

***Tagetes patula* L. como inibidor natural contra dengue vírus
tipo três**
***Tagetes patula* – Marigold as a natural against dengue vírus type three**

(1) Eliza Flores de Souza; eliza_flores15@hotmail.com
(1) Suzy Carvalho Oliveira; suzy_carvalhooliveira@hotmail.com
(1) Gabrielle Figueiredo da Silva; gabriellegueiredo9@gmail.com
(1) Marisa Cristina da Fonseca Casteluber; marisa.casteluber@uemg.br

(1) Universidade do Estado de Minas Gerais, Av. São Paulo (Rod MG 040 URB), 3996 - Vila Rosário, MG, CEP: 32412-190
– Telefone: (31) 3533-4579

Recebido: 10 de abril de 2019; Revisado: 21 de maio de 2019

Resumo

A Dengue é uma endemia que afeta grande parte do mundo. No Brasil a incidência desta doença é muito alta. A doença é causada por um vírus classificado como arbovírus pertencente à família *Flaviviridae* e possui como principal vetor o *Aedes aegypti* que se reproduz em ambientes contendo água que são deixados pela ação antrópica do homem. Atualmente são conhecidos 4 sorotipos do DENV, todos estes circulantes no Brasil. A utilização de plantas medicinais no tratamento e cura de diversas doenças já é reconhecida, visto que vários medicamentos têm em sua formulação alguns componentes extraídos de vegetais. Já é conhecido na literatura os efeitos antivirais de flavonoides, como aqueles encontrados no *Tagetes patula*. Para realização do teste o extrato bruto da planta foi obtido através do macerado de 5 flores com caules e folhas em 15 mL de solução tamponada de PBS 1X, e posteriormente filtrado e acondicionado a -20°C para ser utilizado nos experimentos. Na realização do teste de dose-resposta vários volumes do extrato foram testados, a fim de, encontrar aquele capaz de inibir a multiplicação viral, constatada através da titulação em célula BHK-21. A curva de crescimento apontou uma redução das placas virais nos testes com o extrato em comparação ao controle de células infectadas com DENV.

Palavras-chave: Antiviral, Dengue, cravo de defunto.

Abstract

Dengue is an endemic that affects much of the world. In Brazil the incidence of this disease is very high. dengue is caused by a virus classified as arbovirus belonging to the family *Flaviviridae* and has as its main vector *Aedes aegypti* that reproduces in environments containing water that are left by man's anthropic action. Currently, 4 DENV serotypes are known, all of them circulating in Brazil. The use of medicinal plants in the treatment and cure of various diseases is already recognized, since several medicinal products have in their formulation some components extracted from plants. It is already known in the literature the antiviral effects of flavonoids, such as those found in *Tagetes patula*. The aim of this study was to evaluate the efficacy of *T. patula* in inhibiting the multiplication of dengue virus in vitro. For this, the crude extract of the plant was obtained through the maceration of 5 flowers with stems and leaves in 15 mL of buffered solution of 1X PBS, and later filtered and conditioned at -20°C to be used in the experiments. In performing the dose-response test, several volumes of the extract were tested in order to find the one capable of inhibiting viral multiplication, as evidenced by titration in BHK-21 cells. The growth curve indicated a reduction of the viral plaques in the tests with the extract as compared to the control of infected cells as DENV.

Key words: antiviral drugs, Dengue, *Tagetes patula*.

Introdução

O Brasil é um dos países que mais sofre com a dengue no mundo, isso devido ao seu clima tropical, que favorece a propagação do *Aedes aegypti*. A principal forma de combate à dengue ainda é a prevenção. Os conhecimentos populares sobre as doenças e suas estratégias de controle já é reconhecido como um meio eficaz para o combate destas.

A dengue é uma doença que mobiliza todo o mundo e desde os anos 2000 vem sendo objeto de campanhas no Brasil, devido ao elevado número de casos. Contudo, as estatísticas vêm aumentando, e cada vez mais, o combate diário ao vetor torna-se necessário como a melhor forma de prevenção (LUNA et al., 2013).

