

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Avaliação *in vitro* da atividade antiviral, virucida e imunomoduladora de extratos alcoólicos de *Echinacea angustifolia* contra vírus de interesse veterinário

Renata Pierobom Gressler

Pelotas, 2022

Renata Pierobom Gressler

Avaliação *in vitro* da atividade antiviral, virucida e imunomoduladora de extratos alcoólicos de *Echinacea angustifolia* contra vírus de interesse veterinário

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Lima

Coorientadora: Prof. Dr^a. Sílvia de Oliveira Hübner

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

G832a Gressler, Renata Marques Pierobom

Avaliação *in vitro* da atividade antiviral, virucida e imunomoduladora de extratos alcoólicos de *Echinacea angustifolia* contra vírus de interesse veterinário [recurso eletrônico] / Renata Marques Pierobom Gressler ; Marcelo de Lima, orientador ; Silvia de Oliveira Hubner, coorientadora. — Pelotas, 2022.

54 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Natural. 2. BVD. 3. Fitoterapia. 4. CCoV. 5. BOHV. I. Lima, Marcelo de, orient. II. Hubner, Silvia de Oliveira, coorient. III. Título.

CDD 636.089692

Renata Pierobom Gressler

Avaliação *in vitro* da atividade antiviral, virucida e imunomoduladora de extratos alcoólicos de *Echinacea angustifolia* contra vírus de interesse veterinário

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 24/02/2022

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcelo de Lima (Orientador)
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Prof. Dr. Geferson Fischer
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPeI)

Prof. Dr^a. Marlete Brum Cleff
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dr^a. Clarissa Caetano de Castro
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas (UFPeI)

Agradecimentos

Aos meus pais Ricardo (in memoriam) e Mariza pelo apoio onde estiverem.

Ao Diego, Ana e João, meus amores, obrigada por sempre estarem ao meu lado, compreendendo e me encorajando nesta caminhada.

À Joana Vargas Zillig Echenique que plantou a semente do sonho.

À Prof.^a Dra. Marlete Brum Cleff e Tábata Dias Pereira por me mostrarem o caminho.

Ao meu orientador, Professor Dr. Marcelo de Lima, por ter aceitado me orientar. Por todos os ensinamentos, paciência e dedicação.

À minha coorientadora Professora Dra. Silvia de Oliveira Hübner por tornar esse sonho possível, obrigada!

Ao professor Geferson Fischer, pelos conhecimentos adquiridos.

Ao amigo Dr. Paulo Ricardo Centeno Rodrigues, por todos os ensinamentos, paciência e disponibilidade.

A todos meus amigos do laboratório: Lariane Barcelos, Leonardo Clasen Ribeiro, Matheus Frühauf, Nadálin Botton, sem vocês não seria possível.

Em especial à Renata Nobre da Fonseca, Renatinha, por toda a paciência, cumplicidade, disponibilidade e ensinamentos, com certeza ficou mais fácil com tua parceria.

À UFPEL e ao PPGV, pela oportunidade de pós-graduação.

Resumo

GRESSLER, Renata Pierobom. **Avaliação *in vitro* da atividade antiviral, virucida e imunomoduladora de extratos alcoólicos de *Echinacea angustifolia* contra vírus de interesse veterinário** 2022. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

A *Echinacea angustifolia* é uma planta herbácea, perene, pertencente à família *Asteraceae*, que vem sendo utilizada ao longo dos séculos pelos povos nativos americanos como “anti-infecciosa”, em diversas enfermidades de origem viral e bacteriana. Doenças infectocontagiosas de etiologia viral estão entre as mais importantes dentre aquelas que afetam seres humanos e animais, representando um risco à saúde pública. Além disso, na área veterinária, as doenças virais são responsáveis por grandes perdas econômicas em animais de produção. Nessa perspectiva, pode-se ressaltar a ocorrência de transtornos respiratórios e reprodutivos em bovinos e a gastroenterite em cães jovens. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiviral e virucida *in vitro* de extratos alcoólicos de *E. angustifolia* a 0,25% e 0,5% frente BoHV-1, BVDV e CCoV. Para isso, foi realizado inicialmente um ensaio de citotoxicidade e, posteriormente, avaliação das atividades antiviral e virucida utilizando o método de diluição limitante. Além disso, a fim de verificar a expressão relativa de mRNA em células MDBK tratadas com *E. angustifolia*, foi realizada a avaliação das citocinas IFN α e IFN β por PCR em tempo real. A *E. angustifolia* a 0,5% apresentou atividade antiviral contra o BoHV-1, BVDV e CCoV após 1, 3, 6 e 24 horas de tratamento ($p < 0,05$). A *E. angustifolia* a 0,25% apresentou atividade antiviral contra o BoHV-1 após 1 hora de incubação ($p < 0,05$), mas não contra o BVDV ($p > 0,05$). Adicionalmente, o fitoterápico nessa mesma concentração e tempo resultou em um incremento na expressão relativa de mRNA de IFN α em células MDBK ($p < 0,05$). A *E. angustifolia* a 0,5% não apresentou atividade virucida contra o BoHV-1. Os resultados demonstraram que o fitoterápico *E. angustifolia* a 0,25 e 0,5% apresentaram atividade antiviral contra BoHV-1, BVDV e CCoV. Estudos adicionais *in vitro* são necessários para elucidar o exato mecanismo de ação associado a atividade antiviral observada com este fitoterápico.

Palavras-chave: natural; fitoterapia; BoHV-1; BVDV; CCoV

Abstract

GRESSLER, Renata Pierobom. ***In vitro* evaluation of the antiviral activity of the herbal medicine *Echinacea angustifolia***. 2022. 54f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

Echinacea angustifolia is an herbaceous, perennial plant belonging to the *Asteraceae* family that has been used for centuries by Native Americans as an "anti-infective" in various viral and bacterial diseases. Infectious-contagious diseases of viral etiology are among the most important diseases that affect humans and animals, representing mainly a public health hazard. Particularly, viral diseases are associated with important diseases in several animal species causing huge economic impact to the industry. In this sense, this study aimed to evaluate the *in vitro* antiviral and virucidal activity of alcoholic extracts 20% of the phytotherapy *E. angustifolia* at 0.25% and 0.5% against BoHV-1, BVDV and CCoV. For this, a cytotoxicity assay was initially performed and, later, evaluation of the antiviral and virucidal activities. Furthermore, in order to verify the relative expression of mRNA in MDBK cells treated with *E. angustifolia*, the quantitative PCR technique was performed for the cytokines IFN α and IFN β . *E. angustifolia* at 0.5% showed antiviral activity against BoHV-1, BVDV and CCoV after 1, 3, 6 and 24 hours of treatment ($p < 0.05$). In addition, *E. angustifolia* at 0.25% showed antiviral activity against BoHV-1 after 1 hour of incubation ($p < 0.05$), but not against BVDV ($p > 0.05$). The compound at same concentration and time resulted in an increased relative expression of IFN α mRNA in MDBK cells ($p < 0.05$). *E. angustifolia* at 0.5% did not show virucidal activity against BoHV-1. Overall, the results showed that the herbal medicine *E. angustifolia* at 0.25 and 0.5% showed *in vitro* antiviral activity against BoHV-1, BVDV and CCoV. Further studies *in vitro* and in animal models are needed in order to elucidate its exact mechanism of action.

Keywords: natural; phytotherapy; BoHV-1; BVDV; CCoV

Lista de Figuras

Figura 1	<i>Echinacea angustifolia</i>	18
Figura 2	Título do BoHV-1 após diferentes tempos de incubação da <i>E. angustifolia</i> a 0,5% em células MDBK. Barras com (*) foram estatisticamente diferentes do controle (BoHV-1 em células não tratadas) ($p < 0,05$).....	45
Figura 3	Título do BVDV após diferentes tempos de incubação da <i>E.angustifolia</i> a 0,5% em células MDBK. Barras com (*) foram estatisticamente diferentes do controle (BVDB em células não tratadas) ($p < 0,05$).....	45
Figura 4	Título do CCoV após diferentes tempos de incubação da <i>E.angustifolia</i> a 0,5% em células MDBK. Barras com (*) foram estatisticamente diferentes do controle (CCoV em células não tratadas) ($p < 0,05$).....	46
Figura 5	Título do BoHV-1 e BVDV após 1 hora de incubação da <i>E.angustifolia</i> a 0,25% em células MDBK. Barras com (*) foram estatisticamente diferentes do controle (BoHV-1 ou BVDV em células não tratadas) ($p < 0,05$).....	46
Figura 6	Título do BoHV-1 após diferentes tempos de incubação da <i>E.angustifolia</i> a 0,5%. Barras com (*) foram estatisticamente diferentes do controle (BoHV-1 em células não tratadas) ($p < 0,05$).....	47
Figura 7	Expressão relativa de mRNA de IFN α com 1 hora de estímulo de <i>E. angustifolia</i> 0,25% e 0,5% em MDBK. Barras com (*) foram estatisticamente diferentes do controle negativo (CC) ($p < 0,05$).....	47
Figura 8	Expressão relativa de mRNA de IFN β com 1 hora de estímulo de <i>E. angustifolia</i> 0,25% e 0,5% em MDBK. Barras com (*) foram estatisticamente diferentes do controle negativo (CC) ($p < 0,05$).....	48

Artigo

- Figura 1 Relative expression of interferon alpha (IFN α) and beta (β) messenger RNA after treatment of MDBK cells with 0.5% *E. angustifolia* extract for 3, 6 or 24 hours. CC - control cells, untreated cells. * $P \leq 0.05$ 43
- MDBK cells were infected with 10^3 TCID₅₀ of bovine herpesvirus 1
- Figura 2 (BoHV-1) and after 6 or 24 hours were treated with 0.5% *E. angustifolia* extract. Protection of cells infection was determined by neutral red (NR) dye assay after 48 hours. The experiments were performed at three independent time points in triplicates, and the results are expressed as percentual mean. Treatment with *E. angustifolia* was compared with control cells, not infected cells (CC) and cells infected with BoHV-1 and not treated (BoHV-1); comparison of the groups (a, b) ($P \leq 0.05$)..... 44

Lista de Tabelas

Tabela 1	Sequência de <i>primers</i> utilizados.....	49
----------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

AC	Absorbância controle
a.C	Antes de Cristo
ACTB	Gene da β actina
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT	Absorbância tratado
BoHV-1	Alphaherpesvirus Bovino Tipo 1
BVDV	Vírus da Diarreia Viral Bovina
CCoV	Coronavírus Canino
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CRFK	The Crandell-Rees Feline Kidney Cell
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	Food And Drug Administration
GAPDH	Gene da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
IBR	Rinotraqueíte Infecciosa Bovina
IFN α	Interferon alpha
IFN β	Interferon beta
IPB	Balonopostite Pustular Infecciosa
IPV	Vulvovaginite Pustular Infecciosa
MDBK	Madin-Darby Bovine Kidney
MEM	Meio Essencial Mínimo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo
RNA	Ácido Ribonucleico
SFB	Soro Fetal Bovino
TCID50	Dose Infectante a 50% do Cultivo Celular

Lista de Símbolos

<	Menor
>	Maior
®	Marca Registrada no Brasil
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
Δ	Delta

Sumário

1 Introdução.....	12
2 Revisão de Literatura.....	14
2.1 História da fitoterapia.....	14
2.2 Regulamentação da utilização de fitoterápicos no Brasil.....	15
2.3 O mercado dos fitoterápicos.....	16
2.4 A utilização de fitoterápicos na medicina.....	17
2.5 <i>Echinacea angustifolia</i>.....	18
2.6 Preparações de <i>E. angustifolia</i> e seus constituintes.....	20
2.7 Fitoterápicos e a Medicina Veterinária.....	20
2.8 Alphaherpesvírus bovino, vírus da diarreia viral bovina e coronavírus canino.....	21
3 Artigo.....	23
4 Considerações finais.....	50
Referências.....	51

1 Introdução

A utilização de fitoterápicos para fins medicinais é uma prática milenar. Plantas e seus derivados (materiais botânicos) são preparados e utilizados de diversas formas, incluindo cápsulas (forma farmacêutica sólida em que o princípio ativo e os excipientes estão contidos em um invólucro solúvel duro ou mole), tinturas (preparação líquida resultante da ação de líquido extrator adequado sobre uma determinada droga de origem animal ou vegetal). Infusões (macerações onde droga animal ou vegetal convenientemente fragmentada ou não, em contato com a líquido extrator). (ABRANCHES et al.; 2015, FHB II)

A *Echinacea spp.* um gênero de planta herbácea perene, pertencente à família *Asteraceae*, constituído por nove espécies descritas. A tradição histórica e popular do uso medicinal da *Echinacea spp.* está relacionada as três espécies mais relevantes, originárias da América do Norte. Destas espécies, a *Echinacea angustifolia*, a *Echinacea pallida* e a *Echinacea purpurea* destacam-se pela sua longa e tradicional história de utilização em medicina (BARNES et al, 2005). Os constituintes do gênero *Echinacea* têm sido identificados, apesar da variabilidade nas suas concentrações, que depende de diversos fatores tais como: espécie, a localização geográfica, as condições de cultura, realizada e os métodos de extração (PERRY et al., 2001; AIELLO et al., 2015).

