

POLLYANA DE CARVALHO OLIVEIRA

**Ação dos extratos de *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss contra rotavírus.**

UFMG

2011  
Pollyana de Carvalho Oliveira

**Ação dos extratos de *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss contra rotavírus.**

Monografia apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Especialista em Microbiologia.

Orientadora: Alzira Batista Cecílio

Belo Horizonte  
2011

*Dedico esta conquista a  
minha família, pelo apoio*

*incondicional e pelo incentivo  
na busca pelos meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por orientar meus caminhos.

Aos meus pais e irmã, grandes incentivadores, pelo carinho, amor e compreensão.

À minha família, pelo apoio.

À minha orientadora Alzira Batista Cecílio, pelo voto de confiança e pela oportunidade de aprendizado, por toda sua dedicação na orientação deste trabalho, pelos momentos prazerosos de convívio.

Aos amigos do Serviço de Virologia Molecular e Bioprodutos – FUNED, Sérgio, Fernanda, Cláudio, Robson, Ana Caroline, Ana Paula, Suellen e Rafa, pela paciência e companheirismo, pelos risos, pelos momentos inesquecíveis em que trabalhamos juntos.

Ao colegas do Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica – FUNED pela colaboração indispensável neste trabalho.

Aos professores da Pós-graduação da UFMG pelo profissionalismo e competência, e pela disposição em ensinar.

Aos amigos da Pós, Paula, Fernanda, Déborah Behr, Deborah Valadão, Tião, Bianca e Geralda pelos momentos de alegria e descontração, pelas amizades feitas, pelos encontros.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	6
LISTA DE TABELAS .....	7
LISTA DE ABREVIATURAS .....	8
RESUMO .....	10
ABSTRACT .....	11
1. INTRODUÇÃO .....	12
2 JUSTIFICATIVA .....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	17
3.1 Propriedades gerais do Rotavírus .....	18
3.2 Aspectos gerais da doença .....	21
3.3 Uso de plantas medicinais como antivirais .....	23
3.4 Família Malpighiaceae, <i>Byrsonima verbascifolia</i> Rich. ex. A. Juss .....	25
4 OBJETIVOS .....	28
4.1 Objetivo geral .....	29
4.2 Objetivos específicos .....	29
5 MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
5.1 Delineamento experimental .....	31
5.2 Vírus .....	32
5.3 Cultivo de células .....	32
5.4 Espécies vegetais selecionada para o ensaio antiviral .....	32
5.5 Multiplicação viral .....	33
5.6 Titulação viral .....	34
5.7 Avaliação da citotoxicidade do extrato vegetal bruto e fracionado frente às células MA-104 .....	35
5.8 Ensaio antiviral .....	35
5.9 Obtenção do RNA viral .....	36
5.10 Obtenção do cDNA .....	36
5.11 Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	37
5.12 Titulação viral após aplicação do extrato bruto e frações do extrato vegetal .....	38

<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>8 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>49</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Microscopia eletrônica de rotavírus, visualizados em amostras fecais de crianças com diarreia ..... 18
- FIGURA 2** Representação esquemática da partícula de Rotavírus e seus segmentos de RNA, com os respectivos produtos ..... 19
- FIGURA 3** *Byrsonima verbascifolia*, popularmente conhecida como Murici ..... 26
- FIGURA 4** Mapa do Brasil com a área de ocorrência de *Byrsonima verbascifolia* ..... 26
- FIGURA 5** Alterações morfológicas observadas nas células MA-104 após realização do ensaio de citotoxicidade com diferentes concentrações da fração 3 de *B. verbascifolia*, após 48 horas ..... 41
- FIGURA 6** Efeito citopático observado nas células MA-104 infectadas com a amostra viral SA-11, tratadas com extrato bruto e suas frações, após 48 horas ..... 42
- FIGURA 7** Análise eletroforética do gel de poliacrilamida para presença/ausência do fragmento específico de 144pb, correspondente à amostra de rotavírus, após tratamento com os extratos brutos e fracionados .. 42

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Iniciadores para a região de VP6 utilizados na RT-PCR, descritos por LOGAN; O'LEARY; O'SULLIVAN (2006) .....	37
TABELA 2 Determinação da concentração máxima não citotóxica do extrato bruto e fracionado frente às células MA-104 .....	40
TABELA 3 Percentual de inibição (PI) viral dos extratos brutos e fracionados de <i>B. verbascifolia</i> na concentração de 25 µg/mL, testados contra rotavírus ...	43
TABELA 4 Caracterização fitoquímica para presença/ausência de metabólitos secundários dos extratos bruto e fracionados de <i>B. verbascifolia</i> .....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$  – Micrograma

$\mu\text{L}$  – Microlitro

$\text{Ca}^{2+}$  – Íons cálcio

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

$\text{cm}^2$  – centímetro quadrado

$\text{CO}_2$  – Dióxido de carbono

DEN – 2 – *Dengue virus 2*

DEPC – Dietilpirocarbonato

DMEM – Meio Eagle modificado por *Dulbecco*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

ECP – Efeito citopático

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EIA – Ensaio imunoenzimático

FUNED – Fundação Ezequiel Dias

g – gravidade

HHV – *Herpes virus*

HIV – Virus da Imunodeficiência Humana

KCl – Cloreto de potássio

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  – Fosfato de potássio

m - metro

M - Molar

MCNT – Máxima concentração não citotóxica

mg – Miligrama

$\text{MgCl}_2$  – Cloreto de magnésio

mL – Mililitro

mM – Milimolar

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – Bifosfato de sódio

NaCl – Cloreto de sódio

nm – Nanômetro

NSP (1, 2, 3, 4, 5) – Proteína não-estrutural (1, 2, 3, 4, 5)

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORS – Solução oral para reidratação

pb – Pares de base

PBS – Tampão fosfato salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

PI – Percentual de Inibição

RE – Retículo endoplasmático

RER – Retículo endoplasmático rugoso

RNA – Ácido ribonucleico

RNAs – RNA mensageiros

RT – Transcrição reversa

SFB – Soro fetal bovino

SUS – Sistema Único de Saúde

TCID<sub>50</sub> – *Tissue Culture Infectious Dose*<sub>50</sub>

TRIS – Tris (hidroximetil) aminometano

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VACV-WR – *Vaccinia virus*

VP (1, 2, 3, 4, 5,6, 7, 8) – Proteína viral (1, 2, 3, 4, 5,6, 7, 8)

## RESUMO

Os rotavírus pertencem à família *Reoviridae*. Já foram identificados 7 grupos (A-G), sendo o grupo A predominante na natureza e responsável pelos casos de diarreia em humanos. O rotavírus é o principal agente causador de diarreia e mortalidade em crianças menores de 5 anos, com uma incidência anual de 100 milhões de casos. A transmissão ocorre por via oral-fecal, pessoa/pessoa ou por ingestão de alimentos e água contaminados. O tratamento é paliativo e busca manter e recuperar o equilíbrio hidroeletrolítico do paciente. Neste sentido, a busca por tratamentos específicos são áreas em potencial no campo de pesquisas. Sabe-se que muitos medicamentos fitoterápicos podem melhorar os processos de fagocitose e ainda possuem atividade microbiana, mostrando-se capazes de inibir a replicação viral. A busca por novas drogas antivirais é uma das estratégias para controlar esse tipo de diarreia, e as plantas e compostos naturais apresentam grande aplicabilidade para uso na terapia contra o Rotavírus. Sendo assim, este trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antiviral dos extratos bruto e fracionados do murici (*B. verbascifolia*) contra rotavírus. Para determinar a máxima concentração não citotóxica (MCNT) dos extratos bruto e fracionados, células MA-104 foram incubadas com diferentes concentrações dos mesmos. A análise foi realizada mediante observação em microscópio óptico da alteração morfológica, comparando as células tratadas com as não tratadas. A máxima concentração dos extratos que não gerou mudanças morfológicas foi considerada não tóxica. Para o ensaio antiviral, 20 TCID<sub>50</sub> da amostra viral de referência SA-11 foram incubadas juntamente com os extratos bruto e fracionados na concentração de 25µg/mL em monocamada de células MA-104. O menor efeito citotóxico dos extratos foi observado na concentração de 50µg/mL para o extrato bruto e para suas frações. Os ensaios antivirais com o extrato bruto demonstraram 100% de atividade antiviral contra o rotavírus. Posteriormente este foi fracionado (F1 a F4) e submetido aos ensaios antivirais. A porcentagem de inibição (PI) dos extratos foi verificada através das técnicas de RT-PCR e titulação viral. Observou-se uma redução da atividade antiviral após o fracionamento, sendo que as frações F1 e F3 apresentaram as maiores atividades com PI de 69% e 75%, respectivamente. A caracterização fitoquímica destes extratos revelou a presença de flavonóides, taninos, saponinas e terpenos. A maior atividade antiviral do extrato bruto e a diminuição da atividade após o fracionamento pode estar relacionada com a

proporção dos constituintes e a um possível sinergismo existente entre eles. Os nossos resultados abrem perspectivas para o desenvolvimento de um tratamento para as infecções causadas por rotavírus, com a possibilidade de disponibilização pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Esse sistema visa garantir o acesso a saúde, de forma integral, universal e gratuito a toda população brasileira.

## ABSTRACT

Rotaviruses belong to the family *Reoviridae*. Seven groups have been identified (A-G). The group A predominates in nature and is responsible for cases of diarrhea in humans. Rotavirus is the major causative agent of diarrhea and mortality in children under 5 years with an incidence of 100 million cases. Transmission occurs through fecal-oral route, person / person or by ingestion of contaminated food and water. Treatment is palliative and aims to maintain and restore the electrolyte balance of the patient. In this sense, the search for specific treatments are potential areas in the field of research. It is known that many herbal medicines may improve the processes of phagocytosis and still have microbicidal activity, being able to inhibit viral replication. The search for new antiviral drugs is one of the strategies to control this type of diarrhea, and plants and natural compounds have great applicability in therapy against Rotavirus. Thus, this study aims to evaluate the antiviral activity of crude and fractionated extracts of murici (*B. verbascifolia*) against Rotavirus. To determine the maximum concentration not cytotoxic crude and fractionated extracts, MA-104 cells were incubated with different concentrations of the extracts. The analysis was performed by optical microscope observation of morphological alterations, comparing cells treated and untreated. The maximum concentration of the extract that did not cause morphological changes were considered non-toxic. In the antiviral assay, 20 TCID<sub>50</sub> of the reference virus (SA-11) were incubated in a monolayer of MA-104 cells, with crude and fractionated extracts at concentration of 25µg/mL. The lowest cytotoxic effect was observed at concentrations of 50µg/mL for crude extract and for its fractions. The antiviral assays with the crude extract showed 100% of antiviral activity against rotavirus. Afterwards the crude extract was fractionated (F1-F4) and new antiviral tests were performed. The percentage of inhibition (PI) of the extracts was verified using RT-PCR and virus titration techniques. There was a reduction in antiviral activity after the extract was fractionated, and the fractions F1 and F3 showed the highest activities with PI of 69% and 75%, respectively. The phytochemical characterization of these extracts revealed the presence of flavonoids, tannins, saponins and terpenes. The greater antiviral activity of crude extract and the decrease of activity after the fractionation may be related to the proportion of constituents and to a possible synergism between them. Our results open perspectives for the development of a treatment for rotavirus infection. Which could be need in the Unique System of Health (SUS). This system aims to guarantee access to health, in full, universal and free to all brazilian population.



