

## ESTUDO DO EFEITO CITOTÓXICO E DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DE CORPOS FRUTÍFEROS DE *Agaricus blazei* (MURRIL)

**Fernanda Virgílio Poli<sup>1</sup>; Rosária Regina Tesoni de Barros Richartz; Mariane Bonatti Chaves; Regina Maria Miranda Gern<sup>2</sup>**

**RESUMO:** A espécie *Agaricus blazei* (Murrill), conhecida popularmente como Cogumelo do Sol, é nativa de Piedade, interior do estado de São Paulo, e atualmente é bastante cultivada no Japão, principalmente por suas propriedades medicinais. Em sua composição química podem ser encontrados complexos glicoprotéicos e polissacarídeos ( $\beta$ -glicanos) que apresentam propriedade de potencializar o sistema imune, além de atividade antitumoral, antioxidante, antiinflamatória e antiviral. Vários trabalhos têm demonstrando o potencial terapêutico de *Agaricus blazei* atribuído à presença de polissacarídeos com atividade imunoestimulatória denominados  $\beta$ -glicanos do tipo  $\beta$ -(1,3),  $\beta$ -(1,4) e  $\beta$ -(1,6) presentes na parede celular deste fungo. A herpes bucal é uma doença infecciosa muito contagiosa, geralmente benigna, causada pelo vírus da família dos Herpesviridae, o Herpes simplex vírus (HSV-1). Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico *in vitro* de diferentes concentrações de polissacarídeos extraídos de corpos frutíferos de *Agaricus blazei* (9,76 a 5.000,00  $\mu\text{g/mL}$ ), bem como avaliar a atividade antiviral *in vitro* destes compostos contra o vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1). Para a extração dos polissacarídeos seguiu-se metodologia proposta pela Farmacopéia Brasileira. Para avaliação do efeito citotóxico, bem como da atividade antiviral, utilizou-se células Vero. O vírus utilizado foi o Herpes Simplex (HSV-1). Em relação ao teste de citotoxicidade, a concentração máxima de polissacarídeos, tanto de alto quanto de baixo peso molecular, que não apresentou efeito citopático às células Vero foi a de 156,25  $\mu\text{g/mL}$ . Em relação à atividade antiviral, todas as concentrações de polissacarídeos inferiores à concentração citotóxica, mostraram-se incapazes de reduzir a infectividade do vírus HSV-1.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Agaricus blazei*; Atividade antiviral; Polissacarídeos.

### 1 INTRODUÇÃO

A espécie *Agaricus blazei* (Murrill), conhecida popularmente como Cogumelo do Sol, pertence à ordem Agaricales do grupo dos Basidiomicetos. Esta espécie é nativa de Piedade, interior do estado de São Paulo, e atualmente é bastante cultivada no Japão, principalmente por suas propriedades medicinais. Em sua composição química podem ser encontrados complexos glicoprotéicos e polissacarídeos ( $\beta$ -glicanos) que apresentam propriedade de potencializar o sistema imune, além de atividade antitumoral, antioxidante, antiinflamatória e antiviral (BRUGGERMANN *et al.*, 2006).

A herpes bucal é uma doença infecciosa muito contagiosa, geralmente benigna, causada pelo vírus da família dos Herpesviridae, o Herpes simplex vírus (HSV-1). Este

<sup>1</sup> Discente do Curso de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Biológicas da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Joinville – Santa Catarina. Bolsista IC/UNIVILLE. fernandavpoli@hotmail.com

<sup>2</sup> Docente do Curso de Engenharia Química, Engenharia Ambiental e Ciências Biológicas. Departamentos de Engenharia Química, Engenharia Ambiental e Ciências Biológicas da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Joinville – Santa Catarina. rgern@univille.br

vírus infecta algumas células de forma lítica causando lesão (com destruição de células) do tecido epitelial e das mucosas. O vírus HSV-1 tem como característica biológica o rápido crescimento em cultivo celular, uma ampla gama de hospedeiros e a capacidade, comum a todos os herpesvírus, de se manter latente nas células de seus hospedeiros por tempo indeterminado (COLLINS *et al.*, 1999).

