

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO FITOTERÁPICO *ECHINACEA* *ANGUSTIFOLIA*

GRESSLER, Renata, P.; O., RODRIGUES, Paulo Ricardo, C., Da SILVA,
Wellington da Rocha., DA FONSECA, Renata N., de LIMA, Marcelo,
HÜBNER, Silvia

¹Universidade Federal de Pelotas– repierobomgressler@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – priccenteno@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - wellinhgtondasilva.ws@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas- renatanobredafonseca@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas- mdelima.ufpel@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – silviaoliveirahubner@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A utilização de fitoterápicos para fins medicinais é uma prática milenar. Plantas e seus derivados (materiais botânicos) são preparados e utilizados de diversas formas, incluindo cápsulas (pó seco), tinturas (extratos de etanol), infusões (extrações geralmente à base de água ou óleo), macerações (embebição de material vegetal) e decocções (ebulição do material vegetal) (ABRANCHES et al, 2015). O termo tem origem grega: “*phytos*”, que significa “vegetal”, e “*therapeia*”, que remete a “tratamento”. A utilização de plantas na promoção da saúde remonta à antiguidade e se confunde com a história do próprio homem. Desde o período neolítico, há evidências do uso de ervas aromáticas que eram usadas em culinária e medicina e que ervas e flores eram enterradas com os mortos (BERWICK, 1996).

A *Echinacea* spp é um gênero de plantas herbáceas perenes, pertencente à família *Asteraceae*, constituído por nove espécies validamente descritas. A tradição histórica e popular do uso medicinal da *Echinacea* spp. está relacionada às três espécies mais relevantes, originárias da América do Norte: *Echinacea angustifolia* (DC), a *Echinacea pallida* (Nutt.) e a *Echinacea purpurea* (L.), as quais destacam-se pela sua longa e tradicional história de utilização na medicina (BARNES et al. 2005).

Atualmente, o interesse medicinal na *E. angustifolia* tem sido direcionado aos seus efeitos imunomoduladores e antimicrobianos. Estudos demonstraram efeito antiproliferativo nas células tumorais e um aumento na capacidade de tolerância a danos causados por compostos tóxicos (como quimioterápicos) (DOBRANGE et al. 2019), bem como ação como antifúngica, antibacteriana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena (HUDSON, 2012).

Na medicina veterinária, uma parcela importante de enfermidades infectocontagiosas que acometem os pequenos e grandes animais possui etiologia viral e, em grande parte, podem representar também um risco para à saúde pública (SILVA, 2010). O alphaherpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1), classificado na família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, gênero *Varicellovirus*, é o agente etiológico da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), balanopostite pustular infecciosa (IPB) e vulvovaginite pustular infecciosa (IPV) e, assim como outros membros dessa família, estabelecem infecções latentes nos neurônios dos gânglios nervosos regionais do hospedeiro (ANZILEIRO et al. 2015).

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) pertence à família *Flaviridae* e gênero *Pestivirus* e é responsável por prejuízos econômicos relevantes para a bovinocultura de corte e leite em nível mundial. O BVDV está associado a uma grande variedade de manifestações clínicas, que incluem doença respiratória, gastroentérica, doença hemorrágica, imunossupressão e distúrbios reprodutivos, entre outras (BAKER, 1995). Além disso, o BVDV também pode causar infecção transplacentária resultando em morte fetal, abortamento ou nascimento de animais persistentemente infectados.

Em pequenos animais, o coronavírus canino (CCov), classificado na família *Coronaviridae*, gênero *Alphacoronavirus* 1, acomete os cães, sendo uma das causas mais comuns de gastroenterite em animais jovens, ocasionando diarreia severa e óbito quando associado a outros patógenos, principalmente o parvovírus (DECARO; BUONAVOGLIA, 2011). O objetivo deste trabalho foi de avaliar a atividade antiviral do fitoterápico *E. angustifolia* contra o BoHV-1, BVDV e CCoV, *in vitro*.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas linhagens celulares MDBK e CRFK, provenientes do biorrepositório do Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Pelotas (Labvir/UFPEL) para os testes de avaliação da citotoxicidade, ação antiviral e virucida da *E. angustifolia*.