Doenças infectocontagiosas de etiologia viral estão entre as mais importantes dentre aquelas que afetam seres humanos e animais, representando um risco à saúde pública. Além disso, na área veterinária as doenças virais são responsáveis por grandes perdas econômicas em animais de produção (KAZIYAMA et al., 2012). A produção de fármacos com ação antiviral com capacidade de impedir uma infecção é fundamental. Porém, a obtenção de novos medicamentos antivirais depende do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) para o desenvolvimento de novos medicamentos com essa ação. Dessa forma, torna-se importante a realização de estudos com base

em substâncias naturais e sintéticas com a finalidade de definir e caracterizar novos compostos que tenham a ação no ciclo replicativo viral (SILVA, 2020).

O desenvolvimento de fitoterápicos antivirais de uso veterinário permitirá realizar a integração dos conhecimentos tradicionais para a geração de novas alternativas terapêuticas. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi verificar a atividade antiviral e virucida de extratos de *E. angustifolia* frente aos alfa herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e coronavírus canino (CCoV).

2 Revisão de Literatura

2.1 História da fitoterapia

O termo fitoterapia tem origem grega: “*phytos*”, que significa “vegetal”, e “*therapeia*”, que remete a “tratamento”. A utilização de plantas na promoção da saúde remonta à antiguidade e se confunde com a história do próprio homem. Desde o período neolítico, há evidências do uso de ervas aromáticas eram usadas em culinária e medicina e que ervas e flores eram enterradas com os mortos (BERWICK, 1996). As indicações de uso dos fitoterápicos abrangem desde o combate ao câncer até ação a microrganismos patogênicos que podem acometer os diversos sistemas orgânicos de seres humanos e animais (CARVALHO, 2012).

Na China, é descrito o uso de fitoterápicos desde 3000 a.C. Já na Idade Média, vários cientistas iniciaram os estudos e pesquisas sobre os efeitos terapêuticos dos extratos vegetais. No mundo contemporâneo, a utilização das plantas para o tratamento de doenças tem um caráter histórico social familiar, uma vez que o conhecimento acerca desse assunto, inicialmente, foi transmitido entre as diferentes gerações (YWATA et al., 2006). O descobrimento das propriedades curativas das plantas foi, no início, meramente intuitivo através da observação dos animais quando doentes que buscavam nas plantas a cura para as suas afecções (OLIVEIRA & SILVA, 1994).

O tratamento com extratos de plantas medicinais geralmente apresenta excelente relação custo/benefício, e ação biológica eficaz com baixíssimos níveis de toxicidade e efeitos colaterais, fatores que proporcionaram o reconhecimento da fitoterapia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (BRASIL, 2009).

O Brasil tem de 15 a 20% de toda a biodiversidade mundial, com mais de 50 mil espécies da flora brasileira identificadas. No mercado mundial mais de 70% dos medicamentos estão ligados direta ou indiretamente a produtos naturais, o que revela

um enorme potencial de pesquisa sobre novos agentes terapêuticos preventivos para 'manutenção da saúde (FIOCRUZ, 2022).

Desde a década de 1970 as recomendações da Organização Mundial da Saúde acentuaram-se em relação à adoção de práticas alternativas de cuidado à saúde das populações mundiais, com o objetivo de incentivar a criação de políticas públicas no país, bem como um incremento nos estudos científicos relativos ao tema (SENA et al. 2007).

Atualmente, com base em diversos benefícios demonstrados, a fabricação de fitoterápicos pela indústria farmacêutica cresce significativamente, representando 25% do faturamento no ano de 2020 no Brasil (HARAGUCHI et al., 2020).

2.2 Regulamentação da utilização de fitoterápicos no Brasil

O registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil possui normas específicas desde o ano de 1967. Considerando as modificações implementadas pela Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e Política de Práticas Integrativas e Complementares, essas normativas vêm sendo ajustadas e/ou adaptadas com base no desenvolvimento científico e tecnológico ao longo dos anos e foram recentemente publicadas (BRASIL, 2006). Na atualidade, portanto, seu uso pode ser realizado por meio de práticas populares e/ou providas pelo Estado, sendo esse responsável pelo direito à saúde, incluindo o acesso a tratamentos e medicamentos seguros à população (BRASIL, 2006; GONÇALVES, 2009).

Conforme descrito na Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 13 de 14 de Março de 2013 (ANVISA, 2013):

Plantas medicinais são aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade.

Já os fitoterápicos são produtos obtidos exclusivamente de matéria-prima vegetal. Não são considerados medicamentos fitoterápicos aqueles que incluem em sua composição substâncias ativas isoladas, sintéticas ou naturais, nem as associações dessas com extratos vegetais (ANVISA, 2013).

2.3 O mercado dos fitoterápicos no Brasil

No Sistema Único de Saúde, vem sendo utilizadas diferentes estratégias para a incorporação das Terapias Complementares no cuidado à saúde. A Política Nacional das Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) aprovada pela Portaria 971/20064 no âmbito do SUS. Onde as terapias complementares inclusas nesta política são Acupuntura, Fitoterapia, Homeopatia e Termalismo Social/Crenoterapia. Na maioria das vezes elas se tornam tão eficazes quanto à terapia convencional, porém o uso incorreto, também podem trazer inúmeros efeitos colaterais danosos ao organismo. Sendo de extremas importância a presença de um profissional conhecimento sobre elas para a correta indicação à população

Neste contexto, através de seus princípios e diretrizes norteadores o SUS, abraça a fitoterapia como recurso terapêutico integrativo e complementar à saúde e dispõe de políticas públicas e normatizações específicas que buscam institucionalizar esta prática. As políticas iniciadas em 2006 (Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares – PNPIC e Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos – PNPMF) contemplam diretrizes, ações e responsabilidades das três esferas de governo para oferta de serviços e produtos. Estas vão além das dimensões do setor saúde, são intersetoriais e englobam toda a cadeia produtiva de plantas medicinais e produtos fitoterápicos.

Apesar dos seus benefícios, a fitoterapia não apresenta aplicação igualitária em todo o Brasil, e, além de possuir barreiras culturais e científicas, ainda é pouco explorada pelos profissionais de saúde, possuindo poucos recursos humanos capacitados, investimento insuficiente e espaços institucionais limitados para o desenvolvimento desse tipo de prática (ESTEVEZ et al., 2020).

Contudo, a alteração deste cenário vem sendo estimulada a partir do marco regulatório dos fitoterápicos (ANVISA, 2000), que ratificou os enormes potenciais benefícios trazidos pelos fitoterápicos, e foi possível perceber que as indústrias farmacêuticas foram, e continuam sendo beneficiadas pelos conhecimentos populares sobre o uso medicinal das plantas. Aproximadamente 50% dos medicamentos aprovados pelo FDA, são direta ou indiretamente derivados de produtos naturais (FERREIRA & PINTO, 2010). O Ministério da Saúde Brasileiro recomendou e indicou diversas plantas medicinais aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(ANVISA), cujo uso está consagrado na cultura da medicina popular brasileira (FERREIRA & PINTO, 2010). Ao mesmo tempo, o crescimento do mercado de fitoterápicos tem gerado certa preocupação entre os cientistas, em função do uso indiscriminado, baseado na crença da ausência de efeitos colaterais. Contudo, é importante ressaltar que a utilização inadequada dos fitoterápicos, como a automedicação, pode trazer uma série de efeitos colaterais. Entre os principais problemas estão as reações alérgicas, os efeitos tóxicos em vários órgãos e até mesmo o desenvolvimento de certos tipos de câncer. Aliado a isso, há, ainda, a falta de regulamentação e controle de qualidade adequado para a comercialização, visto que muitos utilizam plantas presentes nos próprios quintais ou as coletadas em terrenos baldios ou florestas (MILLER, 1998).

2.4 A utilização de fitoterápicos na medicina

O aumento do uso de plantas medicinais e de produtos fitoterápicos expansão no Brasil e no mundo. O que tem impulsionado as empresas de medicamentos a investir em pesquisa de novos fármacos, como por exemplo, a pilocarpina do jaborandi (*Pilocarpus* spp.), o α -bisabolol da candeia (*Eremanthus erythropappus*) e o alfavumoleno da erva-baleeira (*Cordia verbenaceae* (DC), que gerou o primeiro fito medicamento brasileiro (Acheflan®, um anti-inflamatório), com comprovações de eficácia e segurança, são demonstrações de que há uma preocupação governamental e de que este mercado deve se profissionalizar nos próximos anos (BRASIL, 2015; BRASIL, 2016). Pode-se citar, também, a espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*), com ação analgésica, cicatrizante, diurética, laxativa, antibacteriana frente a bactérias gram-positivas, e antifúngica. É usada principalmente em problemas gástricos e combate a *Helicobacter pylori*. O mulungu (*Erythrina Verna*) como sedativo (utilizado contra inflamações orais) hipotensivo, devido à ação sedativa, e bacteriostática, provavelmente vinculada a presença de fenóis e taninos encontrada através da prospecção fitoquímica de suas folhas (LICCIARDI & UNDERWOOD, 2011).

As propriedades imunomoduladoras dos fitoterápicos podem fornecer uma contribuição importante para a indústria de vacinas, especialmente na identificação de novas formulações e em relação ao uso de tais preparações como adjuvantes para as vacinas profiláticas e terapêuticas. Nesse sentido, a utilização de extratos de plantas

medicinais como fonte de substâncias antivirais pode ser uma das alternativas para o controle e tratamento de infecções virais, uma vez que podem ser uma alternativa de baixo custo e de alta qualidade, na pesquisa de fitoterápicos desde que sejam produzidos segundo as boas práticas de fabricação e controle (ANTONIO & TESSER, 2014).

Entretanto, sabe-se que os extratos produzidos a partir de plantas são matérias-primas vegetais variáveis, uma vez que sua composição pode variar em função da composição do solo, clima, fatores ambientais, sazonalidade, formas de cultivo, além da possível sensibilidade à luz e ao calor. Em função disso, é necessária a padronização dos extratos, inclusive porque serão utilizados como matérias-primas na produção de medicamentos fitoterápicos (CARVALHO et al., 2012).