Nos últimos anos é notável o aumento no número de casos de dengue e dengue hemorrágica, o que se tornou segundo a OMS, um dos mais graves problemas de saúde pública nos países tropicais. São conhecidos quatro sorotipos do Dengue: DENV-1; DENV-2; DENV-3 e DENV-4, sendo o DENV-1/DENV-2 predominantes no Brasil (RAMOS et al., 2014). Atualmente, o mosquito pode ser encontrado em todos os estados brasileiros. Em 2015 de acordo com o Portal da Saúde, foram registrados 224.101 casos

notificados de dengue no país. Destes, foram confirmados 102 casos de dengue grave e 913 casos de dengue com sinais de alarme. No mesmo período de 2014, foram confirmados 113 casos graves e 897 casos de dengue com sinais de alarme. A região Sudeste teve o maior número de casos notificados (145.020 casos; 64,7%) em relação ao total do país.

Conforme o Levantamento de índices rápido para *Aedes aegypti* – LIRAA (Fonte de consulta e orientação das ações de controle à dengue), uma pesquisa foi realizada entre janeiro/fevereiro de 2015, e identificou focos de infestação do mosquito além de apontar as regiões de maior risco no Brasil. Os resultados apresentaram 627 municípios em situação satisfatória; 877 municípios em situação de alerta e 340 municípios em situação de risco.

Para Mondini *et al.* (2005), a frequente ocorrência de dengue no Brasil demonstra a ascendência da transmissão da doença. Observa-se, um comportamento cíclico, onde existem anos com incidências mais altas e outros com incidências mais baixas (Ministério da Saúde, 2002). Esse aumento no número de casos ocorre mesmo havendo tentativas de controle. As razões desse fato ainda são complexas e difíceis de serem compreendidas, havendo então, a

necessidade de mais estudos (KHORMI & KUMAR, 2011).

É conhecido métodos alternativos, como a utilização de plantas no tratamento e cura de diversas doenças, vários medicamentos têm em seus compostos componentes extraídos de vegetais. A busca de plantas com propriedades terapêuticas é uma prática milenar, desenvolvida e repassada de geração a geração (ARGENTA *et al.*, 2011).

Os primeiros relatos do uso de plantas como remédio no Brasil foram realizados por Gabriel Soares de Souza, autor do Tratado Descritivo do Brasil, de 1587, onde nomeava os produtos medicinais utilizados pelos índios de “as árvores e ervas da virtude”. Os primeiros médicos portugueses em território brasileiro perceberam então a importância de plantas como remédios (VEIGA *et al.*, 2002).

É sabido, que a população de todo o mundo usa, tradicionalmente, plantas na busca de alívio e cura de diversas doenças, além do controle de pragas. A sabedoria popular sobre as espécies tem se tornado objeto de estudo em diversos lugares resultando em compostos naturais com potentes efeitos fármacos (ARGENTA *et al.* 2011).

É importante salientar que, muitas vezes, o uso incorreto de plantas, fora do contexto original e sem respaldo acadêmico, pode ocasionar intoxicações e outros efeitos indesejáveis, sendo então, de suma importância a pesquisa científica nessa área (FERREIRA, 2006).

O *T. patula* possui politianis presente nas raízes e terpenóides presentes nas flores e folhas. No *Tagetes minuta* é encontrado o alfa-tercianil, um poderoso antiviral, por esse motivo, causou o interesse no estudo do *T. patula* e seus componentes químicos para o tratamento de Dengue, e possivelmente, também, de Febre Amarela (MELLO *et al.*, 2013). Com base nessas informações, o objetivo desse estudo foi verificar a eficiência do *T.patula* (cravo de defunto) como inibidor da multiplicação do dengue vírus tipo III.

Material e método

O *T. patula* foi generosamente doado por moradores da cidade de Brumadinho – MG e identificado no Laboratório de Microbiologia Aplicada da UEMG-Ibirité.

Extrato

O extrato da planta foi obtido por meio da maceração do cravo (5 flores, folhas e caule) em 15 mL de solução de PBS 1X (Tampão Fosfato Salino) realizado em recipiente estéril. O extrato foi então filtrado utilizando-se filtro para injeção de poro 0,2 μm e transferido para um tubo de polipropileno (Fálcon®) sendo então armazenado no freezer a -20°C .

Cultivo das células BHK21

As células BHK 21 são fibroblastos derivados de rim de hamster recém-nascido, sendo estas escolhidas por permitir a absorção, penetração e replicação de vírus. As células foram utilizadas para a multiplicação e titulação do DENV. Foram cultivadas em meio Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), e com os antibióticos fungizona ($5\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), penicilina ($5\mu\text{g.mL}^{-1}$) e estreptomicina ($5\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) e mantidas a 37°C em estufa de 5% de CO_2 .