A tintura mãe da *E. angustifolia* (toda a planta) sob a forma de extrato alcoólico a 20% foi adquirida em uma farmácia de manipulação na cidade de Pelotas, RS (LOTE 749875) estando de acordo com as normas da Farmacopeia Brasileira (FHB 2011). Todas as diluições do fitoterápico foram realizadas utilizando MEM.

Foi avaliada a citotoxicidade de diferentes concentrações de *E. angustifolia* (10%, 7%, 6%, 5%, 4,3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,125% e 0,0625%) nas células MDBK e CRFK após 24 horas de contato com as células, utilizando-se o teste do vermelho neutro de acordo com FOTAKIS & TIMBRELL (2006). O percentual de viabilidade foi determinado através da equação: $AT/AC \times 100$, onde AT é a absorbância dos tratados e AC a absorbância do controle. Viabilidades celulares maiores que 90% foram consideradas não tóxicas. Após a avaliação da citotoxicidade de diferentes concentrações de *E. angustifolia*, foi escolhida concentração não-tóxica (0,5%) para realização dos testes posteriores (antiviral e virucida).

No ensaio da atividade antiviral contra o BoHV-1 e o BVDV foi utilizada a linhagem celular MDBK e contra o CCoV a linhagem CRFK. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para a avaliação antiviral, as células foram cultivadas em microplacas de 96 cavidades. Após 24 horas de incubação em estufa de CO₂ a 37°C foi retirado o sobrenadante e após adicionada a solução de *E. angustifolia* 0,5%, que foi mantida em contato com as células durante diferentes tempos (1, 3, 6, e 24h). No controle negativo foi adicionado apenas MEM. Após os diferentes períodos de incubação o sobrenadante foi retirado e foi adicionado suspensões virais (BoHV-1, BVDV ou CCoV), visando a obtenção do título. O título foi expresso em TCID₅₀/25µl após 72 horas de incubação em cultivo celular.

No ensaio virucida *E. angustifolia* a 0,5% foi adicionada à suspensão de BoHV-1 e após 1, 3, 6, e 24h de incubação a 37°C foi realizada a titulação viral.

Para a análise estatística das avaliações antiviral e virucida foi utilizado o teste *t de Student* (controle e tratado). Valores de P menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados significativos. Toda a análise estatística foi realizada no software *GraphPad Prism 7* (*GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA*).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada uma redução significativa ($p < 0,05$) no título do BoHV-1 quando as células foram tratadas com *E. angustifolia* a 0,5% a partir de 1 hora até as 24 horas de incubação, sendo 100% de redução do título viral ($p < 0,05$) a partir de 3 horas. Também foi observado a atividade antiviral contra o BVDV, a partir de 1 hora de incubação com o extrato, levando à redução significativa ($p < 0,05$) no título viral quando comparado ao controle negativo. Em 1, 3, 6 e 24 horas de incubação houve redução significativa no título do CCoV ($p < 0,05$).

Em relação à atividade virucida do composto, diferentemente da atividade antiviral, a *E. angustifolia* a 0,5% não apresentou efeito virucida contra o BoHV-1 em nenhum dos cinco tempos de incubação ($p > 0,05$), o que indica que a ação não ocorra diretamente no vírion (virucida) e sim em nível celular (antiviral).

Em nenhum dos vírus avaliados neste estudo, houve redução significativa do título quando a *E. angustifolia* foi adicionada às células simultaneamente ao vírus (tempo 0), sendo o efeito antiviral observado apenas após 1 hora de incubação. Esses resultados sugerem que, para resultar em uma atividade antiviral, a *E. angustifolia* requer incubação com as células por, pelo menos, 1 hora antecedente à adição da suspensão viral.

Embora o gênero *Echinacea* possua 9 espécies descritas (FLAGEL, 2008), há poucos estudos com preparações de *E. angustifolia*. Além disso, as pesquisas acerca de efeito antiviral usando *Echinacea* spp são focadas majoritariamente em vírus que acometem os seres humanos (AKRAM et al. 2018), sendo grande parte conduzidos com vírus herpes simplex humano (HSV), um dos mais prevalentes (DENARO et al. 2020).

