

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS E
MONOTERPENOS CONTRA VÍRUS DE BOVINOS E
FELINOS COMO POTENCIAIS MODELOS PARA
VÍRUS HUMANOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thaís Felli Kubiça

Santa Maria, RS, Brasil.

2012

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS E
MONOTERPENOS CONTRA VÍRUS DE BOVINOS E
FELINOS COMO POTENCIAIS MODELOS PARA VÍRUS
HUMANOS**

Thaís Felli Kubiça

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves
Co-orientadora: Prof. Dr^a. Luciane Teresinha Lovato

Santa Maria, RS, Brasil

2012

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE ANTIVIRAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS E
MONOTERPENOS CONTRA VÍRUS DE BOVINOS E FELINOS COMO
POTENCIAIS MODELOS PARA VÍRUS HUMANOS**

elaborada por
Thaís Felli Kubiça

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sydney Hartz Alves, Dr.
(Presidente/Orientador)

Emerson Carraro, Dr. (UNICENTRO)

Margareth Linde Athayde, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 16 de março de 2012.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
Jorge Luiz Kubiça e Vania Luíza Felli Kubiça;
e ao meu noivo, Marcelo Gripa Madalosso,
fontes de amor, força e inspiração.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas, me suprir em todas as minhas necessidades e me capacitar para tudo aquilo que Ele me destina. Sem Ele nenhum agradecimento faria sentido.

Agradeço a minha família, o alicerce de minha vida: meus pais, Jorge Luiz Kubiça e Vania Luíza Felli Kubiça, pelo eterno cuidado, dedicação e amor; pelo apoio nos momentos difíceis e de inquietantes decisões; pelos momentos que superamos juntos e pelas vitórias que alcançamos por acreditarmos que unidos somos mais fortes; por estarem ao meu lado a cada passo, a cada conquista, pois estes não teriam valor se vocês não estivessem comigo. Serei eternamente grata a vocês!

Aos meus irmãos, Rafael e Caroline, que mesmo inconscientemente me incentivaram, como irmãos, amigos, companheiros e entre outras qualidades.

Ao meu noivo, Marcelo Grippa Madalosso, pelo apoio, compreensão, companheirismo e, sobretudo, pelo amor incondicional que me conforta e me dá forças para superar obstáculos. Tu sabes que esta conquista também é tua !!!

Meus agradecimentos ao meu orientador, Prof. Dr. Sydney Hartz Alves, que sempre foi um modelo de pesquisador e que, constantemente, demonstrou acreditar no meu potencial; obrigada pela oportunidade oferecida, pela orientação, incentivo à pesquisa e ao aprendizado.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Luciane Teresinha Lovato agradeço a amizade, carinho, paciência e orientação ao longo destes anos.

Ao Prof. Dr. Rudi Weiblen, os meus sinceros agradecimentos pela acolhida, compreensão e disponibilização da estrutura e recursos necessários para a realização deste trabalho.

Aos colegas, funcionários, pesquisadores e bolsistas do Laboratório de Virologia, por me receberem tão bem; agradeço à amizade, conhecimentos compartilhados e auxílio nas atividades de laboratório. Sou muito grata a vocês!

A todos os meus familiares e à família do Marcelo, pelo amor e apoio em minha jornada.

Agradeço aos meus avós Caetano Felli e Olga Andres Felli, que mesmo de longe sempre estiveram presentes torcendo pela concretização deste curso. À minha avó Nair de Lourdes Faturi Kubiça (*in memoriam*) por todo o carinho que me dedicou, meu eterno amor e agradecimento.

Aos meus amigos, por sempre estarem comigo, mesmo que em forma de lembranças, aprendizagens e saudades.

A todos os colegas e professores da pós-graduação pelo convívio e aprendizado.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGCF e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo apoio e incentivo em forma de bolsa de iniciação científica, para que a pesquisa fosse desenvolvida.

A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado!

“Ninguém comete erro maior
do que não fazer nada
porque só pode fazer um pouco.”

Edmund Burke

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1- Artigo

TABELA 1 – Citotoxicidade e atividade antiviral do óleo essencial de manjeriçã e monoterpenos frente ao BVDV51

Capítulo 2- Artigo

TABELA 1 – Citotoxicidade e antiviral antiviral do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) frente ao calicivírus felino (FCV).....74

TABELA 2 – Citotoxicidade e antiviral antiviral do óleo essencial de *Lippia Graveolens* (orégano mexicano) frente ao calicivírus felino (FCV)75

TABELA 3 – Citotoxicidade e antiviral antiviral do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho) frente ao calicivírus felino (FCV).....76

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1- Artigo

FIGURA 1- Atividade antiviral do óleo essencial de manjeriçãõ e monoterpenos frente ao vírus da diarréia viral bovina após a incubação deste com as CMNTs dos compostos por 1 hora à temperatura ambiente52

FIGURA 2- Atividade antiviral do óleo essencial de manjeriçãõ e monoterpenos frente ao vírus da diarréia viral bovina após o pré-tratamento das células com estes53

FIGURA 3- Atividade antiviral do óleo essencial de manjeriçãõ e monoterpenos frente ao vírus da diarréia viral bovina durante a replicação intracelular do vírus.....54

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

% - por cento
 < - menor que
 = - igual
 > - maior que
 µg - micrograma
 µl - microlitro
 BVDV (*bovine viral diarrhea virus*) - vírus da diarreia viral bovina
 CC₅₀ - concentração citotóxica para 50% do cultivo celular
 CG - cromatografia gasosa
 CG-EM - cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
 CI₅₀ - concentração inibitória para 50%
 CMNT - concentração máxima não tóxica
 CO₂ - dióxido de carbono
 CRFK (*Crandell-Reese feline kidney cells*) - células de linhagem de rim felino
 DMSO - dimetilsulfóxido
 DP - desvio padrão
 EBTr - células epiteliais de traquéia bovina
 FCV (*feline calicivirus*) - calicivírus felino
 FCV - VSD - calicivírus felino associado à doença virulenta sistêmica
 Fig. - figura
 g - gramas
 HCV (hepatitis C virus) - vírus da hepatite C
 h - horas
 HSV - vírus herpes simplex
 IFN - α - interferon-alfa
 IS - índice de seletividade
 IT - índice terapêutico
 Kb - kilobase
 MDBK (*Madin-Darby bovine kidney cells*) - células de linhagem de rim bovino
 MEM - meio essencial mínimo
 mg - miligrama
 MBC (*minimum bactericidal concentration*) - concentração bactericida mínima
 MICs (*minimum inhibitory concentrations*) - concentrações inibitórias mínimas
 ml - mililitro
 MTT - ([3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium])
 nm - nanômetro
 NoVs - norovírus
 °C - graus celcius
 RNA - ácido ribonucléico
 RTV - rotavírus
 SFB - soro fetal bovino
 SFE - soro fetal eqüino

Tab. - Tabela

TC₅₀ – (*toxic concentration*) - concentração tóxica para 50%

U - unidades

UFSM - Universidade Federal de Santa Maria

X - *versus*

XN - Xanthohumol

YFV (*yellow fever virus*) - vírus da febre amarela

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 – Cromatogramas dos óleos essenciais.....	85
ANEXO 2 – Certificados de análises dos componentes majoritários.....	89

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

ATIVIDADE ANTIVIRAL DE ÓLEOS ESSENCIAIS E MONOTERPENOS CONTRA VÍRUS DE BOVINOS E FELINOS COMO POTENCIAIS MODELOS PARA VÍRUS HUMANOS

AUTORA: THAÍS FELLI KUBIÇA

ORIENTADOR: SYDNEY HARTZ ALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 16 de março de 2012.

Óleos essenciais obtidos de plantas utilizadas como condimentos constituem uma fonte de compostos com promissoras atividades farmacológicas. No presente estudo, a atividade antiviral do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. (manjeriço) e dos monoterpenos cânfora, 1,8-cineol e timol foi testada frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV), enquanto que os óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Lippia graveolens* HBK. (orégano mexicano) e *Thymus vulgaris* L. (tomilho) foram testados frente ao calicivírus felino (FCV). O teste colorimétrico com MTT ([3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium]) foi aplicado para a detecção de citotoxicidade, já os testes de atividade antiviral foram realizados através da metodologia de ensaio de redução de placas. Para este, três diferentes protocolos foram aplicados: o vírus foi incubado com os óleos essenciais ou compostos antes da infecção viral (ensaio virucida); as células foram pré tratadas com os óleos essenciais ou compostos antes da inoculação do vírus; ou as células infectadas foram incubadas com esses após as 2 horas de adsorção viral. Os resultados foram expressos como CC_{50} (concentração citotóxica para 50% do cultivo celular), CI_{50} (concentração inibitória para 50%) e IS (índice de seletividade = CC_{50}/CI_{50}). Os resultados de atividade frente ao BVDV evidenciaram, no geral, uma boa ação antiviral exercida pelos monoterpenos, sendo que a cânfora (IS=13,88) seguida do 1,8-cineol (IS=9,05) foram os compostos que apresentaram os mais elevados índices de seletividade obtidos no ensaio virucida, bem como a menor toxicidade frente às células de linhagem de rim bovino (*Madin-Darby bovine kidney cells* = MDBK) (CC_{50} = 4420,12 $\mu\text{g/ml}$ e 2996,10 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). Em relação aos testes com FCV, o óleo essencial de tomilho mostrou os melhores resultados, com índice de 8,57 para o tratamento no qual os óleos essenciais foram adicionados às células antes da inoculação viral. Já o óleo essencial de alecrim, além de apresentar uma moderada ação nos ensaios virucida (IS=6,54) e de pós-tratamento (IS=6,86), exibiu baixos níveis de toxicidade em relação às células de linhagem de rim felino (*Crandell-Reese feline kidney* = CRFK), com CC_{50} de 1300,21 $\mu\text{g/ml}$. Dessa forma, conclui-se que os óleos essenciais e monoterpenos em estudo apresentaram algum nível de atividade inibitória em diferentes momentos da infecção viral.

Palavras – chave: vírus da diarreia viral bovina (BVDV); calicivírus felino (FCV); cultivo celular; citotoxicidade; MTT.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

ANTIVIRAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OILS AND MONOTERPENS AGAINST BOVINE AND FELINE VIRUSES AS POTENTIAL MODELS TO HUMAN VIRUSES

AUTHOR: THAÍS FELLI KUBIÇA

ADVISER: SYDNEY HARTZ ALVES

Date and Place of the Defense: Santa Maria, March 16th, 2012.