2.5 *Echinacea angustifolia*

O gênero *Echinacea* pertence à família das *Asteraceae* ou *Compositae*, um grupo de plantas pradenses, silvestres e perenes, nativas da América do Norte, cujas principais características são as raízes apumadas, cilíndricas, estriadas longitudinalmente, que desprendem odor aromático e sabor adocicado, provocando um discreto adormecimento na língua (GRUENWALD et al., 2000).



Figura 1 *Echinacea angustifolia* (Fonte: FineArt, Philip Preston, 2016)

O uso medicinal das espécies do género *Echinacea* iniciou-se com os nativos americanos, que as utilizavam para tratar problemas de saúde que iam desde infeções respiratórias a mordeduras de cobras. Durante o século XIX, a *Echinacea* foi utilizada como purificador de sangue e no tratamento para as tonturas. No início do século XX, foi utilizada como remédio para a constipação e gripe, e como um agente anti-infeccioso até o advento dos antibióticos modernos (MAPA, 2008). Os extratos de *E. angustifolia* foram tradicionalmente utilizados na cicatrização de feridas. Este efeito é atribuído à sua fração de polissacarídeo (equinacina B) que induz a produção de um ácido hialurônico que estimula a cicatrização de feridas, pois leva à inibição da hialuronidase e promove o crescimento de fibroblastos (NEWALL et al., 1996).

As preparações de *Echinacea*, principalmente em três espécies comercialmente importantes (*Echinacea purpúrea*, *Echinacea angustifolia* e *Echinacea pallida*), tem sido utilizada para prevenir e aliviar os sintomas de infeções bacterianas e virais. Algumas dessas preparações são conhecidas por suas atividades antioxidante e anti-inflamatória, além de potencial atividade imunomoduladora (DASGUPTA, 2019).

Atualmente, o interesse medicinal na *E. angustifolia* fundamenta-se nos seus efeitos imunomoduladores. Possui efeito antiproliferativo nas células tumorais promovendo um aumento na capacidade de tolerância a danos causados por compostos tóxicos (como quimioterápicos) (DOBRANGE et al., 2019). Os efeitos imunomoduladores da planta, têm resultam indiretamente em atividades antifúngica, antibacteriana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena (HUDSON, 2012). A combinação de todas essas ações benéficas justifica o uso de preparações dessa espécie no tratamento e profilaxia de infeções do trato respiratório superior, no tratamento e prevenção de infeções do trato urinário, bem como no tratamento de infeções vaginais recorrentes (BRASIL, 2003).

Para que seja possível comprovar a eficácia dos extratos, é necessária e obrigatória a devida validação científica, levando a uma utilização correta e racional das plantas medicinais ou de seus compostos ativos. Os testes *in vitro* permitem uma avaliação da existência de propriedades dos extratos vegetais e constituem uma etapa preliminar para a caracterização de novos compostos ativos presentes nos vegetais (COSTA et al., 2002).

2.6 Preparações de *E. angustifolia* e seus constituintes

A composição fitoquímica das preparações da *Echinacea* pode variar devido a diferenças na parte da planta utilizada. Esta variabilidade também pode ser atribuída ao método utilizado para extrair o material na preparação, até mesmo a localização geográfica e época do ano em que a planta é colhida. Apesar da variabilidade entre as preparações da *E. angustifolia*, apenas recentemente houve tentativas de padronizar e caracterizar o material utilizado em estudos clínicos (ANTONIO & TESSER, 2014).

Dentre os vários constituintes da *E. angustifolia*, destacam-se mais de 20 alquilamidas derivadas do ácido cafeico (equinacósido, ácido chicórico, ácido caftárico, ácido clorogênico e isoclorogénico, cinarina, entre outros). Também poliacetilenos e compostos voláteis, incluindo terpenos, flavonóides (como quercetina e canferol) e alcalóides (tussilagina e isotussilagina) (BARNES et al., 2005).

Apesar da complexidade de compostos que fazem parte das espécies do gênero *Echinacea* e de uma grande maioria contribuir para a atividade biológica da planta, os compostos aos quais é atribuída maior importância e considerados os principais responsáveis pela atividade biológica da planta são as alquilamidas e poliacetilenos (compostos lipofílicos), polissacáridos (FERREIRA et al., 2015), derivados do ácido cafeico e glicoproteínas (compostos hidrofílicos) (MISTRÍKOVÁ & VAVERKOVÁ, 2006; ARDJOMANDWOELKART & BAUER, 2016).

2.7 Fitoterápicos e a Medicina Veterinária

O mercado veterinário brasileiro é composto por diversos tipos de produtos que variam desde medicamentos até rações, suplementos alimentares e, mais recentemente, os fitoterápicos. Principalmente na área de produção, há uma crescente exigência do consumidor em adquirir produtos cada vez mais saudáveis, produzidos dentro dos padrões da agroecologia, seguros e livres de resíduos (BRANDÃO, 2006). Muitos fatores contribuem para o aumento da utilização deste recurso, tais como: o alto custo dos medicamentos industrializados, o difícil acesso da

população à assistência médica como também a tendência ao uso de produtos de origem natural (BERNARDES, SILVA & MOLEIRO, 2011).

O uso das plantas medicinais na terapêutica veterinária surge como uma alternativa de tratamento viável, segura, de fácil obtenção e baixo custo. A utilização dos fitoterápicos em medicina veterinária vem retomando, gradativamente, o espaço ocupado em tempos remotos. Alguns fatores que poderiam, pelo menos em parte, justificar esta tendência seriam os elevados custos dos produtos comerciais e os efeitos indesejáveis/colaterais que alguns produtos já existentes podem causar. Porém, é necessário ter a consciência de que os fitoterápicos são medicamentos, necessitando, portanto, de critérios rigorosos para a sua comercialização e utilização (MARINHO et al., 2007). O ressurgir desse recurso terapêutico nos dias de hoje, apresenta-se como uma alternativa mais acessível e segura, menos agressiva ao paciente e viável para os animais. No entanto, ao contrário do que ocorre na medicina humana, estudos científicos envolvendo produtos fitoterápicos para a prevenção e controle de doenças ainda são escassos na área veterinária (VIEIRA et al., 1999).

2.8 Alphaherpesvírus bovino, vírus da diarreia viral bovina e coronavírus canino

Uma parcela importante de enfermidades infectocontagiosas que acometem os animais possui etiologia viral e, em grande parte, podem representar um risco para a saúde pública (SILVA, 2010).

Os alphaherpesvirus bovino tipos 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5) são classificados na família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*. Assim como outros membros dessa família, estabelecem infecções latentes nos neurônios dos gânglios nervosos regionais do hospedeiro. O BoHV-1 é o agente etiológico da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), balanopostite pustular infecciosa (IPB) e vulvovaginite pustular infecciosa (IPV), enquanto o BoHV-5 tem sido associado a casos de meningoencefalite não supurativa em bovinos (ANZILIERO et al., 2015).

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é responsável por prejuízos econômicos relevantes para a bovinocultura de corte e leite em nível mundial. Trata-se um vírus com genoma RNA, da família *Flaviridae* e gênero *Pestivirus* (BAKER, 1995). O BVDV possui distribuição mundial e está associado com uma grande variedade de manifestações clínicas, que incluem doença respiratória, gastroentérica, doença

hemorrágica, imunossupressão e distúrbios reprodutivos, entre outras. Em geral, a infecção de animais adultos resulta em uma infecção sistêmica que pode estar associada à doença respiratória e gastrointestinais agudas, efeitos imunossupressores e falha reprodutiva em bovinos. Além disso, o BVDV pode causar infecção transplacentária resultando em morte fetal, abortamento ou nascimento de animais persistentemente infectados (SU et al., 2021).

O coronavírus canino (CCoV) é classificado na família *Coronaviridae*, que possui duas subfamílias denominadas *Letovirinae* e *Orthocoronavirinae*, sendo que a subfamília *Orthocoronavirinae* é subdividida em quatro gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus*. As espécies de coronavírus que acometem os cães pertencem ao gênero *Alphacoronavirus* 1. CCoV é um coronavírus que acomete os cães, sendo uma das causas mais comuns de gastroenterite em cães jovens, ocasionando diarreia branda e autolimitante, de caráter altamente contagioso (GREENE; DECARO, 2015).

3 Artigo

Potente atividade antiviral *in vitro* do extrato de *Echinacea angustifolia* contra o herpesvírus bovino tipo 1

Renata Pierobom Gressler, Paulo Ricardo Centeno Rodrigues, Renata Nobre da Fonseca, Gefferson Fischer, Marcelo de Lima, Silvia de Oliveira Hübner.

Aceito para publicação na revista Ciência Rural

**Potent *in vitro* antiviral activity of the extract of *Echinacea angustifolia* against bovine
herpesvirus 1**

**Potente atividade antiviral *in vitro* do extrato de *Echinacea angustifolia* contra o
herpesvírus bovino tipo 1**

Renata Pierobom Gressler

Laboratório de Virologia e Imunologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus
Universitário s/n, Capão do Leão, RS, Brasil.

Paulo Ricardo Centeno Rodrigues

Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, RS, Brasil.

Renata Nobre da Fonseca

Laboratório de Virologia e Imunologia, UFPel, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS,
Brasil.

Geferson Fischer

Laboratório de Virologia e Imunologia, UFPel, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS,
Brasil.

Marcelo de Lima

Laboratório de Virologia e Imunologia, UFPel, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS,
Brasil.

Silvia de Oliveira Hübner

Laboratório de Virologia e Imunologia, UFPel, Campus Universitário s/n, CEP 96010-900,
Capão do Leão, RS, Brasil. E-mail: sohubner@yahoo.com.br

ABSTRACT

Echinacea angustifolia is a perennial plant that has been traditionally used to treat various microbial diseases. This study evaluated the *in vitro* antiviral properties of an ethanolic extract of *E. angustifolia* against bovine *alpha*herpesvirus 1 (BoHV-1). BoHV-1 infection is associated with respiratory, reproductive and neurological disease in cattle, resulting in major economic losses. When cells were treated with *E. angustifolia* extract at a non-cytotoxic concentration at different times (3, 6 or 24 hours) before BoHV-1 inoculation, no viral detection was possible after 72h, while in untreated cells the virus reached a titer of $10^{5.5}$ TCID₅₀ /25μl (median). Incubating the extract with BoHV-1 24 hours before cell inoculation did not result in loss of viral infectivity. Cells infected with 10^3 TCID₅₀ of BoHV-1 and not treated with *E. angustifolia* showed an average of 45.8% viability after 48 hours of infection, while 91.1% remained viable when treated 6 hours after or 84.1% 24 hours after infection, demonstrating a significant reduction in the cytopathic effect. In addition, *E. angustifolia* significantly reduced the relative mRNA expression of the antiviral cytokines IFN α and IFN β in the treated cells, suggesting that the antiviral activity is not due to immunomodulation. The obtained data indicated that the ethanolic extract of *E. angustifolia* may directly interfere with virus attachment, entry, and/or egress from infected cells. Taken together, the presented data emphasized the promising antiviral activity of *E. angustifolia* against BoHV-1.

Key words: antimicrobial; bohv-1; medicinal plants; phytotherapy.

