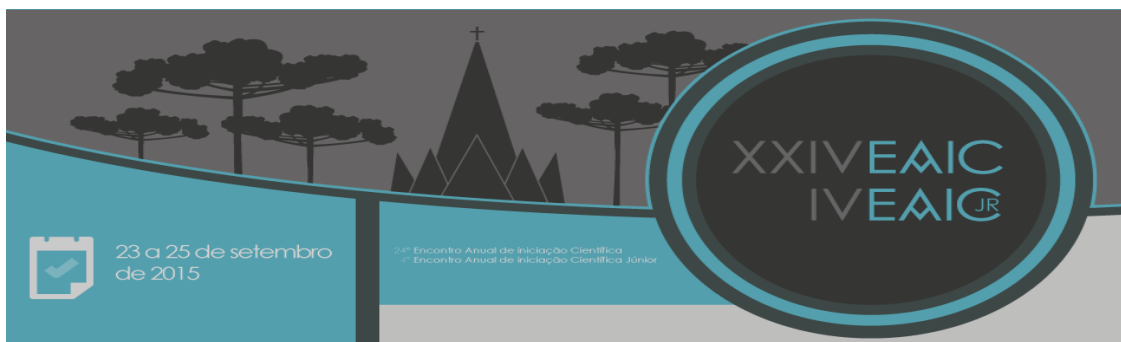




INVESTIGAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-HSV-1 E CITOTOXICIDADE DO EXTRATO AQUOSO DE *Tanacetum parthenium*

Carolina Salinas de Moraes (PIBIC/CNPq/UEM), Tania Ueda Nakamura (Orientador), e-mail: tunakamura@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Farmácia, Farmacognosia.

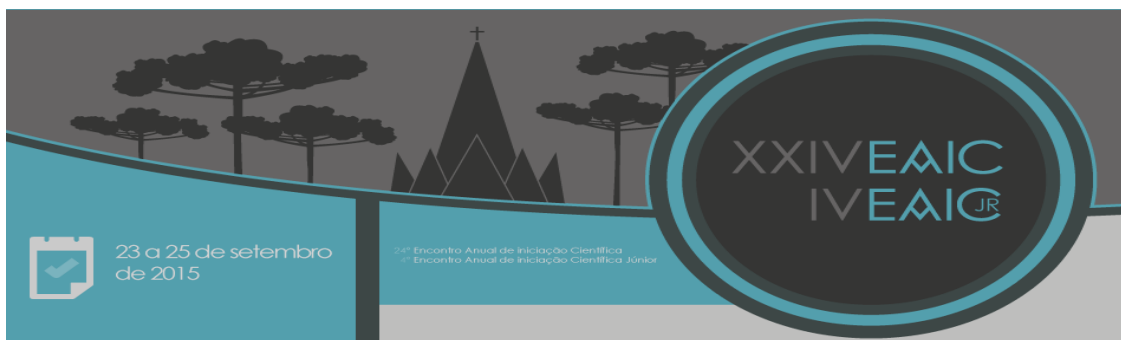
Palavras-chave: Herpes simples tipo 1, atividade antiviral, *Tanacetum parthenium*.

Resumo:

O vírus Herpes simples tipo 1 (HSV-1) é um vírus envelopado, com DNA de fita dupla, amplamente distribuído na população mundial, causador de lesão orofacial branda, que pode agravar conforme o estado imunológico do hospedeiro. O tratamento padrão é realizado com a administração de análogos de nucleosídeos (p.e. aciclovir), que são específicos para células infectadas com o material genético viral, entretanto tem havido seleção de cepas resistentes ao tratamento. O *Tanacetum parthenium* é uma planta herbácea utilizada na medicina popular para várias aplicações, dentre elas dores abdominais, febre e enxaqueca. No entanto, não há estudo que comprove a atividade antiviral do extrato aquoso desta planta, preparação comumente utilizada na medicina popular. O objetivo deste trabalho foi investigar a citotoxicidade e a atividade anti-HSV-1 *in vitro* do extrato aquoso obtido das partes aéreas de *T. parthenium* avaliando-se a viabilidade celular pelo método do MTT. O resultado obtido mostrou que o extrato aquoso de *T. parthenium* foi capaz de proteger 50% das células Vero contra a infecção por HSV-1 em concentração não-tóxica para a célula ($EC_{50}=32,8 \mu\text{g/mL}$) considerando que o CC_{50} obtido foi de $311,8 \mu\text{g/mL}$, indicando um índice de seletividade de 9,5. Esses resultados preliminares sugerem que o uso da preparação (infusão) é segura e pode ser eficaz no tratamento de lesões de pele causadas por HSV-1, desde que sejam utilizadas em concentrações adequadas.