A diarreia é uma das principais e mais comuns enfermidades que acometem crianças em todo o mundo, correspondendo a um grande problema de Saúde Pública (CARMO, 2006). Estima-se que, anualmente, cerca de 1,3 bilhões de episódios de diarreia ocorram em crianças de até cinco anos de idade em todo o mundo e que aproximadamente quatro milhões destes casos evoluam para o óbito.

A etiologia das doenças diarreicas envolve diferentes agentes como vírus, bactérias, parasitas e toxinas (GLASS & BERN, 1994). Os rotavírus são reconhecidamente os agentes virais mais importantes associados às doenças diarreicas agudas que atingem aves e várias espécies de mamíferos, incluindo os humanos, contribuindo para elevada morbidade hospitalar e mortalidade (VRANJAC, 2004; CARMO, 2006). A morbidade associada à diarreia responde por importante impacto social, traduzido pelos danos à saúde, pelo comprometimento do desenvolvimento infantil e pelos altos custos gerados com hospitalizações, medicamentos e perda de dias na escola e trabalho (CARMO, 2006).

Não existe tratamento específico para diarreias, principalmente as virais. O tratamento utilizado é o de suporte, que busca o restabelecer o equilíbrio hidroeletrolítico do paciente com a administração de solução com concentrações diferentes de sais.

A busca por novas drogas antivirais tem se tornado freqüente e nos últimos anos houve grandes avanços na química orgânica sintética. Apesar dos avanços conseguidos com os produtos sintéticos, a medicina natural ainda constitui um amplo campo de pesquisas e o Brasil, neste sentido, apresenta uma extensa diversidade biológica como principal fonte para o desenvolvimento de substâncias bioativas.

A pesquisa por substâncias provenientes de plantas está baseada na identificação dos metabólitos secundários. Como fonte de produtos naturais as florestas brasileiras detém grande biodiversidade, sendo que muitas espécies de plantas ainda permanecem química e farmacologicamente desconhecidas.

O arsenal quimioterápico descrito para infecções virais consiste em aproximadamente 40 fármacos antivirais licenciados pelas autoridades governamentais. Cerca de 20 deles são utilizados para o tratamento da infecção pelo HIV. Os demais antivirais são utilizados contra os vírus das hepatites B e C, vírus influenza, vírus respiratório sincicial, vírus herpéticos, incluindo neste último

grupo o vírus da varicela zoster, o citomegalovírus e os vírus herpes simplex (DE CLERCQ, 2005).

A descoberta de novos compostos biologicamente ativos representa um avanço da medicina moderna e constitui uma alternativa aos tratamentos convencionais, desde estes compostos sejam devidamente elucidados.

**JUSTIFICATIVA**

---

Os rotavírus do grupo A são os maiores causadores de gastroenterites em crianças em todo o mundo. (GOUVEIA *et al*, 1994; TAVARES *et al*, 2008). Estima-se que cerca de 130 milhões de casos de diarreia com origem etiológica por rotavírus, 600.000 a 800.000 mortes de crianças abaixo de cinco anos de idade e dois milhões de hospitalizações de crianças na faixa etária de zero a quatro anos. Nos países em desenvolvimento aproximadamente 1.200 crianças morrem diariamente de diarreia por rotavírus. (LINHARES, 2000; VRANJAC, 2004; ANDREASI *et al*, 2007).

Buscando reduzir a morbidade e mortalidade, muitos esforços têm sido realizados para prevenir e controlar a diarreia causada por rotavírus. Os fármacos antivirais descritos até o presente momento não têm apresentado benefício clínico evidente. Neste sentido a busca por novas drogas se faz necessário e deve-se investir em pesquisas que sejam aplicáveis e de baixo custo na identificação de novos compostos que possuam atividade antimicrobiana.

Apesar da existência de uma vacina eficiente, a mesma só abrange um sorotipo G1[P8] da cepa RIX4414 e é apenas disponibilizada para crianças na faixa etária de seis a 24 meses. Além disso, em regiões onde a extrema pobreza é prevalente, o acesso à vacina se dá de forma ineficiente. O tratamento para estas infecções é paliativo, buscando apenas reestabelecer o equilíbrio hidroeletrólítico do paciente. Neste sentido, o tratamento e a prevenção das infecções virais ainda são um grande desafio para a indústria farmacêutica. Sendo assim, esta realidade constitui um obstáculo para a redução do número de casos de infecções por rotavírus.

Devido à grande diversidade biológica existente em nosso País, as plantas medicinais aparecem com um grande potencial para a descoberta de novos compostos com possível atividade antiviral.

Com indicação na medicina popular, as folhas e cascas de algumas espécies de *Byrsonima* são utilizadas para o tratamento de disfunções gástricas, infecções cutâneas, picadas de cobra e ainda como antidiarreicos (AMARQUAYE *et al.*, 1994).

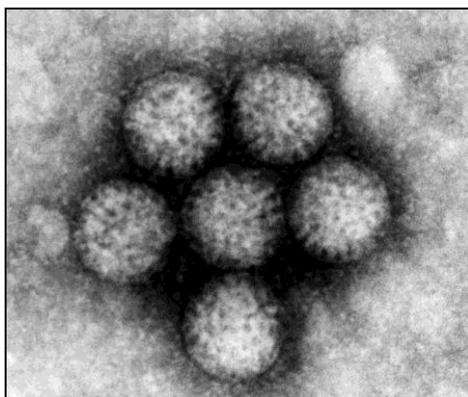
Deste modo, no presente trabalho, buscou-se estudar a potencial atividade antiviral do extrato bruto e fracionado “*in vitro*” da planta medicinal *Byrsonima verbascifolia* contra rotavírus.



### 3.1 Propriedades gerais do rotavírus

Apesar da magnitude do problema causado por diarreia infantil, a busca por importantes agentes etiológicos causadores das doenças diarreicas (enterais) – bactérias, vírus ou parasitas – foi evidenciada apenas em 1970 (ESTES & KAPIKIAN, 2007).

Os rotavírus foram identificados pela primeira vez por Bishop e colaboradores em 1973, na Austrália. Naquela época os quadros de diarreia aguda eram freqüentes, entretanto seu agente causador ainda era desconhecido. O grupo de pesquisas de Bishop analisou biópsias de tecido do duodeno e do intestino delgado de crianças com diarreia e, com o auxílio da microscopia eletrônica, encontrou partículas de vírus com formato circular nas células epiteliais da parede do intestino (GLASS, 2006). Estes patógenos, após vários estudos, foram denominados *Rotavirus*, em alusão ao aspecto radiado que este vírus apresenta (FIG 1) (LINHARES; ARAÚJO; JUSTINO, 2005).

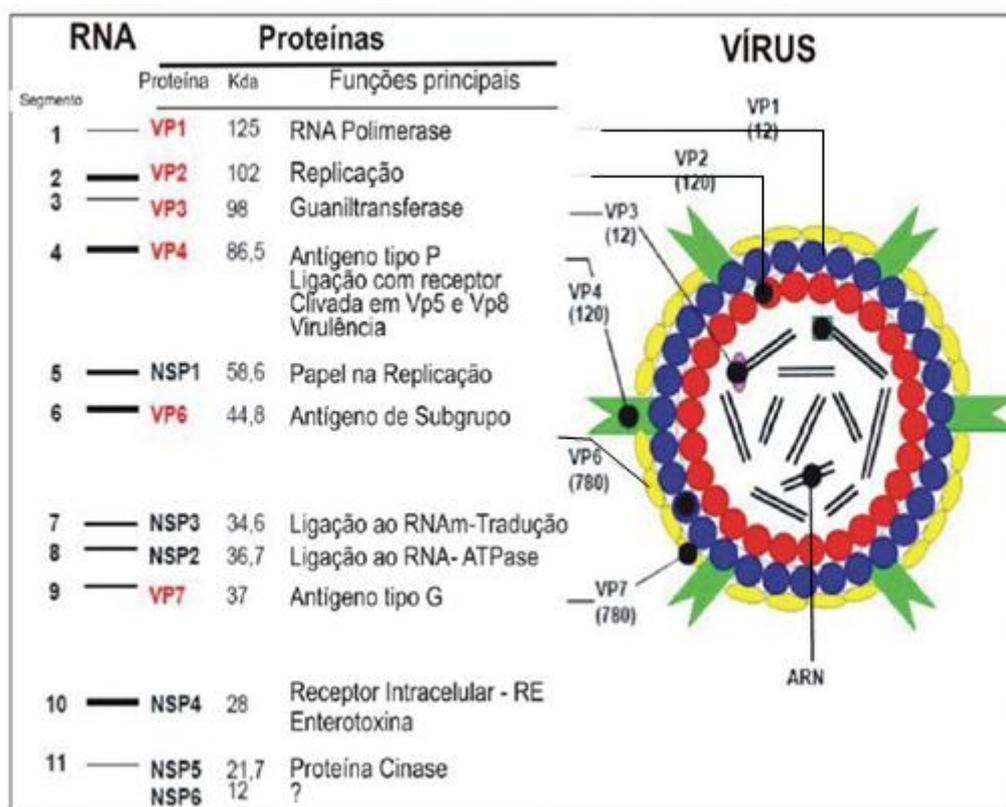


**FIG 1:** Microscopia eletrônica de rotavírus, visualizados em amostras fecais de crianças com diarreia.  
Fonte: UNIVERSITY OF LIVERPOOL, 2011.

No Brasil, os primeiros achados datam de 1976, através de um estudo-piloto conduzido em Belém, no Estado do Pará, envolvendo 25 crianças sob atendimento ambulatorial ou hospitalizadas, com quadro diarreico agudo. Com o uso da microscopia eletrônica e, subsequentemente, do ensaio imunoenzimático, foi

possível a detecção dos rotavírus em amostras fecais de quatro (16%) pacientes (LINHARES, 2000).

Os rotavírus são vírus não envelopados, pertencem à família *Reoviridae* e seu genoma consiste de 11 segmentos de RNA fita dupla que codificam seis proteínas estruturais (VP1-VP4, VP6 e VP7) e seis proteínas não-estruturais (NSP1-NSP6) totalizando 18.550 pares de base (pb) (FIG 2). Tal genoma é envolvido por três camadas protéicas concêntricas, formando assim um capsídio de morfologia icosaédrica, medindo cerca de 75 – 100nm (LEE *et al*, 2000; FERNANDES *et al*, 2000; VRANJAC, 2004; LUZ *et al*, 2005; ANDREASI, 2007).