RESUMO

Echinacea angustifolia é uma planta perene que vem sendo utilizada para tratar diversas enfermidades de origem microbiana. Neste estudo foram avaliadas propriedades antivirais, *in vitro*, de um extrato etanólico de *E. angustifolia* frente ao *alpha*herpesvírus bovino 1 (BoHV-1). BoHV-1 causa enfermidades que afetam principalmente o trato respiratório e genital de

bovinos, e que resultam em grandes perdas econômicas. Quando células foram tratadas com o extrato de *E. angustifolia* em concentração não citotóxica em diferentes tempos (3, 6, ou 24h) antes da inoculação do BoHV-1, não foi possível detectar o vírus por até 72 horas após, enquanto que nas células não tratadas o vírus alcançou o título de $10^{5.5}$ TCID₅₀/25μl (média). A incubação do extrato com BoHV-1 24 horas antes da inoculação celular não resultou em inativação da infectividade viral. Células infectadas com 10^3 TCID₅₀ de BoHV-1 não tratadas com *E. angustifolia* apresentaram em média 45,8% de viabilidade após 48 horas da infecção, enquanto que 91,1% permaneceram viáveis quando tratadas após 6 horas ou 84,1% após 24 horas da infecção, demonstrando uma significativa redução no desenvolvimento de efeito citopático. Além disso, *E. angustifolia* reduziu significativamente a expressão relativa de mRNA das citocinas antivirais IFN α e IFN β nas células tratadas, sugerindo que a atividade antiviral não ocorre devido a imunomodulação. *E. angustifolia* reduziu significativamente a expressão relativa de mRNA das citocinas antivirais IFN α e IFN β nas células tratadas, indicando que a atividade antiviral não ocorre devido a imunomodulação. Os dados obtidos indicam que o extrato etanólico da *E. angustifolia* pode interferir com a adsorção, penetração e/ou o egresso viral das células infectadas. Tomados em conjunto, os dados apresentados enfatizam uma promissora atividade antiviral da *E. angustifolia* contra o BoHV-1.

Palavras-chave: antimicrobiano; BOHV-1; plantas medicinais; fitoterapia.

INTRODUCTION

Echinacea spp. is a genus of perennial herbaceous plant, belonging to the *Asteraceae* family, consisting of nine species already described (FLAGEL et al., 2008). *Echinacea* spp. preparations have been extensively used as an alternative for preventing and/or treating common cold, coughs, bronchitis and other upper respiratory infections and urinary tract infections in humans (OGAL et al. 2021), as well as for treating wounds and bacterial infections

(BURLOU-NAGY et al., 2022). The use of *Echinacea* spp. for medicinal purposes has a long-standing tradition. This tradition is primarily associated with three species: *Echinacea purpurea*, *Echinacea pallida*, and *Echinacea angustifolia* (BARNES et al., 2005). Additionally, some *Echinacea* preparations are known to exert antioxidant and anti-inflammatory activity espousing to its potential immunomodulatory activities (DOBRANGE et al., 2019).

Bovine *alpha*herpesvirus 1 (BoHV-1) is a member of the *Herpesviridae* family, *Alpha*herpesvirinae subfamily, *Varicellovirus* genus. It is a significant etiological agent associated mainly with reproductive and respiratory diseases in cattle (MUYLKENS et al., 2007). The World Organization for Animal Health (OIE) has classified BoHV-1 in category B for infectious diseases due to its high worldwide prevalence and significant impact on beef and dairy cattle farming (MUYLKENS et al., 2007). Besides, it is important to note that evaluating compounds with antiviral activity that are promising against BoHV-1 could provide valuable insights into their antiviral and/or therapeutic potential against human herpes simplex virus (HSV-1 and HSV-2) due to significant similarities in genomic organization and viral replication characteristics.

Some studies investigating the antiviral activity of *Echinacea* spp against various viral agents have shown promising results. CHEMINAT et al. (1988) detected activity of *E. pallida*, attributed to a cichoric acid and echinacoside, as well as caffeic acid, against the replication of vesicular stomatitis virus, a virus that affects several species and which, in pigs and ruminants, is clinically confused with foot-and-mouth disease.

BINNS et al. (2002) examined extracts from a variety of different species and plant parts from *Echinacea* spp for antiviral activity against HSV-1. Assays were designed to test virucidal activity or viral growth inhibition, and they also incorporated exposure to light in case photosensitizers were involved. The hexane root extract of *E. purpurea* and the ethanol inflorescence extract of *E. sanguinea* showed more substantial antiviral activity.

According to HUDSON et al. (2005) aqueous extracts of *E. purpurea* contain a relatively potent activity against HSV and influenza virus, but not against rhinovirus. In contrast, *E. angustifolia* gave no water-soluble antiviral activity, but the ethanolic fractions contained significant activity against all three viruses. This activity was correlated with the presence of alkaloids. In this study, *E. pallida* gave no antiviral activity in any of the fractions. Another study evaluated an extract of *E. purpurea* against the influenza virus H5N1, H7N7 and swine-origin H1N1, and demonstrated interference with the virus's entry into host cells by blocking its cellular receptor binding activity (PLESCHKA et al., 2009). Furthermore, a controlled clinical study showed that *Echinacea* can reduce the use of antibiotics in children with respiratory disease (OGAL et al., 2021).

More recently, a mixture of *Hypericum perforatum* and *E. purpurea* or *E. angustifolia* in a 1:1 ratio was found to have significant antiviral and virucidal effects against SARS-CoV-2, in a study conducted by BAJRAI et al. (2022). It also described the discovery that small molecules of *E. angustifolia* interact with the RNA polymerase of the Japanese encephalitis virus, making it a promising natural compound inhibiting viral RNA polymerase to be considered in future antiviral drug development studies (YADAV et al., 2022).

At present, there is no specific drug licensed for the treatment of BoHV-1 infections. Although *Echinacea* spp. is commonly used medicinally in humans, there are no records of investigations into the use of *E. angustifolia* against BoHV-1. This study evaluated the antiviral and virucidal, prophylactic, and therapeutic capacity of an ethanolic extract of *E. angustifolia* against BoHV-1 *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

***Echinacea angustifolia* extract**

A tincture of *E. angustifolia* obtained from the whole plant was used, in the form of a 20% ethanolic extract. The extract was produced in accordance with the standards of the Brazilian Pharmacopoeia (ANVISA, 2022).

Cells and virus

The MDBK (Mardin-Darby bovine kidney) cell line and the BoHV-1 Los Angeles (LA) strain, from the biorrepository of the Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), were used for all the tests. The cells were grown in EMEM (Sigma-Aldrich, USA) supplemented with fetal bovine serum, 200 I.U./mL of streptomycin and penicillin (Sigma-Aldrich, USA) and 2.5 µg/mL of amphotericin B (Fungizone, Cristália®, Brazil), at 37 °C and 5% CO₂. The virus was multiplied in cell culture, quantified, and stored at -80 °C until use in the experiments. The viral titer was expressed as the infective dose for 50% of the cell culture (TCID₅₀). All assays were always conducted in triplicate in three independent experiments.

Cytotoxicity assay

The extract's cytotoxicity was evaluated using the neutral red (NR) assay, following the methodology previously described (FERNANDES et al., 2013). NR is a vital dye that incorporates into the vacuoles of viable cells and can be detected spectrophotometrically. Serial dilutions of the *E. angustifolia* extract were added to the MDBK cells and kept for 72 hours, after the NR assay was carried out. The percentage of cell viability was determined using the equation: $AT/AC \times 100$, in which AT is the absorbance of the treated cells and AC the absorbance of the control (untreated cells).

Virucidal activity assay

The direct inactivation capacity was investigated by incubating the BoHV-1 suspension ($10^{6.5}$ TCID₅₀/mL titer) with 0.5% *E. angustifolia* extract for 24 hours at 37 °C, after which its residual infectivity was titrated using the limiting dilution method, as described by KÄRBER (1931). Viral inoculum treated with EMEM without extract was used as a control.

Antiviral assays

Prophylactic activity assay

In order to assess the ability of the *E. angustifolia* extract to prevent or reduce viral replication in treated cells (antiviral activity), confluent MDBK cell cultures had the supernatant medium removed and 0.5% *E. angustifolia* extract added, which was kept in contact with the cells for 1, 3, 6 or 24 hours. After these different periods, the cell supernatant was removed and BoHV-1 was inoculated and titrated on these cells. The titer was read after 72 hours of incubation.

Activity therapeutic assay

To determine the existence of post-infection activity and to detect a significant reduction in replication, MDBK cells were infected with 10^3 TCID₅₀ of BoHV-1 and after 6 or 24 hours were treated with 0.5% *E. angustifolia* extract. After 48 hours of infection, the percentage of cell protection was determined by NR assay, as described.

Expression of mRNA for interferon alpha (IFN α) and beta (IFN β) by qPCR

Expression of mRNA for interferon alpha (IFN α) and beta (IFN β) was assessed by qPCR after 10^6 MDBK cells had been exposed to 0.5% *E. angustifolia* for 3, 6 and 24 hours. After treatment, the cells were collected with *TRI Reagent*® (Sigma-Aldrich, USA) and stored at -80 °C until RNA extraction, according to the manufacturer's recommendations. Only samples with a purity ratio (OD₂₆₀/280) of between 1.8 and 2, determined using a spectrophotometer (*NanoDrop Lite*, Thermo Fisher Scientific Inc., USA), were used. The cDNA was synthesized using the *iScript*™ *cDNA Synthesis Kit* (BIO RAD). The synthesized cDNA was standardized

at 500ng for a final reaction volume of 20 μ L. The samples were stored at -20 °C until qPCR was performed.

In a final volume of 10 μ L, 5 μ L of GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 0.25 μ M of forward primer, 0.25 μ M of reverse primer, 2.4 μ L of DNase and RNase free water, 0.1 μ L of CxR Reference Dye and 2 μ L of sample (1 ng of cDNA) were added. The primers sequences to genes IFN α and IFN β were described by WANG et al. (2021) The qPCR was carried out in a StepOnePlus™ Real-Time PCR System thermal cycler (Applied Biosystems™). The following conditions were used for the detection and quantification of mRNA for IFN α and IFN β : 95 °C for 30 seconds, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 seconds, 62 °C for 30 seconds and finally 72 °C for 3 minutes. The beta-actin (ACTB) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) genes (LEUTENEGGER et al., 2000) were used as endogenous controls under the following reaction conditions: denaturation at 95 °C for 2 minutes, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 seconds and 60 °C for 1 minute. For the melting curve, it was 95 °C for 15 seconds, 55 °C for 1 minute and 95 °C for 15 seconds. The expression of each target in each sample in relation to the expression in the reference cDNA was calculated using the 2- $\Delta\Delta$ CT method (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), standardized in relation to the geometric mean CT of the two reference genes for each sample.

Statistical analysis

To evaluate the qPCR results, *Dunnett's* post-test was applied to make multiple comparisons between the treatments and the control. The endogenous controls also underwent analysis of variance; however, the post-test used in this case was *Tukey's*, for multiple comparisons of the all-against-all type. *Student's t*-test was used for all statistical analyses of antiviral activity. All statistical analyses were carried out using *GraphPad Prism software* version 7. p-values of less than 0.05 (p<0.05) were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Although, *Echinacea* spp. has 9 described species (FLAGEL et al., 2008), preparations of *E. purpurea* are the most widely studied and used (BARRET et al., 2003), and there is little information on *E. angustifolia*. The ethanolic extract of *E. angustifolia* in the present study showed low cytotoxicity, being non-cytotoxic from dilutions $\leq 1\%$ after three days of incubation on MDBK cells. However, in order to ensure a wide safety margin, the tests to assess virucidal, antiviral and therapeutic activities were carried out with 0.5% *E. angustifolia*.

The *E. angustifolia* extract showed a significant anti-BoHV-1 effect. To determine the mode of antiviral action, experiments were conducted at different stages of the viral replication cycle. Initially, cells were treated with 0.5% *E. angustifolia* for 3, 6 or 24 hours prior to infection, to check for protective activity. BoHV-1 could not be detected 72 hours after the viral suspension had been added to the cell culture. Even when the cells were treated only for 1 hour before viral inoculation, there was almost no virus ($10^{0.5}$ TCID₅₀/25 μ l), being in untreated cells BoHV-1 reached a titer of $10^{5.5}$ TCID₅₀/25 μ l (average). Interestingly, when the *Echinacea* extract was added at the same time as the viral inoculation (time 0), no antiviral effect was detected, a fact confirmed in experiments carried out at three independent time points.