O teste de citotoxicidade, antes do teste da atividade antiviral, se faz necessário para obtenção da máxima concentração de polissacarídeos que não causam o comprometimento da monocamada celular, presente nos testes *in vitro*, ou seja, que não apresenta efeito citopático. Este efeito é definido como o dano causado à célula, por exemplo, a lise, o arredondamento, a vacuolização, a formação de sincícios, inclusões, picnose e apoptose ([www6.ufrgs.br/labvir/aulat5.pdf](http://www6.ufrgs.br/labvir/aulat5.pdf)). A linhagem celular normalmente utilizada em estudos de replicação viral e ensaios com placas é a Vero, derivada do rim do macaco verde africano, (*Cercopithecus sabaues*) (TAKATA, 1994).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito citotóxico de diferentes concentrações de polissacarídeos extraídos de corpos frutíferos de *Agaricus blazei* (9,76 a 5.000,00 µg/mL), bem como avaliar a atividade antiviral destes compostos contra o vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Basidiomiceto e extração dos polissacarídeos: os corpos frutíferos de *Agaricus blazei* foram obtidos do Comércio de Especiarias Oliveira LTDA – ME, localizada em Joinville – SC. 3 g, secos e pulverizados, ficaram em infusão em 27 mL de água fervente até atingir a temperatura ambiente (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002). Em seguida, procedeu-se a filtração. Os polissacarídeos de baixo peso molecular foram obtidos a partir do filtrado através de precipitação com etanol (1:5 v/v, filtrado/etanol). Após centrifugação o precipitado foi clarificado, sofreu nova precipitação, foi lavado com etanol e acetona e o excesso de solventes evaporado. Para obtenção dos polissacarídeos de alto peso molecular utilizou-se o resíduo sólido proveniente da primeira filtração. Este foi fervido em água por 3 horas e filtrado. O filtrado foi submetido ao mesmo processo de extração descrito para obtenção dos polissacarídeos de baixo peso molecular.

Teste citotóxico: utilizou-se solução salina tamponada para preparo das concentrações a serem avaliadas: 5.000,00 µg/mL; 2.500,00 µg/mL; 1.250,00 µg/mL; 625,00 µg/mL; 312,50 µg/mL; 156,25 µg/mL; 78,10 µg/mL; 39,06 µg/mL; 19,53 µg/mL e 9,76 µg/mL. Todos os testes foram realizados em microplacas de 96 poços, em triplicata, sendo as duas últimas fileiras reservadas para controle. Neste caso, utilizou-se somente meio essencial mínimo de manutenção (MEMM) e células Vero. As microplacas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, a 37 °C, por 72 horas. Considerou-se como produtora de efeito citotóxico a concentração que causou 50%, ou mais, de destruição da monocamada celular.

Atividade antiviral: partiu-se de uma solução viral, vírus Herpes simplex (HSV-1), de concentração 105,625/50µL para o cálculo da concentração mínima capaz de destruir 50% da monocamada celular, ou seja, 100 DIC50. As concentrações das soluções de polissacarídeos testadas, tanto de alto quanto de baixo peso molecular, foram: 320 µg/mL; 160 µg/mL; 80 µg/mL; 40 µg/mL; 20 µg/mL e 10 µg/mL. Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços, em triplicata. Neste ensaio utilizam-se dois controles: controle celular (somente células Vero, 300.000 células/mL) e controle viral (células Vero e vírus HSV-1).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito citotóxico de polissacarídeos, tanto de alto quanto de baixo peso molecular, extraídos de *Agaricus blazei* foi avaliado. As concentrações avaliadas foram: 5.000,00 µg/mL; 2.500,00 µg/mL; 1.250,00 µg/mL; 625,00 µg/mL, 312,50 µg/mL, 156,25 µg/mL; 78,10 µg/mL; 39,06 µg/mL; 19,53 µg/mL e 9,76 µg/mL. As Figuras 1(a) e (b) mostram o efeito, mais especificamente o arredondamento, a vacuolização, a formação de sincícios, de inclusões e a destruição da monocamada celular, parcial ou integralmente, das células Vero, quando foram utilizadas concentrações a partir de 312,50 µg/mL. Concentrações menores não apresentaram efeito citotóxico.