**FIG 2:** Representação esquemática da partícula de Rotavírus e seus segmentos de RNA, com os respectivos produtos. Fonte: Lima, 2007.

A partícula viral madura possui uma tripla camada proteica concêntrica; a camada interna denominada de núcleo é composta pela proteína VP1, VP2 e VP3 a qual envolve o material genético (BENATI *et al*, 2010). A proteína VP6 forma a camada intermediária, sendo ela a determinante de grupo (A-G) e subgrupos e

atualmente são conhecidos quatro subgrupos (I, II, I e II, não I e não II) (KANG *et al*, 2004). A camada externa é formada pelas proteínas VP4, que determina o tipo P (de sensível a Protease) e pela VP7, que determina o tipo G (G de Glicoproteína) (LEE *et al*, 2000; MUNFORD *et al*, 2007; ZUCOTTI *et al*, 2010).

Sabe-se que a VP4 sob a ação da tripsina pancreática é clivada em duas novas proteínas estruturais, a VP5 e a VP8, as quais estão envolvidas diretamente no processo de multiplicação viral (VRANJAC, 2004; LINHARES; ARAÚJO; JUSTINO, 2005; MAGALHÃES, 2007; MACEDO, 2007, ANDREASI, 2007; ESTES & KAPIKIAN, 2007).

Além das proteínas estruturais o genoma do rotavírus codifica outras seis proteínas não-estruturais (NSP). Destas, cinco estão envolvidas na replicação viral (NSP1, NSP2, NSP3, NSP5 e NSP6) e uma (NSP4) na morfogênese e virulência viral (ESTES, 2001).

Baseado na diversidade antigênica e genética, até o presente momento 19 tipos G e 28 tipos P já foram identificados provenientes de amostras de rotavírus de origem humana e animal (CHANDRAN, 2010).

O principal sítio de multiplicação do rotavírus é o intestino delgado, mais precisamente o jejuno. A ligação dos rotavírus é mediada pela VP4, que é clivada pela ação da tripsina pancreática em VP5 e VP8. A VP5 – ácido-siálico independente – interage na ligação com enterócitos humanos. A penetração na célula é mediada por VP4 e VP7 e pode acontecer diretamente, através da membrana celular ou por endocitose (COSTA *et al*, 2005).

Após a internalização, o vírion é transportado ao lisossomo onde ocorre a perda do seu revestimento externo através da ação de enzimas lisossomais. Em seguida, ocorre a ativação da transcriptase viral, produzindo os RNA mensageiros (RNAs). As proteínas codificadas pelo genoma viral são sintetizadas em ribossomos livres, à exceção de VP7 e NSP4, que são sintetizadas em ribossomos ligados ao retículo endoplasmático rugoso (RER) (COSTA *et al*, 2005; ESTES & KAPIKIAN, 2007).

A montagem das partículas de duplo capsídeo (núcleo viral e VP6) parece ocorrer em estruturas eletrodensas perinucleares denominadas viroplasmas. Essas partículas atravessam para o interior do retículo endoplasmático (RE) por ação da NSP4, que atua como um receptor interno. A maturação final das partículas virais

ocorre no interior do RE, na dependência de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , sendo transitoriamente envelopadas. Finalmente, as partículas recebem o capsídeo externo (VP4 e VP7). Quando liberadas após a lise celular, infectam outros enterócitos (RAMIG, 1997; ESTES, 2001; JAYARAM *et al.*, 2004; BALL *et al.*, 2005).

### **3.2 Aspectos gerais da doença**

O rotavírus humano é transmitido principalmente de pessoa a pessoa pela rota fecal-oral, ou por contato direto, mas ocasionalmente pode ser transmitido através de perdigotos (DOORN *et al.*, 2009).

Com a estabilidade deste vírus no ambiente, a sua transmissão pode ocorrer pela ingestão de água e alimentos contaminados e através do contato com objetos e superfícies contaminados. A infecção cruzada através da contaminação das mãos é provavelmente a via de transmissão mais comum em serviços de saúde (FESTINI *et al.*, 2010). Especula-se que haja transmissão por secreções respiratórias, com a formação de aerossóis, mecanismo este que permite a disseminação explosiva da doença e contribui para a ocorrência de epidemias (VRANJAC, 2004; CARMO, 2006).

Infecções por rotavírus produzem um amplo espectro de respostas clínicas, variando desde infecções subclínicas, diarreia leve ou até uma doença severa e potencialmente fatal (ESTES & KAPIKIAN, 2007).

Antes da infecção se instalar, há um curto período de incubação que pode variar de um a três dias. A doença é caracterizada por vômito, diarreia aquosa, desidratação, febre e dor abdominal, sendo a desidratação e o desequilíbrio hidroeletrólítico os principais fatores que podem contribuir para levar o indivíduo a óbito (SOARES, 2006). Em contraste com a gravidade da doença encontrada em crianças, a maioria dos adultos estão protegidos devido a uma prévia infecção por rotavírus, neste caso as manifestações clínicas são leves ou assintomáticas (DOORN *et al.*, 2009). Segundo Festini e colaboradores (2010) podem aparecer ainda sintomas inespecíficos como dores de cabeça, náuseas e fadiga. Isso dificulta a identificação da etiologia das diarreias, podendo acarretar a administração de

medicamentos que não sejam indicados para o tratamento dessa enfermidade. Sendo assim, o acesso ao tratamento de forma ineficiente ou até mesmo errônea pode gerar complicações que culminem no óbito do paciente.

A diarreia usualmente persiste por três a oito dias, com emissão "em jato" de fezes com aspecto gorduroso, coloração amarelo-esverdeada e odor característico. A excreção viral precede o início da doença propriamente dita e alcança um pico entre 72 e 96 horas subseqüentes à emergência dos sintomas, bem como transcende a sua resolução clínica persistindo ao longo de oito a dez dias. Em alguns países, as condições sócio-demográficas, biológicas e culturais podem interferir na evolução e manifestação da doença (VASCONCELOS & FILHO, 2008).

Na maioria dos laboratórios, o diagnóstico de rotina para rotavírus é baseado na detecção do antígeno do grupo A presente nas fezes, geralmente por aglutinação em látex ou pelo ensaio imunoenzimático (EIA). Durante os episódios de diarreia os rotavírus podem ser detectados por até uma semana após a infecção e em pacientes imunocomprometidos por longos períodos (KANG *et al*, 2004; DOORN, 2009).

Com o avanço das técnicas de biologia molecular e a disponibilidade de dados da sequência nucleotídica de vários sorotipos de rotavírus, foram desenvolvidos ensaios moleculares de Transcrição Reversa (RT) seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) empregando-se iniciadores específicos, que é cerca de 100.000 vezes mais sensível que o método eletroforético padrão e 5.000 vezes mais sensível que a técnica de hibridização, auxiliando na genotipagem e sorotipagem das amostras em questão. Essas técnicas de genotipagem têm gerado importantes informações sobre a epidemiologia molecular dos rotavírus (GOUVEA *et al*, 1990; GENTSCH *et al*, 1992; COSTA, 2004; VRANJAC, 2004; ESTES & KAPIKIAN, 2007).

O tratamento é o mesmo administrado para as doenças diarreicas agudas, sendo que seu principal objetivo é restabelecer os fluídos e eletrólitos perdidos na diarreia e vômito. Várias combinações da solução de sais para reidratação oral (ORS) têm mostrado serem efetivas para o tratamento de desidratação causada por diarreia, com pequenas variações em sua eficácia (LINHARES; ARAÚJO; JUSTINO, 2005; ESTES & KAPIKIAN, 2007).

Em relação as medidas de prevenção e controle, o Programa Nacional de Imunização do Ministério da Saúde atualmente oferece a única estratégia efetiva e viável, que é uma nova vacina, disponibilizada de forma ampla e contínua para todas as regiões do país, desde janeiro de 2006 (ARAÚJO *et al*, 2010).

A vacina é denominada Vacina Oral de Rotavírus Humano (VORH), licenciada no mercado internacional como Rotarix® e desenvolvida pela *GlaxoSmithKline® Biologicals (GSK)*, Rixensart, Bélgica. A mesma é elaborada com vírus isolados de humanos e atenuados para manter a capacidade imunogênica, porém não patogênica. A vacina é monovalente, ou seja, a cepa utilizada possui apenas um sorotipo em sua composição que é o G1[P8] da cepa RIX4414 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Cada dose de VORH reconstituída contém: cepa RIX4414 derivada da dose infecciosa mediana de cultura celular (CCID50) de  $10^{6,0}$  da cepa da vacina 89-12 RHA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Essa vacina é administrada de forma oral e direcionada a uma população de menores de seis meses de idade, visando proteger antecipadamente crianças da faixa etária de seis a 24 meses, nas quais se observa maior quadro de complicações das infecções causadas por rotavírus (VRANJAC, 2006). Sabe-se também que medidas de saneamento básico e higiene são importantes para controlar a disseminação da doença.

### **3.3 Uso de plantas medicinais como antivirais**

As plantas medicinais são frequentemente utilizadas em regiões onde o acesso aos serviços de saúde se dá de forma precária ou inexistente, e sua seleção e uso dependem da sintomatologia, da disponibilidade das espécies na região e dos aspectos culturais e educacionais. O entendimento do saber popular sobre o uso dessas plantas auxilia no direcionamento científico na busca e desenvolvimento de novos fitoterápicos (ARAÚJO, 2008).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 80% da população de reduzido poder aquisitivo não tem acesso à medicina moderna e

medicamentos essenciais, recorrendo aos produtos naturais como única fonte terapêutica (DI STASI, 1996).

Dentro deste propósito, os estudos nessa área vêm apresentando grandes perspectivas e contribuições no desenvolvimento da farmacologia, na descoberta de novos produtos, no uso de técnicas menos onerosas, com maior rapidez e segurança na busca de compostos bioativos. O uso de plantas indicadas pela medicina popular com ação antiinflamatória, antidiabética, antimicrobiana, entre outras, favorece a descoberta de princípios ativos, uma vez que as chances de se encontrar substâncias de atividade relevante dentro destas é maior que se selecionadas aleatoriamente dentro da diversidade total de plantas existentes (ARAÚJO, 2008).

As pesquisas científicas têm como base a comprovação da identidade botânica, composição química das drogas vegetais, obtenção, identificação e análise de princípios ativos, bem como a determinação da ação farmacológica e propriedades tóxicas (DEVIIENNE; RADDI; POZETTI, 2004).

Acredita-se que 70% dos medicamentos derivados a partir de plantas foram desenvolvidos com base no conhecimento popular (GARCIA *et al*, 2002).

Alguns exemplos de fármacos obtidos a partir de plantas são a digoxina da *Digitalis* spp., a quinina e quinidina obtidas da *Cinchona* spp, vincristina e vinblastina oriundas da *Catharanthus roseus*, atropina oriunda de *Atropa belladonna* e a morfina e codeína proveniente de *Papaver somniferum* (RATES, 2001).

