	22.01	2.83
BHV-1	62.29	21.10	2.95

^a 50% cytotoxic concentration

^b 50% inhibitory concentration

Figure 1

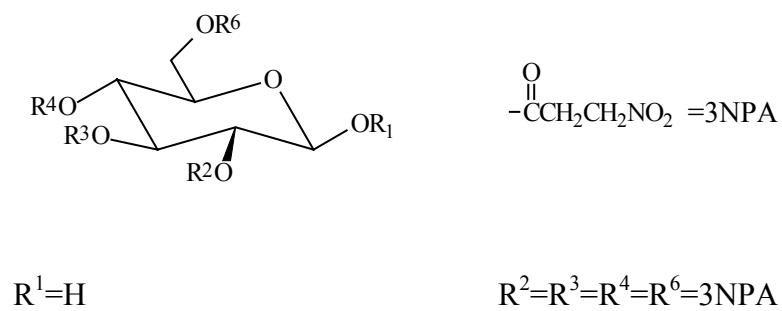
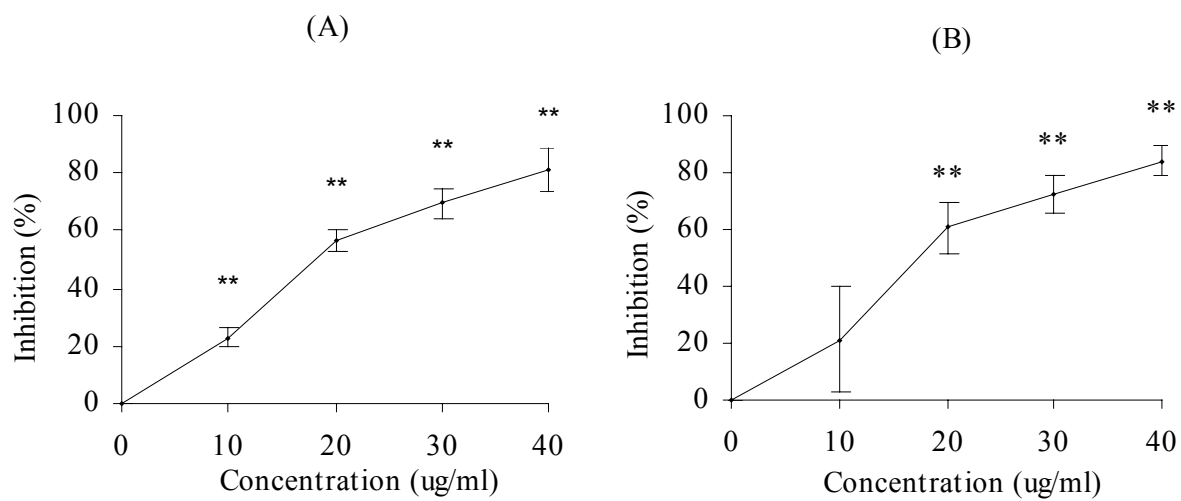


Figure 2



Artigo 2: Avaliação da atividade antiviral da fração aquosa e compostos isolados de *Heteropteris aphrodisiaca* contra pólio e herpes vírus bovino.

Fernando Lucas de Melo^a, Fabricio José Benati^a, Walter Antonio Roman Junior^b, João Carlos Palazzo de Mello^{b,c}, Carlos Nozawa^a and Rosa Elisa Carvalho Linhares^{a*}

^aDept^o de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil. ^bPPG em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, SP, Brasil. ^c PPG em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Brasil.

* Autor para correspondência

Prof^a. Rosa Elisa Carvalho Linhares

Dept^o de Microbiologia/CCB

Universidade Estadual de Londrina

Caixa Postal 6001

CEP 86051-990

Londrina – Paraná

Brasil.

Telefone: 55-4333714617

Fax: 55-4333714207

E-mail: relin@uel.br

RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a atividade antiviral da fração aquosa e dois flavonóides (astilbina e neoastilbina) derivadas de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (Malpighiaceae), uma planta medicinal, popularmente conhecida como Nó-de-Cachorro, contra os vírus pólio-1 e herpesvírus bovino tipo 1. A atividade antiviral foi monitorada pelo ensaio de plaque. A astilbina e neoastilbina não apresentaram atividade antiviral. A fração aquosa foi efetiva apresentando atividade virucida em todas as concentrações.

Palavras-chaves: Planta Medicinal. Ensaio de Plaque. Antiviral. *Heteropteris aphrodisiaca*. Flavonóide.

