



Reitoria



GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ
Secretaria da Ciência, Tecnologia
e Educação Superior



Ciência para redução das desigualdades
**XX Encontro de
Iniciação Científica**
**XIII Encontro de
Pós-Graduação e Pesquisa**
Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA



GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ
Secretaria da Ciência, Tecnologia
e Educação Superior

USO DE PLANTAS *Azadirachta indica* E *Melia azedarach* COMO ANTIVIRAIS CONTRA O LENTIVÍRUS CAPRINO EM COLOSTRO: avaliação dos efeitos citópatóxicos virais

Ana Lúcia Madeira de Sousa¹, Raymundo Rizaldo Pinheiro², Juscilânia Furtado Araújo³, Ana Carolina Silva e Silva⁴, Renato Mesquita Peixoto⁵, Maria Fátima da Silva Teixeira⁶

¹Estudante de doutorado do programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE); analidiams10@yahoo.com.br;

² Pesquisador Embrapa Caprinos e ovinos;

³ Estudante de doutorado da Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), Universidade Estadual do Ceará (UECE);

⁴ Estudante de graduação em Química, Universidade Estadual do Ceará (UECE);

⁵ Doutor em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE),

⁶ Orientadora; Professora do pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Resumo: Este trabalho objetivou avaliar uso das plantas *Azadirachta indica* e *Melia azedarach* como antivirais contra o Lentivírus caprino (LVC) em colostro, por meio da observação dos efeitos citópatóxicos virais. Para tanto, coletou-se colostro de oito cabras, este foi infectado com a cepa padrão do LVC. Em seguida, foi subdividido em alíquotas, e estas tratadas com os extratos de *A. indica* e de *M. azedarach*, como um tempo de ação de 30, 60, 90 minutos. Após, foi realizado o cocultivo das células somáticas do colostro em células da membrana nictitante ovina (MNO). Depois do cocultivo, pode-se concluir que houve uma redução gradativa dos efeitos citópatóxicos virais de acordo com os períodos de ação de 30, 60 e 90 minutos, respectivamente.

Palavras-Chave: Extratos etanólicos; Plantas antivirais; Transmissão lactogênica

INTRODUÇÃO

A lentivirose caprina (LVC) é uma enfermidade de caráter incurável e infectocontagioso, que causa grandes perdas econômicas à caprinocultura (AZEVEDO et al., 2017). A transmissão lactogênica deste vírus, via colostro e leite, ocorre através do trato gastrointestinal pela ingestão do colostro infectado, tanto pelo vírus livre como pelo pro-vírus presente no interior de monócitos/macrófagos (HERRMANN-HOESING et al., 2007).

Dentre as técnicas utilizadas no bloqueio do vírus pela via lactogênica, a mais utilizada é a termização. No entanto, este método é considerado dispendioso, pois necessita de equipamentos e mão-de-obra treinada para sua execução. Portanto, se faz necessário, a busca de alternativas com caráter prático e barato ao produtor rural, que sejam eficientes no bloqueio destas enfermidades (ANDRADE, 2008).

Vários estudos foram realizados com uso de extrato de plantas medicinais no tratamento de doenças respiratórias, entéricas, e no controle de endo e ectoparasitas (SIMONI, 2009). Dentre estas plantas, temos as espécies *Azadirachta indica* (Nim) e *Melia azedarach* (Cinamomo), que já demonstraram inúmeras aplicações, como por exemplo: inseticida, bactericida e atividade antiviral, tanto na medicina humana quanto na veterinária (ALCHÉ et al., 2002; FACCIN-GALHARDI et al., 2012). Além disso, já foram realizados estudos *in vitro*, que evidenciaram a atividade antiviral destas plantas contra o lentivírus caprino. Neste estudo, Araújo (2008), observou que os extratos de fitocompostos, provindo das folhas de *Azadirachta indica* (Nim) e *Melia azedarach* (Cinamomo), quando testados em culturas de células fibroblásticas de caprinos, apresentaram ação antiviral comprovada contra o LVC. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso das plantas *Azadirachta indica* e *Melia azedarach* como antivirais contra o LVC presente no colostro, por meio da avaliação dos efeitos citopáticos virais.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento (protocolo CEUA/EMBRAPA: 002/2018) foi realizado na Embrapa Caprinos e Ovinos. Coletou-se aproximadamente 100 mL de colostro de oito cabras recém-paridas, e em seguida, as amostras foram combinadas em um *pool*. Este material foi infectado com 450 μ L da cepa padrão de LVC (CAEV-Cork), com título inicial de 10^{4,8} TCID₅₀/mL, durante 60 min, à 37°C sob agitação. Em seguida, o *pool* infectado foi subdividido em 24 alíquotas de 15 mL cada.