The essential oils obtained from plants used as condiments are an important source of compounds with pharmacologic activity. In the present study, the antiviral activity of the essential oil of *Ocimum basilicum* L. (basil) and from the monoterpenes camphor, 1,8-cineol and timol was tested against the bovine viral diarrhea virus (BVDV), while the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary), *Lippia graveolens* HBK. (mexican oregano) and *Thymus vulgaris* L. (thyme) were tested against the feline calicivirus (FCV). The colorimetric test MTT ([3-(4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-dimethylthiazolium]) was applied for the measurement of cytotoxicity, and the antiviral tests were performed by the plaque reduction assay. Three different protocols were applied: a) the virus was incubated with the essential oils or compounds before the inoculation into cells (virucidal assay); b) the cells were treated with the essential oils or compounds prior to virus inoculation; or, c) essential oils and compounds were added to the cells after virus inoculation and maintained for 72 hours. The results were expressed as CC₅₀ (cytotoxic concentration to 50% of the cell culture), IC₅₀ (inhibitory concentration to 50%) and SI (selectivity index = CC₅₀/IC₅₀). The best results were evidenced for the monoterpenes camphor (SI=13.88) and the 1,8-cineol (SI=9.05) against BVDV. These results were obtained from the virucidal protocol and these compounds showed also the lower toxicity towards the bovine kidney cells culture (*Madin-Darby bovine kidney cells* = MDBK) (CC₅₀ = 4420.12 µg/mL and 2996.10 µg/mL, respectively). Regarding to the tests with FCV, the thyme essential oil showed the best results with SI=8.57 for c treatment. The basil essential oil had a moderate action in the a protocol (SI=6.54) and also for the c protocol (SI=6.86). In addition, the basil essential oil exhibited low levels of cytotoxicity towards the Crandel-Reese feline kidney cells (CRFK), with CC₅₀ of 1300.21 µg/mL. In conclusion, the essential oils and monoterpenes examined showed different levels of inhibitory activity on diverse moments of the viral infection. The antiviral activity demonstrated by the essential oils and compounds on BVDV and FCV may suggest a possible action on the hepatitis C virus (HCV) and norovirus (NoVs), respectively; since BVDV and FCV shows several structural and replicative similarities to HCV and NoVs.

Key words: bovine viral diarrhea virus (BVDV); feline calicivirus, cell culture, cytotoxicity, MTT

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1 Vírus utilizados como modelos experimentais.....	19
3.1.1 Vírus da diarreia viral bovina (BVDV).....	19
3.1.2 Calicivírus felino (FCV).....	21
3.2 Plantas e compostos com propriedades antimicrobianas.....	23
4 CAPÍTULO 1.....	29
5 CAPÍTULO 2.....	55
6 CONCLUSÕES.....	77
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
8 ANEXOS.....	84

1 INTRODUÇÃO

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios que, diferentemente das bactérias e fungos, necessitam da maquinaria da célula hospedeira para se replicar (WAGNER & HEWLETT, 1999). Considerando que muitos passos de sua replicação envolvem vias metabólicas celulares normais, o desenvolvimento de um tratamento que ataque diretamente o vírus sem causar efeitos adversos sobre as células infectadas, conseqüentemente, acaba sendo dificultado (WAGNER & HEWLETT, 1999).

Além da elevada toxicidade exibida pelos fármacos licenciados para o tratamento de enfermidades virais, o surgimento de cepas resistentes, a questionável eficácia das vacinas atualmente disponíveis, assim como o desenvolvimento de resistência à terapia convencional (LAURITZEN et al., 1998; BHATTACHARYYA et al., 2003; RADFORD et al., 2007; ZHANG et al., 2009) são fatores que tem estimulado a pesquisa por novas substâncias químicas que apresentem eficácia e segurança, tanto para o tratamento, quanto para profilaxia das infecções víricas (DE CLERCQ, 2002).

Produtos naturais originados de micro-organismos, animais e, principalmente, plantas, constituem uma fonte inesgotável de compostos com promissoras atividades biológicas e farmacológicas (JASSIN & NAJI, 2003). As plantas em geral, tem ampla habilidade de sintetizar substâncias odoríferas, as quais se constituem, basicamente, de terpenos ou derivados oxigenados (BAKKALI et al., 2008). Estes compostos estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal, agindo tanto na defesa contra micro-organismos e predadores, como também na atração de insetos e outros agentes polinizadores (SIANI et al., 2000). Muitos constituintes vegetais de ervas aromáticas comumente utilizadas na culinária tem exibido altos níveis de atividade antiviral, no entanto, a maior parte da farmacopéia dessas plantas ainda não é conhecida (JASSIN & NAJI, 2003).

Os óleos essenciais são definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente líquidas e odoríferas (BAKKALI et al., 2008) os quais consistem de hidrocarbonetos (monoterpenos, sesquiterpenos, entre outros) e compostos oxigenados (álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis,

ésteres fenólicos, etc.). Os terpenos estão entre os principais responsáveis químicos pelo uso das plantas odoríferas na medicina, culinária e perfumaria (DORMAN & DEANS, 2000). Além disso, os óleos essenciais vem sendo usados com diversas finalidades durante muitos séculos; nas últimas décadas, numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados avaliando as atividades antibacterianas, antifúngicas e antivirais destas substâncias (HELANDER et al., 1998; SCHNITZLER et al., 2007; POZZATTI et al., 2008).

O estudo da biologia do vírus da hepatite C (HCV), assim como dos norovírus humanos (NoVs), tem sido dificultado pela incapacidade de propagação em cultivo celular (BUCKWOLD et al., 2003; LAGES et al., 2008). Ambos causam infecções em humanos, sendo que o HCV é o maior fator de risco envolvido no desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (LIANG et al., 2000), enquanto que os NoVs são reconhecidos como o agente etiológico de surtos de gastroenterite não-bacteriana em hospitais, asilos, centros de saúde, escolas e navios cruzeiros (FANKHAUSER et al., 1998). Dessa forma, modelos experimentais são necessários nos estudos de identificação de compostos com atividade inibitória frente ao HCV e NoVs (BUCKWOLD et al., 2003; LAGES et al., 2008).

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV), gênero *Pestivirus*, é um membro bem caracterizado da família *Flaviviridae* que está associado com enfermidade reprodutiva, gastroentérica, respiratória, doenças das mucosas, entre outras, em bovinos (YANAGIDA et al., 2004). O fato do BVDV replicar-se facilmente em cultura de células e compartilhar algumas similaridades com o HCV, permite que esse vírus seja utilizado como modelo experimental em estudos de estratégias gerais de replicação do HCV (BUCKWOLD et al., 2003). Da mesma forma, o calicivírus felino (FCV) (família *Caliciviridae*), um dos agentes mais comuns de doença respiratória em gatos, tem sido utilizado como um substituto para a descoberta de novas substâncias sanitizantes e desinfetantes para o controle das infecções causadas pelos NoVs (LAGES et al., 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade antiviral, *in vitro*, de óleos essenciais e compostos majoritários frente ao vírus da diarréia viral bovina (BVDV) e calicivírus felino (FCV).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. (manjeriçã) e dos compostos cânfora, 1,8-cineol e timol frente às células de linhagem de rim bovino (MDBK); e dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Lippia graveolens* HBK. (orégano mexicano) e *Thymus vulgaris* L. (tomilho) frente às células de linhagem de rim felino (CRFK).

- Testar a atividade antiviral, *in vitro*, do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. (manjeriçã) e dos monoterpenos cânfora, 1,8-cineol e timol frente ao BVDV; e dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Lippia graveolens* HBK. (orégano mexicano) e *Thymus vulgaris* L. (tomilho) frente ao FCV, a fim de determinar o índice de seletividade (IS) para cada composto/óleo essencial.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Vírus utilizados como modelos experimentais

3.1.1 Vírus da diarreia viral bovina (BVDV)

A família *Flaviviridae* é dividida em três gêneros: *Pestivirus*, que inclui o vírus da diarreia viral bovina (BVDV), *Hepacivirus*, com o vírus da hepatite C (HCV) e *Flavivirus*, que engloba o vírus da febre amarela (YFV), o vírus da dengue, entre outros (LINDENBACH & RICE, 2001). Todos os membros dessa família apresentam similaridades em relação à estrutura dos vírions, organização genômica e replicação viral (BUCKWOLD et al., 2003).

O BVDV, assim como os outros componentes da família *Flaviviridae*, é um vírus envelopado, cujo genoma contém uma molécula de RNA (ácido ribonucléico) linear de polaridade positiva (RIDPATH & FLORES, 2007). Apesar desse vírus ser responsável por causar uma série de manifestações clínicas em bovinos, incluindo enfermidade gastroentérica aguda, doença respiratória, síndrome hemorrágica com trombocitopenia e imunossupressão, as maiores conseqüências da infecção pelo BVDV parecem estar relacionadas com as perdas reprodutivas, o que resulta em uma taxa de mortalidade mundial de 17–32% e prejuízo de 10 a 40 milhões de dólares por milhão de partos (THIEL et al., 1996; HOUE, 2003, RIDPATH & FLORES, 2007).

Atualmente, não existem antivirais disponíveis para o tratamento de doenças causadas por *Pestivirus* e a contenção de surtos, muitas vezes, é realizada através da quarentena ou abate de animais infectados (BAGINSKI et al., 2000; BITSCH & RONSHOLT et al., 2005). Vacinas são utilizadas na tentativa de controle das infecções, no entanto, essa medida tem apresentado graus variados de sucesso (THIEL et al., 1996).

O HCV, uma das mais importantes infecções da família *Flaviviridae* em humanos, é o maior agente etiológico de hepatites não - A e não - B, acometendo, aproximadamente, 3% da população mundial (WHO, 2000). Embora a infecção pelo HCV muitas vezes seja assintomática, a infecção crônica pode levar ao desenvolvimento de cirrose, doença hepática terminal e carcinoma hepatocelular (LIANG et al., 2000; STUYVER et al., 2003). A cirrose desenvolve-se em cerca de 10-20% dos pacientes infectados cronicamente enquanto que o câncer de fígado em 1-5% durante um período de 20-30 anos (WHO, 2000).