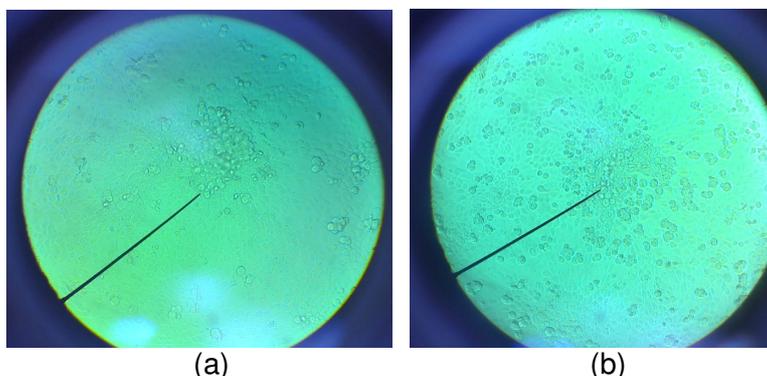


Figura 1. Efeito citopático causado às células Vero por polissacarídeos provenientes de corpos frutíferos de *Agaricus blazei* (a) polissacarídeos de baixo peso molecular e (b) de alto peso molecular.

Bruggemann *et al.* (2006) realizaram estudo similar, avaliou-se a atividade antiviral de polissacarídeos extraídos de *Agaricus blazei*, contra herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e bovino tipo 1 (BoHV-1), utilizando cultura de células HEp-2. O efeito citotóxico, monitorado por mudanças morfológicas nas células, mostrou que o extrato aquoso de *A. blazei* é inócuo nas concentrações de 10 a 200 µg/mL. A concentração tóxica para 50% das células (CC50), determinada utilizando o corante MTT, foi de 5.000 µg/mL. Quanto a atividade antiviral, observaram inibição da replicação do HSV-1 de  $73,9 \pm 0,38\%$  quando a cultura foi tratada com 100 µg/mL de extrato, e inibição de  $78,4 \pm 0,16\%$  quando a cultura foi tratada com 50 µg/mL de extrato. Esta inibição foi confirmada pelo teste de inumofluorescência indireta, o qual indicou redução de 47% no número de células fluorescentes, para ambas as concentrações. Quanto a replicação de BoHV-1, houve inibição de  $51 \pm 0,33\%$  e  $46,8 \pm 0,16\%$  para as concentrações de 100 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente. O número de células fluorescentes foi reduzido em 25,4% para a concentração de 100 µg/mL e 16% para 50 µg/mL.

Neste trabalho as concentrações que não apresentaram efeito citotóxico às células Vero, ou seja, 156,25 µg/mL; 78,10 µg/mL; 39,06 µg/mL; 19,53 µg/mL e 9,76 µg/mL, foram avaliadas quanto à atividade antiviral, para o HSV-1. Esperava-se encontrar inibição da infectividade do HSV-1. Contudo, foi observado efeito citopático em todas as concentrações testadas, independentemente da utilização de polissacarídeos de alto ou de baixo peso molecular. Estes resultados sugerem que apesar destas concentrações não comprometerem a viabilidade celular, estes extratos precisam ser fracionados e purificados antes do teste antiviral. Desta forma será possível também propor o mecanismo de ação do vírus, ou seja, se a ação antiviral se dá por absorção dos polissacarídeos a célula viral impedindo assim que estes infectem as células ou se dá através da absorção dos polissacarídeos a célula estudada protegendo-a da infecção.

A atividade antiviral de substâncias derivadas de plantas e fungos contra o vírus herpes tem sido estudada no meio científico. Zhu *et al.* (2004) observaram que polissacarídeos sulfatados extraídos da alga *Sargassum patens* inibiram acima de 96% a infectividade do vírus herpes simplex tipo-2 (HSV-2) em células Vero. Huheihel *et al.*

(2002) mostraram que polissacarídeos sulfatados extraídos de *Porphyridium* sp. apresentaram 100% de proteção às células Vero contra os vírus HSV-1 e HSV-2, em concentrações a partir de 100 µg/mL. Além disso, não apresentaram efeito citotóxico até 500 µg/mL. A partir de 1.000 µg/mL as células pararam de se multiplicar, porém após uma observação microscópica não foi observado nenhum tipo de dano morfológico a célula. Talarico *et al.* (2004) mostraram que até 1.000 µg/mL de galactanas sulfatadas extraídas de duas algas, *Gymnogongrus griffithsiae* e *Cryptonemia crenulata*, não apresentam efeito citopático às células Vero. A concentração que inibiu 50% da replicação viral, IC50, foi de 0,5 a 2,5 µg/mL.