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (Malpighiaceae) é uma planta medicinal popularmente conhecida como Nó-de-Cachorro, Nó-de-Porco e Cordão-de-São-Francisco (Pott & Pott, 1994), sendo encontrada principalmente nos cerrados dos estados do Mato Grosso e Goiás (Pio Corrêa, 1984). Tradicionalmente é utilizada na forma de “garrafada” como afrodisíaca e como estimulante cerebral no tratamento de “problemas nos nervos” (Pio Corrêa, 1984; Pott & Pott, 1994). Estudos realizados por Mattei et al. (2001) e Galvão et al. (2002) respectivamente, demonstraram que o extrato bruto (BST 0298) foi capaz de reduzir o estresse oxidativo de lipídeos cerebrais de ratos, e melhorar a memória e o aprendizado de ratos idosos. Numa análise fitoquímica preliminar deste extrato Galvão et al. (2002) encontraram diversos compostos, dentre eles alguns flavonóides.

Os flavonóides são compostos polifenólicos que apresentam atividade antiviral contra diversos tipos de vírus, tais como adenovírus (Chiang et al., 2003), influenza A e B (Lin et al., 1999; Kim et al., 2001), citomegalovírus humano (Lin et al., 1999; Mitrocotsa et al., 2000), herpes simplex (Lin et al., 1999; Shahat et al., 2002; Chiang et al., 2003), varicela zoster (Lin et al., 1999), vírus da hepatite B (Huang et al., 2000), poliovírus (Semple et al., 1999) e HIV-1 (Kitamura et al., 1998; Ahn et al., 2002). A taxifolina é um di-hidroflavonóide, cuja atividade antiviral já foi descrita para o vírus da hepatite A (Biziagos et al., 1987) e para o vírus da leucemia murina (Chu, et al. 1992). Neste trabalho portanto nós avaliamos a atividade antiviral da fração aquosa e de dois glicosídeos derivados da taxifolina, obtidos a partir do extrato BST0298 de *Heteropteris aphrodisiaca*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Amostras vegetais de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach., coletadas em diferentes estações do ano, no estado do Mato Grosso, foram identificadas pela Dra. Miramy Macedo, do Instituto de Botânica da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT). Uma exsicata encontra-se depositada sob o número 22181 no Herbarium Central da UFMT.

Uma amostra (50g) de extrato BST-0298 liofilizado, obtido como descrito por Galvão et al. (2002), foi solubilizada em 500 ml de água destilada e submetida a partição com acetato de etila (500ml). A fração aquosa (FW) foi então separada e liofilizada, e posteriormente ressuspensa em água deionizada. A fração de acetato de etila foi submetida a cromatografia em coluna de vidro preenchida com Sephadex LH-20, dando origem a 10 subfrações. A subfração 7, após recristalização, forneceu a substância astilbina [3-O- α -L-ramnosil-trans-(2R,3R)-taxifolina] (fig.1). A subfração 8 foi recromatografada fornecendo três subfrações. A subfração 8.3 originou a substância neoastilbina [3-O- α -L-ramnosil-trans-(2S,3S)-taxifolina] (fig.1). Para a atividade antiviral ambas foram solubilizadas em DMSO 0,25%. Todos os compostos foram mantidos a 4°C.

2.2 Células e Vírus

Células epiteliais de carcinoma de laringe humana (HEp-2) foram cultivadas a 37°C em DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 μ g/ml de estreptomicina, 100 UI/ml de penicilina e 2,5 μ g/ml de fungizona.

A amostra de poliovírus tipo 1 foi doada pelo Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro

(DV-IMPPG-UFRJ). A amostra de herpes vírus bovino tipo 1 (BHV-1) foi doado pelo Dr. Amaury Alfieri, laboratório de Virologia Comparada do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Ambas foram inoculadas em células HEp-2 e incubadas a 37°C até o aparecimento de efeito citopático característico, posteriormente foram congeladas e descongeladas três vezes, centrifugadas e o sobrenadante aliquoteado foi mantido a -80°C até o momento de uso. O título viral foi determinado pelo ensaio de plaque.

2.3 CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade das drogas foi determinada pela alteração na morfologia celular normal. Células HEp-2 foram crescidas em microplacas de 96 poços a 37°C com 5% de CO₂. Após 70% de confluência o meio de crescimento foi retirado e substituído por meio com várias concentrações da FW e subfrações purificadas (6,25; 12,5; 25; 50 e 100µg/ml). Paralelamente meio com e sem DMSO foi adicionado aos controles. As células foram incubadas por 2 dias a 37°C com 5% de CO₂ e então observadas em microscópio invertido. A máxima concentração que não causou alteração morfológica visível foi então determinada.