Até o momento, não há vacina disponível para o HCV e a terapia combinada, que consiste da associação de ribavirina e interferon- α , além de ser extremamente cara, não é satisfatória em aproximadamente metade dos pacientes (BUCKWOLD et al., 2003; BHATTACHARYYA et al., 2003; ZHANG et al., 2009). A ribavirina pode causar anemia enquanto que o uso de interferon- α pode levar ao desenvolvimento de vários efeitos colaterais, incluindo sintomas semelhantes aos da gripe, fadiga e depressão (LINDSAY et al., 1997; MAIN et al., 1998; BHATTACHARYYA et al., 2003). Essas reações adversas podem tanto desencadear uma redução na dose de algum desses fármacos, quanto levar à interrupção temporária ou à descontinuação permanente do tratamento (ZHANG et al., 2009). Para os pacientes que não respondem ou tornam-se intolerantes à terapia disponível no momento, novas alternativas e compostos complementares devem ser explorados.

O desenvolvimento de novos agente antivirais para o tratamento da infecção causada pelo vírus da hepatite C tem sido dificultado pela sua aparente inabilidade de replicar-se eficientemente em cultivo celular (WHITBY et al., 2004). Replicons de RNA do HCV são um sistema que tem se mostrado útil na avaliação de compostos, porém, além dos altos custos associados a essa tecnologia, os replicons não produzem vírions infecciosos, o que dificulta a identificação e caracterização de agentes antivirais que agem nos estágios iniciais e tardios do ciclo de replicação viral, como ligação do vírion, entrada, desencapsulamento, maturação e liberação (BUCKWOLD et al., 2003).

O BVDV, por ser um vírus facilmente cultivado *in vitro*, apresentar um ciclo replicativo completo e possuir similaridades com o HCV, tem sido utilizado como modelo experimental para o estudo de compostos antivirais e seus mecanismos de

ação (BHATTACHARYYA et al., 2003; BUCKWOLD et al., 2003; WHITBY et a., 2004; ZHANG et al., 2009). Tanto o BVDV quanto o HCV pertencem à família *Flaviviridae* e, portanto, além da similaridade estrutural, ambos apresentam um ciclo replicativo com passos gerais semelhantes (BUCKWOLD et al., 2003). Apesar de exibirem tamanhos diferentes (BVDV= 12,6Kb e HCV=9,6Kb), esses vírus codificam para proteínas funcionalmente equivalentes, além de compartilharem algumas similaridades quanto à biologia, uma vez que os dois infectam seus respectivos hospedeiros de forma persistente (RICE 1996; BUCKWOLD et al., 2003). Sendo assim, o BVDV apresenta diversas vantagens para ser utilizado como um modelo do HCV.

3.1.2 Calicivírus felino (FCV)

O calicivírus felino (FCV), membro do gênero *Vesivirus* da família *Caliciviridae*, caracteriza-se por possuir vírions pequenos, não envelopados, que apresentam como genoma uma molécula de RNA de fita simples, linear de polaridade positiva (RADFORD et al., 2007). Essa família também inclui outros importantes patógenos do homem e animais, como os Norovírus e Sapovírus, que são os agentes de gastroenterite infecciosa em humanos; e os Lagovírus, os responsáveis pela doença hemorrágica dos coelhos (GREEN et al., 2000; RADFORD et al., 2007).

O FCV encontra-se amplamente difundido na população de felinos e apesar da transmissão ocorrer principalmente a partir de excreção viral das secreções orais e nasais durante a fase aguda, a maior fonte de vírus parece ser os animais portadores que carregam o vírus de forma subclínica (RADFORD et al., 2007). O estado de portador se desenvolve após a fase aguda da doença e é importante na manutenção do FCV na população felina (RADFORD et al., 2007).

A forma clínica da infecção pelo FCV pode apresentar uma série de sintomas, sendo que a ulceração oral é a lesão mais característica (RADFORD et al., 2007). Podem ocorrer também descarga nasal e ocular, infecções inaparentes, pneumonia ou infecções respiratórias mais severas, as quais podem ser fatais (RADFORD et al.,

2007). Recentemente, tem surgido cepas altamente virulentas de FCV que estão associadas a surtos de doença com uma elevada mortalidade e com novas características clínicas (FCV - associado a doença virulenta sistêmica (VSD) – anteriormente conhecida como febre hemorrágica) (RADFORD et al., 2007).

Vacinas vivas e inativadas estão disponíveis para a aplicação em gatos domésticos, no entanto, a eficácia dessas na proteção contra as manifestações clínicas tem sido questionada (LAURITZEN et al., 1998). Embora as cepas utilizadas nas vacinas sejam amplamente reativas e eficazes na redução e prevenção da doença clássica oral ou respiratória, a vacinação, além de não proteger contra todos os tipos de isolados (DAWSON et al., 1993) e não evitar a forma VSD-FCV (HURLEY, 2003), não é capaz de prevenir a infecção, o que leva os gatos vacinados ao estado de portadores (GASKELL, 1982; BINNS et al., 2000). Além disso, a elevada resistência do FCV no meio ambiente, a presença de animais com infecção persistente e o surgimento de cepas hipervirulentas dificultam o controle e profilaxia da doença (RADFORD et al., 2007).

Devido à inexistência de medicamentos antivirais para o tratamento da infecção por FCV, a terapia é realizada apenas de forma sintomática (RADFORD et al., 2007). Antibióticos de amplo espectro geralmente são recomendados para minimizar as complicações relacionadas à infecção bacteriana secundária nos casos mais graves de FCV - associado à doença oral e respiratória (RADFORD et al., 2007). O uso de estimulantes do apetite e terapia com fluidos são necessários nos casos onde a anorexia é prolongada (RADFORD et al., 2007). Embora alguns antivirais sejam eficazes frente ao FCV em cultivo celular, seu uso na clínica fica impossibilitado devido à alta toxicidade exibida por esses (POVEY, 1978). O interferon-ômega é utilizado por alguns, porém, há evidências que sua eficácia permanece limitada a estudos *in vitro*, além de não estar licenciado para o controle da doença por FCV em alguns países, como por exemplo, os do continente europeu (TAIRA et al., 2005).

Os norovírus (NoVs) humanos, também pertencentes à família *Caliciviridae*, são reconhecidos como a causa mais comum de surtos de gastroenterite não-bacteriana em hospitais, asilos, centros de saúde, escolas e navios cruzeiros (FANKHAUSER et al., 1998). Apesar dos sintomas associados a essa infecção serem brandos, o surgimento

de cepas altamente virulentas representa uma ameaça, principalmente, aos idosos e imunocomprometidos (SIEBENGA et al., 2009). O modo de transmissão do vírus é pela rota fecal-oral, sendo que esta pode ocorrer de pessoa a pessoa, através da ingestão de água ou alimentos contaminados, gotículas infectadas de vômito, fezes e contato com superfícies contaminadas (LAGES et al., 2008)

Por serem excretados em grande quantidade nas fezes e vômitos de indivíduos infectados e, assim, persistirem por longo tempo em superfícies, o NoVs tem-se tornado um importante problema de saúde pública (MALIK et al., 2006). Além disso, esse vírus é extremamente estável no ambiente, resistindo, muitas vezes, ao congelamento, resfriamento, radiação ultravioleta e desinfetantes comerciais (DOULTREE et al., 1999). Dessa forma, a desinfecção das mãos, alimentos e superfícies, é considerada um fator chave para quebrar a cadeia de transmissão desse patógeno (LAGES et al., 2008).

O estudo da eficácia de desinfetantes e sanitizantes frente aos NoVs é dificultado pela inexistência de um sistema de cultivo celular para a sua propagação (LAGES et al., 2008). Assim, o FCV, por também pertencer à família *Caliciviridae*, replicar-se eficientemente em cultivo celular e compartilhar algumas similaridades com os NoVs, tem sido utilizado como um modelo substituto para estudos de algumas estratégias gerais de replicação (MALIK et al., 2006; ESCOBAR-HERRERA et al., 2007).

3.2 Plantas e compostos com propriedades antimicrobianas

Atualmente, se tem percebido certa resistência por parte dos consumidores na utilização de produtos químicos artificiais devido às reações adversas apresentadas por esses, tais como ardor, prurido e placas esbranquiçadas na pele (MALIK et al., 2006; SU et al., 2010). Diante disso, compostos de origem natural que possuem atividade antimicrobiana e que, na sua maioria, não apresentam reações adversas e não causam alterações sensoriais indesejáveis ao produto, estão em crescente demanda (SU et al., 2010).

As plantas apresentam uma ampla variedade e complexidade de substâncias químicas que são responsáveis por diversos efeitos biológicos (GUERRA & NODARI, 2003), porém, muitas vezes, são utilizadas popularmente sem qualquer evidência científica de eficácia (HOLETZ et al., 2002). Além disso, boa parte da farmacopéia de plantas medicinais ainda não foi avaliada quanto à sua atividade antiviral (JASSIM & NAJI, 2003).

Os óleos essenciais constituem misturas naturais complexas de metabólitos secundários voláteis isolados das plantas por destilação (ASTANI et al., 2010) e estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal, como defesa contra micro-organismos e predadores, e também na atração de insetos e outros agentes polinizadores (SIANI et al., 2000). Além disso, devido às suas propriedades antibacterianas, antifúngicas e inseticidas, todas já observadas na natureza, esses têm sido largamente empregados nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, agrônômicas, sanitárias, entre outras (BAKKALI et al., 2008).

Os componentes dos óleos essenciais estão presentes em diferentes concentrações. Dois ou três componentes principais, presentes em concentrações bastante elevadas quando comparados a outros constituintes (BAKKALI et al., 2008), são chamados de compostos majoritários. Essas substâncias são responsáveis pela determinação das atividades biológicas dos óleos e incluem dois grupos de origem biossintética distinta, sendo que o principal é constituído de terpenos e terpenóides e o outro de compostos aromáticos e alifáticos, todos caracterizados por baixo peso molecular (BAKKALI et al., 2008).