Ensaio Dose-Resposta

Foram definidos volumes aleatórios para a realização do teste da dose e resposta, a fim de encontrar o volume ideal para os demais experimentos.

Os volumes do extrato escolhidas para o experimento foram: 5 μL , 10 μL , 50 μL , 100 μL , 200 μL e 300 μL . O experimento foi realizado com DENV3 na MOI-Multiplicidade ótima de infecção 1,0. No dia anterior foi preparada uma placa de BHK-21 (24 wells) com 1×10^5 células implantadas por poço. O extrato bruto do *T. patula* foi retirado do freezer e colocado em banho-maria a 56°C para o descongelamento.

Após a absorção com o vírus, os poços contendo as células foram lavados com PBS 1X. Posteriormente o PBS foi retirado, e cada poço da placa acrescido do volume do extrato + o volume complementar, meio DMEM 1 % (v/v) para o volume final de 1mL. Diferentes concentrações de extrato foram testadas em triplicata. Após 24 horas, os sobrenadantes foram coletados para a titulação do vírus.

Titulação Viral

No dia anterior à titulação foram preparadas placas de 6 poços contendo $2,0 \times 10^5$ células BHK-21.mL⁻¹ em cada poço.

Foram preparados tubos de 1,5 mL da marca Eppendorf® identificados com o número das diluições desejadas (-1, -2, -3, -4, -5) e adicionados 900 μL de meio DMEM 5 % (v/v) em cada um. As amostras que seriam tituladas foram

mantidas no gelo para impedir a perda de viabilidade.

Foi transferido 100µL da amostra a ser titulada para o eppendorf –1, o mesmo tubo foi homogeneizado em Vortex® e realizou-se o restante das diluições de acordo com os manuais do Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Após a realização das diluições, aplicou-se 500µL de cada diluição na placa deixando um poço contendo apenas DMEM 1% (v/v) como controle negativo das células.

Ao término desse processo as placas foram incubadas a 37°C por 1 hora para a adsorção do vírus, homogeneizando-as a cada 15 minutos. Após a adsorção, cada poço foi completado com meio 199-CMC-2% [2% (v/v) de Carboximetilcelulose acrescido de sais e aminoácidos (meio 199)] + 5% de soro fetal bovino.

As placas foram incubadas por 5 dias a 37°C em estufa a 5% de CO₂.

Após essa incubação as placas foram fixadas com formol e coradas com cristal violeta para a contagem das placas de lise.

Teste Virucida

Para este teste duas placas de 6 poços foram cultivadas com $2,5 \times 10^5$ células

BHK 21/ mL em cada poço, preparadas no dia anterior.

Para o experimento, foram adicionados em um tubo Eppendorf® de 1,5 mL estéril, 400µL de DMEM sem SFB + 100µL do extrato + 500µL da alíquota de DENV 3 totalizando 1mL. O volume de 100µL foi escolhido para os experimentos posteriores em função dos resultados obtidos no teste de dose-resposta. Como controle negativo foram adicionados 500 µL de DENV 3 + 500 µL de DMEM sem SFB. Posteriormente, os tubos foram incubados a 37°C por 1 hora sob agitação orbital em Termoblock®.

Após esse período foi verificado o título viral deste experimento.

Curva de Multiplicação

Para este teste, 2 placas de 24 poços foram cultivadas com células BHK no dia anterior. Cada poço foi adicionado $0,9 \times 10^5$ células/mL em um volume final de 2mL/ poço. Uma única concentração foi escolhida baseada na dose -resposta: 100 µL. O experimento foi realizado com DENV3 e MOI: 1,0, a mesma padronizada nos testes anteriores.

Após 1 hora de adsorção com o vírus, os poços foram lavados com PBS 1X e preenchidos com 900 µL de DMEM 1 % (v/v) e 100µL do extrato. Como controle

negativo foi adicionado 1mL de DMEM 1% (v/v) no poço referente ao controle de vírus. Todo o teste foi realizado em triplicata.

Os sobrenadantes foram coletados nos seguintes tempos: 12h, 24h, 36h, 48h.