2.4 Ensaio de redução de plaque

Monocamadas confluentes de células HEp-2 crescidas em placas de 24 poços, foram inoculadas com 50-100 UFP de ambos os vírus e mantidas a 37°C por 1 hora, para adsorção. Após a retirada do inóculo as monocamadas foram lavadas e recobertas com DMEM contendo 0,75% de agarose e as concentrações de 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/ml da FW e subfrações; para o poliovírus 25mM de MgCl₂ foram adicionados (Wallis et al., 1966). Paralelamente foram preparados os seguintes controles: controle de vírus (sem drogas), controle de células (sem vírus e drogas) e controle de vírus com DMSO. Após 48 horas de incubação as monocamadas foram fixadas com formaldeído 10% em PBS, a agarose foi então retirada e a monocamada corada com solução alcoólica de cristal violeta a 0,5%. Os plaques foram contados com o auxílio de um estereomicroscópio. A atividade antiviral foi determinada como a porcentagem de inibição do

número de plaques com relação ao controle: % Inibição = $[1 - (\text{Número de plaques do tratamento} / \text{Número de plaques do controle}) \times 100]$.

O efeito do pré-tratamento das células com as drogas também foi avaliado. Para isso monocamadas confluentes de células HEp-2, crescidas em placas de 24 escavações, foram incubadas durante 1 hora a 37°C na presença das mesmas concentrações de FW e subfrações. Após incubação as monocamadas foram lavadas e inoculadas como descrito anteriormente. Após a retirada do inóculo as monocamadas foram lavadas e recobertas com DMEM contendo 0,75% de agarose. Após 48 horas de incubação os plaques foram contados e a atividade antiviral calculada.

2.5 ATIVIDADE VIRUCIDA

O efeito da FW e das subfrações na infeciosidade viral foi investigado em condições extracelulares. Alíquotas virais ($> 10^6$ PFU/ml) foram misturadas com volumes iguais de DMEM contendo as concentrações das drogas utilizadas nos testes anteriores e incubadas por 1 hora a 37°C. Após incubação o título viral residual foi determinado pelo ensaio de plaque. Paralelamente foram preparados controles de vírus (DMEM sem compostos) e de DMSO (DMEM com DMSO) e então determinada a atividade antiviral.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata. Os dados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS

3.1 CITOTOXICIDADE

O resultado do teste de citotoxicidade demonstrou que tanto FW, quanto astilbina e neoastilbina, não causaram alteração na morfologia normal da célula em concentrações menores ou igual a 50 µg/ml. No entanto as células apresentaram grânulos quando tratadas com astilbina e neoastilbina a 100 µg/ml e quando tratadas com a fração aquosa, nesta mesma concentração, algumas células apresentaram-se vacuolizadas e se desprenderam da monocamada celular.

3.2 ATIVIDADE ANTIVIRAL

Os resultados dos testes de atividade antiviral mostraram que nenhuma das subfrações purificadas apresentou atividade contra poliovírus e BHV-1. A fração aquosa apresentou atividade virucida, inibindo totalmente a formação de plaques, para ambos os vírus, em todas as concentrações testadas, no entanto nos demais tratamentos não foi efetiva.

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho nós avaliamos a atividade antiviral da fração aquosa e de dois di-hidroflavonóis (astilbina e neoastilbina) obtidos a partir do extrato BST 0298 de *Heteropteris aphrodisiaca*. Nenhum dos dois di-hidroflavonóis avaliados apresentou atividade contra os vírus estudados (poliovírus tipo 1 e herpesvírus bovino tipo 1). Estes dois compostos são glicosídeos da taxifolina, um composto cuja atividade antiviral já foi descrita contra o vírus da hepatite A (Biziagos et al., 1987), e contra o vírus da leucemia murina (Chu, et al. 1992). A presença do açúcar poderia explicar a ausência de atividade antiviral dos di-hidroflavonóis, pois segundo Rice-Evans et al., (1996) a glicosilação de flavonóides pode interferir reduzindo suas atividades biológicas, como por exemplo à ação antioxidante, quando comparados com os compostos não glicosilados. Novos experimentos deverão ser realizados na tentativa de se estabelecer alguma relação entre a presença de açúcar e a ausência de atividade antiviral.