Introdução

O Herpes simples tipo 1 (HSV-1) é um vírus envelopado com DNA de fita dupla, amplamente distribuído na população mundial, sendo o causador de



lesão orofacial em geral benigna, mas que pode agravar de acordo com o estado imunológico do hospedeiro (SANTOS *et al.*, 2008).

A terapia anti-herpética padrão é realizada por meio da administração de análogos de nucleosídeos, como o aciclovir que possui uma atividade seletiva, pois atua somente em células infectadas pelo herpesvírus. Porém, mutações podem produzir cepas resistentes ao aciclovir, agravando as lesões e inviabilizando o tratamento (SANTOS *et al.*, 2008). Sendo assim há a necessidade de buscar novos agentes antivirais seguros e eficazes e os produtos de origem natural são importantes fontes de novos medicamentos (ZONG *et al.*, 2012).

O *Tanacetum parthenium* é uma planta herbácea pertencente à família Asteraceae, sendo que as partes aéreas (folhas, flores e caule) são utilizadas na medicina popular para o tratamento de febre, enxaqueca, artrite reumatoide, problemas estomacais, picadas de insetos, infertilidade e problemas menstruais (PAREEK *et al.*, 2011). Além disso, cápsulas contendo as partes aéreas pulverizadas são comercializadas, com diversas doses e recomendações terapêuticas. Apesar das evidências de que o extrato hidro-alcóolico, frações e componentes isolados do *T. parthenium* apresentam atividade anti-herpes (ZANQUETA, 2014), não há estudo que comprove a eficácia, e nem a segurança das preparações na forma de infusão normalmente utilizadas pela população no tratamento tópico de lesões de pele. Assim, o objetivo deste trabalho foi de investigar a atividade anti-HSV-1 e a citotoxicidade *in vitro* do extrato aquoso obtido a partir da infusão das partes aéreas do *T. parthenium*.

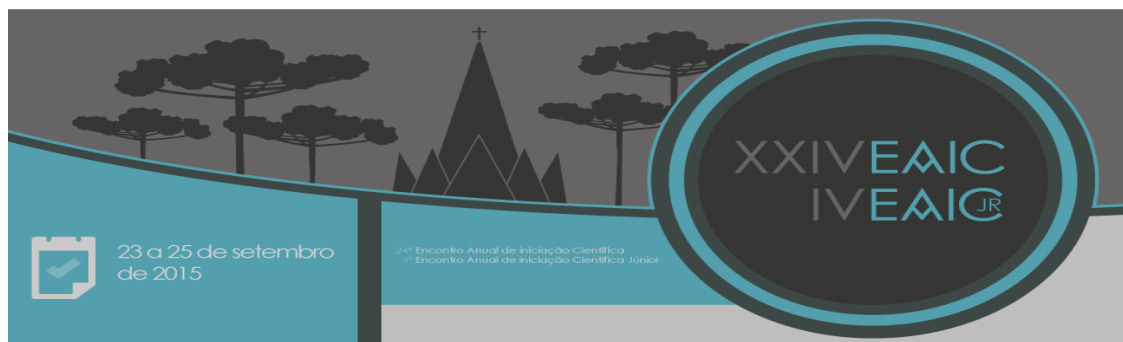
Materiais e métodos

Obtenção do Extrato Aquoso (EA)

Para a obtenção do extrato aquoso, o pó das partes aéreas secas e moídas (66,7 g) de *T. parthenium* (adquirido de Florien Insumos Farmacêuticos, lote 053652, Piracicaba, SP) foi submetido ao processo de infusão em um litro de água destilada e fervido por 25 min (EUROPE, 2011). O extrato foi filtrado, liofilizado e armazenado ao abrigo de luz em freezer (-20 °C).

Cultivo de células e vírus

Os ensaios foram realizados em células Vero (CCL-81/ATCC), cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e gentamicina (50 µg/mL), mantidas em estufa úmida com tensão de 5% de CO₂. A cepa KOS de HSV-1 (sensível ao aciclovir) foi propagada em células Vero, separada em alíquotas e armazenada a -20 °C. O vírus foi previamente titulado em placa de 96 e 24 poços, para ser então utilizado nos experimentos.



Ensaio de Citotoxicidade

Placas de 96 poços foram preparadas com monocamada de células Vero e incubadas a 37 °C até confluência. As células foram lavadas com PBS (tampão fosfato salino) e diluições seriadas (31,25 – 62,5 – 125 – 250 – 500 – 1000 µg/mL) do EA foram adicionadas aos poços, em triplicata. A placa foi incubada por 72 h, a 37 °C. Após a incubação, o meio antigo foi removido, os poços lavados com 100 µL de PBS, e, posteriormente, adicionados 50 µL/poço de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]) (2 mg/mL), exceto no branco, seguido de incubação por 4 h, ao abrigo da luz, em estufa 37 °C. Em seguida, foi adicionado DMSO (dimetilsulfóxido), em todos os poços e a leitura realizada em leitor de microplaca, em 562 nm.