Sabe-se que fármacos antivirais derivados de plantas podem atuar nas diversas etapas da multiplicação viral, desde a adsorção do vírus na célula hospedeira até sua liberação, o que pode resultar em mecanismos de ação complementares à administração dos medicamentos convencionais existentes (VLIETINCK; DE BRUYNE; VANDEN BERGHE, 1997; HUDSON & TOWERS, 1999).

Brandão *et al* (2010) verificaram a atividade antiviral do extrato de partes aéreas de *Polygonum spectabile* Mart. contra *Dengue vírus 2* (DENV-2), *Vaccinia virus* (VACV-WR) e *Herpes virus 1* (HHV-1).

Palomino *et al* (2002) avaliaram a capacidade de 14 espécies de plantas medicinais da América do Sul de inibir *in vitro* o vírus da imunodeficiência humana (HIV), sendo que o extrato de *Baccharis trinervis* apresentou potencial atividade anti-HIV.

Barrio e Parra (2000) investigaram a atividade antiviral do extrato aquoso das folhas de *Phyllanthus orbicularis* sobre o *Herpes virus* bovino tipo I e o *Herpes virus Simplex* tipo 2. Resultados satisfatórios com uma planta do mesmo gênero, *Phyllanthus amarus*, foram obtidos sobre o HIV (NOTKA *et al.*, 2004).

A utilização de plantas medicinais nos programas de atenção primária a saúde pode-se constituir uma alternativa terapêutica muito útil, devido à relativa facilidade de aquisição das plantas e à sua eficácia associada ao baixo custo operacional. Entretanto, seu uso deve ser realizado mediante acompanhamento. Portanto, se faz necessário esclarecer a população a respeito de alguns pontos essenciais para o uso racional das plantas medicinais, correlacionando o conhecimento popular com o científico, para que seja indicada a terapêutica a ser empregada (TÔRRES *et al.*, 2005).

### **3.4 Família *Malpighiaceae*, *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.**

A família botânica *Malpighiaceae* compreende cerca de 63 gêneros e 1250 espécies, de ampla distribuição nas regiões tropicais, especialmente nas Américas. É representada por plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas, ou mais frequentemente trepadeiras com folhas inteiras, de disposição alterna, sem estípulas. Os gêneros mais importantes da América meridional são *Malpighia* e *Byrsonima* (JOLY, 2002).

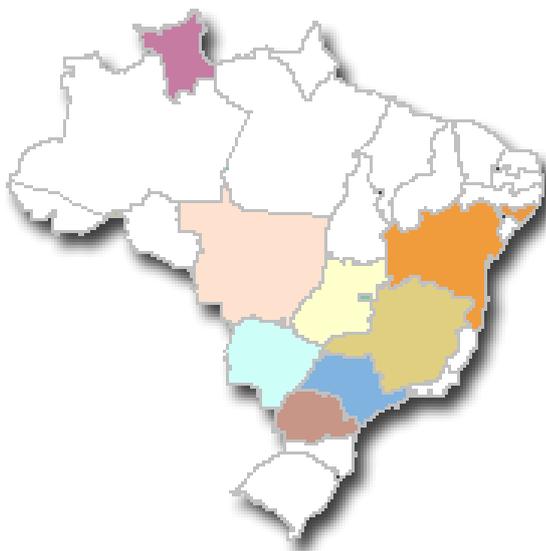
Várias espécies pertencentes ao gênero *Byrsonima* ocorrem no nordeste brasileiro, sendo algumas delas intensamente consumidas na forma de sucos, licores, geléias e doces. Espécies deste gênero são comumente utilizadas como anti-asmáticas e febris e no tratamento de infecções cutâneas (CACERES *et al.*, 1993).

*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss é popularmente conhecida como murici (FIG 3). Trata-se de uma espécie arbórea (4-6 m), podendo, entretanto se apresentar como simples arbusto de 1m de altura nos campos cerrados na região Amazônica (LORENZI, 2002).



**FIG 3:** *Byrsonima verbascifolia*, popularmente conhecida como Murici. Fonte: LORENZI, 2002.

Apresenta distribuição (FIG 4) no Brasil Central e Região amazônica, em cerrados, cerradões e campos cerrados. É particularmente frequente no Triângulo Mineiro (LORENZI, 2002).



**FIG 4:** Mapa do Brasil com a área de ocorrência de *Byrsonima verbascifolia*. Fonte: MAMEDE, 2010.

Sua casca é rica em tanino, com teor de 15 a 20% e é muito utilizada como cicatrizante, anti-inflamatório e antitérmico, devido a sua elevada adstringência (RODRIGUES & CARVALHO, 2001). O chá da casca do caule possui atividade adstringente nas diarreias e disenterias. Além do uso da medicina popular, existe o extrativismo dos frutos de *Byrsonima verbascifolia* que é de grande importância para a alimentação do sertanejo, bem como fonte de renda para suas famílias (GUSMÃO *et al.*, 2006). Apesar de sua importância econômica, esta planta é pouco estudada, principalmente, em relação ao seu comportamento fisiológico e químico diante de variações no ambiente físico em que se desenvolve (CASTRO *et al.*, 2005).

Até o momento, poucas espécies do gênero *Byrsonima* foram estudadas quimicamente. Gottlieb *et al.* (1975) isolaram triterpenos do tronco de *B. verbascifolia*. As folhas de *B. microphylla* forneceram triterpenos esterificados com ácidos graxos, ácidos triterpênicos, quercetina e galato de metila (MENDES *et al.*, 1999). Vários estudos relatam a química de *B. crassifolia*, da qual foram isolados compostos voláteis dos frutos, glicolipídeos, triterpenos, ácidos triterpênicos, catequinas, e flavonóides das folhas (AMARQUAYE *et al.*, 1994; RASTRELLI *et al.*, 1997) e do tronco proantocianidinas e taninos (GEISS *et al.*, 1995). Sannomiya *et al.* (2004) mostraram o isolamento de amentoflavo, quercetina-3-O- $\beta$ -Dgalactopiranosídeo e quercetina-3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosídeo das folhas de *B. crassa*.

**OBJETIVOS**

---

#### **4.1 Objetivo geral**

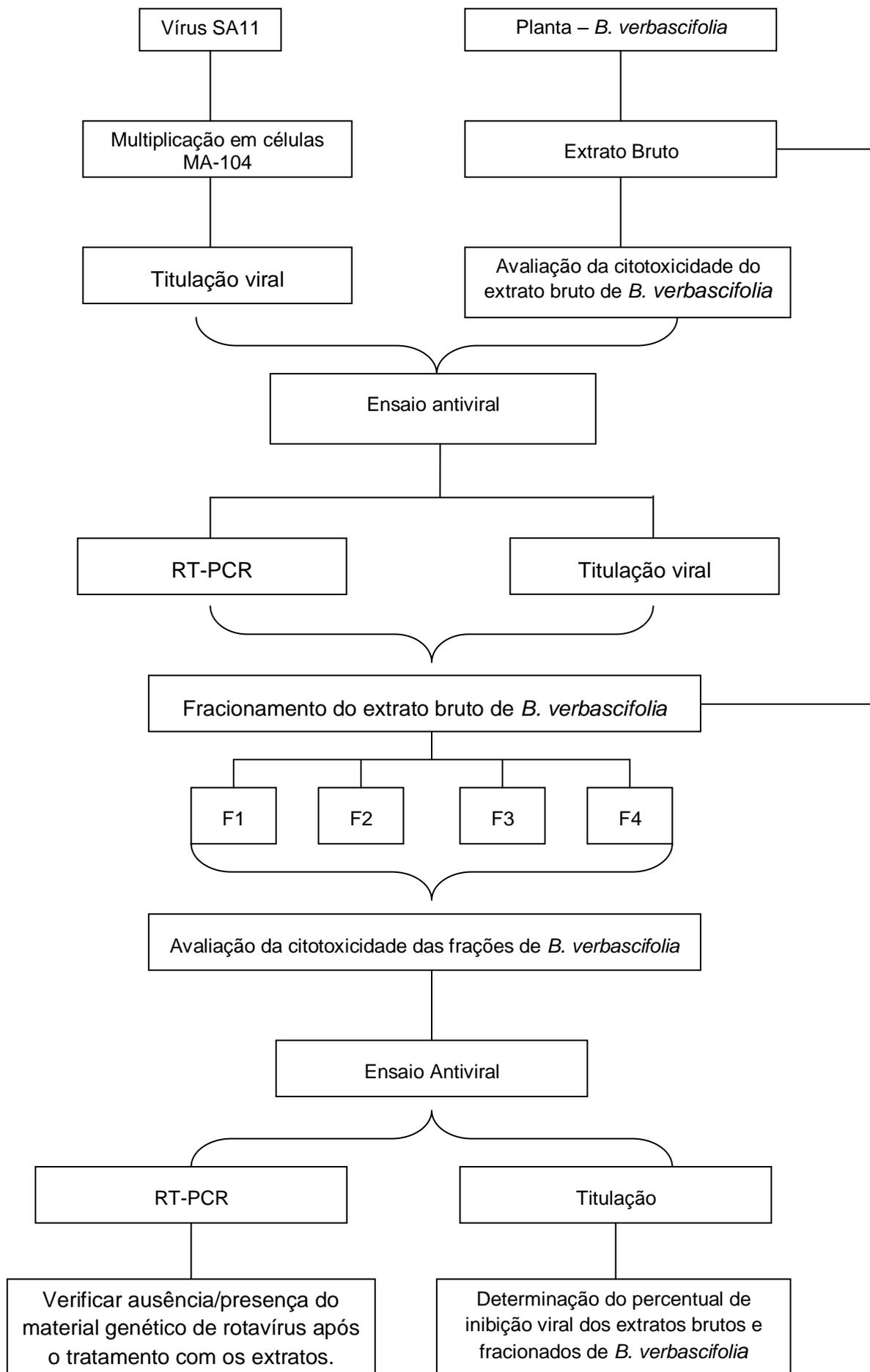
Estudar “*in vitro*” a atividade dos extratos bruto e fracionado de *Byrsonima verbascifolia* contra rotavírus.

#### **4.2 Objetivos específicos**

- Realizar o teste de citotoxicidade morfológica para identificar a máxima concentração não citotóxica dos extratos bruto e fracionados frente às células MA-104;
- Realizar o ensaio antiviral para verificar a potencial atividade antiviral de *B. verbascifolia* contra rotavírus.



## 5.1 Delineamento experimental



## 5.2 Vírus

Neste trabalho utilizou-se a amostra padrão SA-11 de rotavírus cedida pelo Instituto Evandro Chagas, Centro Nacional de Referência para rotavírus, do Estado do Pará. A amostra de referência encontra-se armazenada em freezer – 70 °C.