Os terpenos são formados pela combinação de várias unidades de carbono (C₅), chamadas isoprenos (BAKKALI et al., 2008), sendo que os monoterpenos (C₁₀), os quais constituem 90% dos óleos essenciais, são as moléculas mais representativas (BAKKALI et al., 2008). Essa classe de terpenos permite uma grande variedade de estruturas, que podem consistir de uma série de funções, como por exemplo, cetona bicíclica, no caso da cânfora; fenóis, no caso do timol e carvacrol, e álcool ou éteres, presentes nos compostos linalol e 1,8-cineol, respectivamente (BAKKALI et al., 2008).

O *Ocimum basilicum* L., conhecido popularmente como manjeriço, é um subarbusto aromático pertencente à família *Lamiaceae*, nativo da Ásia tropical e

introduzido no Brasil pela colonização italiana (LORENZI & MATOS, 2002). Além de seu uso como condimento na culinária, suas folhas e flores tem sido amplamente utilizadas na medicina popular para o combate de dores estomacais, febre, constipação, problemas respiratórios e alívio de espasmos (LORENZI & MATOS, 2002). Recentemente, o potencial do óleo essencial de manjeriço, particularmente, como agente antibacteriano, antiparasitário e antioxidante também tem sido investigado (SARTORATTO et al., 2004; LEE et al., 2005; WANNISSORN et al., 2005; DAMBOLENA et al., 2010).

Seu perfil químico caracteriza-se pela presença de timol, metil-chavicol, linalol, eugenol, 1,8-cineol e pireno (LORENZI & MATOS, 2002), no entanto, essa composição pode apresentar diferenças, dependendo das variações nos quimiotipos, coloração das folhas e flores, aroma, origem, localização e época de colheita da planta (HUSSAIN et al., 2008; DAMBOLENA et al., 2010).

Óleos essenciais provenientes das folhas e flores de *O.basilicum* de duas localidades distintas do Quênia apresentaram disparidades em relação à sua composição majoritária, sendo que o linalol (95%) esteve presente em maior concentração nas amostras provenientes da região de Sagana, enquanto que a cânfora e linalol (aproximadamente 30% de cada), nas amostras de Yatta (DAMBOLENA et al., 2010). Já o eugenol, foi relatado como o principal constituinte do óleo essencial obtido das folhas de *Ocimum gratissimum*, tanto da região de Sagana (95,5%) quanto da região de Yatta (70,1%), bem como o componente responsável pela ação inibitória frente ao *Fusarium verticillioides* (DAMBOLENA et al., 2010).

Por outro lado, há autores que sugerem que as atividades antimicrobianas dos óleos essenciais de manjeriço podem ser atribuídas, em parte, à presença de altas concentrações de linalol (SUPPAKUL et al., 2003; SARTORATTO et al., 2004). Hussain et al. (2008) demonstraram que amostras de *O. basilicum* obtidas a partir de culturas de inverno e outono apresentaram uma maior atividade frente à micro-organismos do que amostras provenientes do verão e primavera, podendo tal ação ser relacionada ao alto teor de linalol e outros compostos oxigenados.

O *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), também pertencente à família *Lamiaceae*, trata-se de um subarbusto nativo da região Mediterrânea, cultivado em quase todos os

países de clima temperado de Portugal à Austrália (LORENZI & MATOS, 2002). Além do uso como aditivo na culinária tradicional, o alecrim tem sido muito utilizado como um agente medicinal nos casos de cólica renal, dor de cabeça, dismenorréia, fraqueza e doenças respiratórias (LORENZI & MATOS, 2002; JIANG et al., 2011). Estudos farmacológicos e informativos dessa planta permitiram sua indicação como tratamento caseiro para hipertensão, problemas digestivos, perda de apetite e para sintomas de reumatismo, além de comprovarem suas propriedades espasmolítica sobre a vesícula e duodeno, colerética, protetora hepática e antitumoral (LORENZI & MATOS, 2002).

Seu óleo essencial é constituído de uma mistura de componentes voláteis, dentre os quais pode-se destacar o 1,8-cineol, alfa-pineno e cânfora, e entre os compostos não voláteis, o ácido caféico, diterpenos, flavonóides e triterpenóides (LORENZI & MATOS, 2002).

Jiang et al. (2011), demonstrou que as atividades antimicrobianas exibidas pelo óleo essencial de *R. officinalis* podem ser atribuídas a um efeito sinérgico de seus componentes, uma vez que os compostos 1,8-cineol e alfa-pineno, quando testados isoladamente, apresentaram uma reduzida ação frente às espécies de bactérias e fungos analisados. Já, uma avaliação de óleos essenciais e extratos metanólicos coletados de três regiões distintas da Turquia em quatro diferentes intervalos de tempos durante o ano revelaram que os óleos essenciais de alecrim com altos teores de cânfora apresentaram uma atividade superior frente às bactérias testadas, sendo que *Enterococcus faecalis* e *Proteus vulgaris* foram os micro-organismos mais sensíveis à ação das amostras das três localidades (CELIK TAS et al., 2007).

O gênero *Lippia* (família *Verbenaceae*) inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, as quais estão distribuídas nos países da América Central e do Sul, e territórios da África tropical (PASCUAL et al., 2001). Além do uso como tempero nas preparações alimentícias, muitas de suas espécies tem mostrado atividade antimalárica e citostática (PASCUAL et al., 2001).

A espécie de *Lippia graveolens* HBK., conhecida como orégano mexicano, tem sido amplamente utilizada na medicina popular da América Central para o tratamento de muitas doenças, particularmente desordens gastrointestinais e respiratórias (SALGUEIRO et al., 2003). Dos trinta e três compostos já identificados na espécie, o

timol e carvacrol foram relatados os componentes majoritários do seu óleo essencial, bem como os principais responsáveis pelas atividades antimicrobiana e antioxidante do orégano mexicano (PINO et al., 1989; BARICEVIC & BARTOL, 2002). No entanto, essa composição pode apresentar variações de acordo com a fase de crescimento da planta, temperatura, estresse hídrico e intensidade de radiação solar recebida (DUNFORD & VAZQUEZ, 2005), o que acaba refletindo no espectro de atividades terapêuticas (SALGUEIRO et al., 2003).

Um estudo com óleos essenciais de *L. graveolens* de duas localidades diferentes da Guatemala demonstrou que as amostras com maior concentração de carvacrol apresentaram uma atividade antimicrobiana superior àquelas com altos teores de timol, com concentrações inibitórias mínimas (MICs) variando de 0,25 a 0,83µl/ml e 0,12 a 0,27µl/ml para bactérias e fungos, respectivamente (SALGUEIRO et al., 2003).

Além disso, ensaios de avaliação da atividade inibitória do óleo essencial de orégano mexicano frente a diferentes vírus humanos e animais mostraram uma maior susceptibilidade dos vírus envelopados à ação desses (PILAU et al., 2011). Apesar do carvacrol ter exibido uma elevada atividade antiviral (índice terapêutico (IT) = 33) contra o rotavírus humano, as diferenças entre os ITs do óleo essencial e seu composto majoritário testado isoladamente podem ser atribuídas à um efeito sinérgico exercido por seus componentes (PILAU et al., 2011).

O *Thymus vulgare* L. (tomilho) é outro subarbusto da família *Lamiaceae*, nativo da região Mediterrânea e cultivado no sul e sudeste do Brasil (LORENZI & MATOS, 2002). Devido ao seu sabor levemente amargo e picante, suas folhas são amplamente empregadas como condimento na culinária (LORENZI & MATOS, 2002). Além disso, o tomilho possui uma variedade de efeitos benéficos à saúde, como por exemplo, propriedades antisséptica, expectorante, carminativa, digestiva, antibacteriana, antifúngica e antioxidante (LORENZI & MATOS, 2002; LEE et al., 2005; POZZATTI et al., 2008).

Estudos fitoquímicos do *T. vulgare* indicam a presença de timol, eugenol, carvacrol, linalol, borneol e geraniol em seu óleo essencial, além de saponinas ácidas, pectinas, resinas e princípios amargos (LORENZI & MATOS, 2002; LEE et al., 2005). A forte ação inibitória de *T. vulgare* frente ao *Enterococcus faecium* (MIC = 0,15mg/ml)

foi exibida em uma análise de óleos essenciais obtidos das partes aéreas de plantas aromáticas brasileiras (SARTORATTO et al., 2004). Tal atividade foi atribuída às características fenólicas de seu constituinte majoritário, o timol, o qual é capaz de causar um distúrbio nas atividades de membrana dos micro-organismos (HELANDER et al., 1998).

Além disso, a atividade antiherpética do tomilho tem sido relatada por muitos autores (NOLKEMPER et al., 2006; SCHNITZLER et al., 2007; KOCH et al., 2008). Extratos aquosos de diferentes espécies da família *Lamiaceae* foram analisados quanto à sua atividade antiviral frente ao vírus herpes simplex (HSV), sendo que o tomilho, juntamente com a erva-cidreira e hortelã-pimenta foram os extratos que apresentaram os maiores índices terapêuticos (>900), além de uma inibição em torno de 95%, para o Herpes simplex tipo 1 (HSV-1), e 90%, para o Herpes simplex tipo 2 (HSV-2), nas suas concentrações máximas não tóxicas (NOLKEMPER et al., 2006).

Resultados similares foram encontrados em um estudo do efeito inibitório de óleos essenciais frente ao HSV-2, onde se observou que a formação de placas foi significativamente reduzida por mais de 90% quando esse vírus foi pré-incubado com óleos essenciais de anis, hissopo, tomilho, gengibre, camomila e sândalo (KOCH et al., 2008). Nessa mesma análise, nenhuma ação inibitória foi observada quando os óleos essenciais foram adicionados às células antes à infecção com HSV-2 ou após ao período de adsorção (KOCH et al., 2008).

Da mesma forma, Schnitzler et al. (2007) demonstrou que o pré-tratamento do HSV com óleo essencial de tomilho antes da infecção causou uma significativa redução de infectividade (95,9% - 99,9%) para cepas de HSV-1 sensíveis e resistentes ao aciclovir (ACV), sugerindo que tal ação deve-se à interação do óleo essencial com as estruturas do envelope viral, as quais são necessárias para a adsorção ou entrada do vírus para o interior da célula hospedeira.