Liu *et al.* (2004) confirmaram a atividade antiviral do cogumelo *Ganoderma lucidum*, contra HSV-1 e HSV-2, em células Vero e, além disso, observaram maior eficiência quando o proteoglicano foi adicionado antes e durante a infecção, sugerindo que a ação ocorre devido a interferência nos processos iniciais de adsorção viral e penetração celular. Esta substância não apresentou efeito citopático até 2.000 µg/mL. Sorimachi *et al.* (2001) mostraram que o extrato aquoso e frações obtidas de extratos aquosos de *Agaricus blazei* são capazes de inibir o efeito citopático dos vírus Western Equine Encephalitis (WEE), poliovírus e HSV em cultura de células Vero.

#### 4 CONCLUSÃO

Em relação ao teste de citotoxicidade, a concentração máxima de polissacarídeos, tanto de alto quanto de baixo peso molecular, provenientes de corpos frutíferos de *Agaricus blazei*, que não apresentou efeito citopático às células Vero foi a de 156,25 µg/mL. Em relação a atividade antiviral, todas as concentrações de polissacarídeos inferiores a concentração citotóxica, mostraram-se incapazes de reduzir a infectividade do vírus Herpes simples (HSV-1).

#### REFERÊNCIAS

BRUGGERMANN, R.; ORLANDI, J.M.; BENATI, F.J.; FACCIN, L.C.; MANTOVANI, M.S.; NOZAWA, C.; LINHARES, R.E.C. Antiviral activity of *Agaricus blazei* Murril ss. heinem extract against human and bovine herpes viruses in cell culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 37, p. 561-565, 2006.

COLLINS, P.; ELLIS, N. Sensitivity monitoring of clinical isolates of herpes simplex virus to acyclovir. **Journal Medical Virology**, vol. 1, p. 58-66, 1999.

DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES VIRAIS. Disponível em <http://www6.ufrgs.br/labvir/aulat5.pdf>. Acesso em 03 Mar. 2009.

**FARMACOPÉIA BRASILEIRA**. 4ª Edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2002.

HUHEIHEL, M.; ISHANU, V.; TAL, J.; ARAD, S.M. Activity of *Porphyridium* sp. polysaccharide against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. **Journal Biochemistry Biophysics Methods**, vol. 50, p. 189–200, 2002.

LIU, J.; YANG, F.; YE, L.B.; YANG, X.J.; TIMANI, K.A.; ZHENG, Y.; WANG Y.H. Possible mode of action of antiherpetic activities of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.95, p. 265–272, 2004.

SORIMACHI, K.; IKEHARA, Y.; MAEZATO G.; OKUBO, A.; YAMAZAKI, S.; AKIMOTO, K.; NIWA, A. Inhibition by *Agaricus blazei* Murrill fractions of cytopathic effect induced by

Western Equine Encephalitis (WEE) virus on VERO cells In Vitro. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, vol. 65, p. 1645-1647, 2001.

TALARICO, L.B.; ZIBETTI, R.G.M.; FARIA, P.C.S.; SCOLARO, L.A.; DUARTE, M.E.R.; NOSEDA, M.D.; PUJOL, C.A.; DAMONTE, E.B. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 34, p. 63–71, 2004.

TAKATA, C.S.; KUBRUSLY, F. S.; MIYAKI, C.; MENDES, I. F.; RIZO E. Suscetibilidade da linhagem de células Vero a cepas vacinais do vírus do sarampo. **Revista Saúde Pública**, vol. 28, n. 3, p. 209-212, 1994.

ZHU, W.; CHIU, L.C.M.; OOI, V.E.C.; CHAN, P.K.S.; ANG Jr, P.O. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex vírus type 2. **International Journal Antimicrobiology Agents**, vol. 24, p. 81-85, 2004.