

ATIVIDADE VIRUCIDA DE *Luehea divaricata* CONTRA HERPESVIRUS BOVINO

JULIANA MONTIEL NÚÑEZ¹; RENATA NOBRE DA FONSECA²; RENATA PIEROBOM GRESSLER³; WELLINGTON DA ROCHA DA SILVA⁴; SILVIA DE OLIVEIRA HUBNER⁵

¹ Universidade Federal de Pelotas – julianamontielnunez@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – renatanobredafonseca@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – repierobomgressler@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – wellingtondasilva.ws@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – silviaohubner@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) acarretam em perdas substanciais na produtividade, afetando tanto a pecuária de corte quanto a leiteira (FINO et al., 2012). Esse agente patogênico encontra-se amplamente distribuído ao redor do mundo, causando quadros clínicos como infecções respiratórias, conjuntivite, vulvovaginite, balanopostite, problemas de fertilidade, indução abortos e até mesmo a infecção multissistêmica fatal em neonatos. A capacidade do vírus de entrar em estado de latência complica o processo de diagnóstico, incentivando, assim, pesquisas voltadas para profilaxia e controle das infecções por herpes (KAHRS, 2001).

Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse na incorporação de substâncias de origem natural na pesquisa e criação de novos medicamentos (MARQUES et al., 2022). Nesse sentido, o presente estudo propôs avaliar uma espécie vegetal comum no bioma Pampa, conhecido pelo nome popular de “Açoita-cavalo” (*Luehea divaricata*), conhecida por suas propriedades medicinais tradicionalmente utilizadas pelas populações locais. Dentre as propriedades estudadas da *Luehea divaricata*, destacam-se suas ações antifúngicas e anti-inflamatórias (ROSA et al., 2014). Estudos científicos têm demonstrado que extratos dessa planta possuem compostos ativos que exibem atividade contra fungos patogênicos, e que certos componentes da planta podem inibir processos inflamatórios no organismo, o que pode ter implicações no desenvolvimento de tratamentos para condições inflamatórias, como artrite e doenças autoimunes (BATISTA, et al., 2016) . No entanto, até o momento, não existem registros de estudos específicos que investiguem a *Luehea divaricata* como agente virucida. Assim sendo, nesta pesquisa, foi avaliada a atividade virucida de um extrato hidroalcoólico de *Luehea divaricata* com relação ao vírus BoHV-1, de ampla relevância na área da medicina veterinária.

2. METODOLOGIA

Células de linhagem de rim bovino MDBK (Madin-Darby bovine kidney) provenientes do biorrepositório do Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Pelotas (LabVir/UFPEL) foram utilizadas para realização dos testes. As células foram cultivadas em garrafas de cultura celular, empregando meio essencial mínimo (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas incubadas em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂.

O extrato hidroalcoólico derivado de *Luehea divaricata* foi obtido mediante o processamento das folhas, no Laboratório de Química Aplicada a Bioativos, pertencente ao curso de Química da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

A avaliação da citotoxicidade do extrato hidroalcoólico foi conduzida em células da linhagem MDBK após um período de 72 horas. Foram testadas diferentes concentrações do extrato, incluindo 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,56 µg/mL. O ensaio de citotoxicidade foi realizado por meio do método de redução do MTT (3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio) para formazan (MOSMANN, 1983). O percentual de viabilidade celular foi calculado usando a seguinte fórmula: $AT/AC \times 100$, onde AT representa a absorbância das células tratadas e AC a absorbância do controle (células tratadas apenas com MEM). Consideramos não tóxicas as viabilidades celulares superiores a 90%.

