

AVALIAÇÃO *in vitro* DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTI-HSV-1 DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Coffea arabica* E *Coffea canephora*

Débora Gimenes Vianna (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Carolina Salinas de Moraes, Dyenefer Pereira Fonseca, Prof. Dr^a Tania Ueda Nakamura (Orientadora), e-mail: tunakamura@uem.br

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

Área e subárea do conhecimento: Farmácia, Farmacognosia.

Palavras-chave: Herpes simples tipo 1 (HSV-1), *Coffea canephora*, *Coffea arabica*.

Resumo:

O vírus Herpes simples tipo 1 (HSV-1) é um vírus envelopado, responsável por lesões orofaciais e está amplamente difundido na população mundial. O tratamento das infecções causadas pelo HSV-1 pode ser feito pela administração de análogos de nucleosídeos, no entanto, a seleção de cepas virais resistentes, evidencia a necessidade de métodos alternativos de tratamento. O café é uma planta pertencente ao gênero *Coffea*, sendo as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* de grande importância econômica, tendo diversos constituintes em sua composição, dentre eles a cafeína e o ácido clorogênico, substâncias com atividades biológicas descritas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi a investigação da citotoxicidade e atividade antiviral *in vitro* pelo método do MTT dos extratos hidroetanólicos de grãos verdes de ambas as espécies. Os resultados mostram que os extratos hidroetanólicos das duas espécies de café testadas não apresentam toxicidade *in vitro* e possuem atividade biológica sobre HSV-1.

Introdução

O HSV-1 é um vírus envelopado, com DNA de fita dupla, amplamente distribuído na população mundial. O HSV-1 é transmitido por contato direto entre um indivíduo portador de lesões vesiculares e outro sadio. A infecção primária é caracterizada por lesões orofaciais que, em geral, é benigna, se agravando com o estado imunológico do hospedeiro (SANTOS et al., 2015).

A terapia anti-herpética padrão é realizada por análogos de nucleosídeos, como o aciclovir, que age seletivamente em células infectadas. Porém, mutações no DNA viral podem selecionar cepas resistentes, inviabilizando o tratamento (DE CLERCQ, 2004; PIRET, BOIVIN, 2011) e, tornando a busca por outros tratamentos contra o HSV-1 necessária.

O Brasil é líder na produção e exportação de café, o café verde possui constituintes importantes, como a cafeína e o ácido clorogênico, substâncias com atividade antiviral. Para tornar-se próprio ao consumo, os grãos de café passam por torrefação, processo que gera mudanças químicas de compostos presentes nos grãos (FARAH, 2012). Sendo assim, o estudo da atividade biológica dos grãos de café verde tem grande importância, pois não há perda de bioativos. Diante disso, se objetiva nesse trabalho a avaliação da citotoxicidade e eficácia anti-HSV-1 *in vitro* dos extratos hidroetanólicos de grãos de café verdes das espécies *C. arabica* e *C. canephora*.

Materiais e métodos

Obtenção dos Extratos Hidroetanólicos (EH) de C. arabica e C. canephora

A obtenção dos extratos hidroetanólicos, seguiu metodologia descrita por Babova e colaboradores (2016), em que 600 g de grãos de café verde das espécies *C. arabica* e *C. canephora* foram moídos e passados em tamis com abertura de 2 mm. Utilizou-se a proporção de 20 g de material peneirado para 100 mL de líquido extrator composto de etanol:água destilada (1:1). A solução foi submetida ao processo de maceração ao abrigo da luz, durante 7 dias. Após extração, a solução foi concentrada em rotaevaporador (modelo: R-200 - Büchi) a uma temperatura de 40°C e liofilizado (Liofilizador Christ ALPHA 1-4 LD plus). Por fim, sendo armazenado em freezer (-20°C). Os grãos de café verde foram fornecidos gentilmente pela Cocamar Cooperativa Agroindustrial de Maringá.

Cultura e manutenção de células e vírus

Os ensaios foram realizados em células VERO (CCL-81 – ATCC) cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 10% de soro fetal bovino (SFB), mantidas em estufa úmida 37°C, 5% de CO₂ (Sanyo MCO-17AC). Nos ensaios antivirais foi utilizada cepa KOS de HSV-1 (sensível ao aciclovir), previamente propagadas e tituladas, com diluições seriadas do vírus (1:10) para determinar o TCID₅₀ (dose infectiva de 50%).