To assess whether the observed effect could be due to virucidal action, the 0.5% *E. angustifolia* extract was incubated for until 24 hours with a BoHV-1 suspension, prior to infection and titration in cell culture. Unlike SCHNEIDER et al. (2010) studies which identified anti HSV-1 and HSV-2 virucidal activity of hydroalcoholic extracts from another *Echinacea* specie (*E. pallida*), in the present study no reduction in viral titer was detected. This result indicated that the antiviral activity of *E. angustifolia* is not due to inactivation of the virion.

Immunomodulatory effects have been described for various species of *Echinacea* spp. (DOBRANGE et al., 2019; BURLOU-NAGY et al., 2022). In this sense, hypothesizing that the antiviral effect of *E. angustifolia* observed in the present study occurred due to the

immunomodulatory action on MDBK cells, the relative expressions of type I IFNs (IFN α and IFN β) were evaluated. IFN I are the main cytokines involved in the antiviral response and are produced and secreted by various cell types. Once produced, these cytokines induce the expression of various genes that result in the synthesis of proteins that prevent viral replication (GOODBOURN et al., 2000). Extracts from a wide variety of plants exhibit antiviral activity and IFN-I induction (LIN et al., 2014). In this study, *E. angustifolia* showed anti-inflammatory action, since treatment of MDBK cells for 6 and 24 hours resulted in a significant decrease in the relative expression of IFN α and IFN β mRNA (Figure 1), compared to untreated cells ($p < 0.05$). Thus, the decrease in the relative expression of IFN α or IFN β mRNA indicates that the antiviral activity exerted by *E. angustifolia* observed in this study is not due to the production of these cytokines. Generally, type I IFNs are produced via the activation of pattern recognition receptors (PRRs) in the membrane and cytosol. Negative regulators of type I IFN production target PRRs, intermediate PRR signaling molecules, and interfere with regulatory transcription factors (ARIMOTO et al., 2018). Causes for the hindrance in the relative expression of IFN I have not been investigated.

Due to the significant antiviral activity observed, the study was expanded to evaluate therapeutic activity *in vitro*. When the *E. angustifolia* extract was added to cells that had been infected with 10^3 TCID₅₀ of BoHV-1 for 6 or 24 hours, a significant reduction in the development of a cytopathic effect was observed ($p \leq 0.05$). Untreated infected cells showed 45.8% (average) viability, while 91.1% (average) remained viable when treated 6 hours after infection, or 84.1% (average) 24 hours after infection (Figure 2). Readings were taken 48 hours after viral infection. Both treatments were significant, with no significant difference between them. Taking all the data together, the viral blockade when the extract is added prior to infection, the inability to block BoHV-1 when the extract is added concomitantly with the virus, the absence of virucidal activity and the extract's ability to prevent the production of progeny

up to 24 hours after infection, indicated that the *E. angustifolia* extract probably prevented the adsorption or penetration of the virus, or even viral egress.

When the results of the present study were compared with other studies evaluating antiviral effects, it was observed that many were conducted with the HSV-1, one of the most prevalent among humans, and belonging to the same family as BoHV-1. Aqueous and ethanolic extracts of *E. purpurea* show antiviral activity against HSV-1 and 2 strains that are acyclovir-resistant and acyclovir-susceptible (THOMPSON, 1998). BINNS et al. (2002) observed antiviral activity of alcoholic extracts of various *Echinacea* species (*E. laevigata*, *E. purpurea*, *E. pallida*, *E. angustifolia*, *E. paradoxa*, *E. tennesseensis*, *E. atrorubens* and *E. sanguinea*) against HSV-1 when exposed to ultraviolet light. The activity observed varied according to the *Echinacea* species and the phytochemical fractions of the extracts. Antiviral activity against rhinoviruses, HSV-1 and influenza viruses has also been described using 55 and 70% alcoholic extracts of *E. purpurea*, *E. pallida* and *E. angustifolia* (HUDSON et al., 2005; 2012). The avian strains (H7N7) and (H5N1), influenza viruses A (H1N1) and (H3N2) and the pandemic swine-origin influenza (H1N1) in direct contact with the standard preparation of the *E. purpurea* demonstrated substantial inhibition. Experiments revealed that it is due prevent a virus from entering treated cells (PLESCHKA et al., 2009).

The important components to which activity from *E. angustifolia* can be attributed include high molecular-weight polysaccharides, polyacetylenes, highly unsaturated alkamides, and caffeic acid derivatives (MISTRÍKOVÁ & VAVERKOVÁ, 2006). In ethanolic extract from *Echinacea* spp., at least 20 alkamides are present, mainly isobutylamides of straight-chain fatty acids with olefinic and/or acetylenic bonds, for example isomeric dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraenoic acid isobutylamide (SLOLEY et al., 2001), present in the roots and aerial parts of *E. angustifolia* and *E. purpurea*, but mainly absent from *E. pallida*. Among the natural products

isolated from *E. angustifolia* are a series of diacetylenic amides, which have been shown to be active against larvae (KRAUS & BAE, 2003).

The major flavonoid found in the leaves and stems of *E. angustifolia* has been identified as patuletin-3-rutinoside (LIN et al., 2002). In addition, the following flavonoids have been reported, and occur as both the aglycones and as conjugates with various sugars: luteolin, kaempferol, quercetin, quercetagenin, apigenin, isorhamnetin. Quercetin has been estimated at 0.48% for *E. purpurea* and 0.38% of the leaves for *E. angustifolia* (BAUER, 1998).

Varying mixtures of caffeic acid derivatives are present in being the major component (0.5–1.0%) of the roots of *E. angustifolia* (BARNES et al., 2005). The caffeic acid derivatives (i.e., polyphenolic compounds) present in echinacea include cichoric acid, caftaric acid, echinacoside, chlorogenic acid, and cynarin. Echinacoside being prominent in *E. angustifolia*. Chlorogenic acid generally exist as the minor compounds, and cynarin can only be found in the roots of *E. angustifolia*. Cynarin was reported inhibit replication of Ebola virus (CORONA et al., 2022). Of all the caffeic acid derivatives, cichoric acid, a major active ingredient in *E. purpurea* has been one of the most widely studied (CASTRO et al., 2010), Cichoric acid have activity against vesicular stomatitis virus e HIV (MISTRÍKOVÁ & VAVERKOVÁ, 2006) but is present in smaller amounts in *E. angustifolia* (BAUER, 1998).

The tested extract was not chemically characterized, and we considered this as the major limit of the research worthy to be underlined; nevertheless, the choice of a marketed product produced according to an official pharmacopoeia allowed us to consider the tested sample suitable to be used in in vivo trials and replicate or to go into further detail in in vitro tests. Since ethanolic extracts contain multiple classes of phytochemicals, it is difficult to suggest which isolated compounds may be responsible for the antiviral action observed in this study. Although, it has been suggested that the alkamides present in the ethanolic are responsible for the antiviral effect (HUDSON et al., 2005; 2012), it is generally thought that no single

constituent or group of constituents is responsible for the activities of echinacea. Rather, several groups of constituents (the alkaloids, caffeic acid derivatives, polysaccharides and alkenes (such as polyenes)) appear to contribute to activity (BARNES et al.,2005). Furthermore, it is probably that the antiviral activity observed is due to synergistic and additive effects exerted by the various phytochemicals present in the extract. Plant extracts are generally more potent antiviral inhibitors than pure compounds (DALBY-BROW et al., 2005).

CONCLUSION

The study showed that *Echinacea angustifolia* extract had a significant antiviral and therapeutic effect against bovine alphaherpesvirus 1. This effect is likely due to the inhibition of virus attachment, entry, and/or egress from infected cells. The antiviral activity is not associated with an increase in the expression of the antiviral cytokines IFN α and IFN β . These findings provide strong evidence for further research into the potential of *Echinacea angustifolia* as an anti-BoHV-1 treatment for bovines.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for granting scholarships and the Universidade Federal de Pelotas (UFPel). This work was financed in part by the CAPES, Brasil - Finance code 001.

DECLARATION OF CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All authors contributed equally for the conception and writing of the manuscript. All authors critically revised the manuscript and approved of the final version.

REFERENCES

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1. 6^a Edição, 2022. Available from: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/Volume1.pdf >. Accessed: Aug. 19, 2022.

ARIMOTO, K. I. et al. Negative regulation of type I IFN signaling. **Journal of Leukocyte Biology**, v.103, n. 6, p.1099-1116, 2018. Available from: < <https://doi.org/10.1002/JLB.2MIR0817-342R>>. Accessed: Oct. 18, 2023.

BAJRAI, L.H. et al. In vitro screening of anti-viral and virucidal effects against SARS-CoV-2 by *Hypericum perforatum* and *Echinacea*. **Scientific Reports** v.12, 21723, 2022. Available from: < <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26157-3>>. Accessed: Oct. 18, 2023.

BARNES, J. et al. Echinacea species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n.8, p. 929-954, 2005. Available from: < <https://doi.org/10.1211/0022357056127>>. Accessed: Aug. 18, 2021. doi: 10.1211/0022357056127.

BAUER, R. Echinacea: biological effects and active principles. In: Lawson, L. D., Bauer, R. (eds) **Phytomedicines of Europe: chemistry and biological activity**. American Chemical Society, Washington DC, pp 140–157, 1998. Available from: < <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bk-1998-0691.ch012>>. Accessed: Apr, 24, 2024. doi: 10.1021/bk-1998-0691.ch012

BINNS, S. E. et al. Antiviral activity of characterized extracts from *Echinacea* spp. (Heliantheae: Asteraceae) against herpes simplex virus (HSV-1). **Planta Medica**, v. 68, n.9, p. 780-783, 2002. Available from: < <https://doi.org/10.04.31/s-2002-34397>>. Accessed: Jan, 24, 2023. doi: 10.04.31/s-2002-34397.

BURLOU-NAGY, C. et al. *Echinacea purpurea* (L.) Moench: Biological and Pharmacological Properties. A Review. **Plants**, v. 11, n.9, p.1244, 2022. Available from: <<https://www.mdpi.com/2223-7747/11/9/1244>>. Accessed: Apr. 18, 2023. doi: 10.3390/plants11091244.

CHEMINAT, A. et al. Caffeoyl conjugates from *Echinacea* species: Structures and biological activity. **Phytochemistry**, v.27: p.2787–2794, 1988. Available from: < [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80664-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80664-2)>. Accessed: Feb. 16, 2024.

CORONA, A. et al. Cynarin blocks Ebola virus replication by counteracting VP35 inhibition of interferon-beta production. **Antiviral Research**. v.198:105251, 2022. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105251>>. Accessed: Ap. 21, 2024. doi: 10.1016/j.antiviral.2022.105251

DALBY-BROWN, L. et al. Synergistic antioxidative effects of alkamides, caffeic acid derivatives, and polysaccharide fractions from *Echinacea purpurea* on in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n. 24, p. 9413-9423, 2005. Available from: < <https://doi.org/10.1021/jf0502395>>. Accessed: Aug. 18, 2021. doi: 10.1021/jf0502395.

DOBRANGE, E. et al. Fructans as immunomodulatory and antiviral agents: The case of *Echinacea*. **Biomolecules**, v. 9, n.10, p. 615, 2019. Available from: < <https://doi.org/10.3390/biom9100615>> . Accessed: Oct, 10, 2021. doi: 10.3390/biom9100615.