Ensaio de Citotoxicidade – MTT

Foram cultivadas 2 placas de 96 poços contendo 1×10^4 células BHK 21/mL em cada poço. Uma das placas foi considerada Placa Espelho e outra Placa de Célula.

A Placa espelho foi utilizada para a realização das diluições. Os volumes iniciais adotados foram definidos com base nos testes de dose-resposta. Neste foi observado que 30% (v/v) do extrato era suficiente para reduzir a multiplicação viral. Por isso duas concentrações foram utilizadas uma mais baixa: 180 μ L extrato + 20 μ L DMEM; e outra mais alta: 240 μ L extrato + 60 μ L de DMEM. As duas concentrações foram utilizadas a fim de verificar se ocorreria algum efeito de citotoxicidade em concentração maior do que aquela definida como suficiente para reduzir a multiplicação do vírus *in vivo*.

As diluições seriadas foram com 150 μ L retirados do primeiro poço e adicionado ao segundo e assim subsequentemente até o final da placa. Dessa placa diluída foi retirado 100 μ L de

cada um dos 96 poços e adicionados em cada poço correspondente da outra placa contendo as células (Placa de Célula).

A placa de célula foi incubada por 48 horas a 37°C em estufa de 5% de CO₂. Após esse tempo o sobrenadante foi descartado e foi adicionado em cada poço da placa 2mg.mL⁻¹ do reagente MTT (Sal tetrazólico – Brometo 3-[4,5-dimetiltiazol- 2-il] – 2,5-difenil-tetrazolio) diluído em PBS. A placa foi incubada por 1 hora e 30 minutos, após esse tempo foi adicionado DMSO, a placa foi mantida sob agitação por 15 min e após esse processo a leitura dos dados foi realizada em espectrofotômetro a 540nm.

Resultados e Discussão

A partir da análise da placa de células, utilizada na realização do ensaio de dose-resposta, foi possível verificar que nos volumes de 5 μ L, 10 μ L, 50 μ L e 100 μ L do extrato, não foi observado efeito citopático. Porém em concentrações mais altas 200 μ L e 300 μ L o extrato mostrou-se tóxico. Após a titulação e análise estatística foi observado que nas concentrações mais baixas (5 μ L, 10 μ L, 50 μ L) os resultados não foram estatisticamente significativos como demonstrado no Figura 1, em concentrações mais altas 200 μ L e 300 μ L não foi possível a análise estatística devido

a citotoxicidade apresentada, porém a concentração de 100 µL foi extremamente eficiente em reduzir o título viral comparado ao controle (Figura 1), sendo esse volume definido, então, para os experimentos posteriores.

Os resultados apresentados na Figura 1, evidenciam que 100 µL do extrato foi efetivo para reduzir a multiplicação do vírus nas células.

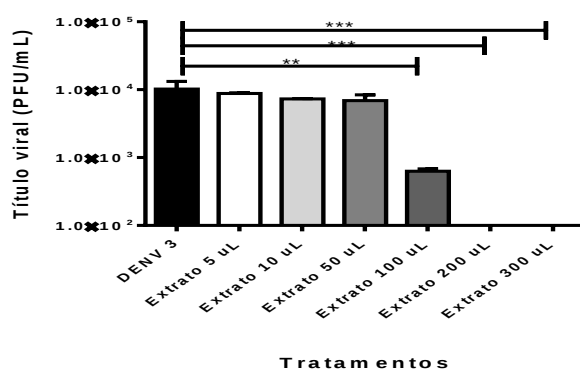


Figura 1- Efeito do Extrato Bruto do *T. patula* sobre as células BHK-21 infectadas com o DENV-3.

Esses resultados colaboram com Mello (2013), que afirmam que, os flavonoides, como os encontrados em plantas do gênero *Tagetes*, e possivelmente encontrados no cravo de defunto (*T. patula*), apresentam atividade antiviral, e podem ser eficazes inibidores da multiplicação de alguns vírus, no caso desse estudo o DENV3. Este teste comprova que o *T. patula*, reduziu a multiplicação dos vírus no cultivo *in vitro*.