4 CAPÍTULO 1

Inibição *in vitro* do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) pelo *Ocimum basilicum* (manjeriçã) e monoterpenos

Inibição *in vitro* do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) pelo *Ocimum basilicum* (manjeriço) e monoterpenos

***In vitro* inhibition of the bovine diarrhea virus (BVDV) by *Ocimum basilicum* (basil) and monoterpenes**

Thaís Felli Kubiça; Sydney Hartz Alves; Rudi Weiblen; Luciane Teresinha Lovato

RESUMO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um membro bem caracterizado da família *Flaviviridae* que por suas similaridades estruturais e de replicação tem sido sugerido como um modelo para estudos de identificação de compostos com atividade inibitória para o vírus da hepatite C (HCV), pertencente à mesma família. Nesse estudo, investigou-se a atividade, *in vitro*, do óleo essencial de *Ocimum basilicum* (manjeriço) e dos compostos cânfora, 1,8-cineol e timol frente ao BVDV. Os ensaios de toxicidade frente às células MDBK (*Madin-Darby bovine kidney cells*) foram realizados através do teste colorimétrico de MTT ([3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium]). Os testes de atividade antiviral foram realizados através da metodologia de ensaio de redução de placas. Foram usados três tratamentos: a) o vírus foi incubado por 1h à 37°C com o óleo essencial ou compostos antes da inoculação viral (ensaio virucida); b) as células foram pré tratadas com o óleo essencial ou compostos 1h antes da inoculação viral; c) ou as células foram incubadas com esses, por 72 h, após a inoculação viral. Após esse período, a porcentagem de inibição de placas para cada composto foi determinada baseada no número de placas do controle viral. Os resultados foram expressos como CC₅₀ (concentração citotóxica para 50% do cultivo celular), CI₅₀ (concentração inibitória para 50%) e IS (índice de seletividade = CC₅₀/CI₅₀). A cânfora (CC₅₀ = 4420,12 µg/ml) e o 1,8-cineol (CC₅₀ = 2996,10 µg/ml) foram os compostos menos tóxicos frente às células MDBK. Os resultados de atividade antiviral evidenciaram uma boa atividade antiviral exercida pelos monoterpenos, sendo que a cânfora (IS=13,88) seguida do 1,8-cineol (IS=9,05) foram os compostos que apresentaram os mais elevados índices de seletividade, ambos obtidos no ensaio virucida. O *O.basilicum* reduziu a infectividade em aproximadamente 90% enquanto a cânfora apresentou uma inibição de placas de 84,17%. O timol foi o terpeno menos eficiente frente ao BVDV. A melhor atividade do óleo essencial e compostos quando incubados com o vírus sugere uma ação destes diretamente sobre a partícula viral. Portanto, estudos mais detalhados dos mecanismos e atuações conjuntas com outros compostos se justificam.

Palavras chave: atividade antiviral, óleos essenciais, cânfora, 1,8-cineol, manjeriço

ABSTRACT

The bovine viral diarrhea virus (BVDV) is a well characterized member of the *Flaviridae* family which is suggested as a model for studies of identification of inhibitory compounds to HCV due to their similarities at the structural and replication levels. In the present study, the antiviral activity *in vitro* against BVDV of the essential oil (EO) of *Ocimum basilicum* (basil) and of the compounds camphor, 1,8-cineol, and thymol was investigated. The cytotoxicity assays towards the MDBK cells (*Madin-Darby bovine kidney cells*) were performed by the colorimetric test MTT ([3- (4.5-dimetilazol-2-il)-2.5-brometo of difeniltetrazolium]). In order to perform the antiviral tests, the plaque reduction assay was applied using three different treatments: a) the virus was incubated for 1h at 37°C with the essential oil or compounds prior to the virus inoculation in cells (virucidal assay); b) the cells were incubated with the essential oil or compounds 1h before virus inoculation; or c) the cells were incubated with essential oil or compounds for 72 hrs after virus inoculation. After that time, the percentage of plaques inhibition for each compound was determined based on the number of plaques in the viral control. The results were expressed by CC₅₀ (cytotoxic concentration to 50% of the cell culture), IC₅₀ (inhibitory concentration to 50%) and SI (selectivity index = CC₅₀/IC₅₀). Camphor (CC₅₀ = 4420.12 µg/ml) and 1,8-cineol (CC₅₀ = 2996.10 µg/ml) showed the lowest levels of cytotoxicity towards MDBK cells. The antiviral tests results evidenced a good activity for the monoterpenes, with the best result for camphor (IS=13,88) followed by the 1,8-cineol (IS=9.05) in the virucidal assay. The *O.basilicum* reduced the virus infectivity by approximately 90% while the compound camphor showed a plaque inhibition of 84.17%. The thymol was the monoterpene with the lower efficiency against BVDV. A better activity of the essential oil and the compounds when incubated previously with the virus suggest a direct action of them on the viral particle. Hence, more detailed studies on the mechanisms and complementary or synergistic action with other compounds may be justified.

Key words: antiviral activity, essential oil, camphor, 1,8-cineol, basil

1 INTRODUÇÃO

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV), protótipo do gênero *Pestivirus* da família *Flaviviridae*, é responsável por causar uma série de manifestações clínicas em bovinos, incluindo aborto, teratogênese, problemas respiratórios, doença debilitante crônica, disfunções do sistema imune e predisposição às infecções secundárias virais e bacterianas, (THIEL et al., 1996). Além disso, o BVDV, por pertencer à mesma família do vírus da hepatite C (HCV) e por apresentar similaridades em relação à estrutura do vírion, organização do genoma e ciclo de replicação, tem sido considerado como um possível modelo experimental para o HCV na identificação de agentes antivirais, já que o estudo do HCV é dificultado pela sua incapacidade de propagar-se de forma eficiente em cultivo celular (BUCKWOLD et al., 2003).

O HCV, membro do gênero *Hepacivirus*, é a causa mais comum de hepatites crônicas em todo o mundo, sendo o principal fator de risco envolvido no desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular (LIANG et al., 2000). Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 170 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas pelo HCV, onde 80% dos novos pacientes infectados progridem para o desenvolvimento de uma infecção crônica (WHO, 2000).

Atualmente, não há vacina disponível para a infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) e o tratamento padrão consiste da combinação de interferon (IFN)- α e ribavirina (RBV) (BHATTACHARYYA et al., 2003). Contudo, além desses agentes apresentarem uma elevada toxicidade e, com isso, uma série de efeitos colaterais, essa terapia é extremamente cara e é bem sucedida apenas em uma pequena parcela da população (BHATTACHARYYA et al., 2003; YANAGIDA et al., 2004). Pacientes que utilizam a

ribavirina podem desenvolver anemia enquanto que o tratamento com IFN- α é responsável por uma ampla variedade de efeitos colaterais, incluindo sintomas semelhantes aos da gripe, fadiga e depressão (BHATTACHARYYA et al., 2003). Dessa forma, a necessidade de novas alternativas terapêuticas para o tratamento do vírus da hepatite C é uma realidade.

Produtos naturais obtidos de plantas tradicionais tem provido a indústria farmacêutica como uma das mais importantes fontes de pesquisas de compostos sendo que 40% dos fármacos modernos são substâncias de origem natural, usadas na versão *in natura* ou sintetizadas (JASSIM & NAJI, 2003). Uma grande variedade de fitoquímicos ativos, incluindo terpenos e terpenóides, constituintes aromáticos e alifáticos, entre outros, tem sido relatados como os principais responsáveis por suas atividades biológicas (BAKKALI et al., 2008). Óleos essenciais voláteis utilizados como condimentos tem apresentado altos níveis de atividade antiviral, no entanto, a maioria da farmacopéia de compostos de plantas medicinais ainda não é conhecida (JASSIM & NAJI, 2003).

Os óleos essenciais são constituídos por uma grande variedade de componentes, sendo que alguns deles estão presentes em maior quantidade e são designados de constituintes majoritários (ASTANI et al., 2010). Entre estes componentes destacam-se os monoterpenos que constituem 90% dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008). Os monoterpenos 1,8-cineol, cânfora e timol estão presentes em diferentes concentrações em plantas utilizadas na culinária e medicina popular como o *Ocimum basilicum* (manjeriçã), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Thymus vulgaris* (tomilho) (LORENZI & MATOS, 2002; LEE et al., 2005; POZZATTI et al., 2008).

Alguns monoterpenos como o 1,8-cineol e o timol apresentaram atividade antiviral contra o herpes simplex (HSV) *in vitro* (ASTANI et al., 2010).

Ocimum basilicum L., conhecido como manjeriço, é uma planta da família *Lamiaceae* largamente utilizada como condimento na culinária, e que também tem sido aplicada na medicina popular no combate a diversas doenças; entre elas problemas estomacais e respiratórios (LORENZI & MATOS, 2002). Recentemente, o potencial do manjeriço como antibacteriano (SUPPAKUL et al., 2003; SARTORATTO et al., 2004), antifúngico (POZZATTI et al., 2008) e antiviral (CHIANG et al., 2005) tem sido investigado. A composição química do óleo essencial desta planta inclui timol, metilchavicol, linalol, eugenol, 1,8-cineol e pireno (LORENZI & MATOS, 2002), no entanto, essa composição pode apresentar variabilidade.

O presente estudo descreve a atividade antiviral do óleo essencial de *Ocimum basilicum* (manjeriço) e dos monoterpenos 1,8-cineol, cânfora e timol frente ao BVDV, possível modelo experimental para o HCV, bem como a determinação do momento do ciclo replicativo viral em que atuam estes compostos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Óleo essencial e monoterpenos

Os procedimentos de obtenção da planta (*Ocimum basilicum*), extração do óleo essencial, bem como a análise de seus constituintes químicos encontram-se relatados no trabalho de Pozzatti et al. (2008). As análises qualitativas e semiquantitativas dos

principais constituintes químicos do manjeriço foram realizadas através das técnicas de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), as quais forneceram os espectros de massa da maioria dos componentes do óleo essencial (Pozzatti et al., 2008). Os compostos 1,8-cineol, cânfora e timol foram adquiridos comercialmente da Acros Organics, Bélgica, com os respectivos certificados de análise, os quais encontram-se anexados no trabalho de Pilau (2010).

Para os ensaios, o óleo essencial de manjeriço e os monoterpenos foram inicialmente diluídos em metanol até uma concentração de $0,64\text{g ml}^{-1}$ (solução I). A partir dessa, realizou-se então uma diluição 1:100 em meio essencial mínimo (MEM), a fim de ser obter uma concentração final de $6400\ \mu\text{g ml}^{-1}$ (solução II). A solução II foi utilizada como diluição de trabalho para os testes de citotoxicidade e atividade antiviral.

