

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE VIRUCIDA DE EXTRATOS DE PLANTAS NATIVAS NO RIO GRANDE DO SUL

RENATA MARQUES PIEROBOM GRESSLER¹; JULIANA MONTIEL NUNEZ²;
GABRIEL DA SILVA ZANI³; WELLINGTON DA ROCHA DE SILVA⁴; ROGÉRIO FREITAG⁵; SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – repierobomgressler@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – julianamontielnunez@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – gzani27@gmail.com

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

⁵Universidade Federal de Pelotas – rafreitag@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – silviaoliveirahubner@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas na promoção da saúde remonta à antiguidade e se confunde com a história do próprio homem. No Brasil, a utilização da fitoterapia teve origem com os povos indígenas, e foi influenciada pela cultura africana e portuguesa (ALVES, SILVA, 2021). No entanto, com o avanço da medicina alopata e da indústria farmacêutica, os medicamentos fitoterápicos foram deixados de lado, porém, esse cenário vem sofrendo mudança principalmente devido aos efeitos adversos e ao alto custo dos medicamentos sintéticos. (NEWMAN & CRAGG (2020). Dentre as vantagens de se utilizar a fitoterapia temos a relação custo/benefício; o fácil acesso; e um efeito farmacológico identificável e menos agressivo (REZENDE; COCCO, 2002).

Além do exposto, é importante ressaltar que, a utilização da fitoterapia na medicina veterinária traz outra vantagem, a de viabilizar o emprego de novas substâncias nas quais os patógenos não tiveram contato, evitando assim a resistência aos fármacos. Importante lembrar que as modernas técnicas de produção de um medicamento veterinário estão associadas a todas as etapas de desenvolvimento de um produto (estabilidade, eficácia e segurança), para garantir um resultado clínico eficaz (REGNER, 2012). O mercado de saúde veterinária está em ascensão em razão de vários fatores, dentre eles: o aumento de doenças entre os animais, a elevada demanda por animais de companhia, a predileção por tratamentos mais sustentáveis, baseados em plantas medicinais *in natura* e/ou medicamentos fitoterápicos, levando a um incentivo à pesquisa e desenvolvimento (P&D).

As plantas do presente estudo são popularmente utilizadas para tratamento de diversas condições clínicas, contudo, há poucos estudos científicos a respeito de suas ações antivirais. Na medicina veterinária, uma parcela importante de enfermidades infectocontagiosas que acometem os pequenos e grandes animais possui etiologia viral (SILVA, 2010). De grande importância temos o herpesvírus felino tipo 1 (FHV-1), um vírus com alta prevalência em gatos, causador de rinotraqueíte, e conjuntivite. O FHV-1 é responsável por mais da metade das doenças virais do trato respiratório superior em gatos e pode levar a lesões oculares que resultam em perda de visão (SYNOWIECK et al, 2023).

Esse projeto tem como objetivo avaliar a atividade virucida *in vitro* de extratos das plantas nativas no Rio Grande do Sul, visando o potencial terapêutico frente ao herpesvírus felino tipo 1 (FHV-1).

2. METODOLOGIA

1- Coleta das plantas e obtenção dos extratos: aquoso, etanólico e hidroalcólico

Foram obtidas e analisadas plantas identificadas como A e B. Os exemplares utilizados foram coletados nos meses de outubro e novembro de 2023 no município de São Lourenço do Sul – RS e posteriormente foram identificados junto do Herbário da Universidade Federal de Pelotas. Após, foram obtidos os extratos: aquoso, etanólico e hidroalcólico das mesmas. Estes extratos foram posteriormente liofilizados para posterior uso.

2- Cultivo celular

A linhagem celular CRFK (The Crandell-Rees Feline Kidney Cell) proveniente do biorrepositório do Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Pelotas (LabVir/UFPeI) foi utilizada para realização dos testes *in vitro* dos extratos.

3- Ensaio de citotoxicidade

Foi realizada avaliação da citotoxicidade dos extratos nas linhagens CRFK após 48 horas de incubação. As concentrações testadas foram: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,56 µg/ml para cada extrato. O ensaio de citotoxicidade foi realizado através do método de redução do MTT (3(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio) à formazan. Viabilidades celulares maiores que 90% foram consideradas não tóxicas.