O teste virucida foi realizado para verificar se o mecanismo de atuação do

extrato era diretamente contra o vírus, porém como demonstrado na Figura 2, o extrato apresentou atividade semelhante ao meio, não evidenciando um efeito virucida. Novos estudos devem ser feitos para entender o mecanismo de ação do extrato, uma vez que ele pode agir sobre as células infectadas impedindo novas infecções, apesar de não ter um efeito de morte sobre o vírus. Isso pode sugerir uma intervenção do extrato de *T. patula* como inibição de vias sinalizadoras da célula.

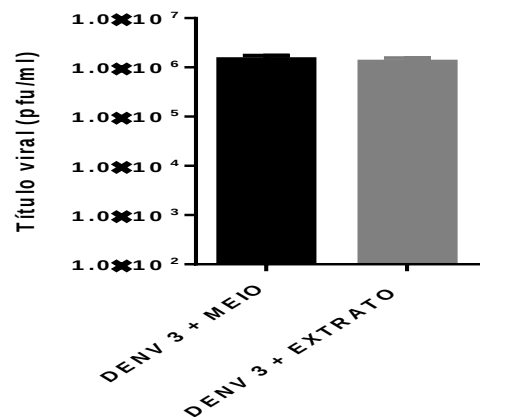


Figura 2- Efeito virucida do Extrato Bruto do *T. patula* sobre as células BHK infectadas com o DENV-3.

Apesar do extrato testado não ter demonstrado um efeito virucida, tal extrato foi capaz de reduzir a multiplicação viral. De acordo com os dados obtidos pela curva de multiplicação viral (Figura 3) pode ser observado que a multiplicação do DENV-3 foi menor nas células infectadas e tratadas

como o extrato bruto de *T. patula* quando comparado ao controle contendo apenas células infectadas e DMEM. É possível perceber uma redução das placas virais nos testes com o extrato em comparação ao controle de células infectadas com o DENV (Figura 4).

A multiplicação do DENV-3 na presença do extrato bruto foi estatisticamente menor ($p < 0.0001$) quando comparado ao controle.

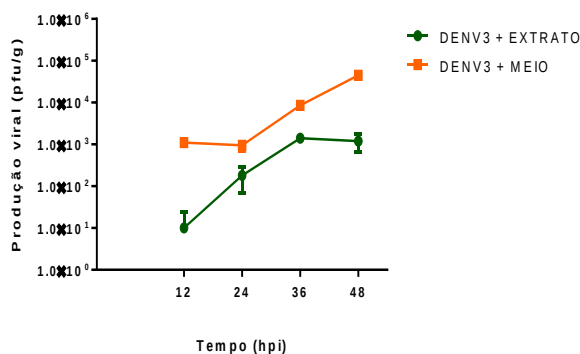


Figura 3- Curva da multiplicação do DENV-3 em células BHK-21 na presença e ausência do extrato bruto de *T. patula*.

A avaliação da citotoxicidade demonstrou que o extrato de *T. patula* inibe a multiplicação do DENV-3 nas células, (Figura 4), além disso, nas análises microscópicas não foi observado efeito citotóxico do extrato sobre as células.

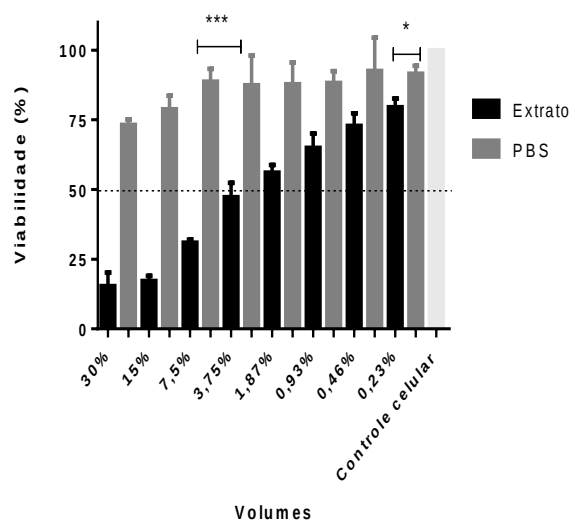


Figura 4: Curva da multiplicação do DENV-3 em células BHK-21 na presença e ausência do extrato bruto de *T. patula*.

Esse achado sugere que novos estudos sejam feitos para verificar as vias de inibição do extrato sobre os vírus nas células infectadas. Na presença do extrato há menor multiplicação celular, sem a observação de morte celular elevada quando comparadas ao controle. O que pode sugerir que as células permanecem infectadas pelo DENV-3, no entanto, não se observa novas infecções na presença do extrato, permitindo inferir que, um efeito de inibição da infectividade viral esteja ocorrendo.