2.2 Cultivo celular e vírus

Foram utilizadas células MDBK (*Madin-Darby bovine kidney cells* = células de linhagem de rim bovino), as quais foram mantidas em garrafas plásticas de cultivo celular em meio essencial mínimo (MEM) Eagle contendo 10% de soro fetal eqüino (SFE), penicilina, estreptomicina e anfotericina B, nas concentrações de 100 U/ml, 100 e $2,5\ \mu\text{g/ml}$, respectivamente. O meio de manutenção das células nas placas foi constituído de 5% de soro. Realizaram-se repiques periódicos através da tripsinização das células (tripsina – DIFCO laboratories, Detroit, USA) para o aumento e manutenção das mesmas de acordo com a necessidade. Para a realização dos testes de citotoxicidade e atividade antiviral, foram preparadas culturas de células em placas de

poliestireno rígido com 96 e 6 cavidades, respectivamente, e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

A cepa do vírus da diarréia viral bovina (BVDV) citopático Singer genótipo 1 foi fornecida pelo Setor de Virologia (UFSM). Os estoques de vírus foram preparados (DEZENGRINI et al., 2006) e titulados (BRUM & WEIBLEN, 2007) na respectiva célula como já descrito e as alíquotas mantidas a -70°C até o momento do uso.

2.3 Ensaio de citotoxicidade

A toxicidade do óleo essencial de *O. basilicum* e dos monoterpenos foi medida através do ensaio colorimétrico com ([3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium]) (MTT) (M2128, Sigma) de acordo com a metodologia descrita por Mosmann (1983) e modificada por Cueto et al. (2011).

Resumidamente, MEM acrescido de SFE e concentrações crescentes do óleo essencial/compostos numa faixa de 25 a 3200µg/ml foram adicionados à monocamada de células pré-formada ($1,6 \times 10^5$ células/ml), em placas de 96 poços (NUNC - Roskilde, Dinamarca), em um total de seis repetições para cada concentração. Controles celulares e de toxicidade do metanol foram incluídos. Após 72 horas de incubação a 37°C e 5% CO₂, o meio de cultivo foi removido e 50 µl de MTT (1mg/ml) foram adicionados às placas, as quais foram mantidas, novamente, na estufa por um período de 2 horas. Após a remoção do MTT, acrescentou-se 100µl de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar os cristais de formazan. O sobrenadante foi então transferido para uma nova placa que foi lida no espectrofotômetro a 540nm.

A porcentagem de células viáveis para cada composto/óleo essencial foi calculada através da fórmula: absorbância do composto ou óleo essencial/absorbância do controle celular x 100%. A partir da curva concentração *versus* % de viabilidade celular, pôde-se obter a equação da reta, a qual foi útil para a determinação do CC₅₀ (concentração citotóxica para 50% do cultivo celular). A concentração mais alta dos óleos que não causou citotoxicidade, ou seja, a concentração máxima não tóxica (CMNT) foi posteriormente usada para o teste inicial de atividade antiviral.

2.4 Ensaio Antiviral

Para a elucidação do mecanismo de ação antiviral do óleo proposto e dos compostos, o vírus foi incubado com o óleo antes da infecção (ensaio virucida), as células foram pré tratadas com o óleo essencial antes da infecção viral (ensaio de pré tratamento) ou as células infectadas foram incubadas imediatamente após a penetração do vírus dentro da célula (ensaio de pós tratamento), conforme metodologia descrita por Astani et al. (2010), com algumas modificações.

O ensaio virucida foi realizado com iguais volumes de suspensão de vírus (BVDV) e diferentes concentrações de óleo essencial ou monoterpenos incubados em *eppendorfs* por 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período, foi permitida a adsorção do vírus + óleo essencial/compostos às células por 2 horas a 37°C (10³ PFU). O inóculo residual foi removido e as células infectadas foram, então, sobrepostas com 2ml de agarose 0,5% contendo MEM e SFE. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa e, após, fixadas e coradas com formol e cristal violeta por 60 minutos a temperatura ambiente. O corante foi removido em água corrente e, depois de seca a

monocamada, realizou-se a contagem de placas. Baseando-se no número de placas observado nas monocamadas de controle de vírus (culturas sem tratamento), obteve-se a % de inibição viral para cada concentração. Com isso, a concentração do óleo essencial em teste que inibiu o número de placas em 50% (concentração inibitória para 50% das placas = CI_{50}) foi determinada a partir de curvas de dose-resposta. O índice de seletividade (IS) foi obtido a partir da relação CC_{50}/CI_{50} .

O procedimento para realização dos ensaios de redução de placa para os ensaios de pré e pós tratamento foi semelhante ao descrito acima para o ensaio virucida, porém, para o primeiro, as células foram pré tratadas com a CMNT de óleo essencial antes da infecção viral por 1 hora (ensaio de pré tratamento) e, para o segundo, as células infectadas foram incubadas com CMNT de óleo essencial após as 2 horas de adsorção viral (ensaio de pós tratamento) por um período de 72 horas em estufa à 37°C com 5% CO_2 . Poços contendo MEM com 1% de metanol, mas sem óleo, foram também incluídos como controle nos ensaios de redução de placa.

Todos os resultados foram calculados a partir da média de três experimentos independentes realizados em duplicata.

A avaliação dos valores de IS fornecidos pelos ensaios antivirais seguirá a proposta estabelecida por Amoros et al. (1992), a qual estabelece que um valor de índice de seletividade (IS), ou índice terapêutico (IT), maior que quatro é o apropriado para um composto poder ser classificado com potencial atividade antiviral.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da análise cromatográfica da composição do óleo essencial de manjeriço do presente estudo encontram-se relatados no trabalho de Pozzatti et al. (2008). Os dados obtidos com os testes de citotoxicidade através do ensaio colorimétrico com MTT e ensaio de redução de placas realizados em cultivo celular, *in vitro*, estão apresentados na Tabela 1 e Figuras 1, 2 e 3.

Os óleos essenciais são uma complexa mistura natural que contém cerca de 20-60 componentes em diversas concentrações, onde dois ou três desses, que se encontram em concentrações bastante elevadas, são os responsáveis pela determinação de suas propriedades biológicas. Esses componentes incluem dois grupos de origem biossintética distinta, onde o principal é composto de terpenos e terpenóides, e o outro de constituintes aromáticos e alifáticos, todos caracterizados por baixo peso molecular (BAKKALI et al., 2008).

Os monoterpenos 1,8-cineol (23,61%) e cânfora (12,80%), juntamente com o linalol (31,22%) apresentaram-se como os principais constituintes do óleo essencial de *Ocimum basilicum* utilizado neste trabalho, enquanto que o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* está composto basicamente de 28,59% de 1,8-cineol e 26,31% de cânfora (POZZATTI et al., 2008). O timol (21,0%) e o γ -terpineno (64,0%) estão presentes em concentração majoritária no óleo essencial de *Thymus vulgaris* (POZZATTI et al., 2008).

A quantidade de óleo ou compostos necessário para demonstrar a concentração citotóxica a 50% foi similar e, em alguns casos, superior a valores descritos na literatura

científica em estudos anteriores com óleos essenciais e seus componentes. Os compostos cânfora ($CC_{50} = 4420,12 \mu\text{g/ml}$) e 1,8-cineol ($CC_{50} = 2996,10 \mu\text{g/ml}$) apresentaram menor citotoxicidade frente às células MDBK do que o óleo essencial de manjeriço ($CC_{50} = 1750,01 \mu\text{g/ml}$), enquanto que o timol ($CC_{50} = 1404,32 \mu\text{g/ml}$) foi o mais tóxico de todos os produtos testados (Tabela 1). Em estudo realizado por Pilau et al. (2011), os valores de CC_{50} encontrados para o óleo essencial de *Lippia graveolens* (orégano mexicano) e seu constituinte majoritário carvacrol, frente a esse mesmo cultivo celular, foram de 568 e 215 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Valores ainda mais baixos foram obtidos com extratos de própolis de duas diferentes origens, os quais se mostraram bastante tóxicos para células de linhagem de rim bovino, exibindo CC_{50} de 293 e 343 $\mu\text{g/ml}$ (CUETO et al., 2011).

Mais especificamente, o composto 1,8-cineol já foi testado para sua atividade antiviral juntamente com outros monoterpenos frente ao herpes simplex humano exibindo um valor de CC_{50} de 2000 $\mu\text{g/ml}$ (ASTANI et al., 2010). No mesmo artigo, a CC_{50} para o timol foi de 85 $\mu\text{g/ml}$. É importante ressaltar que no trabalho citado foram utilizadas células RC-37 para a realização dos experimentos (ASTANI et al., 2010). A utilização de diferentes cultivos celulares e condições de experimentos podem ter sido a razão para diferenças observadas neste e nos outros trabalhos citados. Entretanto há alguns aspectos relevantes que devem ser observados. A citotoxicidade dos monoterpenos 1,8-cineol e do timol apresentaram consistência quando testados frente a células distintas em laboratórios independentes. Além disso, a baixa toxicidade ao cultivo celular é um bom indicador inicial para um futuro candidato a antiviral, e os dados obtidos são promissores, considerando que o óleo e compostos testados no presente trabalho apresentaram menor citotoxicidade em quase todas as comparações.

Os parâmetros para a definição de um composto como bom candidato a antiviral ainda não estão bem definidos, havendo uma variação muito grande entre valores de CI_{50} e IS para diferentes vírus e produtos. Muitas são as variáveis que influenciam no resultado final de um teste de susceptibilidade antiviral, como: linhagem celular, título do inóculo viral, tempo de incubação, intervalo de concentração do agente antiviral em teste, cepas de referência, método de ensaio, cálculos e critérios de interpretação (SWIERKOSZ & HODINKA, 2003). Entretanto existe uma proposta sugerida por Amoros et al. (1992), que será usada como base para nossas discussões. A proposta é de que um valor de índice de seletividade (IS), ou índice terapêutico (IT), maior que quatro seria o apropriado para um composto poder ser classificado com potencial atividade antiviral.