Os extratos etanólicos provindos das folhas de *Azadirachta indica* (Nim) e *Melia azedarach* (Cinamomo), nas frações orgânicas; bruta, acetato de etila e metanol, foram adicionados nas amostras de colostro, na concentração de 150 μ g, durante 30 min, 60 min e 90 min, individualmente. Também foram utilizados os tratamentos controle do colostro (sem adição dos extratos). Após os períodos de ação, as amostras foram centrifugadas a 3.000 g durante 15 min., a 4°C. A obtenção das células somáticas do colostro (CSC) seguiu metodologia descrita por Karanikolaou et al. (2005), as citadas células foram destinadas ao cocultivo com membrana nictitante ovina (MNO).

Para o cocultivo, seis placas de 24 poços foram preparadas 72 horas antes, com adição de células da MNO. Após a confluência de cerca de 80% das células de MNO, as CSC foram distribuídas nas placas, na quantidade de 50 μ L em quatro repetições. Os poços foram acrescidos de 500 μ L de meio essencial mínimo (MEM), adicionado de 2% de anfotericina B, 3% de penicilina e estreptomicina, 1% de gentamicina e 5% de soro fetal bovino (SFB). Institui-se por placa, oito poços controle, sendo a metade com células de MNO, controle negativo (C⁻), e a segunda metade, o controle positivo (C⁺) com células de MNO infectadas com cepa padrão de LVC. As placas foram armazenadas em ambiente a 5% de CO₂, a 37 °C. Foram realizadas trocas de meio a cada sete dias e tripsinização celular a cada 21 dias. Após o período de cultivo, os poços foram corados com cristal violeta (0,1%) para visualização dos efeitos citopáticos virais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de avaliação dos efeitos citóxicos (ECPs) virais estão dispostos na tabela 1. Após 63 dias de cocultivo foi observada uma redução gradativa dos ECPs conforme o tempo, com ambas as plantas. Nos tratamentos com 30 minutos de ação dos extratos *A. indica* e *M. azedarach*, em todas as frações orgânicas, apresentou grande destruição da monocamada celular e presença moderada de sincícios. Estes ECPs se mantiveram constantes nos tratamentos com 60 minutos de ação das frações orgânicas de *A. indica*. No entanto, os mesmos apresentaram leve redução nos tratados com extratos de *M. azedarach*, com o mesmo tempo de ação. As células tratadas com as três frações orgânicas de ambas as plantas, durante 90 minutos, apresentaram redução acentuada dos ECPs.

O tratamento com fração orgânica bruta de *A. indica*, com período de ação de 90 minutos, apresentou menor número de ECPs, e foi observado formação de sincício. No entanto, na fração bruta provinda de *M. azedarach*, não apresentou ECPs característicos para o LV caprino (Fig.1-B, H). A fração de acetato de etila, em ambas as plantas, também com tempo de ação de 90 minutos, não apresentou ECPs característicos para o vírus (Fig.1- C, I). No tratamento com *A. indica*, com a fração orgânica provinda do metanol, durante o mesmo período de ação, o tratamento proporcionou redução dos ECPs, e estes não foram visualizados. Entretanto, houve formação de sincícios nas células de MNO no tratamento de 90 minutos usando a fração metanólica de *M. azedarach* (Fig.1- D, J).

Este estudo corrobora com dados de Araújo (2008) que observou a ação antiviral dos extratos etanólicos provindos de *A. indica* e *M. azedarach* contra o lentivírus caprino, onde a fração de acetato de etila obteve resultados semelhantes ao deste estudo. Além do mais, Parida et al. (2002), observaram resultados significativos ao testarem extratos aquosos obtido das folhas a *A. indica*, sobre o vírus do dengue tipo 2. Estes, suprimiram a replicação do vírus tanto em sistemas *in vitro* como *in vivo*. Além disso, os polissacarídeos obtidos a partir das folhas de *A. indica*, atuaram contra o poliovírus (PV-1) ao inibir a intensidade da replicação viral em culturas celulares (FACCIN-GALHARDI et al., 2012).

