

## BIOATIVIDADE DE EXTRATOS VEGETAIS FRENTE AO VÍRUS DENGUE

Simone Maria da SILVA<sup>1</sup>; Stéphane Oliveira MENDES<sup>2</sup>; Raysuara VIEIRA<sup>2</sup>; Cristóvão Alves da COSTA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq-INPA; <sup>2</sup>Estagiária/Voluntária; <sup>3</sup>Orientador CSAS/INPA

### 1. Introdução

Dengue é a mais importante doença causada por um arbovírus, família Flaviridae, gênero Flavivírus, que são vírus mantidos na natureza, por meio de transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis e artrópodes hematófagos (Rosa *et al.* 1997). O dengue vírus tem se tornado de particular importância nas regiões tropical e subtropical (Jacobs e Levin 2002). O ciclo enzoótico de transmissão do dengue vírus envolve mosquitos e a presença de primatas em florestas tropicais da Ásia e África (Gubler 1998). O ciclo considerado grave para o sistema de saúde pública é o que acontece no sistema urbano, podendo causar endemias ou epidemias. Os vírus são mantidos no ciclo mosquito-homem com epidemia periódica. Humanos são infectados com o vírus por meio da picada de mosquito infectado. O principal vetor desse vírus é o *Aedes aegypti*, um mosquito tropical altamente domesticado. Em Manaus, o vírus dengue tem sido registrado em todas as zonas geográficas da cidade, com circulação de pelo menos dois sorotipos por zona, detecção realizada em sorologia humana, ou seja, após ou durante a ocorrência da infecção (Castro 2004).

Atualmente ainda não há tratamento específico para a doença dengue. A vacina para o vírus dengue é inexistente e até o presente, o único método de prevenir a dengue e dengue hemorrágica é através do combate ao vetor (Gubler 1998; Gubler 2002; Leão 1997; Tauil 2001). Produtos naturais utilizados como remédio tradicional, têm apresentado compostos antivirais *in vitro*. A possível busca de antivirais através de extratos vegetais indica à descoberta de potentes inibidores do crescimento viral *in vitro* (Cowan 1999; Taylor 1996). A presente situação indica a necessidade da busca de substâncias provenientes da natureza, especialmente os vegetais, de onde tem se originados inúmeras drogas atualmente em uso na medicina convencional. Além disso, os produtos naturais também têm sido estudados como alternativa viável e mais econômica em comparação a outras técnicas de desenvolvimento de um fármaco antiviral (Martinez *et al.* 2012).

A Amazônia brasileira dispõe de uma biodiversidade vegetal com plantas consideradas medicinais pelo uso popular e suas propriedades terapêuticas apresentam estudos científicos comprovados. Este estudo tem o objetivo de pesquisar *in vitro* a presença de capacidade antiviral em extratos químicos de origem vegetal frente a amostras de vírus dengue tipo 2 e 3.

### 2. Material e Métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Virologia e Imunologia do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia). Os extratos vegetais utilizados nos ensaios antivirais foram fornecidos pelo laboratório de malária e dengue e pelo CPPN. Foram cultivadas células VERO (Rim de Macaco), em frascos estéreis de poliestireno, em meio de cultivo MEM (EARLE) enriquecido com 10% do soro fetal bovino. As células foram mantidas em atmosfera úmida a 37 °C para formação de monocamada confluenta. Depois da monocamada formada foram feitos repiques de culturas de células em microplacas de 96 cavidades e incubadas novamente a 37 °C com CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Quando confluentes, o meio de cultura foi removido e substituído por 100µL de extrato vegetal contendo diluições seriadas em DMSO. No controle celular, adicionou-se 100µL de MEIO MEM (EARLE) enriquecido com 2% de soro fetal bovino sem a adição dos compostos a serem testados. Todas as culturas foram incubadas a 37 °C por um período de 2 a 5 dias. A morfologia das células foi observada em microscópio óptico e as possíveis alterações morfológicas analisadas, como perda de monocamada celular, seu desprendimento, agrupamento, granulação e vacuolização no citoplasma das células. Essa metodologia foi utilizada em estudos semelhantes (Parida *et al.* 1998). No ensaio de determinação da propriedade antiviral foram preparadas culturas em microplacas de 96 cavidades, incubadas a 37°C enriquecida com 5% de CO<sub>2</sub> por 2 a 3 dias. Estando a cultura de células confluenta, foi removido o meio de cultura da monocamada celular. Para a monocamada confluenta de células Vero em placas de 96 cavidades, 0,1 mL de volume de suspensão viral contendo 100 doses de TCID 50% (*Tissue Culture Infective Dose 50*) e 0,1 mL de meio de manutenção contendo concentrações apropriadas para os compostos que foram testados, usando CMNC com as maiores concentrações permitidas. Como controles virais foram utilizados: 0,1 mL do volume de suspensão viral e 0,1 mL de meio de manutenção sem extrato. As placas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera controlada (5% CO<sub>2</sub>) por 2 a 5 dias. Após a incubação o efeito citopático foi observado em microscópio. O efeito citopático induzido pelo vírus foi de acordo com o descrito no ensaio de citotoxicidade (Lanciotti 1992; Kott 1999; Raibhandari 2001).

