



ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIHERPESVIRUS DE *Inga marginata* Willd.

Karina S. Bambini ^a, Paulo M. Roehle ^b, Sérgio A. L. Bordignon ^c, Grace Gosmann ^a, Jarbas A. Montanha ^a

^a Faculdade de Farmácia – UFRGS; ^b Instituto de Ciências Básicas da Saúde – UFRGS; ^c Centro Universitário La Salle.



INTRODUÇÃO

O herpes humano tipo 1 pertence à família *Herpesviridae*, e à sub-família *alphaherpesvirinae* (MIRANDA *et al.*, 2002). A transmissão do HHV-1 ocorre por contato direto da mucosa ou pele com as secreções que contenham o vírus. As partículas virais são transportadas ao longo dos neurônios sensoriais até o gânglio trigêmeo, onde podem estabelecer infecções latentes por toda vida do hospedeiro (BRADY *et al.*, 2004). São replicados rapidamente em cultura de células fibroblásticas, epiteliais, nervosas e ovos embrionados, levando à lise celular (ABRANTES, 2006).

Como os vírus são parasitas absolutos, uma das dificuldades da quimioterapia antiviral é que esta substância iniba a replicação viral dentro da célula hospedeira sem causar toxicidade ao sistema celular. A maioria dos agentes antivirais disponíveis atualmente é efetiva apenas enquanto o vírus está se replicando (RANG & DALE *et al.*, 2008). Um antiviral pode atuar exercendo uma ação virucida, interferindo na adsorção do vírus, bloqueando estágios da replicação, impedindo sua liberação, ou estimulando a produção de interferonas pelas células (HUDSON *et al.*, 1999).

Os produtos naturais, tanto compostos purificados quanto extratos, podem ser considerados uma grande fonte de novas moléculas com efeitos farmacológicos devido a sua grande diversidade química (COS *et al.*, 2006). Tendo sido observada boa atividade antiherpesvirus (HHV-1) do extrato aquoso e hidroetanólico de *Inga marginata* Willd, (BAMBINI *et al.*, 2009) buscou-se através do fracionamento com solventes de polaridade crescente a fração responsável pela atividade antiviral.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados de inibição viral pode-se concluir, que o fracionamento do extrato hidroetanólico foi efetivo para a separação dos compostos que apresentam atividade antiviral na espécie *Inga marginata* Willd..

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL: A espécie vegetal *Inga marginata* Willd. foi coletada, seca e triturada. Um extrato aquoso, um extrato hidroetanólico e quatro frações deste último foram preparados. O extrato aquoso foi obtido a 50°C em água destilada e o extrato hidroetanólico por maceração utilizando a mistura água e etanol na proporção 1:1; e as frações foram obtidas da fase aquosa do extrato hidroetanólico, utilizando solventes de polaridade crescente (clorofórmio, acetato de etila e álcool n-butílico). Os extratos e as frações foram secos e conservados em dessecador e a solução a -20°C até o momento do uso.

CÉLULAS: Utilizou-se células VERO (ATCC CCL-81), fibroblastos isolados de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Foram preparadas placas de 96 poços com 30.000 células por poço. As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ e atmosfera úmida por 24 horas antes do uso.

VÍRUS: Utilizou-se Herpesvirus humano tipo 1 (HHV-1), cepas KOS. Os estoques virais são preparados em células VERO e armazenado a -70°C.

CITOTOXICIDADE: Foi determinada a concentração máxima não tóxica (CMNT) utilizando a técnica da alteração morfológica. As amostras foram preparadas a diferentes diluições e adicionadas à cultura celular, o efeito citotóxico é observado após 72 horas de incubação a 37°C, através da observação ao microscópio invertido (MONTANHA *et al.*, 2004; WALUM *et al.*, 1990; WILSON, 1986).