## 5.3 Cultivo de células

No presente trabalho, foram utilizadas células da linhagem MA-104 (célula epitelial do rim de *Macaca mulata*) cultivadas em Meio Eagle modificado por Dulbecco, Gibco® (DMEM), com 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina (Invitrogen®) e 10% de soro fetal bovino, Laborclin (SFB) em garrafas de 25cm<sup>2</sup>, sendo mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Os repiques foram realizados quando a monocamada apresentava-se fechada. O meio de cultivo foi desprezado e a monocamada lavadas duas vezes com 2 mL de tampão fosfato salina – PBS - (NaCl 0,13 M; KCL 0,002 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,007 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,001 M) e posteriormente foram adicionados 700 µL de solução de Tripsina, Invitrogen® (0,25%) – EDTA, Invitrogen® (Ácido etilenodiamino tetraacético - 0,025%), seguido de incubação por 10 minutos em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> para desprendimento das células do fundo da garrafa. Após este procedimento as células foram homogeneizadas com 2 mL de meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (meio suplementado) e distribuídas em duas novas garrafas de 25cm<sup>2</sup> contendo cada uma 4mL de meio suplementado.

## 5.4 Espécies vegetais selecionadas para o ensaio antiviral

Em um primeiro momento, para a seleção das espécies vegetais foi realizado um levantamento bibliográfico levando-se em consideração critérios

etnofarmacobotânicos e o uso das plantas na medicina popular para tratamento de diarreias e gastroenterites. Inicialmente trabalhou-se com 20 espécies vegetais, selecionadas de acordo com os critérios descritos acima.

As espécies vegetais que foram escolhidas para o trabalho são provenientes do cerrado brasileiro e foram devidamente selecionadas, coletadas, identificadas e os seus extratos preparados pelo Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica, Divisão de Ciências Farmacêuticas, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). O material vegetal foi colocado em exsiccatas para deposição em herbário na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Estudos anteriores realizados no Laboratório de Virologia Molecular, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da FUNED trabalharam com os extratos brutos obtidos a partir das folhas ou cascas das plantas selecionadas submetendo-os ao ensaio de atividade antiviral contra rotavírus. O extrato bruto foi preparado por percolação com etanol, até o esgotamento total. A solução etanólica foi evaporada à temperatura de 40°C em evaporador rotatório, sob pressão reduzida. O extrato foi mantido em dessecador, sob vácuo, para a eliminação total do etanol.

Após a identificação da atividade antiviral contra rotavírus, o extrato foi fracionado de acordo com metodologias específicas, obtendo-se quatro frações, testadas em ensaio antiviral neste trabalho.

O extrato bruto e as frações foram caracterizados fitoquimicamente visando a avaliação da presença de metabólitos secundários e a possível identificação da substância ativa responsável pela ação antiviral observada anteriormente. Todos os extratos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se uma concentração final de 50mg/mL.

## **5.5 Multiplicação viral**

A multiplicação viral foi realizada com o intuito de se obter um estoque do vírus e uma quantidade ideal de carga viral para ser utilizada nos ensaios.

Uma alíquota de 75µL da amostra viral de referência foi diluída na proporção 1:1 com meio DMEM sem SFB contendo 20µg/mL de tripsina (meio de ativação) e incubada por 1 hora em banho-maria a 37°C, para prévia ativação do vírus.

A inoculação viral foi realizada em garrafas de cultura celular com 25cm<sup>2</sup> de área, contendo células MA-104 com cerca de 80% de confluência e 5mL de meio DMEM não suplementado e 10µg/mL de tripsina (meio de incubação), sendo mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi recolhido após 48 horas de inoculação e armazenada em alíquotas de 100µL em freezer a -70°C.

## 5.6 Titulação viral

O título viral foi estimado em TCID<sub>50</sub> (*Tissue Culture Infectious Dose*<sub>50</sub>) conforme descrito por Reed & Muench (1938), ou seja, a diluição da amostra viral em que cinquenta por cento das células presentes nos poços demonstram efeito citopático.

Para a titulação viral, uma alíquota de 100µL da amostra viral recolhida na passagem (previamente ativada) foi diluída seriadamente (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>), em meio DMEM não suplementado e 10µg/mL de tripsina. Uma placa de 96 poços foi preparada com 4 x 10<sup>4</sup> células MA-104 por poço. Foram inoculados 100µL de cada diluição, sendo um total de oito poços por diluição. À placa foram adicionados controle positivo (célula e vírus não diluído) e controle negativo, onde era utilizado apenas meio DMEM não suplementado e 10µg/mL de tripsina sobre as células. A placa foi incubada por 48 horas em estufa a 37°C com de 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final deste período, as células foram examinadas em microscópio óptico invertido para determinação do título viral.

## **5.7 Avaliação da citotoxicidade do extrato vegetal bruto e fracionados frente às células MA-104**

Para a realização da avaliação de citotoxicidade foram realizadas diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  do extrato bruto e suas frações com concentração inicial de 50mg/mL e inoculadas em placas de 12 poços com  $2,8 \times 10^5$  células MA-104/por poço. Após a incubação destas placas, por 48 horas em estufa a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub>, foi realizada a análise morfológica das células, em microscópio óptico invertido. Observou-se se houve desprendimento da monocamada, presença de inclusões celulares, células disformes, dentre outros aspectos. Todas as diluições que apresentaram esses aspectos foram consideradas citotóxicas e não foram selecionadas para uso no ensaio antiviral.

## **5.8 Ensaio antiviral**

Para o ensaio antiviral utilizou-se uma placa de 96 poços preparada com  $4 \times 10^4$  / células MA-104 por poço. Posteriormente, foram adicionados 100µL da amostra viral contendo 20 TCID<sub>50</sub> e 100µL das diluições do extrato bruto e frações do extrato vegetal com a máxima concentração não citotóxica (MCNT). Foram feitos controle negativo (células contendo meio sem extrato e sem vírus) e controle positivo (células com meio e vírus), sendo a placa incubada por 48 horas em estufa a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub>, para posterior análise. Após a incubação o material foi recolhido para posterior realização de RT-PCR e titulação.

Os resultados dos ensaios foram expressos em percentual de inibição (PI) utilizando o valor do antilogaritmo de TCID<sub>50</sub> :  $PI = (1 - \text{antilog}T / \text{antilog}C) \times 100$ , onde T corresponde ao título viral das células tratadas com os extratos e C é o título viral das células não-tratadas (controle positivo), de acordo com Nishimura *et al*, 1977.

## 5.9 Obtenção do RNA viral

Para a obtenção do RNA viral foi utilizado o método de extração por sílica, de acordo com BOOM *et al*, 1990.

Em tubos para microcentrífuga de 1,5 mL previamente siliconizados foram adicionados 200µL de solução de lise (isotiocianato de guanidina, Invitrogen® 0,507M, 50mL de TRIS, Invitrogen® 0,1M pH 6,4, 11mL de EDTA 0,2M pH 8,0, 1,3mL de etilfenil-polietileno glicol) e 50µL de sílica. Em seguida, para cada tudo foram adicionadas 60µL do material recolhido no ensaio antiviral. Os tubos foram homogeneizados em agitador de tubos e deixados em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, após nova homogeneização, os tubos foram centrifugados em rotação de 16000 x g por 30 segundos, o sobrenadante de cada tubo descartado e o precipitado lavado com 200 µL de solução de lavagem (isotiocianato de guanidina 0,507M, 50mL de TRIS 0,1 M pH 6,4). Os tubos foram homogeneizados e centrifugados em rotação de 16000 x g por 30 segundos, repetiu-se este passo. Em seguida, o precipitado foi lavado com 500µL de solução de etanol 70%, conforme descrito acima. O precipitado então foi lavado com 500µL de acetona. Após a última lavagem, as amostras foram centrifugadas por 30 segundos em rotação de 16000 x g, os sobrenadantes descartados e os tubos com precipitado deixados secar à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos. Após a secagem, foram adicionados 50 µL de água contendo 1 % de dietilpirocarbonato (DEPC) em cada tudo e os mesmos foram incubados em banho-maria à 56 °C durante 10 minutos. Após esse tempo os tubos foram centrifugados a 16000 x g durante 2 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado em tubos de microcentrífuga de 0,2 mL a -70°C.

## 5.10 Obtenção do cDNA

Para a obtenção do cDNA, alíquotas de 7 µL dos RNAs extraídos foram adicionados aos iniciadores (2 µL do oligonucleotídeo iniciador reverso Rota A-rev1

e 2 µL do oligonucleotídeo senso Rota A-fwd1, descritos por LOGAN; O' LEARY; O' SULLIVAN, 2006 (TABELA 1) para a região de VP6 e a 2µL de DMSO em tubo de microcentrífuga de 0,2 mL sendo aquecido a 95 °C durante 10 minutos, seguido de incubação a 4 °C durante 5 minutos. Após esse procedimento, foram adicionados à cada reação: 4 µL de tampão de reação, 2,4 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de dNTP e 1 µL da enzima *Transcriptase Reversa* (Improm II, Promega). Após 5 minutos a 25 °C, as reações foram incubadas em termociclador à 42 °C durante 60 minutos e posteriormente 70 °C durante 15 minutos. Os cDNAs obtidos foram estocados a – 20°C.

**TABELA 1**  
**Iniciadores para a região de VP6 utilizados na RT-PCR, descritos por LOGAN; O'LEARY; O'SULLIVAN (2006).**

<b>Primer</b>	<b>Posição</b>	<b>Tamanho</b>
Rota A- Fwd 1: 5' GGATGTCCTGTACTCCTTGTC AAAA 3'	<b>26-50</b>	<b>144pb</b>
Rota A- Rev 1: 5' TCCAGTTTGGA ACTCATT TCCA 3'	<b>170-149</b>	

### **5.11 Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Para a amplificação do fragmento do genoma do rotavírus, 25 pmol de cada oligonucleotídeo (iniciador senso e anti-senso) descritos anteriormente foram adicionados a reação “PCR Supermix” (Invitrogen®, Califórnia, EUA) contendo 32 mM TRIS-Cl (pH 8,4), 55 mM KCl, 1,65mM MgCl<sub>2</sub>, 220 mM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP), 2,2 U de *Taq DNA Polimerase* e 5 µL do cDNA resultando em um volume final para cada reação de 32,5 µL.

A reação foi incubada em termociclador, com um período de aquecimento de 10 minutos a 95 °C, seguidos de 30 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C e 1 minuto a 72 °C. A PCR foi utilizada para a detecção da presença ou ausência do material genético de rotavírus nas amostras submetidas ao ensaio antiviral.

Os amplicons obtidos foram visualizados em gel de poliacrilamida 8 % corado com nitrato de prata.

### **5.12 Titulação viral após aplicação do extrato bruto e frações do extrato vegetal**

As amostras obtidas no ensaio antiviral foram submetidas à titulação conforme descrito no item 5.4. O objetivo deste experimento foi identificar a ausência ou presença de partículas virais viáveis. Além de verificar se houve ou não redução do título viral das amostras consideradas positivas em relação ao título do controle positivo do experimento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

O resultado da titulação viral realizada pelo método TCID<sub>50</sub> demonstrou que a amostra de rotavírus SA 11 possui um título de  $1 \times 10^{6,1}$  TCID<sub>50</sub>/mL.

