

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DA ATIVIDADE ANTI-HSV-1 DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES DA ORQUÍDEA *Stanhopea lietzei*

Débora Gimenes Vianna (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Dyenefer Pereira Fonseca, 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), *Stanhopea lietzei*, atividade antiviral.

Resumo:

O Herpes simples tipo 1 (HSV-1) pertencente à família *Herpesviridae*, é um vírus envelopado de DNA fita dupla, associado a uma patologia muito frequente na população. As manifestações clínicas comumente ocasionadas são lesões orofaciais avermelhadas, com presença de vesículas, que podem evoluir para quadros mais graves, como encefalite viral e ceratite herpética. O tratamento anti-herpético frequentemente empregado é promovido por fármacos análogos de nucleosídeo, como o aciclovir, pró-fármaco que atua bloqueando o ciclo da replicação viral. Entretanto, devido a mutações que afetam a ação desse fármaco, o tratamento não tem obtido a mesma eficácia, evidenciando a necessidade da busca por substâncias alternativas para a terapia anti-herpética. As orquídeas têm sido utilizadas para o tratamento de grande número de enfermidades há muitos séculos. Dentro desse contexto, a *Stanhopea lietzei*, espécie que pertence à família *Orchidaceae*, gênero *Stanhopea*, possui substâncias com comprovada atividade biológica, tais como indol e o linalol. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi a investigação da citotoxicidade e atividade antiviral *in vitro* pelo método do MTT do extrato bruto e frações da orquídeia *Stanhopea lietzei*. Os resultados demonstraram que das três amostras testadas, a fração hexano foi a menos citotóxica, tendo somente o extrato bruto atividade antiviral *in vitro*.

Introdução:

O Herpes simples tipo 1 (HSV-1) é um vírus envelopado de DNA fita dupla, amplamente difundida entre a população mundial. Clinicamente sua manifestação é caracterizada pela formação de lesões orofaciais avermelhadas com presença de vesículas, podendo haver febre, desaparecendo as lesões em cerca de 8 a 10 dias (WHITLEY; ROIZMAN, 2001). Casos mais severos da doença estão relacionados à encefalite viral e ceratite herpética, sendo esses quadros potencialmente fatais (PACHOTA et al, 2017).

A primo-infecção ocorre através do contato entre mucosas de um indivíduo que apresenta lesões com um indivíduo sadio (WHITLEY; ROIZMAN, 2001). As lesões surgem no epitélio estratificado escamoso, e posteriormente o vírus tende a se instalar nos gânglios da base, onde após um curto estágio de replicação, torna-se latente (WHITLEY; ROIZMAN, 2001). Quando desencadeada por fatores que podem

ser endógenos e/ou exógenos, como infecções, traumas ou stress, o vírus apresenta-se em ciclo lítico, o que resulta no reaparecimento das manifestações clínicas.

O tratamento anti-herpético frequentemente empregado é por meio de fármacos análogos de nucleosídeo, como o aciclovir, pró-fármaco que causa bloqueio no ciclo de replicação do vírus. Entretanto, devido a mutações que afetam seu mecanismo de ação, esse tipo de tratamento não tem obtido a mesma eficácia, sendo necessária a busca por substâncias alternativas para a terapia herpética (WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

A *Stanhopea lietzei* trata-se de uma espécie pertencente à família *Orchidaceae*, Gênero *Stanhopea*. Planta nativa da região de mata atlântica, a *S. lietzei* é composta em maior parte por benzoato de benzila, possuindo demais constituintes como indol, linalol e cânfora (REIS et al., 2004). O indol e o linalol são as duas moléculas que obtém maior destaque por seu potencial de atividade antiviral. O indol em sua forma natural possui ação contra o processo inicial de replicação viral (ZHANG et al, 2015). O linalol apresenta atividade anti adenovirus, tendo efeito inibitório, o mecanismo pelo qual isso se dá ainda não está completamente elucidado (CHIANG et al., 2005).

Dessa forma, o presente trabalho tem como propósito a análise da atividade citotóxica e antiviral *in vitro* do extrato bruto e de frações da espécie *S. lietzei*.

Materiais e métodos:

Amostras

O extrato bruto e as frações obtidos das raízes, rizomas, pseudobulbos e folhas da planta *Stanhopea lietzei*, foram fornecidos pelo professor Dr. Armando Mateus Pomini do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá. O Aciclovir (Sigma-Aldrich®) foi empregado como controle positivo dos ensaios antivirais *in vitro*. O extrato bruto e a fração hexano foram dissolvidos em diclorometano/PBS (Solução tampão fosfato), respectivamente nas proporções 1:2 e 1:4. A fração etanólica foi preparada com dimetilsulfóxido (DMSO). Para os ensaios de citotoxicidade e antiviral *in vitro* foram realizados os controles dos solventes. Em sequência, as amostras foram submetidas à filtração com membrana de éster de celulose com poros de membrana de 0,22 µm de diâmetro.

Cultivo celular e de vírus

Os ensaios foram realizados em células VERO (Células Epiteliais de Rim de Macaco Verde Africano), cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em estufa úmida 37°C, 5% de CO₂.