ENSAIO ANTIVIRAL: A atividade anti-HHV-1 foi avaliada pela redução do título infeccioso viral (TCID₅₀) em placas de 96 poços preparadas com 24 horas de antecedência. Para a realização do ensaio, o tapete celular foi tratado com o extrato na CMNT e na CMNT/2. Após este procedimento foram adicionadas diluições decimais de vírus de 10⁻¹ a 10⁻⁶. Após incubar por 72 horas a 37°C em uma atmosfera úmida foi determinado o título viral dos tratados e da cultura não tratada. Para determinação do título, utilizou-se o método de Kärber (BURLESON *et al.*, 1992).

RESULTADOS

A concentração máxima não tóxica (CMNT), e a atividade anti-HHV-1 estão indicados na Tabela. Os resultados referentes à redução do título infeccioso estão representados em termos logarítmicos, e são resultado da comparação com as médias aritméticas do título viral obtido dos controles vírus dos ensaios realizados.

O extrato aquoso e a fração remanescente aquosa de *Inga marginata*, apresentaram considerável atividade anti-HHV-1.

<i>Inga marginata</i>	CMNT (mg/mL)	REDUÇÃO DO TÍTULO VIRAL EM log ₁₀		
		(CMNT)	(CMNT/2)	(CMNT/4)
EXTRATO AQUOSO	2.5000	2,58 ± 0,14	1,33 ± 0,14	0,42 ± 0,14
EXTRATO HIDROETANÓLICO	0.6250	0,33 ± 0,14	0,17 ± 0,14	0,25 ± 0,00
FRAÇÃO CLOROFÓRMICA	0.1563	1,17 ± 1,61	0,75 ± 0,00	0,50 ± 0,25
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	0.0781	0,08 ± 0,14	0,17 ± 0,29	0,75 ± 0,25
FRAÇÃO ÁLCOOL n-BUTÍLICO	0.1563	0,42 ± 0,29	0,50 ± 0,25	0,58 ± 0,14
FRAÇÃO REMANESCENTE AQUOSO	5.0000	2,17 ± 0,58	0,75 ± 0,25	0,75 ± 0,25

BIBLIOGRAFIA

- ABRANTES, J. L. Estudo da Atividade Anti-hsv-1 de Terpenos Isolados de Algas Pardas Marinhas. 88 P. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) Programa de Pós-Graduação em Neuroimunologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói/RJ, 2006.
- BAMBINI, K. S.; ROEHE, P. M.; BORDIGNON, S. A. L.; MONTANHA, J. A. Estudo da atividade antiherpesvirus de extratos vegetais. In: XXI Salão de Iniciação Científica, 2009, Porto Alegre. Livro de Resumos, 2009. p. 159-159.
- BRADY, R.C. & BERNSTEIN, D.I. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Research*, 61, p.73– 81, 2004.
- BURLESON, F. G.; CHAMBERS, T.M.; WIEDBRAUK, D.L. Virology. A laboratory manual. San Diego: Academic, 1992.
- COS, P.; VLIETINCK, A.J., BERGHE, D.V. & MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethno-pharmacology, article in press*, 2006.
- HUDSON, J.; TOWERS, G. H. N. Phytomedicines as antivirals. *Drugs of the Future*, v. 24, p. 295 – 320, 1999.
- MIRANDA, M.M.F.S.; GONÇALVES, J.L.S.; ROMANOS, M.T.V.; SILVA, F.P.; PINTO, L.; SILVA, M.H.; EJZEMBERG, R.; GRANJA, L.F.Z.; WIGG, M.D. Anti-herpes simplex virus effect of a seed extract from the tropical plant *Licania tomentosa* (Benth.) Fritsch (Chrysobalanaceae). *Phytomedicine* 9: 641–645, 2002.
- MONTANHA, J.A.; MOELLERKE, P.; BORDIGNON, S.A.L.; SCHENKEL, E.P.; ROEHE, P.M. Antiviral activity of Brazilian Plant Extracts. *Acta Farmaceutica Bonaerense* 23 (2): 183-6, 2004.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; TITTER, J.M. *Farmacologia*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- WALUM E.; STENBERG, K.; JENSSEN, D. Understanding cell toxicology. Principles and practice. New York: Ellis Horwood, 1990.
- WILSON, A.P. Cytotoxicity and Viability Assays. In: FRESHNEY, R.I. (Ed.) *Animal cell culture: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 1986.