- FERNANDES, M. H. V. et al. Avaliação da citotoxicidade do peptídeo antimicrobiano p34. **Science and Animal Health**, v.1, p. 02-10, 2013. Available from: <<https://doi.org/10.15210/sah.v1i1.368>>. Accessed: Mai. 15, 2023. doi: 10.15210/sah.v1i1.368.
- FLAGEL, L. E. et al. Phylogenetic, morphological, and chemotaxonomic incongruence in the North American endemic genus *Echinacea*. **American Journal of Botany**, v.95, n.6, p. 756-765, 2008. Available from: <<https://doi.org/10.3732/ajb.0800049>>. Accessed: Mar. 04, 2021. doi: 10.3732/ajb.0800049.
- GOODBOURN, S. et al. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. **Journal of General Virology**, v.81, n.10, p.2341-2364, 2000. Available from: <<https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-10-2341>>. Accessed: Sep. 18, 2023. doi: 10.1099/0022-1317-81-10-2341.
- HUDSON, J. et al. Characterization of antiviral activities in *Echinacea*. Root preparations. **Pharmaceutical Biology**, v.43, n.9, p.790-796, 2005. Available from: <<https://doi.org/10.1080/13880200500408491>>. Accessed: Apr. 17, 2021. doi: 10.1080/13880200500408491.
- HUDSON, J. B. Applications of the phytochemistry *Echinacea purpurea* (Purple Coneflower) in infectious diseases. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 769896, 2012. Available from: <<https://doi.org/10.1155/2012/769896>>. Accessed: Mar. 27, 2023. doi: 10.1155/2012/769896.
- KÄRBER, G. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. **Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie** v. 162, p.480–484, 1931. Available from: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF01863914>>. Accessed: Feb. 16, 2024. doi: 10.1007/BF01863914
- KRAUS, G. A., BAE, J. Synthesis of N-(2-methylpropyl)-2E-undecene-8,10-diamide, a novel constituent of *Echinacea angustifolia*. **Tetrahedron Letters**, v.44, p.5505–5506, 2003.

Available from: <[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(03\)01253-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(03)01253-X)>. Accessed: Ap. 24, 2024.

doi: 10.1016/S0040-4039(03)01253-X

LEUTENEGGER, C. M. et al. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan® polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.77, p.275-287, 2000. Available from: <[https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(00\)00243-9](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(00)00243-9)>. Accessed: Aug. 15, 2022. doi: 10.1016/S0165-2427(00)00243-9.

LIN, L. et al. Patuletin-3-O-rutinoside from the aerial parts of *Echinacea angustifolia*. **Pharmaceutical Biology**. v. 40, p. 92–95, 2002. Available from: <<https://doi.org/10.1076/phbi.40.2.92.5839>>. Accessed: Ap. 23, 2024. doi: 10.1076/phbi.40.2.92.5839

LIN, L. T. et al. Antiviral natural products and herbal medicines. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v.4, p.24-35, 2014. Available from: <<https://doi.org/10.4103/2225-4110.124335>>. Accessed: Jun. 18, 2023. doi: 10.4103/2225-4110.124335.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v.25, n.4, p. 402-408, 2001. Available from: <<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>>. Accessed: Aug. 18, 2021. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

MUYLKENS, B. et al. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. **Veterinary Research**, v. 38, n.2, p. 181-209, 2007. Available from: <<https://doi.org/10.1051/vetres:2006059>>. Accessed: Jan. 10, 2024. doi: 10.1051/vetres:2006059.

OGAL, M. et al. Echinacea reduces antibiotic usage in children through respiratory tract infection prevention: a randomized, blinded, controlled clinical trial. **European Journal of**

Medical Research, v.26, p.1-9, 2021. Available from: <[https://doi.org/ 10.1186/s40001-021-00499-6](https://doi.org/10.1186/s40001-021-00499-6)>. Accessed: Aug. 11, 2023. doi: 10.1186/s40001-021-00499-6.

MISTRÍKOVÁ, I. ; VAVERKOVÁ, Š. Echinacea – chemical composition, immunostimulatory activities and uses. – **Thaiszia – Journal of Botany**, v.16, p. 11-26, 2006. ISSN 1210-0420. 06. Available from: <<http://www.bz.upjs.sk/thaiszia/index.html> >. Accessed: Ap 18, 2024.

PLESCHKA, S. et al. Antiviral properties and mode of action of standardized Echinacea purpurea extract against highly pathogenic avian influenza virus (H5N1, H7N7) and swine-origin H1N1 (S-OIV). **Virology Journal**, v.6, p. 1-9, 2009. Available from: <[https://doi.org/ 10.1186/1743-422X-6-197](https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-197)>. Accessed: Nov. 18, 2023. doi: 10.1186/1743-422X-6-197.

SCHNEIDER, S. et al. Anti-herpetic properties of hydroalcoholic extracts and pressed juice from *Echinacea pallida*. **Planta Medica**, v.76, n.3, p.265-272, 2010. Available from: <[https://doi.org/ 10.1055/s-0029-1186137](https://doi.org/10.1055/s-0029-1186137) >. Accessed: Aug. 22, 2023. doi: 10.1055/s-0029-1186137.

SLOLEY, B.D. et al. Comparison of chemical components and antioxidant capacity of different Echinacea species. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.53, p. 849–857, 2001. Available from: <<https://doi.org/10.1211/0022357011776009>>. Accessed: Ap. 20, 2024. doi: 10.1211/0022357011776009

THOMPSON, K. D. Antiviral activity of Viracea® against acyclovir susceptible and acyclovir resistant strains of herpes simplex virus. **Antiviral Research**, v. 39, n.1, p. 55-61. 1998. Available from: <[https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(98\)00027-8](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(98)00027-8)>. Accessed: Dez. 15, 2023. doi: 10.1016/S0166-3542(98)00027-8.

WANG, Y. X. et al. Melatonin as Immune Potentiator for Enhancing Subunit Vaccine Efficacy against Bovine Viral Diarrhea Virus. **Vaccines**, v. 9, n. 9, p. 1039, 2021. Available from: <<https://doi.org/10.3390/vaccines9091039>>. Accessed: Dez. 18, 2023. doi: 10.3390/vaccines9091039

YADAV, P. et al. Discovery of Small Molecules from *Echinacea angustifolia* Targeting RNA-Dependent RNA Polymerase of Japanese Encephalitis Virus. **Life**. v. 24, n. 12, p. 952, 2022. Available from: < <https://doi: 10.3390/life12070952>>. Accessed: Dez. 18, 2023. doi: 10.3390/life12070952

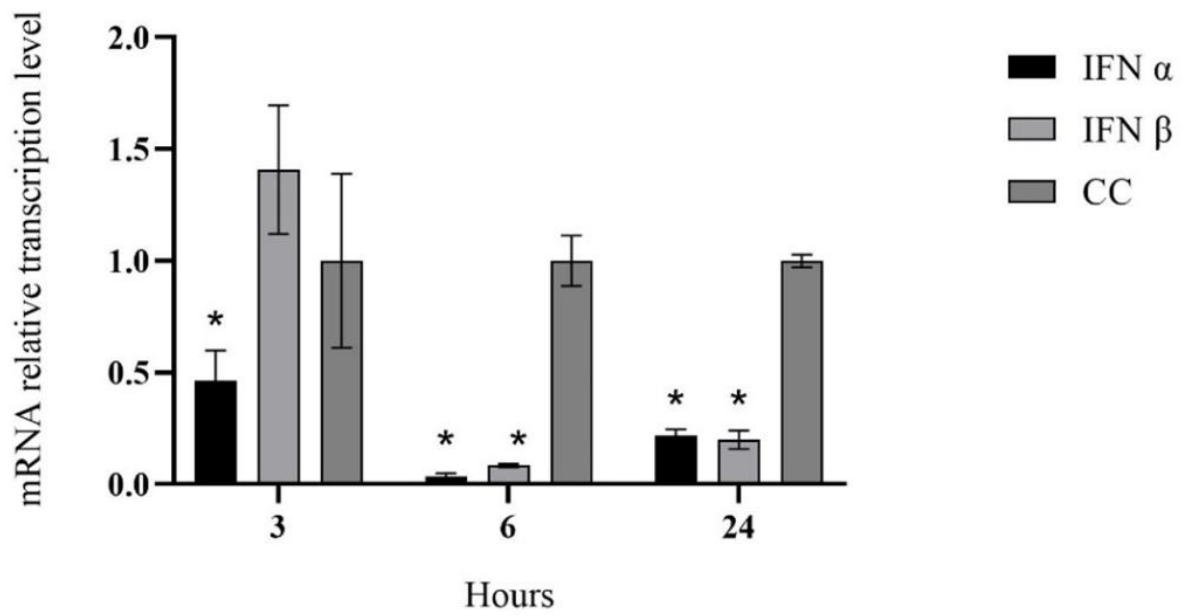


Figure. 1 - Relative expression of interferon alpha (IFN α) and beta (β) messenger RNA after treatment of MDBK cells with 0.5% *E. angustifolia* extract for 3, 6 or 24 hours. CC - control cells, untreated cells. * $P \leq 0.05$.

.....

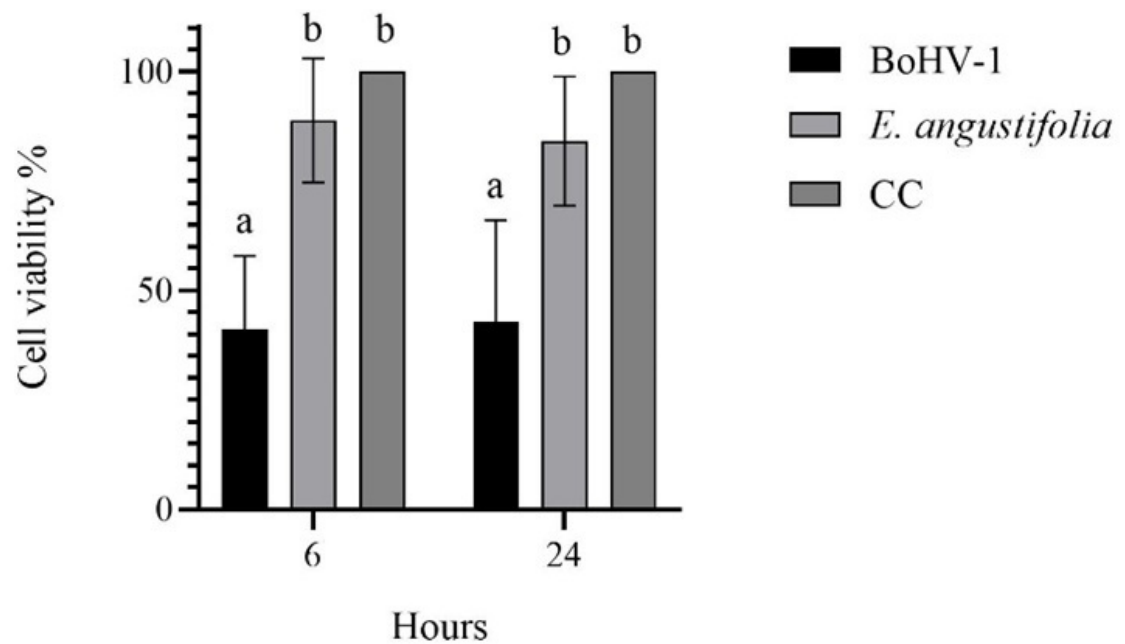


Figure. 2 - MDBK cells were infected with 10^3 TCID₅₀ of bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and after 6 or 24 hours were treated with 0.5% *E. angustifolia* extract. Protection of cells infection was determined by neutral red (NR) dye assay after 48 hours. The experiments were performed at three independent time points in triplicates, and the results are expressed as percentual mean. Treatment with *E. angustifolia* was compared with control cells, not infected cells (CC) and cells infected with BoHV-1 and not treated (BoHV-1); comparison of the groups (a, b) ($P \leq 0.05$).