Para os ensaios de atividade antiviral foi utilizado HSV-1 cepa KOS (sensível ao aciclovir), previamente propagadas e tituladas, com diluições seriadas do vírus para determinar o TCID₅₀ (dose infectiva para 50% das células).

Ensaio de Citotoxicidade e atividade antiviral pelo método de MTT

O ensaio de citotoxicidade do extrato bruto e das frações de *Stanhopea lietzei* foi realizado em placas de 96 poços preparadas com monocamada de células VERO. Diluições seriadas dos compostos (15,62, 31,25, 62,5, 125, 250 e 500 µg/mL) foram adicionadas sob a monocamada e a placa foi incubada por 72h, a 37°C e 5% de CO₂. Ao término do período de incubação, foram reveladas pelo método colorimétrico de MTT, (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetra-zólio]). Foram realizados dois experimentos independentes.

Para o ensaio da atividade antiviral monocamadas celulares foram cultivadas em placa de 96 poços e incubadas até confluência. Em sequência, foi adicionado 25 µL (TCID₅₀) do HSV-1 (cepa KOS) e incubada por 1 h. Posteriormente, nos poços controle de vírus foram adicionados DMEM e nos poços testes diluições seriadas das amostras (3,12, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 µg/mL). A placa foi incubada por 72 h e a revelação feita pelo método colorimétrico do MTT. Foram realizados dois experimentos independentes.

Resultados e Discussão:

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* (Tabela 1) revelaram que o extrato bruto e a fração etanólica de *Stanhopea lietzei* apresentam CC₅₀ semelhantes, com média de 475 e 395 µg/mL. Por outro lado, a fração Hexano mostrou menos tóxica, portanto, até a maior concentração testada (500 µg/mL) não foi possível determinar o CC₅₀.

O ensaio antiviral *in vitro* demonstrou que das três amostras, o extrato bruto apresentou melhor atividade anti-HSV-1 nas concentrações testadas, com valor de EC₅₀ igual a 72,5 µg/mL. A fração etanólica e a fração hexano apresentaram valores superiores à maior concentração utilizada no ensaio, ou seja EC₅₀ >100 µg/mL.

Entre as amostras avaliadas, o extrato bruto de *Stanhopea lietzei* foi o único a apresentar atividade antiviral. Não foi possível determinar o índice de seletividade (IS) pois o CC₅₀ médio encontrado foi maior que 475, mas pode-se deduzir que o IS é maior que 6,5. Provavelmente nas demais frações testadas, o solvente utilizado não tenha extraído as substâncias responsáveis pela atividade antiviral que foi observada para o extrato bruto. Para os ensaios de antiviral foi utilizado o Aciclovir como controle positivo, tendo sido obtido valor de EC₅₀ de 0,64 ± 0,04 µg/mL. Foi feito também controle de diclorometano/PBS com a maior concentração testada, não tendo sido observada atividade sobre as células e o vírus.

Tabela 1: Citotoxicidade e atividade anti-HSV-1 (cepa KOS) pelo método do MTT.

| | CC ₅₀ (µg/mL) | EC ₅₀ ± DP |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Extrato Bruto | >475 | 72,5 ±12,0 |
| Fração Etanólica | 395 | >100 |
| Fração Hexano | >500 | >100 |
| Aciclovir (controle) | >500 | 0,64 ± 0,04 |

CC₅₀ = Concentração citotóxica 50%; EC₅₀ = Concentração efetiva 50% da infecção Viral;

Conclusões:

Dentre as amostras avaliadas, o extrato bruto de *Stanhopea lietzei* foi o único a apresentar atividade anti-HSV-1. Os ensaios antivirais realizados para as demais frações não demonstraram atividade nas concentrações testadas, sendo necessária a realização de ensaios utilizando maiores concentrações. Levando em consideração os resultados obtidos por esse trabalho, são necessários mais testes para avaliar quais são as substâncias responsáveis pela atividade antiviral do extrato bruto, assim como, o mecanismo de ação dessas substâncias.

Agradecimentos:

Agradeço a Thalita Zago e Leandro Martin, pela paciência, atenção e esclarecimento para a execução deste trabalho. Assim como, ao apoio financeiro recebido dos órgãos de fomento FA e CNPq.

Referências:

CHIANG, L.; NG, L.; CHENG, P.; CHIANG, W.; LIN, C. Antiviral activities of extracts and selected pure pure constituents of *Ocimum basilicum*. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 32, p. 811–816, 2005.

REIS, M. G.; PANSARIM, E. R.; SILVA, U. F.; AMARAL, M. C. E.; MARSAIOLI, A. J. Pollinator attraction devices (floral fragrances) of some Brazilian orchids. **ARKIVOC**, v. 6, p. 103-111, 2004.

PACHOTA, M.; KLYSIK, K.; SYNOWIEC, A.; CIEJKA, J.; SZCZUBIALKA, K.; PYRC, K.; NOWAKOWSKA, M. Inhibition of herpes simplex viruses by cationic dextran derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 8620-8630, 2017.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **Lancet**, v. 357, p.1513-1518, 2001.

ZHANG, M.; CHEN, Q.; YANG, G. A review on recent developments of indole-containing antiviral agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, p. 421-441, 2014.