Após a análise da citotoxicidade, com base nos resultados obtidos, foi selecionada a concentração que não apresentou toxicidade nas células MDBK para realizar os testes. A atividade virucida foi avaliada pelo método de diluição limitante (BEHRENS; KÄRBER; 1935). Essa metodologia permite comparar, através de título viral, se houve redução dos títulos virais em células que foram tratadas, em comparação aos controles. Para realização do ensaio virucida, 50 µL do extrato em concentração não citotóxica (6 µg/ml) foram incubados com 50µL do BoHV por 24, 12, 6, e 1 hora à 37 °C e como controle negativo o vírus foi incubado apenas com MEM, na mesma quantidade e tempos. Após esse período de incubação, foi aplicado o método de diluição limitante. A leitura do título do vírus tratado ou não foi realizada 72 horas após o experimento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio de avaliação da citotoxicidade, a concentração do extrato hidroalcoólico de Açoita-Cavalo (ACH) que não apresentou toxicidade, após 72 horas de análise, foi determinada como 6µg/mL.

Em relação à atividade virucida do composto, não foram observados efeitos significativos durante o período de 1 e 6 horas. Após 12 horas, o título viral reduziu de $10^{6,5}$ para $10^{5,25}$ (média). E, após 24 horas, uma atividade altamente significativa foi observada, uma vez que não foi possível a detecção do vírus que inicialmente tinha um título de 10^5 .

A avaliação da atividade virucida tem como finalidade verificar se os compostos estudados têm a capacidade de inativar as partículas virais diretamente, causando sua desestabilização ou se ligando a elas de maneira irreversível, o que evita que se liguem aos receptores celulares e iniciem o processo de infecção.

O presente trabalho trata-se de um estudo pioneiro que investigou o potencial virucida da do extrato hidroalcoólico da *Luehea divaricata*. Outros extratos naturais como o *Solanum Paniculatum* (Jurubeba) e *Solidago Microglossa* (Arnica-do-brasil) já foram estudados e apresentaram ter atividade virucida contra BoHV1, conforme relatado por KAZIYAMA *et al* (2012). Portanto, sabe-se que muitos extratos apresentam características promissoras que justificam a continuação de estudos em laboratório e em organismos vivos, visando ao futuro desenvolvimento de formulações com propriedades antivirais contra o BoHV1, com potencial aplicação terapêutica. No entanto, é importante ressaltar que, apesar dos resultados promissores, ainda são necessárias pesquisas mais aprofundadas para compreender completamente o potencial virucida do extrato, assim como seu mecanismo de ação.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que o ACH demonstrou ser seguro em relação à citotoxicidade, com uma concentração não tóxica de 6µg/mL após 72 horas de análise. Embora não tenhamos observado efeitos significativos de atividade virucida do extrato após 1 e 6 horas, foi evidente uma ação virucida após 24 horas de tratamento, indicando um potencial efeito contra o vírus após um período prolongado de exposição. Esses achados sugerem que o ACH merece investigações adicionais como um possível agente terapêutico contra infecções virais, e mais estudos são necessários para elucidar seu mecanismo de ação e avaliar sua eficácia em modelos *in vivo*. Esses resultados preliminares fornecem uma base sólida para futuras investigações e sugerem que o ACH pode ser um candidato promissor para o desenvolvimento de terapias contra herpesvírus.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, E. K. F. et al. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Luehea divaricata*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, p. 433-441, 2016.

BEHRENS, B.; KÄRBER, C. Wie sind reihenversuche fur biologische auswertungen am zweckmassigsten anzuordnen. **Archiv fur Experimentelle Pathologie und Pharmakologie** v. 177, p. 379-388, 1935.

FINO, T. C. M. et al. Infecções por herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e suas implicações na reprodução bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 2, p. 122-127, 2012.

KAHRS, Robert F. Infectious bovine rhinotracheitis. In: **Diseases of Cattle in the Tropics: Economic and Zoonotic Relevance**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1981. p. 197-205.

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, p. 522-528, 2012.

MARQUES, Lana Grasiela Alves et al. O impacto da bioprospecção para o descobrimento de novas moléculas terapêuticas. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro 2022.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

ROSA, Roseane Leandra da et al. Anti-inflammatory, analgesic, and immunostimulatory effects of *Luehea divaricata* Mart. & Zucc.(Malvaceae) bark. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 599-610, 2014.