A fração aquosa apresentou resultados significativos no ensaio de atividade virucida, entretanto não apresentou atividade nos demais ensaios, sugerindo que ela atue especificamente no vírion. Os compostos ativos presentes nesta fração deverão ser posteriormente isolados e identificados, e experimentos posteriores deverão ser realizados para esclarecer o mecanismo de ação destes compostos.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a Dra. Miramy Macedo pela identificação do material vegetal. Ao CNPq, Capes, CPG-UEL e Fundação Araucária pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Ahn, M.J., Kim, C.Y., Lee, J.S., Kim, T.G., Kim, S.H., Lee, B.B., Shin, C.G., Huh, H., Kim, J., 2002. Inhibition of HIV-1 integrase by gallolyl glucoses from *Terminalia chebula* and flavonol glycoside gallates from *Euphorbia pekinensis*. *Planta Medica* 68, 457-459.
- Biziagos, E.; Crance, J.M.; Passagot, J.; Deloince, R., 1987. Effect of antiviral substances on hepatitis A virus replication *in vitro*. *Journal of Medical Virology* 22, 57-66.
- Chiang, L.C.; Chiang, W.; Liu, M.C.; Lin, C.C., 2003. In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52, 194-198.
- Chu, S.C.; Hsieh, Y.S.; Lin, J.Y., 1992. Inhibitory effects of flavonóides on Moloney murine virus reverse transcriptase activity. *Journal of Natural Products* 55, 179-183.
- Galvão, S.M.P., Marques L.C., Oliveira, M.G.M, Carlini, E.A. 2002. *Heteropterys aphrodisiaca* (extract BST0298): a Brazilian plant that improves memory in aged rats. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 305–311.
- Huang, R.L., Chen, C.C., Huanh, H.L., Chang, C.G., Chen, C.F., Chang, C., Hsieh, M.T., 2000. Anti-hepatitis B virus effects of wogonin Isolated from *Scutellaria baicalensis*. *Planta Medica* 66, 694-698.
- Kitamura, K., Honda, M., Yoshizaki, H., Yamamoto, S., Nakane, H., Fukushima, K., Tokunaga, T., 1998. Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production in vivo. *Antiviral Research* 37, 131-140.
- Lin, Y.M., Flavin, M.T, Schure, R., Chen, F.C., Sidwell, R., Barnard, D.L., Huffman, J.H., Kern, E.R., 1999. Antiviral activities of biflavonoids. *Planta Medica* 65, 120-125.
- Mattei, R, Barros, M.P., Galvao, S.M.P., Bechara, E.J.H., Carlini, E.A., 2001. *Heteropteris aphrodisiaca* O. Machado: Effects of extract BST 0298 on the oxidative stress of young and old rat brains. *Phytotherapy Research* 15, 604-607.

Mitrocotsa, D., Mitaku, S., Axarlis, S., Harvala, C., Malamas, M., 2000. Evaluation of the antiviral

Pio Corrêa, M., 1984. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, vol. 5. Ministério da Agricultura/Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, p. 293.

Pott, A. & Pott, V.J, 1994. Plantas do Pantanal. EMBRAPA–SPI, Corumbá, p. 101.

Rice-Evans, C.A; Miller, N.J.; Paganga, G., 1996. Free Radical & Medicine 20, 933-956.

Semple, S.J., Nobbs, S.F, Pyke, S.M., Reynolds, G.D., Flower, R.L.P., 1999. Antiviral flavonoid from *Pterocaulon sphacelatum*, an australiam aboriginal medicine. Journal of Ethnopharmacology 68, 283-288.

Shahat, A.A., Cos, P., Bruyne, T..D., Apers, S., Hammouda, F.M., Ismail, S.I., Claeys, M., Goovaerts, E., Pieters, L., Vanden Berghe, D., Vlietinck, A.J., 2002. Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. Planta Medica 68, 539-541.

Wallis, C., Morales, F., Powell, J., Melnick, J.L., 1966. Plaque enhancement of enteroviruses by magnesium chloride, cysteine and pancreatin. Journal of Bacteriology 91, 1932-1935.

5 CONCLUSÃO

O nitrocomposto apresentou citotoxicidade nas concentrações maiores que 50 $\mu\text{g/ml}$, enquanto que a astilbina, neoastilbina e a fração aquosa apresentaram citotoxicidade apenas a 100 $\mu\text{g/ml}$;

Apenas o nitrocomposto e a fração aquosa apresentaram atividade antiviral. O nitrocomposto apresentou índice de seletividade (SI) de 2,83 e 2,95 respectivamente para Poliovírus e BHV-1. A fração aquosa foi efetiva somente no teste pré-tratamento do vírus, inibindo completamente o aparecimento de plaques em todas as concentrações testadas.