

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosa centifolia* FRENTE À SARS-COV-2

VICTOR DOS SANTOS BARBOZA¹; ANDRESSA DE OLIVEIRA BLANKE HELLWIG²; PATRÍCIA DAIANE ZANK²; MILENA MATTES CERVEIRA²; JANICE LUEHRING GIONGO²; RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER³

¹Universidade Federal de Pelotas – victorbarboza10@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – patricia-zank@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – andressa-blanke@hotmail.com

²Faculdade Anhanguera – janicegiongo@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – rodvaucher@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A contínua disseminação global do COVID-19 (doença SARS-CoV-2 2019) está causando uma repercussão sem precedentes na saúde humana e na economia (WANG et al., 2020). Apesar do modo primário de transmissão ser através de gotículas de ar (CHAN et al., 2020) e contato (CARLOS et al., 2020), a transmissão via águas residuais é uma preocupação considerada crítica (LAHRICK et al., 2021). Faltam técnicas capazes de proporcionar uma desinfecção completa (GOSWAMI e PUGAZHENTHI, 2020), juntamente com a incerteza relacionada ao comportamento do SARS-CoV-2 no ambiente natural e riscos de contaminação (VENUGOPAL et al., 2020). Este fato torna urgente a pesquisa de novas alternativas para remoção de vírus da água e efluentes e tendo em vista que as plantas fornecem a indústria farmacêutica diversos compostos com propriedades bioativas medicinais, surgem como uma alternativa no combate e tratamento de diversas patogenias (ASIF et al., 2020; KOWALCZYK et al., 2020). Assim, esta pesquisa teve como objetivo de avaliar atividade antiviral utilizando o óleo essencial da *Rosa centifolia* (OERC) na remoção de SARS-CoV-2 presente na água.

2. METODOLOGIA

Para o experimento de remoção do vírus, adicionamos 10 mg de OERC em um microtubo contendo 1,5 mL de água ultrapura estéril livre de RNase e 150 µL da suspensão viral SARS-CoV-2 inativada ($2,5 \times 10^6$ cópias/mL), seguido de incubação a 28°C com agitação a 200 rpm por 24 h, pH 7,0. Para o controle positivo, adicionamos 750 µL de água DEPC e 750 µL da solução de SARS-CoV-2.

Após a incubação, o sobrenadante do OERC foi transferido para um novo microtubo e o RNA viral foi extraído. A extração do RNA foi realizada utilizando o kit QuickExtract RNA Extraction (Lucigen, Hoddesdon, Ucrânia). Após a extração, os RNAs foram quantificados em NanoDrop™ (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Uma concentração de aproximadamente 10 ng de RNA foi usada para realizar RT-qPCR.

O primer e a sonda usados nas reações de PCR foram projetados de acordo com as sequências publicadas pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2020). Resumidamente, uma reação de 25 µL do volume final foi usada, com os seguintes volumes adicionados 1x do master mix concentrado: 5 µL de RNA de amostra, 12,5 µL de 2x tampão de reação, 1 µL de Superscript™ III One-Step com Platinum™ Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Darmstadt, Alemanha), 0,4 mM de cada dNTP, 0,4 µL de uma solução 50 mM de MgSO₄ (Invitrogen), 1 µg de albumina bovina não acetilada (Roche), 10 µM de cada primer 2019-nCoV N1 (5'GACCCCAAAATCAGCGAAAT3'), 2019-nCoV N1 (5'TCTGGTTACTGCCAGTTGAACTTG3') e sonda 2019-nCoV N1-P2019-nCoV N1'-FAM – ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC– BBQ 3') e água DEPC. A reação ocorreu no QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) na seguinte ciclagem: 55°C por 10 min para transcrição reversa, seguido de 95°C por 3 min e 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 58 °C por 30 s.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar na Tabela 1 que os valores detectados no sobrenadante foram de ct 38.36 para OERC enquanto que para o controle positivo identificamos o ct 24.67, respectivamente.

Tabela 1. Limiar do ciclo (C_T), carga viral (cópias mL⁻¹) e remoção obtida após 24 h de incubação.

	OERS	Controle negativo	Controle positivo
Controle CT	-	UND	24,67
Carga viral no controle (cópias mL ⁻¹)	-	UND	2,45 x 10 ²
Sobrenadante CT	38,36	UND	-
Carga viral no sobrenadante (cópias mL ⁻¹)	7 x 10 ⁻⁵	UND	-

Os valores são média ± desvio padrão. As médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes ao nível de confiança de 95% (teste de Tukey). A sigla UND indica que não observou-se fluorescência durante amplificação da RT-qPCR

O valor limite do ciclo (CT) na análise RT-qPCR é referido como o número de ciclos de amplificação que são necessários para que o gene exceda o nível limite. Os valores detectados para C_T são inversos ao conteúdo de carga viral, e representa um método indireto de detecção do número de cópias do RNA viral (RAO et al., 2020).

A concentração de SARS-CoV-2 utilizada neste trabalho foi selecionada para ser superior aos níveis encontrados em águas residuais e no meio ambiente, garantindo assim que OERC seria capaz de remover a carga viral de forma eficiente em diferentes locais que apresentam diferentes níveis de partículas virais.