Os resultados apresentados na Tabela 1 evidenciam, no geral, uma boa atividade antiviral exercida pelos monoterpenos, sendo que a cânfora (IS=13,88) seguida do 1,8-cineol (IS=9,05) foram os compostos que apresentaram os mais elevados índices de seletividade obtidos no ensaio virucida. Apesar do óleo essencial de *O.basilicum* apresentar uma considerável porcentagem de inibição viral, conforme demonstrado pela Figura 1, sua CI_{50} e índice de seletividade não foram satisfatórios (Tabela 1).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. basilicum* tem sido atribuída, em parte, à presença de alto teor de linalol nas amostras testadas (SUPPAKUL et al., 2003; SARTORATOTTO et al., 2004). Levando-se em consideração tal informação, a concentração de 31,22% desse monoterpeno oxigenado no óleo essencial em estudo pode não ter sido o suficiente para a exibição de uma expressiva atividade antiviral. Além disso, a cânfora, que apresentou isoladamente um elevado IS e inibição frente ao

BVDV, não está presente em concentração majoritária nessa amostra de óleo essencial. Quando testados isoladamente, os monoterpenos 1,8-cineol e cânfora exibiram consideráveis valores de IS, o que poderia sugerir a existência de algum outro constituinte em quantidade minoritária que, juntamente com esses componentes, pudesse exercer um efeito do tipo antagônico quando testados em conjunto no óleo essencial de *O. basilicum*.

Por outro lado, extratos desta planta testados frente ao HCV utilizando métodos de inibição da protease deste vírus não demonstraram bons resultados. Hussein et al. (2000) em um estudo com diferentes partes de 71 plantas usadas comumente na medicina tradicional sudanesa, demonstraram que os extratos obtidos das folhas de *O. basilicum* exibiram uma baixa porcentagem de inibição (59,8% para o extrato alcoólico e 37,6% para o extrato aquoso).

Os resultados aqui apresentados indicam uma redução de placas de 90% (Figura 1); o que seria uma alta taxa de inibição, entretanto a dose necessária para inibir a formação de placas ($CI_{50} = 474,29 \mu\text{g/ml}$) (Tabela 1) torna inviável a utilização deste óleo. Analisando conjuntamente os dados citados com os dados obtidos nos experimentos descritos com BVDV, há evidência suficiente de que o óleo essencial ou o extrato de *O. basilicum* não teriam efeito antiviral sobre o HCV que justificasse maiores estudos. Entretanto, os resultados obtidos com componentes deste óleo essencial indicam atividade antiviral.

Estudos recentes tem mostrado o potencial de plantas medicinais para aplicações terapêuticas no tratamento do HCV, utilizando como modelo experimental o BVDV. Os resultados exibidos em uma análise do efeito antiviral da artemisina, obtida da planta *Artemisia annua*, sugeriram potencial utilidade da associação desse composto

com a terapia atual para o tratamento de infecções causadas por flavivirus (ROMERO et al., 2006). Da mesma forma, extratos aquosos de *Celosia cristata*, *Ophioglossum vulgatum*, *Houttuynia cordata*, *Selaginella tamariscina*, *Alpinia galanga* e *Alpinia oxyphylla* demonstraram inibição frente ao BVDV sem a presença de efeitos tóxicos sobre às células MDBK (HERRMANN et al, 2011).

Além disso, extratos das raízes de *Phyllanthus amarus* causaram uma considerável redução do efeito citopático induzido pelo BVDV com índice terapêutico maior que 6 e ausência de citotoxicidade, o que justificou a continuação de estudos para investigação de sua possível ação sobre o HCV (BHATTACHARYYA et al., 2003). Como já salientado anteriormente, não há parâmetros bem definidos na qualificação de um produto qualquer quanto à sua atividade antiviral. Entretanto, a comparação entre os índices obtidos com os terpenos e, aquele obtido no trabalho anteriormente citado, indica uma boa atividade anti-BVDV para a cânfora e o 1,8-cineol (Tabela 1).

O pré-tratamento do BVDV com os monoterpenos por 1 hora (Figura 1) causou uma grande redução na formação de placas, sendo que na sua concentração máxima não-tóxica (CMNT), a infectividade foi reduzida em aproximadamente 84% para a cânfora e 75% para o 1,8-cineol. A formação de placas de HSV-1 também foi reduzida quando este vírus foi incubado por 1 hora a 37°C com o 1,8-cineol (ASTANI et al., 2010), embora com valores de redução considerados moderados pelo autor (aproximadamente 40%). Em uma outra situação, o composto 1,8-cineol e a cânfora reduziram a infectividade do HSV-1 em 35% e 0%, respectivamente, quando usados em uma diluição de 0,1% (SIVROPOULOU et al., 1997). Os vírus da família *Herpesviridae* são vírus grandes com um número expressivo de proteínas presentes no seu envelope em termos de quantidade e diversidade (FRANCO & ROEHE, 2007). Já

os vírus da família *Flaviviridae* são vírus relativamente menores com uma menor diversidade de proteínas no envelope se comparados aos herpesvírus (RIDPATH & FLORES, 2007). Esta diferença estrutural talvez possa ter contribuído para a diversidade de resultados observados com os dois vírus.

O pré-tratamento das células com os compostos, assim como a incubação com estes após a inoculação do vírus nas células não apresentaram atividade antiviral no mesmo nível que o tratamento prévio do vírus (Figura 1). Esses resultados sugerem que os compostos investigados atuam diretamente sobre a partícula viral de tal forma que interferem com a infectividade do vírus. Efeitos sobre a estrutura e função da membrana de bactérias tem sido utilizados para explicar a ação antimicrobiana de óleos essenciais e seus principais constituintes. As atividades desses componentes ativos podem ser atribuídas às suas características lipofílicas que, por serem capazes de interagir com a membrana lipídica destas bactérias (HELANDER et al., 1998, COX et al., 2000), poderiam exercer um efeito similar frente a envelopes virais (SCHNITZLER et al., 2007). Os óleos essenciais de diversas plantas e seus componentes majoritários testados tem demonstrado uma boa atividade sobre vírus que apresentam envelope lipídico, levando pesquisadores a concluir que estes compostos inativam diretamente os vírus e podem interferir com as estruturas do envelope viral ou mascarar as estruturas virais que são necessárias para adsorção e entrada do vírus para o interior da célula hospedeira (SCHNITZLER et al., 2007; ASTANI et al., 2010).

No geral, o timol foi o monoterpeno menos eficiente nos testes de atividade antiviral realizados (Figuras 1, 2 e 3). Em outro ensaio virucida descrito, este monoterpeno inibiu a formação de placas de HSV em > 80% (ASTANI et al., 2010). No

entanto, o índice terapêutico deste composto naquele caso foi de apenas 2,8 devido à alta toxicidade deste para as células RC-37 usadas no experimento.

Produtos naturais podem desempenhar um grande papel como fontes de agentes anti-HCV. Sho-Saiko-to, uma receita composta por *Bupleuri radix*, *Zizyphi fructus*, *Tuber pinelliae*, *Ginseng radix*, *Zingiberis rhizoma*, *Glycyrrhizae radix* e *Scutellariae radix*, demonstrou potencial para inibir o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em casos de doença hepática crônica no Japão (OKA et al., 1995).

A associação de agentes antivirais tradicionais com produtos naturais obtidos de plantas é outra alternativa que tem sido apresentada a fim de minimizar os efeitos causados por esses fármacos. A combinação de IFN- α com o composto natural Xanthohumol (XN) exibiu um melhor efeito antiviral, *in vitro*, quando comparado com cada composto testado isoladamente (ZHANG et al., 2010). Isto indicou a possibilidade de uma redução na dosagem de IFN- α quando utilizado em associação com XN, fato que pode beneficiar os indivíduos que não toleram as reações adversas dessa medicação em doses elevadas (LIANG et al., 2000). Nesse mesmo estudo, XN também apresentou potencial para substituir a ribavirina na terapia combinada utilizada atualmente quando os indivíduos não podem tolerar os efeitos colaterais associados a esse tratamento (ZHANG et al., 2010).

Diante dessas considerações, a atividade antiviral virucida sobre o BVDV exibida pelos monoterpenos em estudo; em especial a cânfora, sugere que estes compostos possam também apresentar alguma atividade sobre o HCV, uma vez que o BVDV tem sido sugerido como modelo para estudos referentes ao HCV (BUCKWOLD et al., 2003). Por outro lado, o uso de produtos naturais com atividade antiviral isolados ou em

conjunto com a terapia disponível no momento poderia vir a ser uma alternativa para a minimização dos efeitos colaterais apresentados por essa.

4 CONCLUSÃO

Os monoterpenos cânfora e 1,8-cineol testados neste estudo demonstraram atividade virucida frente ao BVDV o que justifica estudos posteriores para examinar a atuação desses.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMOROS, M. et al. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal Nat Prod**, v.55, n.12, p.1732-40, dec, 1992.

ARASE, Y. et al. The long term efficacy of glycyrrhizin in chronic hepatitis C patients. **Cancer**, v.79, p.1494-1500, 1997.

ASTANI, A. et al. Comparative Study on the Antiviral Activity of Selected Monoterpenes Derived from Essential Oils. **Phytother Res**, v.24, p. 673–679, 2010.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**. v.46, p. 446-475, 2008.

BHATTACHARYYA, R. et al. *Phyllanthus amarus* clone with significant activity against bovine diarrhoea virus - a surrogate model of Hepatitis C virus. **Current Science**, v.84, n.4, p.529-533, 2004.

BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R. Detecção, identificação e quantificação de vírus In: FLORES, E.F. (Org.). **Virologia veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2007. p.60-86.

BUCKWOLD, V.E. et al. Bovine viral diarrhoea virus as a surrogate model of Hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents. **Antiviral res.**, v.60, n.1, p.1-15, sep. 2003.

BUCKWOLD, V. E. et al. Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA and RNA viruses. **Antiviral Res**. v.61, n.1, p.57-62, Jan. 2004.

CHIANG, L.C. et al. Antiviral activities of extracts & selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v.32, n.10, p.811-816, 2005.

COX, S.D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**. v.88, p.170-175, 2000.

CUETO, A.P.; ALVES, S.H.; PILAU, M.; WEIBLEN, R.; KUBIÇA, T.F.; LOVATO, L.T. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. **Ciência Rural**. v.41, n.10, p.1800-1806, out. 2011.