### 3. Resultados e Discussão

No presente estudo foram utilizados 14 extratos vegetais em diferentes concentrações. Para os ensaios de citotoxicidade os extratos testados apresentavam diluições a partir de 1:1 a 1:64 (Tabela 1). Já as diluições utilizadas para os ensaios antivirais foram de 1:1 até 1:128 (Tabela 2 e 3). Nos ensaios de citotoxicidade, 10 dos 14 extratos testados apresentaram nas suas diluições mais concentradas (1:1 a

1:4) a monocamada confluenta, e nas demais diluições as células estavam recolhidas e dispersas. Os ensaios antivirais foram realizados em apenas 4 dos 14 extratos vegetais testados, devido a quantidade insuficiente do extrato. A análise microscópica da morfologia celular apresentada após o ensaio antiviral apresentou, em todos os extratos testados, destruição da monocamada celular. Mais estudos são necessários para uma melhor compreensão desses resultados.

Tabela 1. Diluições dos extratos nos ensaios de citotoxicidade.

Extratos	Diluições (mg/mL)						
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
ACSPP01	1,9	0,95	0,475	0,237	0,118	0,059	0,029
ACOEEF88	1,0	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015
DIL1	2,4	1,2	0,6	0,3	0,15	0,075	0,037
2KLA15A	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039
1KL11E	1,5	0,75	0,375	0,187	0,093	0,046	0,023
1KL39C	2,2	1,1	0,55	0,275	0,137	0,068	0,034
1LK90C	2,6	1,3	0,65	0,325	0,162	0,081	0,040
1TM6A	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039
1KL83D	2,1	1,05	0,525	0,262	0,131	0,065	0,032
1KL80D	1,0	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015
01CC	102,4	51,2	25,6	12,8	6,4	3,2	1,6
02CC	30,1	15,05	7,525	3,762	1,881	0,940	0,470
03CC	102,6	51,3	25,65	12,825	6,412	3,206	1,603
04CC	30,0	15	7,5	3,75	1,875	0,937	0,468

Tabela 2. Ensaio da atividade / ação viral.

Extratos	Diluições (mg/mL)							
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
01CC	102,9	51,45	25,725	12,862	6,431	3,215	1,607	0,803
02CC	34,3	17,15	8,575	4,287	2,143	1,071	0,535	0,267
03CC	85,3	42,65	21,325	10,662	5,331	2,665	1,332	0,666
04CC	15,1	7,55	3,775	1,887	0,943	0,471	0,235	0,117

Tabela 3. Controle da atividade / ação viral.

Controle	A	B	C	D	E	F	G	H
Infecção viral	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl
Meio MEM sem SFB	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL
DMSO	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL
Controle celular	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL

A prevenção e o tratamento de viroses provocadas por Flavivírus, como o vírus dengue, continuam sendo uma prioridade de saúde pública global e grandes esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de vacinas e a descoberta de compostos terapêuticos como substâncias naturais ou sintéticas potentes contra Flavivírus importantes. Como não existem vacinas para o vírus da dengue, isso é particularmente uma importante área de pesquisa devido ao grande número de casos de dengue reportados (mais de 50 milhões relatados anualmente) (Pugachev *et al.* 2003; Ray e Shi 2006).

