

ATIVIDADE ANTIVIRAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE AO *ALPHAHERPESVIRUS BOVINO 1*

RODRIGO BOZEMBECKER DE ALMEIDA¹; TONY PICOLI²; STEFANIE
BRESSAN WALLER²; GEFERSON FISCHER³

¹Universidade Federal de Pelotas – rodrigobozembecker@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – picolivet@gmail.com, stefanie.waller@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – geferson.fischer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Métodos terapêuticos naturais vêm sendo cada vez mais exigidos pela população e mais aceitos e utilizados pelos profissionais da saúde, a fim de diminuir as desvantagens trazidas pelo uso crônico de drogas sintéticas. As propriedades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de diversas espécies vegetais têm sido estudadas e reconhecidas há décadas. A atividade antimicrobiana tem sido atribuída principalmente aos terpenos e derivados, muitas vezes devido à capacidade destes compostos de interagirem com diferentes moléculas alvo e funções celulares, tais como inibição da síntese de ácidos nucleicos, das funções da membrana citoplasmática e do metabolismo energético (LIMA et al., 2013).

Os membros da família Lamiaceae têm apresentado vários constituintes químicos com atividades biológicas, e o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), orégano (*Origanum vulgare*) e manjerona (*Origanum majorana*), representantes da família, já foram relatados com propriedades antimicrobianas, inclusive antivirais (SIDDIQUI et al, 1996; WALLER et al., 2016a; WALLER et al., 2016b).

O *Alphaherpesvirus bovinum 1* (BoHV-1), membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e gênero *Varicellovirus* é um vírus envelopado, de genoma DNA fita dupla, com capacidade de estabelecer infecções latentes. O BoHV-1 tem sido associado com manifestações respiratórias e genitais em bovinos (FLORES, 2007), causando grandes prejuízos à pecuária. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiviral dos óleos essenciais de alecrim, orégano e manjerona frente ao BoHV-1.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas células da linhagem MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*), por serem permissíveis ao vírus estudado, e o BoHV-1 cepa Los Angeles. Células e vírus foram provenientes do Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (LabVir/UFPEL). Os óleos essenciais de *R. officinalis*, *O. vulgare* e *O. majorana* foram adquiridos comercialmente (Ferquima[®], Brasil) e estocados sob refrigeração.

As células foram cultivadas em placas de cultivo celular com 96 cavidades contendo meio essencial mínimo com sais de Eagle (E-MEM, Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO) com antibióticos e antifúngicos, e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco[®]). Aproximadamente 3×10^4 células foram semeadas por cavidade e, após 24 horas sob cultivo em estufa úmida, com atmosfera com 5% de CO₂ a 37°C, os tapetes celulares encontravam-se confluentes e aptos para os experimentos subsequentes.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado após o cultivo das células por 24 horas, nas condições supracitadas. O sobrenadante foi gentilmente aspirado e, sobre os tapetes celulares, foram adicionados os óleos essenciais de alecrim, orégano e manjerona, diluídos em E-MEM, em concentrações que variaram de 0,03 a 8mg/ml. Após 24h de incubação, foi aplicado o protocolo do ensaio de redução do MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo) para determinação da viabilidade celular, conforme descrito por Mosmann (1983). Os testes foram realizados em quadruplicata.

Para o ensaio da atividade antiviral, após crescimento em placas de 96 cavidades, as células foram infectadas com 0,1 MOI (*multiplicity of infection*) de suspensão de BoHV-1 e incubadas por 2h. Posteriormente o sobrenadante foi aspirado e duas concentrações de cada óleo essencial (determinadas pelo ensaio anterior) foram colocadas sobre os tapetes celulares. Após 72 horas de incubação, as placas foram congeladas, descongeladas e o sobrenadante dos poços submetidos à título viral através do método de Reed e Muench (1938). Células sem infecção foram utilizadas como controle negativo e células infectadas e sem tratamento foram utilizadas como controle positivo. O percentual de inibição (PI) viral foi calculado através da fórmula:

$$PI = \left[1 - \left(\frac{\text{antilog tratados}}{\text{antilog controle}} \right) \right] \times 100$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 demonstra a viabilidade celular após exposição aos óleos essenciais. Nota-se a maior toxicidade dos óleos essenciais do gênero *Origanum* (orégano e manjerona) quando comparados ao alecrim. Orégano e manjerona apresentaram citotoxicidade em concentrações acima de 0,25 mg/ml, e alecrim em concentrações superiores a 2 mg/ml. As concentrações de óleos essenciais selecionadas para uso nos ensaios antivirais foram alecrim (1 e 2 mg/ml), orégano e manjerona (0,1 e 0,2 mg/ml).

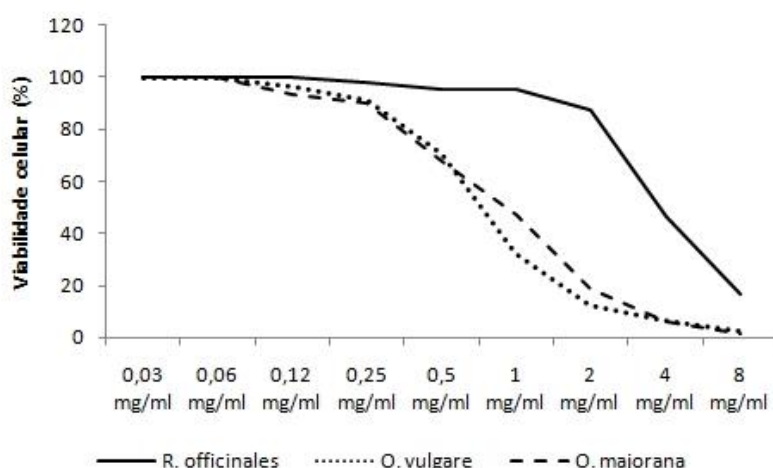


Figura 1. Viabilidade de células *Madin-Darby Bovine Kidney* (MDBK) após exposição aos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare* e *Origanum majorana* durante 24 horas. Dados mensurados por meio do ensaio de redução do MTT e expressos em porcentagem de viabilidade celular comparadas ao controle de células (100%)

Observa-se, na Tabela 1, os resultados dos ensaios antivirais. O título viral do BoHV-1, sem nenhum tipo de tratamento (controle) foi de $10^{6,25}$ DICC₅₀/25 µl, e todos os tratamentos demonstraram atividade antiviral.