Em relação a atividade antiviral de *M. azedarach*, Castilla et al. (1998), extraíram a Meliacine, um peptídeo isolado a partir de folhas de *M. azedarach*. Este peptídeo inibiu a multiplicação do vírus Junin em células renais de macaco verde (VERO) tratadas com o composto antes da infecção (pré-tratamento), ou imediatamente após a adsorção do vírus. Além disso, Alché et al. (2002) constataram que extratos provindos do cinamomo exercem uma ação antiviral tanto na síntese de DNA viral quanto na maturação e saída do herpes vírus tipo 1, também células de linhagem VERO.

TABELAS E IMAGENS

Tabela 1. Níveis dos efeitos citopáticos nas células de MNO após cocultivo com células somáticas de colostro tratadas nas frações orgânicas: bruta, acetato de etila e metanol

		Efeitos citopáticos virais											
		Destruição celular						Presença de sincício					
Tempo (min.)		C-	Bruto	A. Etila	Metanol	C+ c.	C+	C-	Bruto	A. Etila	Metanol	C+ c.	C+
<i>A. indica</i>	30	-	++++	+++	+++	+++	+++	-	+	+++	+++	+++	+++
	60	-	+++	++++	++++	++++	++++	-	++	+++	+++	++++	++++
	90	-	+	-	-	+	++	-	++	-	-	+++	+++
<i>M. azedarach</i>	30	-	++++	++++	++++	++++	++++	-	+++	+++	+++	+++	++++
	60	-	++	+++	+++	+++	+++	-	+++	++	++	+++	+++
	90	-	-	-	+	++	++	-	-	-	++	++	++

C-: controle negativo; C+: controle positivo, C+c.: controle positivo colostro, sem extratos. -: sem efeito citopático; +: efeito muito leve; ++: efeito leve; +++: efeito moderado; ++++: efeito intenso.