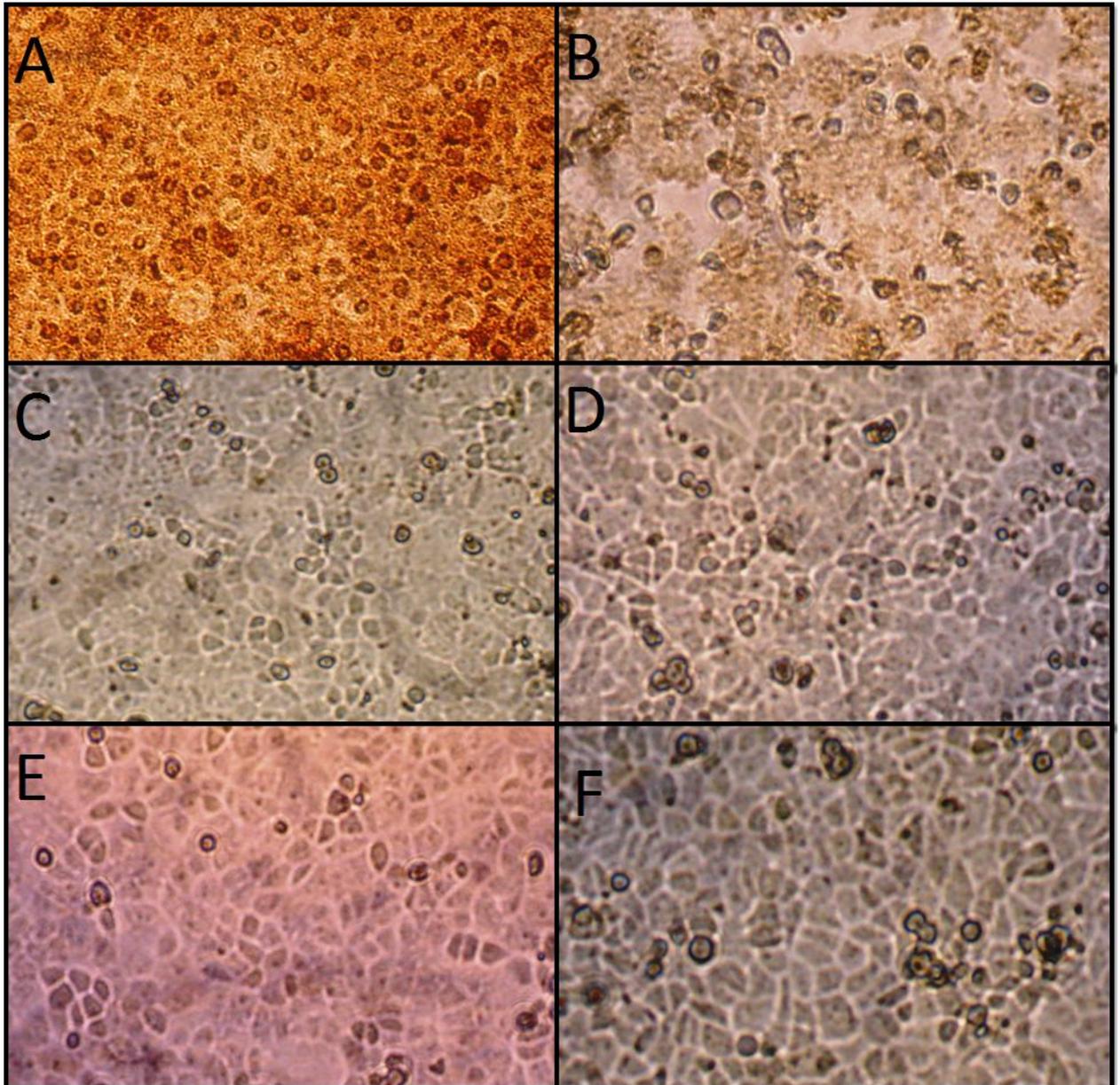
Para a identificação do potencial antiviral de uma substância qualquer, é necessário a avaliação prévia de sua possível toxicidade em relação às células permissivas ao vírus de trabalho, em razão do fato de que um agente antiviral que seja ideal deve inibir o ciclo de replicação viral, interferindo o mínimo na estrutura e metabolismo das células hospedeiras (MÜLLER, 2006).

O estudo do efeito citotóxico dos extratos e suas frações frente a células MA-104 foi realizado utilizando como base as alterações morfológicas presentes nas células tratadas com os extratos. A concentração máxima não citotóxica obtida para o extrato bruto e suas frações foi de 50µg/mL (diluição  $10^{-3}$ ) (Tabela 2). Para as concentrações acima desse valor, foi observada vacuolização do citoplasma, morte e desprendimento do tapete celular. Todas as diluições que apresentaram algum destes efeitos não foram selecionadas para o ensaio antiviral. A figura 5 mostra os resultados do ensaio de citotoxicidade após 48 horas de incubação.

**TABELA 2**  
**Determinação da concentração máxima não citotóxica do extrato bruto e fracionado frente às células MA-104**

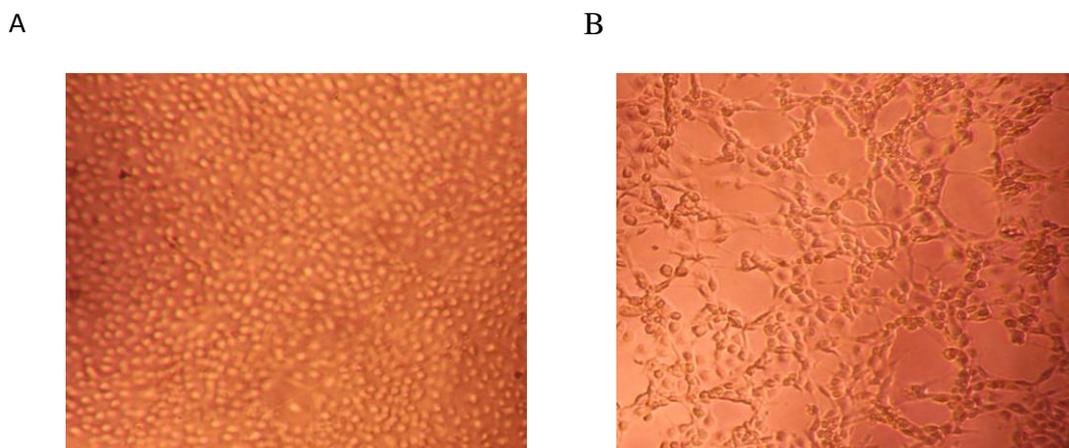
Extratos vegetais	Concentração do extrato (µg/mL)				
	5.000 ( $10^{-1}$ )	500 ( $10^{-2}$ )	50 ( $10^{-3}$ )	5 ( $10^{-4}$ )	0,5 ( $10^{-5}$ )
<b>Extrato bruto</b>					
<i>Byrsonima verbascifolia</i> – AM 04	+	+	-	-	-
<b>Frações</b>					
AM 04 - F1	+	+	-	-	-
AM 04 - F2	+	+	-	-	-
AM 04 - F3	+	+	-	-	-
AM 04 - F4	+	+	-	-	-

(+) presença de citotoxicidade; (-) ausência de citotoxicidade



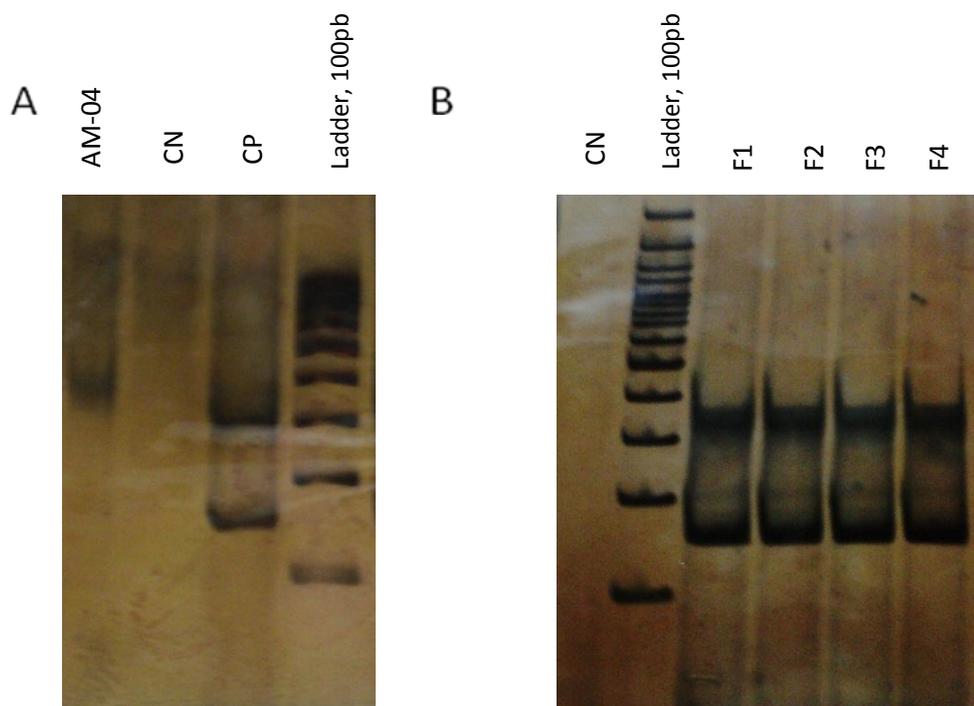
**FIG 5:** Alterações morfológicas observadas nas células MA-104 após realização do ensaio de citotoxicidade com diferentes concentrações da fração 3 de *B. verbascifolia*, após 48 horas. A – Diluição  $10^{-1}$  (5.000  $\mu\text{g/mL}$ ). B – Diluição  $10^{-2}$  (500  $\mu\text{g/mL}$ ). C – Diluição  $10^{-3}$  (50  $\mu\text{g/mL}$ ). D – Diluição  $10^{-4}$  (5  $\mu\text{g/mL}$ ). E – Diluição  $10^{-5}$  (0,5  $\mu\text{g/mL}$ ). F – Controle Negativo.

Em relação à morfologia das células no ensaio antiviral após 48 horas de incubação pode-se verificar a ausência do efeito citopático (ECP) do vírus no extrato bruto. Entretanto observou-se a presença do ECP característico do vírus em todas as frações. O efeito citopático (FIG 6) característico do vírus observado corresponde a uma conformação em rede, caracterizado pela presença de inclusões perinucleares com vacuolização citoplasmática (ESTES, 1979).



**FIG 6:** Efeito citopático observado nas células MA-104 infectadas com a amostra viral SA-11, tratadas com extrato bruto e suas frações, após 48 horas. A – Células tratadas com o extrato bruto: ausência de efeito citopático. B – Células tratadas com as frações: presença do efeito citopático.

Na RT-PCR, verificou-se a ausência do *amplicom* específico de 144pb no material tratado com o extrato bruto. Já nos ensaios utilizando as frações verificou-se a presença do mesmo, conforme apresentado na figura 7.