Tabela 1. Atividade antiviral dos óleos essenciais de alecrim, orégano e manjerona. Título viral e percentual de inibição viral (PI)

Tratamento	Concentração	Título viral após tratamento (log10)	PI (%)
Controle	-	6,25	-
Alecrim	1 mg/ml	5,25	90,0
	2 mg/ml	5,25	90,0
Orégano	0,1 mg/ml	5,5	82,22
	0,2 mg/ml	4	99,44
Manjerona	0,1 mg/ml	4,5	98,22
	0,2 mg/ml	4,5	98,22

Óleos essenciais são compostos que, pela sua forma de extração, mantém a maioria dos constituintes químicos da planta. Os óleos essenciais utilizados nesse estudo foram caracterizados quimicamente (WALLER et al., 2016a; WALLER et al., 2016b) e apresentaram ácidos fenólicos, terpenos e flavonóides. Os compostos 1,8 cineole, 4-terpineol, γ terpineno destacaram-se em todos os óleos. Esses autores ainda relatam atividade antimicrobiana desses óleos sobre micro-organismos do complexo *Sporothrix schenckii*.

Existe dificuldade em determinar o mecanismo de ação dos compostos com complexidade química, pelos componentes atuarem sinergicamente ou antagonicamente. Em condições laboratoriais, apenas os estudos com os componentes isolados e/ou atuando sinergicamente em concentrações conhecidas podem identificar quais compostos apresentam os efeitos biológicos apresentados. Existem estudos na literatura científica que sugerem mecanismo de ação: Siddiqui et al. (1996), ao utilizarem microscopia eletrônica de transmissão, sugeriram que orégano atuou na dissolução do envelope viral de vírus da família *Herpesviridae*.

Em estudos conduzidos por Elizaquível et al. (2013), óleo de orégano (2%) reduziu título de norovírus murino e calicivírus felino (ambos sem envelope) em temperatura de 37°C, porém à temperatura de 4°C não obtiveram sucesso no combate ao vírus, sugerindo um efeito antiviral dependente da temperatura. Astani et al. (2011), ao utilizar metodologia semelhante à empregada neste estudo, para avaliação de efeito antiviral de óleos essenciais sobre herpesvírus humano, concluíram que o mecanismo de ação se baseia na ligação direta de componentes dos óleos a estruturas virais.

Atividades antibacteriana e antifúngica de óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae já foram descritas (atividade sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Sporothrix schenckii*), e os autores relatam mecanismos de ação semelhantes, com atuação inicial em regiões superficiais dos micro-organismos e que, dependendo da concentração utilizada apresenta efeito bacteriostático/fungistático/virustático ou bactericida/fungicida/virucida (CELIK TAS et al. 2007; WALLER et al., 2016a).

4. CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de alecrim, orégano e manjerona, nas concentrações testadas, apresentaram atividade antiviral frente ao BoHV-1, com um percentual de inibição acima de 80%. Os dados apresentados são importantes para guiar estudos na busca de novas alternativas de controle às infecções pelo BoHV-1.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. **Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.**, 2011.

CELIK TAS, O.Y.; KOCABAS, E.E. H.; BEDIR E.; SUKAN F.V.; OZEK T.; BASER K.H.C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemical**, v. 100, p. 553–559, 2007.

ELIZAQUÍVEL, M.; AZIZKHANI, R.; AZNAR, G.; SANCHEZ, G. The effect of essential oils on norovirus surrogates. **Food Control**, v. 32, p. 275-278, 2013.

FLORES, E. **VIROLOGIA VETERINÁRIA**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007.

LIMA, L. M.; BABAKANI, B.; BOLDADI, S. A. H.; et al. Essential oils composition and antibacterial activities of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. **International Journal of Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, n. 2, p. 214-219, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

REED, R.H.; MUENCH, H. A single method of estimating fifty percent end points. **American Journal of Hygiene**, v.27, n.3 p.493-497, 1938.

SIDDIQUI, Y.M.; ETTAYEBI, A.M.; AL-AHDAL, M.N. Effect of essential oils on the enveloped viruses: antiviral activity of oregano and clove oils on herpes simplex virus type1 and Newcastle disease virus. **Medical Science Research**, v. 24, p. 185-286, 1996.

WALLER, S. B. MADRID, I. M.; FERRAZ, V.; PICOLI, T.; CLEFF, M. B.; DE FARIA, R. O.; MEIRELES, M.C.A.M.; DE MELLO, J.R.B. Cytotoxicity and anti-*Sporothrix brasiliensis* activity of the *Origanum majorana* Linn. oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 896-901, 2016a.

WALLER, S. B.; MADRID, I. M.; CLEFF, M. B.; SANTIN, R.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Effects of essential oils of *Rosmarinus officinalis* Linn. and *Origanum vulgare* Linn. from different origins on *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* complex. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Online)**, v. 68, p. 991-999, 2016b.