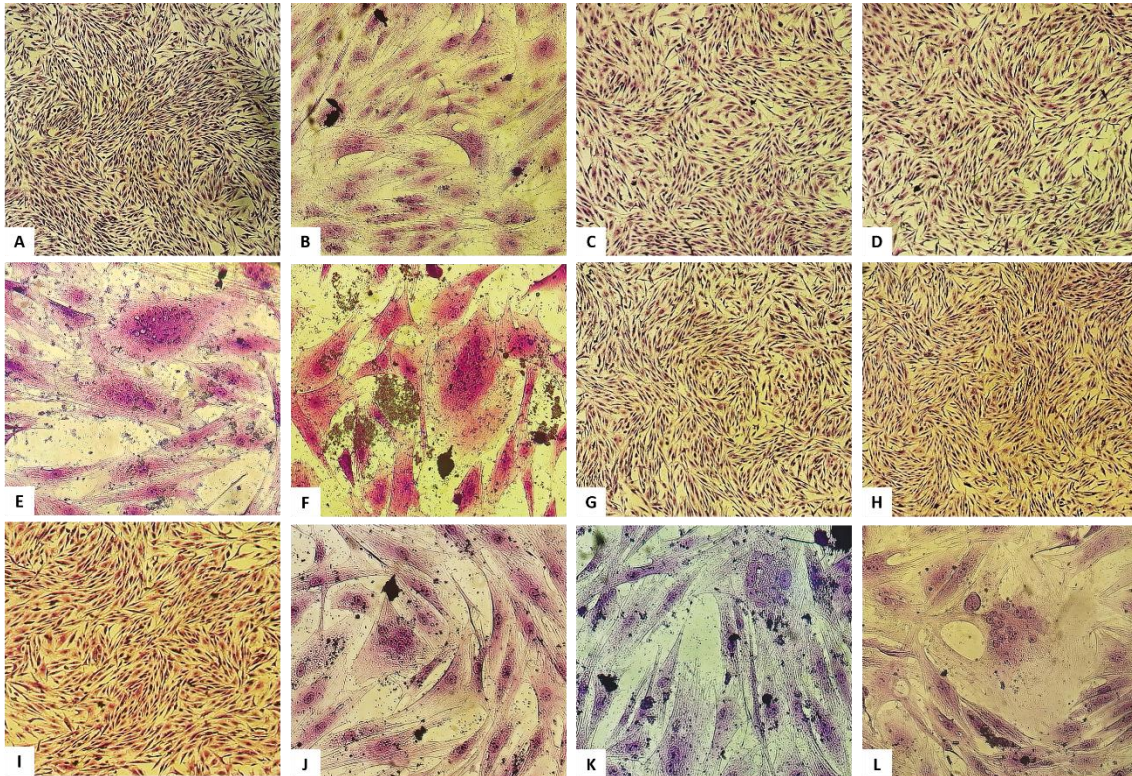


Figura 1. Cocultivo com células de MNO e células somáticas do colostro. A e G: controle negativo da cultura com células de MNO (aumento 100x). B, C e D: tratamento com extrato de *A. indica*, durante 90 minutos, com as frações bruta, acetato de etila e metanol, respectivamente (aumento 100x/200x). H, I, J: tratamento com extrato de *M. azedarach*, durante 90 minutos, com as frações bruta, acetato de etila e metanol, respectivamente (aumento 100x/200x). E e K: tratamento controle (sem adição dos extratos) com as células de colostro (aumento 100x/200x). F e L: controle positivo da cultura (aumento 100x);

CONCLUSÃO

Os extratos etanólicos de *A. indica* e de *M. azedarach*, nas frações bruta, acetato de etila e metanol, apresentam redução gradativa dos ECP para lentivírus caprino, conforme os tempos de ação de 30, 60 e 90 minutos. Além disso, no período de 90 minutos ação, a fração orgânica de acetado de etila, de ambas as plantas, não apresentou formação de ECP nas células da MNO cocultivadas com células somáticas do colostro infectado com o vírus.

AGRADECIMENTOS

Embrapa Caprinos e Ovinos, Universidade Estadual do Ceará (UECE), FUNCAP, CNPq.

REFERÊNCIAS

ALCHÉ, L. E; BARQUERO, A. A.; SANJUAN, N. A.; CELIA E. COTO, C. E. An antiviral principle present in a purified fraction from *Melia Azedarach* L. Leaf aqueous extract restrains herpes simplex virus type 1 propagation. **Phytotherapy Research**, v.16, n.1, p. 348–352, 2002.

ANDRADE, M. L. R. **Avaliação da dinâmica de absorção do colostro em caprinos das raças saanen e moxotó explorados no semi-árido cearense**. 2008. 60f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale Do Acaraú – UVA, Sobral – CE, 320 2008.

ARAÚJO, S.A.C. **Avaliação in vitro da atividade antiviral de produtos sintéticos e naturais contra lentivírus de pequenos ruminantes**. 2008. 149f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

AZEVEDO, D. A. A.; SANTOS, V. W. S.; SOUSA, A. L. M.; PEIXOTO, R. M. ; PINHEIRO, R. R. ; ANDRIOLI, A. ; TEIXEIRA, M. F. S. Small ruminant lentiviruses: economic and productive losses, consequences of the disease. **Arquivos do Instituto Biológico (ONLINE)**, v. 84, p. 1-10, 2017.

CASTILLA, V.; BARQUERO, A. A., MERSICH, S. E.; COTO, C. E. In vitro anti-Junin virus activity of a peptide isolated from *Melia azedarach* L. leaves. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.10, n.1, p. 67–75, 1998.

FACCIN-GALHARDI, C. L; YAMAMOTO, K. A.; RAY, S.; RAY, B.; LINHARES, R. E. C; NOZAWA, C. The in vitro antiviral property of *Azadirachta indica* polysaccharides for poliovirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v.142, n.1, p. 86–90, 2012

HERRMANN-HOESING, L. M.; PALMER, G. H.; KNOWLES, D. P. Evidence of proviral clearance following postpartum transmission of an ovine lentivirus. **Virology**, v.362, n.1, p.226–234, 2007

KARANIKOLAOU, K.; ANGELOPOULOU, K.; PAPANASTASOPOULOU, M. et al. Detection of small ruminant lentiviruses by nPCR and serology tests in field samples of animals from Greece. **Small Ruminant Res.**, v.58, n.2, p.181-187, 2005.

PARIDA, M. M.; UPADHYAY, C.; PANDYA, G.; JANA, A. M. Inhibitory potential of neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on Dengue virus type-2 replication. **Journal of Ethnopharmacology**. v.79, n.2, p. 273-27, 2002.