**FIG 7:** Análise eletroforética do gel de poliacrilamida para presença/ausência do fragmento específico de 144pb, correspondente à amostra de rotavírus, após tratamento com os extratos brutos e fracionados. A – Canaleta 1: Ausência do fragmento específico de rotavírus na célula tratada com o extrato bruto AM-04; Canaleta 2: Controle Negativo (Célula e meio DMEM); Canaleta 3: Controle Positivo (Célula e vírus); Canaleta 4: Ladder, 100pb. B – Canaleta 1: Controle negativo (Célula e meio DMEM); Canaleta 2: Ladder, 100pb; Canaletas 3, 4, 5 e 6: Presença do fragmento específico de rotavírus de 144pb, após tratamento com as frações 1 (F1), 2 (F2), 3 (F3) e 4 (F4), respectivamente.

Após os resultados obtidos pela PCR, as amostras consideradas positivas e negativas para o ensaio antiviral foram submetidas à titulação viral.

O ensaio antiviral realizado com o extrato bruto foi considerado negativo tanto para a PCR quanto para a titulação viral, uma vez que não houve efeito citopático em 50% das células infectadas. Os resultados das frações foi positivo tanto para a PCR, quanto para a titulação.

A atividade antiviral referente aos extratos bruto e fracionados, na máxima concentração não citotóxica e o seu PI (percentual de inibição) estão descritos na tabela 3.

**TABELA 3**

**Percentual de inibição (PI) viral dos extratos brutos e fracionados de *B. verbascifolia* na concentração de 25 µg/mL, testados contra rotavírus.**

<b>Material vegetal testado</b>	<b>Concentração não citotóxica (µg/mL)</b>	<b>PI (%)</b>
<b>Extrato bruto</b>		
<i>Brysonima verbascifolia</i> – AM-04	25	100 %
<b>Frações</b>		
AM 04 - F1	25	69,80 %
AM 04 - F2	25	22,37 %
<b>AM 04 - F3</b>	25	<b>75,45 %</b>
AM 04 - F4	25	15,08 %

O extrato bruto de *B. verbascifolia* apresentou 100 % de inibição viral na concentração de 25µg/mL. Dentre as frações, observou-se redução do título viral acima de 50% em duas delas, a F1 e a F3, correspondendo a uma inibição de 69,8% e 75,45% respectivamente, na mesma concentração.

O fato de nenhuma das frações ter apresentado inibição completa do vírus, pode estar relacionado ao sinergismo presente dentre as substâncias que constituem o extrato bruto. Este fenômeno tem sido demonstrado entre várias combinações de flavonas e flavonóis. Canferol e luteolina mostraram sinergismo contra HHV (*Herpes virus*), sugerindo que estes compostos são mais ativos juntos do que quando estão isolados (AMOROS *et al*, 1992).

As análises farmacognósticas (Tabela 4) foram realizadas pelo Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica para a detecção dos compostos de interesse no extrato bruto e suas frações.

**TABELA 4**  
**Caracterização fitoquímica para presença/ausência de metabólitos secundários dos extratos bruto e fracionados de *B. verbascifolia*\*.**

Extratos	Flavonóides	Taninos	Saponinas	Terpenos
AM-04	+	+	+	+
AM-04 F1	-	-	-	+
AM-04 F2	-	-	-	+
AM-04 F3	+	+	+	+
AM-04 F4	-	+	+	-

(+) presença; (-) ausência

Diversos estudos promovidos por (CARDOSO, 2006; FIGUEIREDO *et al.*, 2005; GIL *et al.*, 2005; MENDANHA *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 1999; REZENDE & FRAGA, 2003; SANNOMIYA *et al.*, 2005) têm revelado que algumas espécies de murici apresentam vários compostos químicos importantes com potencial uso em diferentes áreas.

As folhas e cascas de algumas espécies de *Byrsonima* são popularmente utilizadas para o tratamento de disfunções gástricas, infecções cutâneas, picadas de cobra e ainda como antidiarréicos (AMARQUAYE *et al.*, 1994). No entanto, não há dados sobre a química ou efeitos farmacológicos de extratos das folhas no sistema gastrointestinal (FIGUEIREDO *et al.*, 2005).

Flavonóides, terpenos, taninos e saponinas são metabólitos secundários presente nas plantas e tem atraído a atenção de muitos pesquisadores devido ao amplo espectro de atividades biológicas.

Já foram identificados a presença de amentoflavona, derivados de quercetina e catequinas no extrato metanólico de *Byrsonima crassa*. Estes metabólitos contribuem para a atividade gastroprotetora, além disso estes compostos foram capazes de inibir a peroxidação lipídica e ainda possuem atividade antioxidante (SANNOMIYA *et al.*, 2004).

De acordo com a literatura, alguns flavonóides apresentam atividade antidiarréica como no caso da quercetrina, quercetina e ternatina. Essa atividade dos flavonóides foi observada através de experimentos de diarreia crônica em ratos e

motilidade do trânsito intestinal de camundongos (GALVEZ *et al.*, 1993; GALVEZ *et al.*, 1996; RAO *et al.*, 1997).

Os flavonóides, conhecidos por seus efeitos benéficos na saúde, estão sendo isolados como compostos efetivos. Estudos experimentais *in vitro* têm demonstrado atividades antioxidantes, antiinflamatórias e um amplo espectro de atividades biológicas (antifúngica, antibacteriana, entre outras), para estes compostos (NIJVELD, 2001). Sabe-se que os flavonóides também possuem atividade antiviral e vários mecanismos estão associados a eles, como: inibição da polimerase viral, ligação do ácido nucléico viral ou proteínas do capsídeo viral (CUSHNIE; LAMB, 2005). Dessa forma, a presença de tal substância nos extratos testados indica possíveis vias de atuação para a atividade antiviral encontrada.

Muitas outras substâncias como alcalóides, proteínas, saponinas e taninos já foram encontradas em plantas com potencial antiviral (HUDSON, 1990; GONÇALVES *et al.*, 2005).

Os taninos são substâncias polifenólicas de alto peso molecular e sabor adstringente, encontrados no interior dos vacúolos vegetais. Além de sua larga utilização nas indústrias de curtume, tradicionalmente são também empregados na medicina popular, devido a sua ação adstringente (HASLAM, 1996).

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina popular como remédio para o tratamento de diarreias, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, problemas estomacais, dentre outros. Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas pelo menos em parte a três características principais: 1 – complexação com íons metálicos; 2 – atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e 3 – habilidade de complexar com outras moléculas incluindo macromoléculas como proteínas e polissacarídeos (SIMÕES *et al.*, 2000).

Já foram isolados do gênero *Byrsonima* alguns derivados de flavonóides (*B. verbascifolia*), no entanto, são os triterpenos que representam a classe de substâncias naturais de ocorrência mais freqüente no gênero (CANTRELL *et al.*, 1996).

Em estudos farmacológicos, foram verificadas atividades bactericidas, antifúngicas, espasmogênicas e anti-protozoárias associadas aos triterpenóides (ácido betulínico e lupeol), flavonóides (hiperina), quercetina, sulfonoglicosídeo, esteróides aromáticos, aminoácidos e proantocianinas (FELÍCIO *et al.*, 1995).

A fitoterapia é amplamente utilizada em regiões brasileiras e muitas vezes é a única alternativa de tratamento para pessoas que não possuem acesso à medicina convencional. A utilização destes produtos fitoterápicos, que são economicamente viáveis, mostra-se como uma alternativa para melhorar o acesso da população aos cuidados com a prevenção e o tratamento de inúmeras enfermidades. Entretanto é necessário associar o conhecimento fornecido pela medicina popular aos conhecimentos desenvolvidos pelas pesquisas científicas, a fim de se esclarecer e orientar a população quanto ao uso das plantas medicinais, bem como o perigo do uso indiscriminado das mesmas, principalmente com relação toxicidade que muitas delas apresentam.

**CONCLUSÃO**

---

Considerando os resultados obtidos, pôde-se verificar que o extrato bruto de *Byrsonima verbascifolia* apresenta promissores resultados de proteção contra a infecção viral por rotavírus, entretanto o mecanismo desta ação e a atividade das substâncias isoladas não foi ainda identificado. Mais estudos são necessários para verificar quais compostos podem ser responsáveis por esta atividade e como eles exercem sua ação antiviral.



Novos ensaios serão realizados variando-se as concentrações do extrato bruto em modelos animais visando estabelecer uma possível relação dose-resposta.

O estudo realizado abre novas perspectivas para o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos/fitofármacos nos casos de infecções com rotavírus, sendo uma opção de tratamento de baixo custo, que pode ser viabilizado pelo Sistema Único de Saúde - SUS.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

AMARQUAYE, A.; CHE, C. T.; BEJAR, E.; MALONE, M. H.; FONG, H. H. S. A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. **Planta Med.**, v. 60, n. 1, p. 85-86. 1994.

AMOROS, M. *et al.* Synergistic effect of flavones and flavonol against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **J Nat Prod**, n.55, 1732-40. 1992.

ANDREASI, M. S. A. *et al.* Rotavírus A em crianças de até três anos de idade, hospitalizadas com gastroenterite aguda em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 40, n. 4, p. 411-414. 2007.

ARAUJO, Thiago Antônio de Sousa. 2008. **Taninos e Flavonóides em Plantas Medicinais da Caatinga: Um Estudo de Etnobotânica Quantitativa**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ARAUJO, T. M. E. *et al.* Surto de diarreia por rotavírus no município de Bom Jesus (PI). **Ciênc. Saúde Coletiva**, n. 5, p. 1039-1046. 2010.

BALL, J. M. *et al.* Rotavirus NSP4: a multifunctional viral enterotoxin. **Viral Immunol.**, v.18, n.1, p.27-40. 2005.

BARRIO, G. D; PARRA, F. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. **J. Ethnopharmacol**, v. 72, n. 1-2, p. 317-322. 2000.

BOOM, R. *et al.* Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. **J. Clin. Microbiol**, v. 28, n. 3, p. 495-503. 1990.

BRANDÃO, G. C. *et al.* Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of extracts and constituents from *Polygonum spectabile* Mart. **Phytomedicine**, n. 17, p.926-929. 2010.

CACERES, A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory-diseases .2. Evaluation of activity of 16 plants against gram-positive bacteria. **J. Ethnopharmacol.**, v. 39, n. 1, p. 77-82. 1993.

CANTRELL, C. L. *et al.* Antimycobacterial cycloartanes from *Borrchia frutescens*. **J. Nat. Prod.**, v. 59, p. 1131-1136. 1996.

CARDOSO, C. R. P. 2006. **Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermedia* A. Juss (Malpighiaceae)**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

CARMO, E. H. Doença diarreica por rotavírus: magnitude, introdução da vacina e desafios para a vigilância epidemiológica. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n.11, p. 2266-2267. 2006.

CASTRO, A. H. F. *et al.* Avaliação sazonal da atividade da fenilalanina amônia-liase e dos teores de fenóis e taninos totais em *Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss: uma espécie medicinal do cerrado. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 7, n. 3, p. 45-55. 2005.