Em nosso estudo constatamos uma carga viral no controle positivo de 2,45x 10², correspondendo a 245,6 cópias mL⁻¹, enquanto que no controle negativo observamos uma carga viral de 7 x 10⁻⁵, totalizando em 0,00007 cópias mL⁻¹. Conforme descrito pela literatura, a média, títulos de RNA SARS-CoV-2 de 5,1 ± 0,3, 5,5 ± 0,2 e 5,5 ± 0,3 log¹⁰ cópias mL⁻¹ foram quantificados em águas residuais usando misturas de primer/sonda N1, N2 e N3, respectivamente, sendo que títulos

de 4 e 5 a mais de 6 log¹⁰ cópias mL⁻¹ foram relatados em Massachusetts e França, respectivamente (WU et al., 2020; WURTZEL et al., 2020)

De acordo com estudo de Randozzo et al (2020), utilizando a técnica RT-qPCR, quantificaram a carga viral de RNA de SARS-CoV-2 em amostras de águas residuais não tratadas e constataram uma carga viral de 5,4 ± 0,2 log¹⁰ cópias genômicas/L em média.

4. CONCLUSÕES

Concluimos que este estudo destaca a possibilidade de utilização OERS para redução de SARS-CoV-2, sendo uma excelente alternativa para tratamento de efluentes ou descontaminação de cursos d'água.

Portanto, o desenvolvimento um biomaterial de baixo custo incorporado ao OERC, atenderia diversos países e consequentemente reduziria propagação viral de COVID-19, assim interferindo nas situações atuais e futuras da pandemia ocasionada pelo SARS-CoV-2.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASIF, M., SALEEM, M., SAADULLAH, M., YASEEN, H.S., AL ZARZOUR, R. COVID-19 and therapy with essential oils having antiviral, anti-inflammatory, and immunomodulatory properties. **Inflammopharmacology**, v.5, p.1153-1161, 2020.

KOWALCZYK A, PRZYCHODNA M, SOPATA S, BODALSKA A, FECKA I. Thymol and Thyme Essential Oil-New Insights into Selected Therapeutic Applications. **Molecules**, v.25(18), p.4125, 2020.

WANG H., LI X., LI T., ZHANG S., WANG L., WU X., LIU J. The genetic sequence, origin, and diagnosis of SARS-CoV-2. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **Infect. Dis**, v.39, p.1629–1635, 2020.

CHAN, K. W., WONG, V. T., TANG, S. C. W. COVID-19: An Update on the Epidemiological, Clinical, Preventive and Therapeutic Evidence and Guidelines of Integrative Chinese-Western Medicine for the Management of 2019 Novel Coronavirus Disease. **Am J Chin Med**, p. 1-26, 2020.

CARLOS W.G., CRUS C., CAO B., PASNICK S., JAMIL S. Novel Wuhan (2019-nCoV) coronavirus. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**, v.201, p.7–8, 2020.

LAHRICH, S., LAGHRIB, F., FARAHI, A., BAKASSE, M., SAQRANE, S., EL MHAMMEDI, M.A. **Review on the contamination of wastewater by COVID-19 virus: impact and treatment.** *Sci.Total Environ*, v.751, p. 142325, 2021.

Goswami, K.P.,Pugazhenth, G. **Credibility of polymeric and ceramic membrane filtration in the removal of bacteria and virus from water: a review.** *J. Environ. Manag*, v.268, p. 110583, 2020.

VENUGOPAL, A., GANESAN, H., RAJA, S.S.S., GOVINDASAMY, V., ARUNACHALAM, M., NARAYANASAMY, A., VELLINGIRI, B. **Novel wastewater surveillance strategy for early detection of SARS-CoV-2 disease 2019 hotspots**. Curr. Opin. Environ. Sci. Health, v.17, p. 8-13, 2020.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention Home Page**. Acessado em fev. 2020. Online. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-for-detection-instructions.pdf>

RAO, S.N., Manissero, D., STEELE, V.R., PAREJA, J. **A narrative systematic review of the clinical utility of cycle threshold values in the context of COVID-19**. Infect. Dis. Ther, p. 1-14, 2020.

WURTZER, S.S., MARECHAL, V., MOUCHEL, J.M., MOULIN, L. **Time course quantitative detection of SARS-CoV-2 in Parisian wastewaters correlates with COVID-19 confirmed cases**, medRxiv, 2020.

WU, F., XIAO, A., ZHANG, J., GU, X., LEE, W.L., KAUFFMAN, K., HANAGE, W., MATUS, M., GHAEI, N., ENDO, N., DUVALLET, C., MONIZ, K., ERICKSON, T., CHAI, P., THOMPSON, ALM, E. **SARS-CoV-2 titers in wastewater are higher than expected from clinically confirmed cases**, medRxiv, 2020.

RANDAZZO, W., TRUCHADO, P., CUEVAS-FERRANDO, E., SIMÓN, P., ALLENDE, A., SÁNCHEZ, G. **SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area**, Water Res., v.181, p. 115942, 2020.