Atividade antiviral in vitro pelo método do MTT

Monocamadas confluentes de células VERO cultivadas em placas de 96 poços foram lavadas com PBS e infectadas com 25 µL de suspensão viral (cepa KOS) TCID₅₀/mL (*Median Tissue Culture Infective Dose*), incubadas por 1h a 37 °C em tensão de CO₂ a 5%. Sobre a monocamada, foram adicionados 100 µL/poço de cada concentração não-tóxica do extrato aquoso diluído em DMEM, em triplicata. Após incubação a 37 °C em tensão de CO₂ a 5% durante 72 h, a viabilidade celular foi verificada pelo método do MTT, como descrito no item anterior. A atividade antiviral foi determinada de acordo com o percentual de inibição do efeito citopático.

Resultados e Discussão

Rendimento do extrato

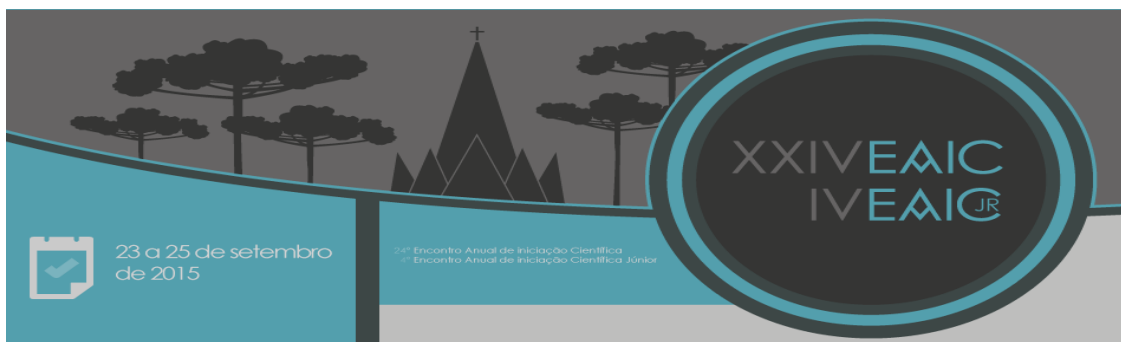
Após a liofilização, o pó obtido a partir do extrato aquoso por infusão, apresentou como características cor amarelo esverdeado e aroma canforado, e apresentou rendimento de 12,65% (8,40 g).

Citotoxicidade e atividade antiviral

Tabela 1. Citotoxicidade (Células Vero) e atividade anti-HSV-1 (cepa KOS) e índice de seletividade do extrato aquoso de *Tanacetum parthenium* pelo método do MTT.

CC ₅₀ ± DP (µg/mL)	Cepa KOS	
	EC ₅₀ ± DP (µg/mL)	IS
311,8 ± 18,2	32,8 ± 1,9	9,5

CC₅₀=Concentração tóxica para 50% das células; EC₅₀=concentração que inibiu 50% da infecção Viral; IS = Índice de seletividade (CC₅₀/ EC₅₀); n = 3 (sendo n = nº de experimentos independentes); DP = Desvio Padrão.



O índice de seletividade (9,5) indica que o extrato aquoso de *T. parthenium* foi efetivo contra a infecção celular pelo HSV-1 (cepa KOS) e apresenta baixa toxicidade às células, ou seja, a concentração capaz de proteger 50% das células contra a infecção por HSV-1 é segura para a célula hospedeira.

Conclusões

O extrato aquoso de *T. parthenium* foi capaz de proteger as células Vero contra a infecção por HSV-1 em concentrações não-tóxicas, portanto os resultados obtidos neste estudo podem contribuir para a validação da preparação obtida por infusão empregada na medicina popular no tratamento de lesões causadas pelo HSV-1.

Agradecimentos

À doutoranda Erica Benassi Zanqueta pelo auxílio na obtenção do extrato, e no treinamento/orientações nos experimentos. À Fundação Araucária, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro.

Referências

EUROPE MEDICINES AGENCY. **Assesment report on *Tanacetum parthenium* (L.)** Schultz-Bip, herb. 2011

PAREEK, A.; SUTHAR, M.; RATHORE, G. S.; BANSAL, V. **Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): a systematic review.** Pharmacognosy review, v. 5, n. 9, p. 103-110, 2011.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M., T., V.; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2. ed., 2008.

ZANQUETA, E. B. **Atividade antiherpesvirus do extrato hidroetanólico e frações das partes aéreas de *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip. e modo de ação do partenolídeo.** 2014. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, 2014.

ZHONG, M. G.; XIANG, Y. F.; QIU, X. X.; LIU, Z.; KITAZATO, K.; WANG, Y. F. **Natural product as source of anti-herpes simplex virus agents.** The Royal Society of Chemistry, v. 3, p. 313-328, 2013.