.....

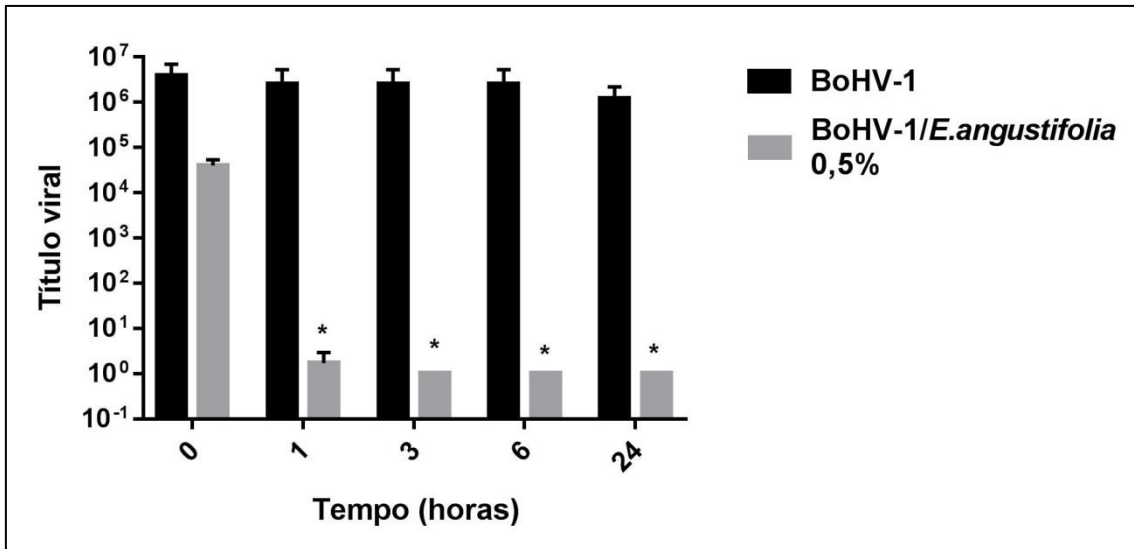


Figura 2 Título do BoHV-1 após diferentes tempos de incubação da *E. angustifolia* a 0,5% em células MDBK. Barras com (*) foram estatisticamente diferentes do controle (BoHV-1 em células não tratadas) ($p < 0,05$).

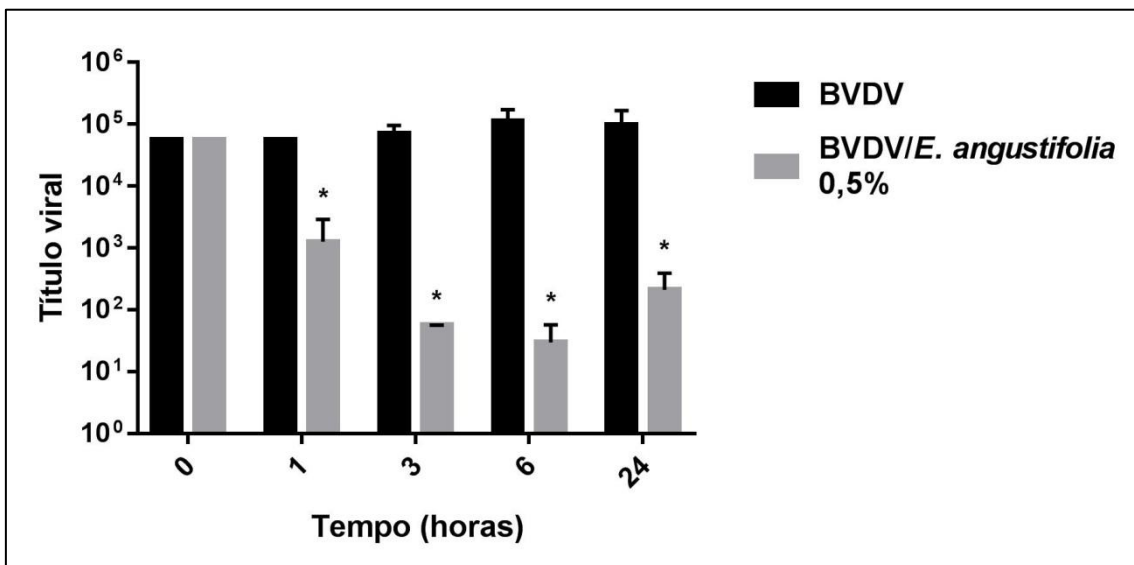


Figura 3 Título do BVDV após diferentes tempos de incubação da *E. angustifolia* a 0,5% em células MDBK. Barras com * foram estatisticamente diferentes do controle (BVDV em células não tratadas) ($p < 0,05$).

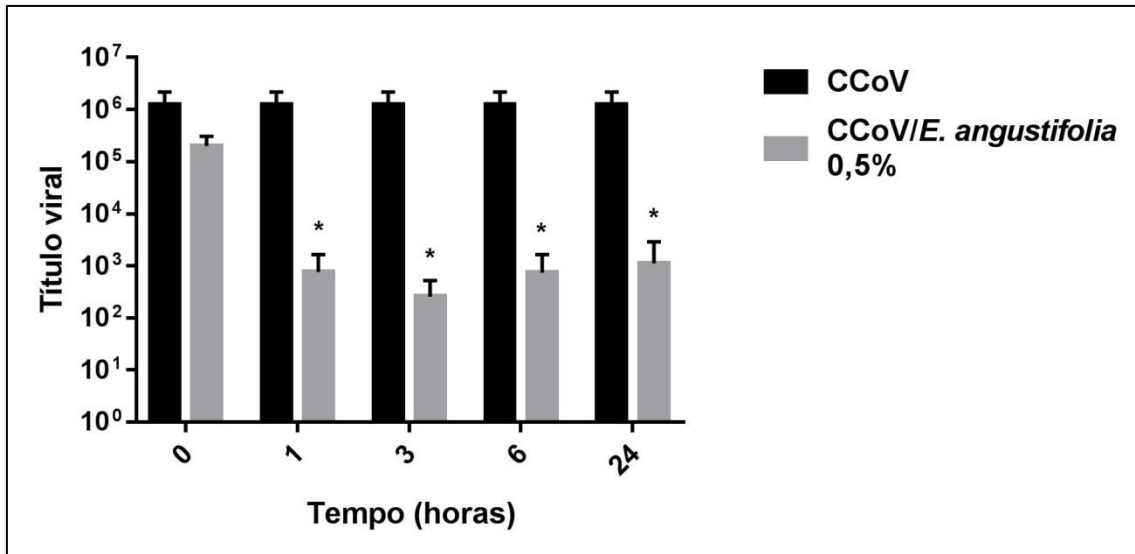


Figura 4 Título do CCoV após diferentes tempos de incubação da *E. angustifolia* a 0,5% em células MDBK. Barras com (*) foram estatisticamente diferentes do controle (CCoV em células não tratadas) ($p < 0,05$).

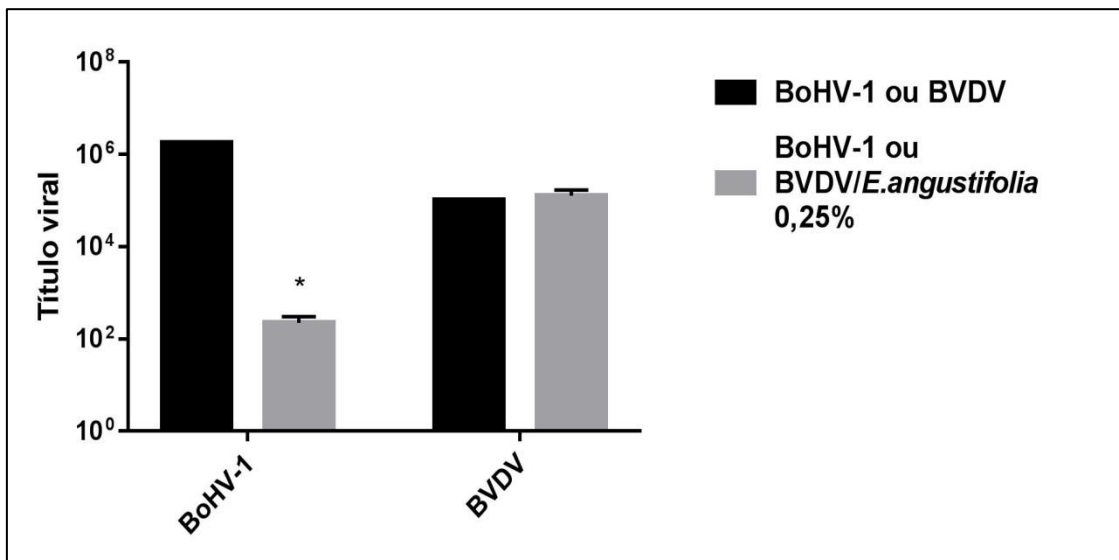


Figura 5 Título do BoHV-1 e BVDV após 1 hora de incubação da *E. angustifolia* a 0,25% em células MDBK. Barras com (*) foram estatisticamente diferentes do controle (BoHV-1 ou BVDV em células não tratadas) ($p < 0,05$).

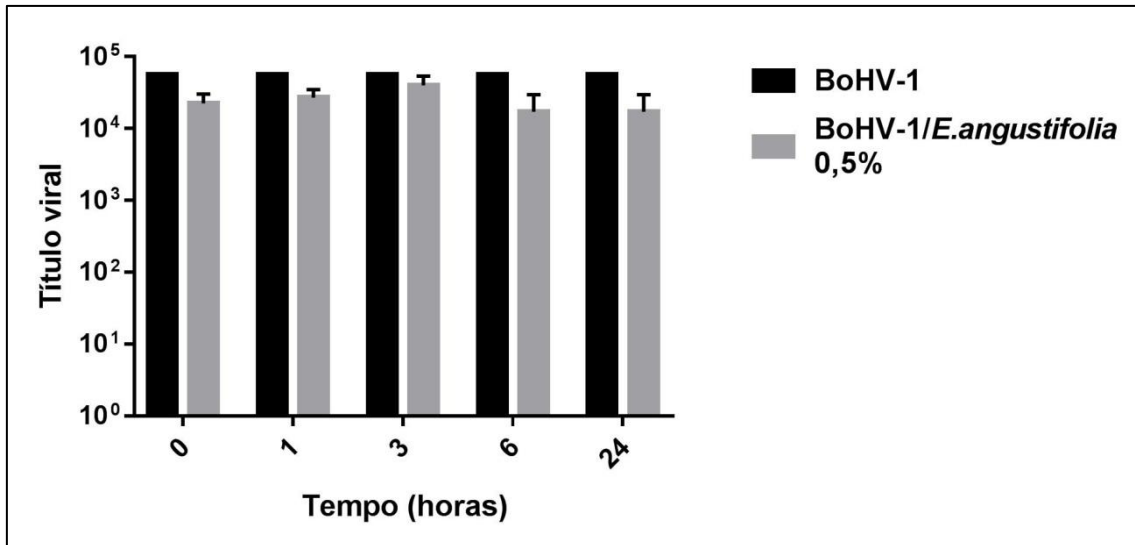


Figura 6 Título do BoHV-1 após diferentes tempos de incubação da *E.angustifolia* a 0,5%. Barras com (*) foram estatisticamente diferentes do controle (BoHV-1 em células não tratadas) ($p < 0,05$).