BINS et al. (2002) relataram atividade antiviral de extratos alcoólicos 70% de *E. angustifolia*, *E. sanguinea* e *E. purpurea* frente ao HSV. De maneira semelhante, HUDSON et al. (2005) avaliaram a atividade antiviral de extratos alcoólicos (55 e 70%) e aquosos de *E. purpurea*, *E. pallida* e *E. angustifolia* contra o rinovírus, HSV e vírus influenza. O extrato aquoso de *E. angustifolia* não apresentou atividade antiviral frente a nenhum desses vírus, entretanto, o extrato alcoólico dessa mesma espécie apresentou atividade antiviral contra os três vírus testados. Os autores sugerem que as frações etanólicas e de acetato de etila do extrato alcoólico sejam as responsáveis pelo efeito antiviral, por possuírem em sua composição as alcaloides. Em ambos os estudos citados, o extrato alcoólico de *E. angustifolia* apresentou atividade antiviral contra HSV. HSV pertence à mesma família e subfamília do BoHV-, assim, as características morfológicas e estruturais, bem como a estratégia de replicação destes vírus são muito semelhantes (JONES, 2003), o que pode explicar os resultados encontrados.

4. CONCLUSÕES

A *E. angustifolia* a 0,5 % apresenta efeito antiviral *in vitro* contra o BoHV-1, no entanto apenas na concentração e 0,5% é que o fitoterápico reduziu os títulos

do BVDV e CCoV em comparação com os controles. Não houve efeito virucida observado contra o BoHV-1.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, Monise Viana. **Plantas Medicinais e Fitoterápicos: Abordagem teórica com ênfase em nutrição**. AS Sistemas, 2015.
- AKRAM, Muhammad et al. Antiviral potential of medicinal plants against HIV, HSV, influenza, hepatitis, and coxsackievirus: A systematic review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 5, p. 811-822, 2018.
- ANZILIERO, Deniz et al. Serological response to bovine herpesvirus 1 and 5 and bovine viral diarrhea virus induced by commercial vaccines/Resposta sorológica aos herpesvirus bovino tipos 1 e 5 e vírus da diarréia viral bovina induzida por vacinas comerciais. **Ciência Rural**, v. 45, n. 1, p. 58-64, 2015.
- BAKER, John C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 11, n. 3, p. 425-445, 1995.
- BARNES, Joanne et al. Echinacea species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 8, p. 929-954, 2005.
- BERWICK, Ann. Aromaterapia holística. **Rio de Janeiro: Record**, 1996.
- BEHRENS, B.; KÄRBER, C. Wie sind reihenversuche fur biologische auswertungen am zweckmassigsten anzuordnen. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 177, p. 379-388, 1935.
- BINNS, S. E. et al. Antiviral activity of characterized extracts from *Echinacea* spp. (*Heliantheae*: *Asteraceae*) against herpes simplex virus (HSV-I). **Planta Medica**, v. 68, n. 09, p. 780-783, 2002.
- DECARO, Nicola; BUONAVOGLIA, Canio. Canine coronavirus: not only an enteric pathogen. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 41, n. 6, p. 1121-1132, 2011.
- DENARO, Marcella et al. Antiviral activity of plants and their isolated bioactive compounds: An update. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 4, p. 742-768, 2020.
- DOBRANGE, Erin et al. Fructans as immunomodulatory and antiviral agents: The case of *Echinacea*. **Biomolecules**, v. 9, n. 10, p. 615, 2019.
- FHB - FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2011. P. 55-57.
- FLAGEL, Lex E. et al. Phylogenetic, morphological, and chemotaxonomic incongruence in the North American endemic genus *Echinacea*. **American Journal of Botany**, v. 95, n. 6, p. 756-765, 2008.
- FOTAKIS, George; TIMBRELL, John A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.
- HUDSON, Jim et al. Characterization of antiviral activities in *Echinacea*. Root preparations. **Pharmaceutical biology**, v. 43, n. 9, p. 790-796, 2005.
- HUDSON, James B. Applications of the phytomedicine *Echinacea purpurea* (Purple Coneflower) in infectious diseases. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.
- JONES, Clinton. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 79-95, 2003.