4- Ensaio virucida

Para o ensaio virucida 500 µL de cada extrato em concentração não citotóxica foi incubado com 1000 DI50/100 µL no volume de 500µL de vírus durante 24 horas, 1 hora, 30 min ou 15 min à 37 °C. Como controle negativo cada vírus foi incubado apenas com meio de cultivo celular, na mesma quantidade e tempos. Após esse período foi aplicado o método de diluição limitante (Behrens; Kärber, 1935) para determinar se os extratos foram capazes de reduzir o título viral em comparação ao controle negativo. A leitura do título viral foi 72 horas após. Essa metodologia permite comparar se houve redução dos títulos virais em células que foram tratadas, em comparação aos controles. Os testes foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1-Teste de citotoxicidade dos extratos:

Tabela 1 – Concentrações não citotóxicas para células CRFK de diferentes extratos após 48 horas de incubação

Extratos	Concentração não citotóxica
Extrato A Aquoso	50 µg/ml
Extrato A Etanólico	50 µg/ml
Extrato A Hidroalcólico	12,5 µg/ml
Extrato B Aquoso	50 µg/ml

Extrato B Etanólico	25 µg/ml
Extrato B Hidroalcoólico	50 µg/ml

2-Ensaio virucida

Tabela 2 – Título do FHV (média) após incubação com os diferentes extratos por 24 horas.

Extratos	Controle	Tratado
Extrato A Aquoso	$10^{3,5}$	$10^{1,5}$
Extrato A Etanólico	$10^{3,5}$	$10^{1,5}$
Extrato A Hidroalcoólico	$10^{3,5}$	$10^{1,5}$
Extrato B Aquoso	10^3	10^0
Extrato B Etanólico	10^3	10^0
Extrato B Hidroalcoólico	10^3	10^0

Tabela 3 – Título do FHV (média) após incubação com os diferentes extratos por 1 hora.

Extratos	Controle	Tratado
Extrato A Aquoso	10^3	$10^{1,5}$
Extrato A Etanólico	10^3	10^1
Extrato A Hidroalcoólico	10^3	$10^{1,75}$
Extrato B Aquoso	10^3	10^0
Extrato B Etanólico	10^3	10^0
Extrato B Hidroalcoólico	10^3	10^0

Tabela 4 – Título do FHV (média) após incubação com os diferentes extratos por 30 minutos.

Extratos	Controle	Tratado
Extrato A Aquoso	$10^{2,5}$	10^1
Extrato A Etanólico	$10^{2,5}$	10^0
Extrato A Hidroalcoólico	$10^{2,5}$	10^0
Extrato B Aquoso	$10^{2,5}$	10^0
Extrato B Etanólico	$10^{2,5}$	10^0
Extrato B Hidroalcoólico	$10^{2,5}$	10^0

Tabela 5 – Título do FHV (média) após incubação com os diferentes extratos por 15 minutos.

Extratos	Controle	Tratado
Extrato A Aquoso	$10^{2,5}$	10^1
Extrato A Etanólico	$10^{2,5}$	$10^{1,75}$
Extrato A Hidroalcoólico	$10^{2,5}$	10^1

Extrato B Aquoso	10 ³	10 ⁰
Extrato B Etanólico	10 ³	10 ⁰
Extrato B Hidroalcoólico	10 ³	10 ⁰

4. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados até o momento permitem concluir que os extratos A aquoso, etanólico e hidroalcoólico apresentaram uma redução significativa no título viral nos tempos de incubação de 24hs, 1h, 30 min e 15 min. Os extratos B aquoso, etanólico e hidroalcoólico apresentaram uma redução total do título nos tempos acima citados, demonstrando assim alto potencial virucida. Demais testes serão conduzidos para a elaboração e análise de produtos farmacológicos baseados nesses extratos visando terapia anti-FHV1.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A.R.; SILVA, M.J.P. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. **Revista Escola de Enfermagem**, v. 37, n. 4, p. 85-91, 2003.

BEHRENS, B.; KÄRBER, C. Wie sind reihenversuche fur biologische auswertungen am zweckmassigsten anzunehmen? **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 177, p. 379-388, 1935.

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.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of natural products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

REGNER, C. F. Fitoterapia na clínica de pequenos animais: um futuro promissor. 2012. Acesso em: 18 set. 2023.

REZENDE COCCO, M. I. M. A utilização da fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista Escola Enfermagem USP**, v. 36, n. 3, p. 282-288, 2002.

SILVA, M. H. S. et al. Caracterização demográfica e epidemiológica de cães e gatos domiciliados em Barbacena, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 1002-1006, 2010.

SYNOWIEC, A; DABOWSKA, A; PACHOTA, M; BAUCHE, M; OWCZAREK, K; NIZANSKI, W; PYRC, K; Feline herpesvirus 1 (FHV-1) enters the cell by receptor-mediated endocytosis. **Journal of Virology**, The University of Arizona, Tucson, pg. 15, 2023.