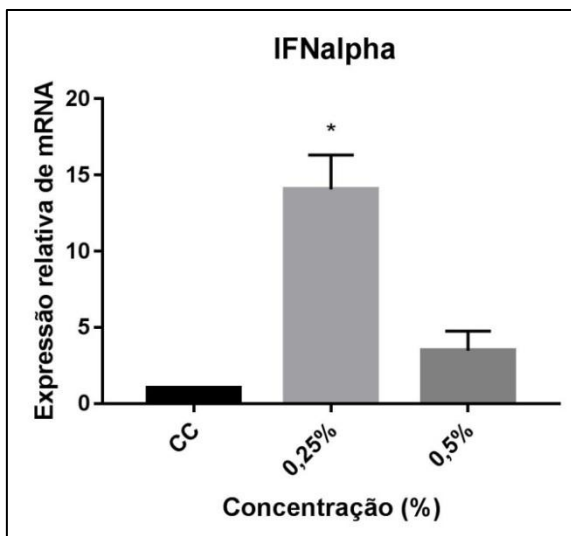


Figura 7 Expressão relativa de mRNA de IFN α com 1 hora de estímulo de *E.angustifolia* 0,25% e 0,5% em MDBK. Barras com (*) foram estatisticamente diferentes do controle negativo (CC) ($p < 0,05$).

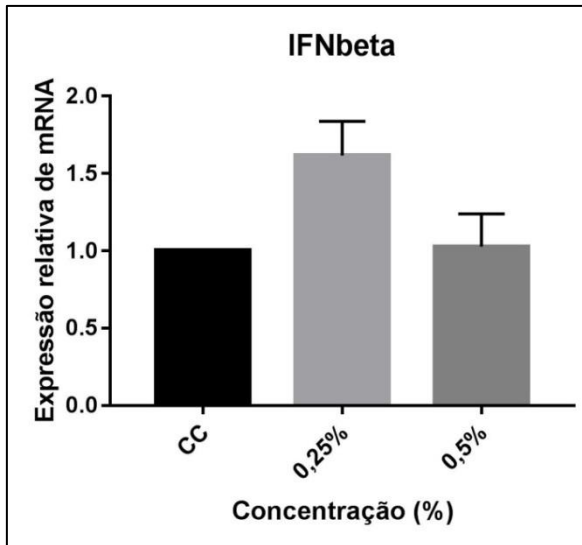


Figura 8 Expressão relativa de mRNA de IFN β com 1 hora de estímulo de *E. angustifolia* 0,25% e 0,5% em MDBK. Barras com (*) foram estatisticamente diferentes do controle negativo (CC) ($p < 0,05$).

Tabela 1 Sequência de *primers* utilizados.

Gene	Sequência (5' - 3')	Referência
ACTB	F - TGTCCACCTTCCAGCAGATG	Bandeira (2015)
	R - CTAGAAGCATTTGCGGTGGA	
GAPDH	F- GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA	Leutenegger et al. (2000)
	R - CCCTCCACGATGCCAAAGT	
IFNα	F - GTGAGGAAATACTTCCACAGACTCACT	Wang et al. (2021)
	R - TGAGGAAGAGAAGGCTCTCATGA	
IFNβ	F- CCTGTGCCTGATTCATCATGA	
	R- GCAAGCTGTAGCTCCTGGAAAG	

4 Considerações Finais

O Brasil possui uma grande biodiversidade, com cerca de 55.000 espécies vegetais catalogadas, representando a maior diversidade genética vegetal do mundo. Mesmo assim, apenas 8% das plantas foram estudadas quanto à presença de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais. Além disso, o país possui um grande potencial para consumo de fitoterápicos, visto que o setor farmacêutico apresenta um crescimento constante no faturamento com estes produtos. Nesse sentido, o aumento de pesquisas científicas buscando elucidar o mecanismo de ação destes fitoterápicos se faz necessária, sendo um amplo mercado a ser explorado e com boas perspectivas. Os resultados apresentados neste estudo mostram um potencial promissor do fitoterápico estudado com uma ação antiviral *in vitro* significativa contra vírus de interesse veterinário. O trabalho representa um passo inicial para estudos posteriores em modelos experimentais *in vivo*, buscando elucidar o mecanismo molecular exato de ação deste composto. Muitas pesquisas já foram feitas com as diferentes espécies de *Echinacea*, porém estudos científicos com *E. angustifolia* ainda é um campo extenso a ser explorado.

Referências

ABRANCHES, M. V. **Plantas Medicinais e Fitoterápicos: abordagem teórica com ênfase em nutrição**. AS Sistemas, cap. 3, p. 45-51, 2015.

AIELLO, N. *et al.* Harvest in different years of growth influences chemical composition of *Echinacea angustifolia* roots. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 1164-1168, 2015.

ANTONIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Fitoterapia na atenção primária à saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, p. 541-553, 2014.

ANVISA, Resolução - RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. Diário Oficial União, 2000.

ANVISA, Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 13 de 14 de Março de 2013, Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos.

ANZILIERO, D. *et al.* Serological response to bovine herpesvirus 1 and 5 and bovine viral diarrhea virus induced by commercial vaccines/Resposta sorológica aos herpesvirus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarreia viral bovina induzida por vacinas comerciais. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 58-64, 2015.

ARDJOMAND-WOELKART, K.; BAUER, R. Review and assessment of medicinal safety data of orally used Echinacea preparations. **Planta medica**, v. 82, n. 01/02, p. 17-31, 2016.

BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 425-445, 1995.

BANDEIRA, F. S. Bacterina de *Staphylococcus aureus* contendo própolis como adjuvante para controle da mastite. 2015. 112f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015

BARNES, J. *et al.* Echinacea species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 8, p. 929-954, 2005.

BERNARDES, C. A. C. G.; SILVA, F. A.; MOLEIRO, F. C. Uso de plantas medicinais pelos moradores do bairro Cohab Tarumã, Tangará da Serra, MT para o tratamento da alergia ou de seus sintomas. *RevBiol Farm*, v. 6, n. 2, p. 161-172, 2011.

BERWICK, A. Aromaterapia holística. **Rio de Janeiro: Record**, 270p, 1996.

BRASIL, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento rural e das Pescas, **MAPA** Decreto-Lei n.º 136/2003, de 28 de junho, in *Diário da República*, Série I-A, n.º 147. 2003.

BRASIL. Decreto nº 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 2006.

BRASIL, Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Assistência farmacêutica na atenção básica: instruções técnicas para sua organização (Série A. Normas e Manuais Técnicos). **Diretrizes para estruturação de farmácias no âmbito do Sistema Único de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2009b.(Série A. Normas e Manuais Técnicos).**

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **PNPIC: Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, Diário Oficial da União, Brasília: 2015.**

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, Diário Oficial da União, Brasília: 2016.**

CARVALHO, A. C. B. *et al.* Regulação brasileira em plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 7, n. 01, 2012.

COSTA, C. T. C. *et al.* Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 11, n. 2, p. 57-60, 2002.

DASGUPTA, A. Anti-inflammatory herbal supplements. In: **Translational inflammation**. Academic Press, p. 69-91, 2019.

DECARO, N; BUONAVOGLIA, C. Canine coronavirus: not only an enteric pathogen. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 41, n. 6, p. 1121-1132, 2011.

DENARO, M. *et al.* Antiviral activity of plants and their isolated bioactive compounds: An update. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 4, p. 742-768, 2020.

DOBRANGE, E. *et al.* Fructans as immunomodulatory and antiviral agents: The case of *Echinacea*. **Biomolecules**, v. 9, n. 10, p. 615, 2019.

ESTEVEES, C. O. *et al.* Medicamentos fitoterápicos: prevalência, vantagens e desvantagens de uso na prática clínica e perfil e avaliação dos usuários. **Revista de Medicina**, v. 99, n. 5, p. 463-472, 2020.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química nova**, v. 33, n. 9, p. 1829-1829, 2010.

FERREIRA, S. S. *et al.* Structure – function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. **Carbohydrate polymers**, v. 132, p. 378-396, 2015.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

GONÇALVES, M. L. Q. Boas práticas para medicamentos fitoterápicos em escala magistral no setor público. 2009. 168f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

GREENE, C. E.; DECARO, N. Canine viral enteritis. In: GREENE, C. E. **Doenças infecciosas em cães e gatos**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 179-186, 2015.

GRUENWALD, J.; BRENDLER, T.; JAENICKE, C. PDR for Herbal Medicines – the information standard for complementary medicines. Montvale Medical Economics Company, 2. ed., 1106p, 2000.

HARAGUCHI, L. M. M. *et al.* Impacto da Capacitação de Profissionais da Rede Pública de Saúde de São Paulo na Prática da Fitoterapia. **Revista brasileira de educação médica**, v. 44, 2020.

HUDSON, J. *et al.* Characterization of antiviral activities in *Echinacea*. Root preparations. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n.9, p. 790-796, 2005.

HUDSON, J. B. Applications of the phytomedicine *Echinacea purpurea* (Purple Coneflower) in infectious diseases. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 769-896, 2012.

KAZIYAMA, V. M.; FERNANDES, M. J. B.; SIMONI, I. C. Atividade antiviral de extratos de plantas medicinais disponíveis comercialmente frente aos herpesvírus suíno e bovino. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 522-528, 2012.

LEUTENEGGER, C. M. *et al.* Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan® polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 77, n. 3-4, p. 275-287, 2000.

LICCIARDI, P. V.; UNDERWOOD, J. R. Plant-derived medicines: a novel class of immunological adjuvants. **International immunopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 390-398, 2011.

- MARINHO, M. L. *et al.* A utilização de plantas medicinais em medicina veterinária: um resgate do saber popular. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 3, p. 64-69, 2007.
- MILLER, L. G. Herbal medicinal: selected clinical considerations focusing on known or potential drug-herb interactions. **Archives of internal medicine**, v. 158, n. 20, p. 2200-2211, 1998.
- MISTRIKOVA, I.; VAVERKOVA, S.; *Echinacea* — chemical composition, immunostimulatory activities and uses. **Thaiszia J Bot**, v. 16, p. 11-26, 2006.
- NEWALL, C. A. *et al.* Fitoterápicos: um guia para profissionais de saúde. Londres: Imprensa Farmacêutica, 320p, 1996.
- PERRY, N. B.; BURGESS, E. J.; GLENNIE, V.. *Echinacea* standardization: analytical methods for phenolic compounds and typical levels in medicinal species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 1702-1706, 2001.
- SENA, J. *et al.* Política intersectorial de plantas medicinais do estado do Rio Grande do Sul: visão docente. *Revista Gaúcha de Enfermagem*, v 28(1): 62-9, 2007.
- SILVA, M. H. S. *et al.* Caracterização demográfica e epidemiológica de cães e gatos domiciliados em Barbacena, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 1002-1006, 2010.
- SILVA, C. R. *et al.* **Panorama dos Antivirais de Ação Direta (AAD) para tratamento da hepatite C e identificação dos medicamentos de interesse para monitoramento com foco na produção nacional.** 2020. 115f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, Fundação Oswaldo Cruz, 2020.
- SU-YANG, L.; SANCHEZ, D. J.; CHENG, G. New developments in the induction and antiviral effectors of type I interferon. **Current opinion in immunology**, v. 23, n. 1, p. 57-64, 2011.
- VIEIRA, L. S. *et al.* Evaluation of anthelmintic efficacy of plants available in Ceará State, North-east Brazil, for the control of goat gastrointestinal nematodes. **Revue de Medicine Vétérinaire**, v. 150, n. 5, 1999.
- WANG, Y. *et al.* Melatonin as Immune Potentiator for Enhancing Subunit Vaccine Efficacy against Bovine Viral Diarrhea Virus. **Vaccines**, v. 9, n. 9, p. 1039, 2021.
- YWATA, C.; ANTÔNIO, J.; CORDEIRO, R.; **Medicina natural: a cura está na natureza.** Editora Três, Cajamar, São Paulo, 548p, 2006.