CHANDRAN, A. *et al.* Prevention of rotavirus gastroenteritis in infants and children: rotavirus vaccine safety, efficacy, and potential impact of vaccines. **Biologics: Targets & Therapy**, n. 4, p. 213-229. 2010.

COSTA, P. S. S. *et al.* Infecções e reinfecções por Rotavirus A: genotipagem e implicações vacinais. **J. Pediatr**, v. 80, n.2, 2004.

COSTA, P. S. S. *et al.* Rotavirus A e sua profilaxia vacinal. **Rev. de Patolog. Trop.**, v. 34, n. 1, p. 1-16. 2005.

CUSHNIE, T. P. T., LAMB, A. Antimicrobial activity of flavonoids. **Internat. J. Antimicrobial Agents**, n. 26, p. 343-356, 2005.

DE CLERCQ, E.; Recent highlights in the development of new antiviral drugs. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 552–560. 2005.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 6, n. 3, p. 11-14. 2004.

ESTES, M. K. *et al.* Simian Rotavirus SA11 Replication in Cell Cultures. **J. Virol**, p. 810-815. 1979.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M., GRIFFIN, D.E. **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1426-1454.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses. In: KNIPE, David M.; HOWLEY, Peter M. **Fields Virology**, 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1917-1974.

FELICIO, J.D *et al.* Triterpenos isolados das folhas de três espécies de *Byrsonima*. **Arq. Imst. Biol.**, v. 62, n. 1,2, p. 91-92. 1995.

FERNANDES, J. V. *et al.* Detecção de rotavírus nas fezes de crianças com diarreia aguda. **J. Pediatr**, Rio de Janeiro, v. 76, n. 4, p. 300-304. 2000

FESTINI, F. *et al.* Nosocomial Rotavirus Gastroenteritis in pediatric patients: a multi-center prospective cohort study. **BMC Infectious Diseases**, n. 10, p. 235. 2010.

FIGUEIREDO, M. E. *et al.* Avaliação química e da atividade antidiarréica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). **Rev. Bras. Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, jan./mar. 2005.

GALVEZ, J. *et al.* A. Antidiarrheic activity of quercitrin in mice and rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 45, n. 2, p. 157-159. 1993.

GALVEZ, J. *et al.* A. Inhibitory effects of quercetin on guinea-pig ileum contractions. **Phyto. Res.**, v. 10, n. 1, p. 66-69. 1996

GARCIA, E. S. *et al.* **Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas. Fitoterápicos.**

Disponível: <<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap10/eloi.html>>. Acesso em: 15 dez 2010.

GENTSCH, J. R. *et al.* Identification of group A rotavirus gene 4 types by Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol**, v. 30, n. 6, p. 1365-373, 1992.

GEISS, F. *et al.* Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. **Phytochemistry**, v. 39, n.3, p. 635-643. 1995.

GIL, E. S. *et al.* Atividade antioxidante de extrato etanólico e hidroalcoólico de “canjiqueira” (*Byrsonima orbignyana*). Doseamento de rutina, quercetina, ácido elágico e ácido ascórbico. **Rev. Eletr. Farm**, n. 2, p. 85-88. 2005.

GLASS, R.I.; BERN, C. **Impact of diarrhoeal disease worldwide**. 2ed. New York: Marcel Dekker, 1994.

GLASS, R. I. Combate ao Rotavírus. **Scientific American Brasil**, n. 48. 2006.

GONÇALVES, J. L. S. *et al.* In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. **J. Ethnopharmacol**, n. 99, p.403-407. 2005.

GOTTLIEB, O. R. *et al.* Triterpenoids from *Byrsonima verbascifolia*. **Phytochemistry**, v. 14, n. 5-6, p. 1456-1456. 1975.

GOUVEA, V. *et al.* Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **J. Clin. Microbiol**, v. 28, n. 2, p. 276-282, 1990.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **J. of Nat. Prod**, v.59, n.2, p.205-15. 1996.

HUDSON, J. B. **Antiviral compounds from plants**. Boca Raton, Florida: CRC Press., 200 p. 1990.

HUDSON, J. B.; TOWERS, G.H.N. Phytomedicines as antivirals, **Drugs of the Future**, v. 24, p. 295-320, 1999.

JAYARAM, H.; ESTES, M. K. e PRASAD, B. V. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. **Virus Res**, v.101, n.1, p. 67-81, abr. 2004.

JOLY, Aylthon Brandão. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal / 13ed.** São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

KANG, G. *et al.* Quantitation of Group A Rotavirus by Real-Time Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction: Correlation with Clinical Severity in Children in south India. **J Med Virol**, v. 73, n. 1, p. 118-122. 2004

LEE, C. *et al.* NSP4 Gene Analysis of Rotaviruses Recovered from Infected Children with and without Diarrhea. **J. Clin. Microbiol**, p. 4471-4477. 2000.

LIMA, Jackson Cordeiro. **Caracterização Evolutiva da Proteína Não-Estrutural 4 de Rotavírus do Grupo A**. 2007. 57f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

LINHARES, A. C. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 3, p. 629-646. 2000.

LINHARES, A. C.; ARAÚJO, E. C.; JUSTINO, M. C. A. Rotaviroses. In: COURA, José Rodrigues. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap. 160, p. 1857-1876.

LOGAN, C.; O'LEARY, J. J.; O'SULLIVAN, N. Real-Time Reverse Transcription-PCR for Detection of Rotavirus and Adenovirus as Causative Agents of Acute Viral Gastroenteritis in Children. **J. Clin. Microbiol**, v. 44, n. 9, p. 3189-3195. 2006.

LORENZI, Harri. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**, vol 2/2. Ed. Nova Odessa, Sp: Instituto Plantarum, 2002.

LUZ, C. R. N. E. *et al.* Rotavirus serotypes and electropherotypes identified among hospitalised children in São Luís, Maranhão, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 47, n. 5, p. 287-293. 2005.

MACEDO, C. I. *et al.* G and P rotavirus genotypes in stool samples from children in Teresina, State of Piauí. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 40, n. 4, p. 381-384. 2007.

MAGALHÃES, G. F. *et al.* Rotavirus and Adenovirus in Rondônia. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p. 555-557. 2007.

MAMEDE, M.C.H. 2010. *Byrsonima* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB019434>).

MENDANHA, D. M. *et al.* Efeito modulador da planta medicinal *Byrsonima verbascifolia*, Rich. Ex. Juss (EBv), contra os danos induzidos pela doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. SMART/asa. In: **1º Congresso de Genética do Centro-Oeste**, 2008, Brasília, DF.

MENDES, C. C. *et al.* Triterpenes esterified with fatty acid and triterpene acids isolated from *Byrsonima microphylla*. **Quím. Nova**, v. 22, n. 2, p. 185-188. 1999.

MULLER, Vanessa Danielle Menjon. 2006. **Triagem Antiviral de Extratos Vegetais: Fracionamento biomonitorado de *Ilex paraguariensis* A. St. Fil. Aquifoliaceae (erva-mate)**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis

MUNFORD, Veridiana *et al.* Serological and Molecular Diversity of Human Rotavirus in São Paulo, Brazil. **Braz. J. Microbiol**, n. 38, p. 459-466. 2007.

NIJVELDT, R. J. *et al.* Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr**, n.74, p.418–425, 2001.

NISHIMURA, T. *et al.* Antiviral compounds. XII. Antiviral activity of aminohydrazones of alkoxyphenyl substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and mice. **Kitasato Arch. Experim. Med.**, n. 50, p. 39-46, 1977.

NOTKA, F. *et al.* Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication in vitro and ex vivo. **Antiviral Research**, v. 64, n. 2, p. 93-102. 2004.

PALOMINO, S. S. *et al.* Screening of South American Plants against Human Immunodeficiency vírus: Preliminary Fractionation of aqueous extract from *Baccharis trinervis*. **Biol. Pharm Bull.**, n. 25, v. 9, p. 1147-1150. 2002.

RAMIG, R. F. Genetics of the rotaviruses. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.51, p.225-55, 1997.

RAO, V. S. N. *et al.* Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosae*. **Planta Méd.**, v. 63, n. 2, p. 146-149. 1997.

RASTRELLI, L. *et al.* Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, 647-650. 1997.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Rev. Bras. de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69. 2001.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **American Journal of Hygiene**, n. 27, p. 493-497, 1938.

REZENDE, C. M.; FRAGA, S. R. G. Chemical and seeds of murici (*Byrsonima crassifolia* L.). **J. Braz. Chem. Soc.**, n. 14, p. 425-428. 2003.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D.A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 2001. 180p.

SANNOMIYA, M. *et al.* Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* /Niedenzu (IK). **J. Chromatography A**, v. 1035, p. 47-51. 2004.

SANNOMIYA, M. *et al.* Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **J. Ethnopharmacol**, v. 97, p.1-6, 2005.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed da UFSC, 2000.

SIMONI, I.C. Tratamentos Antivirais. **Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 1/2, p. 41-44, jan./dez. 2003.

SOARES, Luana da Silva. **Caracterização antigênica e molecular de amostras de rotavírus do tipo G1, obtidas de crianças participantes de estudos em gastroenterites virais, no período de 1982 a 2003, em Belém, Pará, Brasil.** 2006. 97f. Dissertação (Mestrado em Patologia das doenças tropicais) – Universidade Federal do Pará, Belém.

TÔRRES, A. R. *et al.* Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 373-380, Out/Dez. 2005.

**UNIVERSITY OF LIVERPOOL.** 2011. Disponível em: <[http://www.liv.ac.uk/mmgum/research/dr\\_cunliffe/index.htm](http://www.liv.ac.uk/mmgum/research/dr_cunliffe/index.htm)>. Acesso em: 20 jan 2011.

VAN DOORN L. J. *et al.* Detection and genotyping of human rotavirus VP4 and VP7 genes by reverse transcriptase PCR and reverse hybridization. **J Clin Microbiol.**, v. 9, n. 47, p. 2704-2712. 2009.

VASCONCELOS, M. J. O. B.; FILHO, M. B. Doenças diarréicas em menores de cinco anos no Estado de Pernambuco: prevalência e utilização de serviços de saúde. **Rev. Bras. Epidemiol**, v. 11, n. 1, p. 128-138, 2008.

VLIETINCK, A.J.; DE BRUYNE, T.; VANDEN BERGUE, D. A. Plant substances as antiviral agents. **Current Organic Chemistry**, v. 1, p. 307-344, 1997.

VRANJAC, A. Informe técnicos institucionais: Diarréia e Rotavírus. **Rev. Saúde Pública**, v. 38, n. 6, p. 844-845, 2004.

VRANJAC, A. Informe técnicos institucionais: Vacina contra rotavírus. **Rev. Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 355-358, 2006.

ZUCCOTTI, G. *et al.* Epidemiological and clinical features of rotavirus among children younger than 5 years of age hospitalized with acute gastroenteritis in Northern Italy. **BMC Infectious Diseases**, n. 10. 2010.