Ensaio de citotoxicidade e atividade antiviral pelo método do MTT

Placas de 96 poços foram preparadas com monocamada de células Vero e incubadas a 37 °C até confluência. Os EH *C. canephora* e *C. arabica* e, as substâncias padrões (cafeína e ácido clorogênico), foram diluídas seriadamente (1:2) e aplicadas sobre monocamada celular em triplicada. A placa foi incubada por 72h, em estufa úmida 37°C, 5% CO₂. Em seguida, foi realizado o ensaio de viabilidade celular pelo método colorimétrico do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]). Foram realizados três ensaios independentes.

Para o ensaio de atividade antiviral foram preparadas monocamadas de células Vero em placas de 96 poços até confluência. A monocamada foi infectada com o vírus HSV-1 (cepa KOS) de suspensão viral TCID₅₀ e incubadas por 1h, 37°C, 5% CO₂. Sobre a monocamada infectada, foram adicionadas diluições seriadas (1:2) dos EH e das substâncias padrões, incubadas por 72h a 37°C, sendo depois submetidas ao teste do MTT.

Resultados e Discussão

Características e rendimento dos extratos hidroetanólicos

Após a liofilização, os extratos apresentaram como características: o EH de *C. arabica* aspecto graxoso, cor esverdeada e rendimento de 10,40% (62,39 g). Já o EH de *C. canephora* tornou-se pó, com cor esverdeada e rendimento de 10,71% (64,28 g).

Citotoxicidade e atividade antiviral pelo método de MTT

A avaliação da citotoxicidade e atividade anti-herpética dos EH de *C. arabica* e *C. canephora* tem descrito os resultados na tabela a seguir:

Tabela 1. Ensaios de citotoxicidade e atividade antiviral dos extratos.

AMOSTRAS	VERO	HSV-1 (Cepa KOS)	
	CC ₅₀ ± DP	EC ₅₀ ± DP	IS
<i>C. arabica</i>	356,7±25,0	269,3±18,6	1,3
<i>C. canephora</i>	328,3±34,0	91,0±13,5	3,6
Cafeína	590,0±60,0	>500	-
Ac. Clorogênico (3-CQA)	92,0±6,2	>100	-
Aciclovir*	1020,0±56,6	0,15±0,01	6800

CC₅₀=Concentração tóxica para 50% das células (µg/mL); EC₅₀=concentração que inibiu 50% da infecção viral (µg/mL); IS = Índice de seletividade (CC₅₀/EC₅₀); DP = Desvio Padrão; * utilizado como controle positivo de atividade anti-HSV-1.

Os resultados mostraram que em concentração capaz de proteger 50% das células contra a infecção pelo HSV-1 (cepa KOS) o EH de *C. canephora*, não foi tóxico para as células. Os resultados da avaliação *in vitro* de citotoxicidade e atividade anti-HSV-1 método do MTT, expressos como CC₅₀ e EC₅₀, respectivamente, mostraram um índice de seletividade (IS) igual a 3,6. Enquanto que o EH de *C. arabica* foi ativo em uma concentração muito próxima à do CC₅₀, apresentando menor índice de seletividade quando comparado ao *C. canephora*.

Na atividade antiviral pelo método de MTT, a cafeína e ácido clorogênico não apresentaram atividade anti-HSV-1 nas concentrações testadas. Esses resultados indicam que outros componentes nos extratos podem ser os responsáveis pela atividade anti-herpética. Tendo a possibilidade de existir um efeito combinatório das substâncias presentes, efeito frequentemente observado em extratos bruto.

Conclusões

Os EH de *C. arabica* e *C. canephora* apresentaram CC_{50} similares. Na avaliação da atividade anti-HSV-1 *in vitro* pelo método de MTT, o EH de *C. canephora* foi ativo em uma menor concentração tendo melhor índice de seletividade em relação ao *C. arabica*. Todavia, ainda é necessária a realização de outros ensaios para elucidação da composição química e mecanismo de ação dos extratos.

Agradecimentos

O presente trabalho recebeu apoio financeiro do CNPq.

Referências

BABOVA, O.; OCCHIPINTI, A.; MAFFEI, M. A. Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin. **Phytochemistry**, v. 123, p. 33–39, 2016.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of clinical virology**, v.30, p. 115-133, 2004.

FARAH, A. Coffee Constituents. **Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention**, John Wiley & Sons, p. 21–58, 2012.

PIRET, J.; BOIVIN, G. Resistance of herpes simplex vírus to nucleoside analogues: mechanism, prevalence and management. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, p. 459-472, 2011.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M., T., V.; WIGG, M. D. **Virologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 3 ed., 2015.