A proliferação das células infectadas pelo DENV-3 e na presença do extrato bruto foi estatisticamente menor quando comparado ao controle.

Os resultados obtidos demonstraram que o *T. patula* tem potencial terapêutico contra o DENV-3. Como reportado por Argenta et al. (2011), plantas com propriedades terapêuticas são usadas e transmitidas por gerações a um

longo tempo, demonstrando assim, a grande importância dos vegetais curativos e terapêuticos.

Diante disso, esse trabalho aponta a importância de verificar a eficácia terapêutica de plantas medicinais como o *T. patula* *in vitro* e *in vivo* para verificar o feito inibitório do extrato sobre as vias de sinalização celular.

Ainda são necessários mais estudos, a fim de, entender o mecanismo de inibição da multiplicação do vírus em células BHK-21 e também nas células dos experimentos *in vivo* que precisam ser testadas.

Além disso, esse trabalho deixa claro a importância dos argumentos de Pereira et al., (2015), onde afirmam a importância das plantas medicinais, atualmente, são uma excelente alternativa para o tratamento de doenças. Isto, porque ainda não existe um medicamento para conter a infecção por DENV e medidas alternativas poderão auxiliar a população no combate a essas doenças.

Conclusão

Esse estudo permitiu verificar a importância da utilização de plantas medicinais como alternativas para o tratamento de infecções. Principalmente nos casos de doenças que ainda não possuem medicamentos eficazes e vacinas seguras. Isto porque muitos medicamentos têm em suas formulações compostos extraídos de vegetais.

A fitoterapia utilizada de forma racional e principalmente com respaldo acadêmico/científico pode ser um grande aliado no tratamento e erradicação de diversas doenças.

Os dados sugerem que *T. patula* inibe a multiplicação do DENV-3 nas células infectadas *in vitro*. Também permitem propor que as vias de sinalização celular sejam futuramente estudadas, a fim de, explicar como o extrato bruto desta planta impede a multiplicação do vírus sem causar dano às células e sem causar a morte viral. Novos experimentos devem ser realizados para comprovar a eficácia do *T. patula* também *in vivo*, a fim de, descrever os mecanismos de inibição do extrato do cravo-de-defunto sobre as células infectadas com o vírus.

Referências

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Estado da Saúde de Minas Gerais. Portal da Saúde. LIRAa Janeiro 2015 – Região Sudeste. Disponível em: http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2015/Fev/26/Dados_LIRAa_JAN_
- ARGENTA, S. C. et al. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências**, v. 7, n. 12, p. 51-60, 2011.
- MELLO, J. C. P. et al. Estudo farmacognóstico de flores de *Tagetes patula* L. (Asteraceae). **Revista Fitos**, v. 7, n. 04, p. 225-230, 2013.
- FERREIRA, M. Aspectos sociais da fitoterapia. **Embrapa Rondônia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.

KHORMI, H. M.; KUMAR, L.; ELZAHRANY, R. A. Modeling spatio-temporal risk changes in the incidence of dengue fever in Saudi Arabia: a geographical information system case study. **Geospatial Health**, v. 6, n. 1, p. 77-84, 2011.

LIRAA: Levantamento Rápido do Índice de Infestação por *Aedes aegypti* – Ministério da Saúde. Dengue. Disponível em: http://www.dengue.org.br/dengue_levantamento_municipios.pdf. Acesso em: Abril, 2015.

LOPES, N. *et.al* “Características generales y epidemiología de los arbovirus emergentes en Brasil” Laboratório de Virologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil 2014.

LUNA, E. J. A.; SILVA JUNIOR, J. B. Doenças transmissíveis, endemias, epidemias e pandemias. **A saúde no Brasil em 2030: prospecção estratégica do sistema de saúde brasileiro**, 2013.

OMS. Organização mundial da saúde. *Programa Nacional de Controle da Dengue*. Brasília (DF), 2002.

MONDINI, A. *et al.* Análise espacial da transmissão de dengue em cidade de porte médio do interior paulista. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, p. 444-451, 2005.

VEIGA J.V.F.; PINTO A.C. Química Nova 2002, 25, 273