INVESTIGAÇÃO SAZONAL DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIVIRAL DE EXTRATOS BRUTOS DE FOLHAS DE *Cordia americana*

Ana Luiza Carvalho Vieira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Tania Ueda Nakamura (Orientadora), Gislaine Franco de Moura Costa (Coorientadora) e André Henrique dos Santos. E-mail: ra117114@uem.br.

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

Área e sub-área de conhecimento: Farmácia/Farmacognosia

Palavras-chave: *Boraginaceae*; extratos hidroalcoólicos; herpes simples tipo 1.

RESUMO

O vírus herpes simples tipo 1 (HSV-1) causa lesões na pele e mucosas, capazes de assumir estado de latência e reativação periódica. O fármaco mais utilizado para o tratamento da Herpes é o aciclovir, um análogo de nucleosídeo. Porém, estes pacientes, necessitam de repetidos tratamentos com o fármaco, o que gera o surgimento de cepas resistentes ao aciclovir, sendo assim necessária a busca por substâncias alternativas. A *Cordia americana*, uma planta que se encontra amplamente distribuída pelo território nacional, apresenta grande potencial medicinal e é pouco estudada. Nenhum estudo foi realizado sobre o melhor período do ano para se realizar a coleta do material vegetal, de modo a se obter uma melhor atividade biológica. Deste modo, o objetivo deste estudo foi verificar a atividade biológica, em particular a atividade antiviral e citotoxicidade dos extratos brutos de *C. americana*, de acordo com variação sazonal. Foi observado um melhor índice de seletividade nos meses de dezembro/2021 e janeiro/2022, seguido dos meses de julho/2021.

INTRODUÇÃO

A família *Herpesviridae* possui 9 espécies capazes de infectar seres humanos. Em 2022, a OMS estimou que cerca de 67% da população mundial com idade inferior a 50 anos, teve infecção por HSV-1 (WHO, 2023). A principal manifestação clínica da infecção primária causada pelo HSV-1 é a gengivoestomatite herpética e infecção da orofaringe. Por assumirem estado de latência com reativação periódica, em pacientes imunossuprimidos podem gerar quadros de infecção grave, podendo levar a óbito. O fármaco mais utilizado para o tratamento é o Aciclovir, um fármaco capaz de inibir a replicação viral. Nesse contexto, pacientes que necessitam de repetidos tratamentos com o fármaco, propiciam o surgimento de cepas resistentes aos antivirais análogos aos nucleosídeos, sendo assim necessária a busca por ativos alternativos. O gênero *Cordia* é o mais numeroso da família *Boraginaceae* e abrange árvores e arbustos, sendo que no Brasil estão descritas cerca de 65 espécies, que têm sido utilizadas para o tratamento de diversas doenças. Extratos hidroalcoólicos

obtidos de folhas de *Cordia americana* apresentaram atividade anti-HSV-1 (MOURA-COSTA et al., 2021) mostrando um índice de seletividade promissor. Vários fatores, tais como o ciclo biológico e a variação sazonal, podem influenciar na composição química e consequentemente na atividade biológica dos extratos brutos obtidos das plantas. Considerando que a *Cordia americana* é uma árvore, cuja floração ocorre de setembro a novembro, com frutificação logo em seguida, de novembro a dezembro, o presente estudo teve como objetivo avaliar a variação da atividade anti-HSV-1 de extratos de plantas coletadas ao longo de um ano.

MATERIAIS E MÉTODOS

EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS A PARTIR DE Cordia americana

Os extratos brutos hidroalcoólicos a 50% foram obtidos a partir de folhas coletadas mensalmente do espécime de *Cordia americana* (Moura-Costa et al. 2021) da mata nativa localizada na região rural do município de Maringá - Pr, A exsicata está depositada no Herbário da UEM, sob o número HUEM 36972.

CULTIVO E MANUTENÇÃO DA LINHAGEM CELULAR

Células VERO (CCL-81–ATCC) foram cultivadas em DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de antibiótico (Estreptomicina + Penicilina) em garrafas de cultura e incubadas em estufa úmida 37ºC, com subculturas semanais obtidas por desagregação da monocamada celular com tripsina-EDTA.

CULTIVO E MANUTENÇÃO DO VÍRUS

Amostra de HSV-1 cepa KOS foi adicionada à monocamada de células VERO cultivadas em garrafas de cultura e incubada em estufa úmida à 37ºC com 5% de CO_2 até visualização do efeito citopático correspondente a 80%. O meio de cultura foi coletado e centrifugado. O sobrenadante contendo as partículas virais foi coletado e adicionado glicerol estéril. Em seguida, foi armazenado em alíquotas em freezer -20ºC até a execução experimental de titulação do vírus e atividade antiviral.

ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

O potencial citotóxico dos extratos brutos foi avaliado em monocamadas de células VERO cultivadas durante 24 h, a 37ºC em placas de 96 poços. A viabilidade celular foi revelada pelo método colorimétrico do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio), descrito por Mosmann, (1983) após tratamento com concentrações dos extratos de 1000 a 15,6 µg/mL, as placas foram incubadas por 72 h nas mesmas condições citadas anteriormente. A densidade ótica foi determinada em leitor de placa, em comprimento de onda de 570nm para determinar a Concentração Citotóxica 50% (CC_{50}) em relação ao controle de células. Três experimentos independentes foram realizados e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

ATIVIDADE ANTIVIRAL

Monocamadas de células VERO cultivadas em placas de 96 poços durante 24 h foram infectadas com suspensão de HSV-1 ($TCID_{50}$) por 1 h a 37ºC. Os poços destinados ao controle de células receberam somente meio de cultura. Aos demais poços foram adicionadas as diluições dos extratos de 100 a 3,1 µg/mL. Os poços destinados ao controle de vírus receberam apenas DMEM. As placas foram incubadas por 72 h em estufa úmida a 37ºC. Após incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo método de MTT. Os dados foram plotados em gráfico, permitindo, assim, a determinação da Concentração Efetiva (CE) capaz de proteger 50% das células contra a infecção pelo HSV-1. Três experimentos independentes foram realizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 01 demonstra os resultados obtidos de citotoxicidade e atividade antiviral dos extratos hidroalcoólicos 50% das folhas de *C. americana* coletados no período de fevereiro/2021 a janeiro/2022. Os melhores resultados, conforme o Índice de Seletividade (IS) foram obtidos nos meses de janeiro/2022, seguido dos meses de dezembro, final de primavera e início do verão e posteriormente, julho/2021, início do inverno. Estes resultados demonstram que há uma variação sazonal da atividade anti-herpes, provavelmente associadas às condições climáticas do período estudado, que pode influenciar na composição química dos extratos obtidos. Não foi encontrado nenhum estudo de sazonalidade envolvendo a família *Boraginaceae*, entretanto, Prinsloo e Nogemane (2018) relatam que, além da sazonalidade, outros fatores interferem na produção de metabólitos secundários das plantas como, por exemplo, a incidência de chuvas, que pode variar dentro da mesma estação do ano.

Tabela 01 – Atividade anti-HSV-1 e citotoxicidade dos extratos brutos hidroalcoólicos obtidos de folhas de *Cordia americana* coletadas mensalmente ao longo de 12 meses.

Extrato	Mês de coleta	CC_{50}	CE_{50}	IS
1	Fevereiro/2021	400	28,0	14,4
2	Março/2021	900	30,7	29,3
3	Abril/2021	>1000	40,7	> 24,6
4	Junho/2021	>1000	57,7	> 17,3
5	Julho/2021	> 1000	25,3	> 39,5
6	Setembro/2021	880	41,7	21,1
7	Outubro/2021	580	42,7	13,6
8	Novembro/2021	480	>100,0	< 4,8
9	Dezembro/2021	595	14,0	42,5
10	Janeiro/2022	>1000	17,3	> 57,8

CC_{50} - Concentração tóxica para 50% das células; CE_{50} = Concentração efetiva que reduz em 50% a infecção pelo vírus; IS = índice de seletividade (CC_{50}/CE_{50})

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, observamos que *C. americana* apresenta boa atividade anti HSV-1, sendo esta atividade melhor observada nos meses de dezembro/2021 e janeiro/2022. Assim, neste estudo foi demonstrado que o final da primavera e início do verão é a melhor época para a coleta das folhas desta planta para obter um produto com atividade anti-herpes. Estudos envolvendo a variação da composição química devem ser realizados de modo a elucidar estes resultados.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Universidade Estadual de Maringá (PIBIC) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

REFERÊNCIAS

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n.1-2, p. 55-63, 1983. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6606682/. Acesso 28 ago. 2023

MOURA-COSTA, Gislaine F. *et al*. Cordia americana: Evaluation of in vitro anti-herpes simplex virus activity and in vivo toxicity of leaf extracts. **Australian Journal of Crop Science**, v. 15, n. 3, p. 362-368, 2021. Disponível em: https://www.cropj.com/moura_15_3_2021_362_368.pdf. Acesso 28 agosto 2023.

PRINSLOO, G.; NOGEMANE, N. The effects of season and water availability on chemical composition, secondary metabolites and biological activity in plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 4, p. 889-902, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/324532939_The_effects_of_season_and_water_availability_on_chemical_composition_secondary_metabolites_and_biological_activity_in_plants. Acesso 28 agosto 2023.

WHO. **Herpes Simplex Virus**. 2023. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus. Acesso 28 ago. 2023