



AVALIAÇÃO DO EFEITO DE POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DE *STEVIA REBAUDIANA* SOBRE AS PARTÍCULAS DE HERPES SIMPLES TIPO I

Fabiana Ferreira Evangelista (PIBIC/FA), Thalita Zago Oliveira (PIBIC/FA), Mychelle Vianna Pereira Companhoni, Ligia Fernanda Ceole, Tania Ueda-Nakamura (Orientador), e-mail: tunakamura@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área: Ciências da Saúde

Subárea do conhecimento: Farmácia

Palavras-chave: Polissacarídeos de *Stevia rebaudiana*, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Atividade antiviral.

Resumo

O vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1) pertence à família *Herpesviridae* e apresenta DNA de fita dupla; possui tropismo pelo epitélio orolabial, causando lesões brandas, benignas e latentes. Estima-se que cerca de 70-90% da população mundial já entrou em contato pelo menos uma vez com o vírus, mesmo sem manifestar a doença. O tratamento padrão é a administração de análogos de nucleosídeos, como o Aciclovir, que é altamente seletivo. Porém, mutações virais podem selecionar cepas resistentes a este medicamento, que torna necessário o desenvolvimento de pesquisas em busca de novos compostos ativos. A *Stevia rebaudiana*, é uma planta herbácea, e apresenta em sua composição polissacarídeos que possuem atividade anti-herpética mostrados em experimentos *in vitro*. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) o efeito destes polissacarídeos sobre as partículas de HSV-1 na tentativa de compreender o modo de ação destes polissacarídeos.





Introdução

O herpesvírus tipo 1 (HSV-1) é um vírus envelopado com DNA de fita dupla pertencente à família *Herpesviridae*, causador de lesão orofacial branda, benigna e latente, podendo agravar dependendo do estado imunológico do hospedeiro (SANTOS et al, 2008).

O tratamento padrão das infecções herpéticas consiste em administração de análogos de nucleosídeos, como o Aciclovir, que atuam apenas em células infectadas; entretanto, mutações virais podem selecionar cepas resistentes a este medicamento sendo necessária a busca de novos compostos ativos. A *Stevia rebaudiana*, é uma planta herbácea pertencente à família *Asteracea* nativa do Paraguai e do Brasil (REYES et al., 2014). Em sua composição, apresenta diversos polissacarídeos com várias atividades biológicas já descritas, dentre elas, destaca-se a atividade antiviral, previamente observada pelo nosso grupo de pesquisa, onde os polissacarídeos extraídos da *S. rebaudiana* (PS-2 e PS-4) apresentaram atividade anti-herpética nas etapas iniciais da infecção viral (adsorção e penetração), e também um efeito de neutralização (CEOLE et al., 2013). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) o efeito destes polissacarídeos sobre as partículas de HSV-1.

Materiais e métodos.

Obtenção dos extratos de polissacarídeos

Os extratos de polissacarídeos da *S.rebaudiana* foram obtidos em parceria com Prof. Dr. Arildo José Braz de Oliveira, no Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais e Sintéticos, seguindo a metodologia descrita em Oliveira et al. (2013)

Manutenção da cultura de células, propagação e titulação do vírus.

Células Vero (ATCC CCL-80) mantidas em estufa úmida à 37 °C, tensão de 5% de CO₂ foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) e 50µg/ml de gentamicina em frascos de cultura. Os vírus HSV-1 (cepa KOS ou isolado clínico/aciclovir resistente) foram propagados em células Vero e titulados em monocamadas de células Vero cultivadas em placas de 24 poços para determinar a diluição capaz de produzir cerca de 60-80 unidades formadoras de placas (UFP) por mL. A

2





suspensão viral foi então separada em alíquotas de 150 μ L e armazenada a -20°C .

Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras de microscopia foram preparadas de acordo com Hong et al., (2014), com algumas modificações. Para isto, suspensões virais da cepa KOS ou isolados clínicos do vírus foram tratados com os polissacarídeos P2 e P4, durante 1h a 37°C . Amostras sem tratamento, incubada apenas com meio de cultura sob as mesmas condições, serviram de controle. As amostras foram depositadas sobre grades de cobre recobertas com formar/carbono (200mesh), e em seguida submetidas à contrastação negativa com ácido fosfotúngstico 2%, expostas à luz UV e secas ao ar (fluxo laminar). Várias regiões das grades foram observadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM-1400, operado a 80kV e as imagens capturadas.

Resultados e Discussão

As partículas de HSV-1 apresentam envelope de natureza lipídica onde encontram-se glicoproteínas responsáveis pela adsorção do vírus à superfície da célula hospedeira e pelo processo de penetração do vírus na célula. Assim, o bloqueio ou a interferência na interação vírus-célula poderá prevenir a infecção. Os resultados obtidos por Ceole et al. (2013) no ensaio de redução de placas mostraram que o tratamento prévio do vírus com os polissacarídeos foi capaz proteger as células contra a infecção pelo HSV-1. No presente estudo demonstramos que as partículas de HSV-1 tratadas com diferentes concentrações dos polissacarídeos e preparadas para visualização ao MET aparecem circundadas com material elétron-denso sugerindo que os polissacarídeos estariam bloqueando receptores virais ou danificando o envelope viral.

Conclusões

As imagens obtidas até o momento mostram que os polissacarídeos extraídos da *S. rebaudiana* envolvem as partículas virais, sugerindo um efeito de neutralização do vírus, ou seja, os polissacarídeos podem interferir na ligação do vírus HSV-1 aos receptores da célula hospedeira. No entanto, estes resultados são preliminares, e necessitam de confirmação.





Agradecimentos

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação Araucária (Convênio 2143/14), CAPES, CNPq e FINEP. A Microscopia eletrônica foi realizada no COMCAP (Complexo de Centrais de apoio à Pesquisa) da UEM.

Referências

CEOLE, L. F. Polysaccharides from leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) and anti-herpesvirus properties. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 79, p. 1159, 2013.

HONG, W.; LI, T.; SONG, Y.; ZHANG, R.; ZENG, Z.; HAN, S.; ZHANG, X.; WU, Y.; LI, W.; CAO, Z. Inhibitory activity and mechanism of two scorpion venom peptides against herpes simplex virus type 1. **Antiviral Research**, v. 102. P. 1-10, 2014.

OLIVEIRA, A.J.B.; CORDEIRO, L.M.C.; GONÇALVES, R.A.C.; CEOLE, L.F.; UEDA-NAKAMURA, T.; IACOMINI, M. Structure and antiviral activity of arabinogalactan with (1→6)- β -galactan core from *Stevia rebaudiana* leaves. **Carbohydrate Polymers**, London, v.94, n.1, p. 179-184, 2013.

REYES, R.S; HERRERA, M.S; MENACHO, L.P. Study of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) as a natural sweetener and its use in benefit of the health. **Scientia Agropecuaria** - Revista Científica de la Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, v. 5, n. 3, p. 157-163, 2014.

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