A pesquisa de compostos vegetais para desenvolvimento de um fármaco antiviral é essencial para avaliar a capacidade de toxicidade frente às células permissivas ao vírus em estudo (citotoxicidade) (Muller 2011). No presente estudo 4 extratos testados provocaram morte celular em todas as diluições testadas. Pode-se supor que os extratos em estudo podem ter sido citotóxicos para as células, no entanto, a repetição do ensaio não foi possível. Este estudo será continuado a fim de descobrir compostos terapêuticos com grande potencial antiviral frente ao vírus dengue.

#### 4. Conclusão

Até o presente momento 10 das 14 substâncias testadas demonstraram resultados satisfatórios nos ensaios de citotoxicidade, em concentrações de 1:1 até 1:4, sendo necessária a realização de mais testes

para uma melhor compreensão dos resultados encontrados até o momento. Este projeto será continuado com o objetivo de descobrir um extrato vegetal que se apresente como alternativa efetiva, segura e economicamente viável para o desenvolvimento de um fármaco antiviral frente ao vírus dengue.

### 5. Referências Bibliográficas

- Castro, J.N.C. 2004. *Aspectos Viroológicos do Dengue no Estado do Amazonas*. Manaus: UEA, 2004. Dissertação de Mestrado, Universidade do estado do Amazonas.
- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*, 12(4): 564-582.
- Gubler, D.J. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3): 480-496.
- Gluber, D.J. 2002. Epidemic dengue/ dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in Microbiology*, 10(2): 101-103.
- Jacobs, M.; Levin, M. 2002. An improved endothelial barrier model to investigate dengue hemorrhagic fever. *Journal of Virological Methods*, 104: 173-85.
- Kott, V.; Barbini, L.; Cruanes, M.; Munoz, J. De D.; Vivot, E.; Martino, V.; Ferraro, G.M.; Cavallaio, L.; Campos, R. 1999. Antiviral Activity in Argentine Medicinal Plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 74-84.
- Leão, Q.N.; Raimundo *et al.* 1997. *Doenças infecciosas e parasitárias: Enfoque Amazônico*. Belém: CEJUP.
- Lanciotti, R.S.; Calisher, C.H.; Gubler, D.J.; Chang, G-J.; Vorndam, V. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 545-551.
- Martínez, C.A.; Giulietti, A.M.; Rodríguez Talou, J. 2012. Research advances in plant-made flavivirus antigens. *Biotechnology Advances*, 30: 1493-1505.
- Muller, V.D.M. 2011. *Avaliação da atividade antiviral de peçonhas de serpente e escorpião contra os vírus da dengue e da febre amarela*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo. 86 pp.
- Parida, M.M.; Upadhyay, C.; Pandya, G.; Jana, A.M. 1998. Inhibitory Potential of Neem (Azadirachata Indica Juss) Leaves On Dengue Vírus Type-2 Replication. *Journal Of The Immunocompromised Host*, 11: 1-10.
- Pugachev, K.V.; Guirakhoo, F.; Trent, D.W.; Monath, T.P. 2003. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. *Int J Parasitol*, 33(5-6): 567-82.
- Rajbhandari, M.; Wegner, U.; Julich, M.; Schopke, T.; Mentel, R. 2001. Screening Of Nepalese Medicinal Plants For Antiviral Activity. *Journal Of Ethnopharmacology*, 74: 251-255.
- Ray, D.; Shi, P.Y. 2006. Recent advances in flavivirus antiviral drug discovery and vaccine development. *Recent Patents Anti-Infective Drug Discovery*, pp 45–55.
- Rosa, A.P.A.T.; Rosa, J.F.S.T.; Pinheiro, F.P.; Vasconcelos, P.G.C. 1997. Arboviroses. In: *Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico*. CEJUP.
- Tauil, P.L. 2001. Urbanização e ecologia do dengue. *Caderno de Saúde Pública*. 17: 99-102.
- Taylor, R.S.A.; Manandhar, N.P.; Hudson, J.B.; Towers, G.N.H. 1996. Antiviral activities of Nepalese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 52: 157-163.