DEZENGRINI, R. **Soroprevalência de infecções víricas em cães de Santa Maria, RS; e seleção e caracterização de linhagens celulares resistentes ao vírus da diarreia viral bovina**. 2006. 63f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. *Herpesviridae*. In: FLORES, E.F. (Org.) **Virologia veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2007. p.435-488.

HELANDER, I.M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **J. Agric. Food Chem.** v. 46, p.3590-3595, 1998.

HERRMANN, F. et al. Diversity of Pharmacological Properties in Chinese and European Medicinal Plants: Cytotoxicity, Antiviral and Antitrypanosomal Screening of 82 Herbal Drugs. **Diversity**, v.3, p.547-580, 2011.

HUSSEIN, G. et al. Inhibitory Effects of Sudanese Medicinal Plant Extracts on Hepatitis C Virus (HCV) Protease. **Phytotherapy Research**. v.14, p.510-516, 2000.

JASSIM, S.A.; NAJI, M.A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **J Appl-Microbiol.**, v.95, n.3, p.412-427, 2003.

LEE, S.J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**. v.91, p.131-137. 2005.

LIANG, T.J et al. Pathogenesis, natural history, treatment, & prevention of hepatitis C. **Ann Intern Med**. v.132, n.4, p.296-305, 2000.

LINDSAY, K.L. **Hepatology**, v.26, p.71S-77S, 1997.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2002. 512p.

MAIN, J.; McCARRON, B.; THOMAS, H.C. Antiviral Chem. **Chemother**, v.9, p.449-460, 1998.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**. v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

OKA, H. et al. Prospective study of chemoprevention of hepatocellular carcinoma with Sho-saiko-to (TJ-9). **Cancer**, v.76, p.743-749, 1995.

PILAU, M. **Atividade de óleos essenciais de condimentos frente a Herpesvírus, Flavivírus, Paramyxovírus e Reovírus**. 2010. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

PILAU, M. R. et al. Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. *Brazilian Journal of Microbiology*. vol.42, n.4, p. 1616-1624, 2011.

POZZATTI, P. et al. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. **Can J Microbiol**. v.54, n.11, p.950-6, nov. 2008.

RIDPATH, J.F.; FLORES, E. F. *Flaviviridae*. In: FLORES, E.F. (Org.) **Virologia veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2007. p.565-590

ROMERO, M.R. et al. Antiviral effect of Artemisin from *Artemisia annua* against a Model Member of the Flaviviridae Family, the Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV). *Planta Med*, v. 72, p.1169-1174, 2006.

SARTORATOTTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.35, p.275-280, 2004.

SCHNITZLER, P.; KOCH, C.; REICHLING, J. Susceptibility of Drug-Resistant Clinical Herpes Simplex Virus Type 1 Strains to Essential Oils of Ginger, Thyme, Hyssop and Sandalwood. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p.1859-1862, may. 2007.

SWIERKOSZ, E.M.; HODINKA, R.L. Antiviral agents and susceptibility tests. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. (eds): **Manual of Clinical Microbiology**, 8th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2003.

SIVROPOULOU, A. et al. Antimicrobial, Cytotoxic and Antiviral Activities of *Salvia fruticosa* Essential Oil. **J. Agric. Food Chem.** v. 45, p. 3197-3201, 1997.

SUPPAKUL, P et al. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packing. **Journal of Agriculture and Food Chemistry.** v.51, p.3197-3207, 2003.

THIEL, H.J.; PLAGEMANN, P.G.W.; MOENNIG, V. *Pestiviruses*. In: **Virology** (Ed.) FIELDS, B.N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. Lippincott: Philadelphia, 1996. p. 1059–1073.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Hepatitis C. Fact Sheet Number 164, 2000.

YANAGIDA, K. et al. Inhibition of bovine viral diarrhea virus (BVDV) by mizoribine: synergistic effect of combination with interferon-alpha. **Antiviral Research.** v.64, n.3, p.195-201, dec. 2004.

ZHANG, N. et al. Xanthohumol enhances antiviral effect of interferon alpha-2b against bovine viral diarrhea virus, a surrogate of hepatitis C virus. **Phytomedicine.** v.17, n.5, p.310-316, apr. 2010.

Tabela 1 - Citotoxicidade e atividade antiviral do óleo essencial de manjeriço e monoterpenos frente ao BVDV. Os ensaios foram realizados em triplicata e os dados representam a média de três experimentos \pm DP.

Óleo essencial/monoterpeno	CC₅₀^a \pm DP^b	CI₅₀^c \pm DP	IS^d
Óleo essencial de manjeriço	1750,01 \pm 11,32	474,29 \pm 8,65	3,69
1,8-cineol	2996,10 \pm 9,53	331,17 \pm 7,42	9,05
Cânfora	4420,12 \pm 8,89	318,51 \pm 8,57	13,88
Timol	1404,32 \pm 6,91	248,56 \pm 5,32	5,65

^a Concentração citotóxica ($\mu\text{g/ml}$) para 50% do cultivo celular.

^b Desvio padrão.

^c Concentração inibitória ($\mu\text{g/ml}$) para 50% obtida no ensaio virucida.

^d Índice de seletividade ($=\text{CC}_{50}/\text{CI}_{50}$).

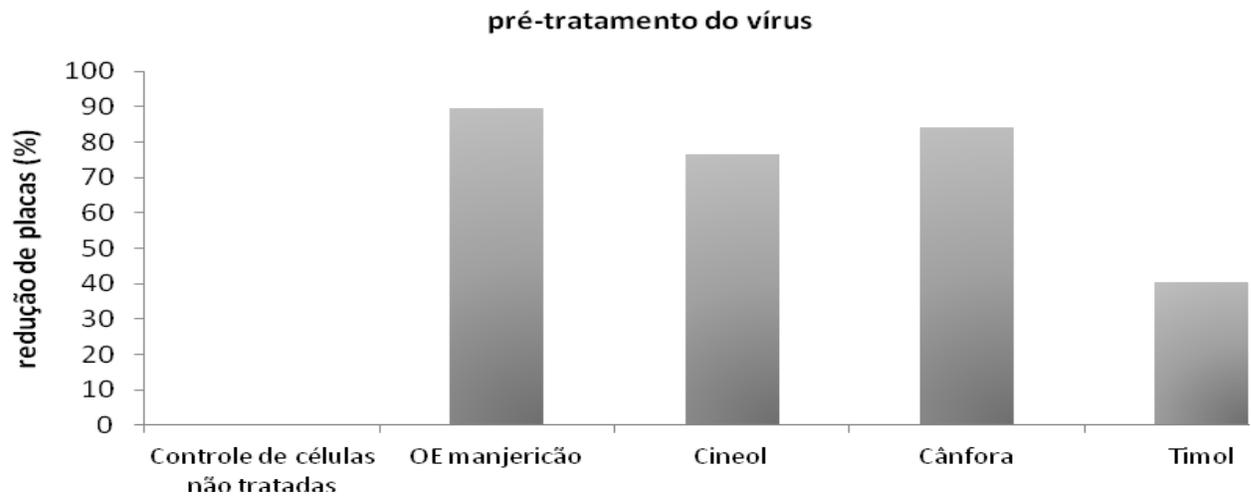


Figura 1- Atividade antiviral do óleo essencial de manjeriço e monoterpenos frente ao vírus da diarreia viral bovina após a incubação do BVDV com as CMNTs dos compostos por 1 hora à temperatura ambiente. O número de placas de vírus foi determinado 3 dias após a infecção e comparado com o controle de células não tratadas. Os resultados foram expressos como a porcentagem de redução de placas. Esses experimentos foram repetidos independentemente e os dados apresentados como a média de três experimentos.

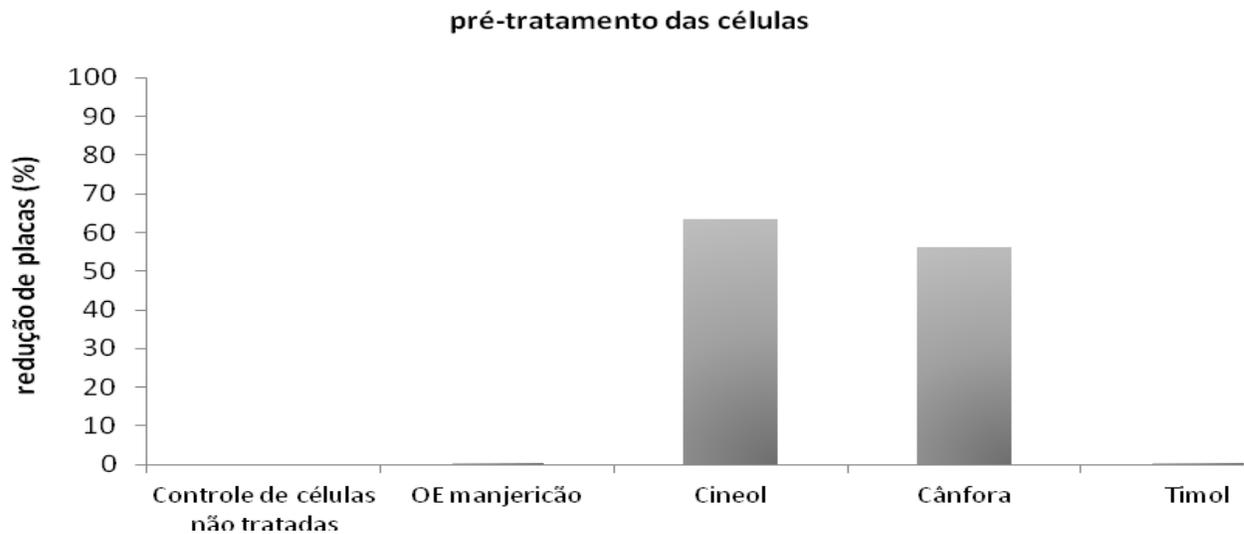


Figura 2- Atividade antiviral do óleo essencial de manjeriço e monoterpenos frente ao vírus da diarreia viral bovina após o pré tratamento das células com estes. As células foram incubadas com as CMNTs dos compostos antes da infecção viral. O número de placas de vírus foi determinado 3 dias após a infecção e comparado com o controle de células não tratadas. Os resultados foram expressos como a porcentagem de redução de placas. Esses experimentos foram repetidos independentemente e os dados apresentados como a média de três experimentos.

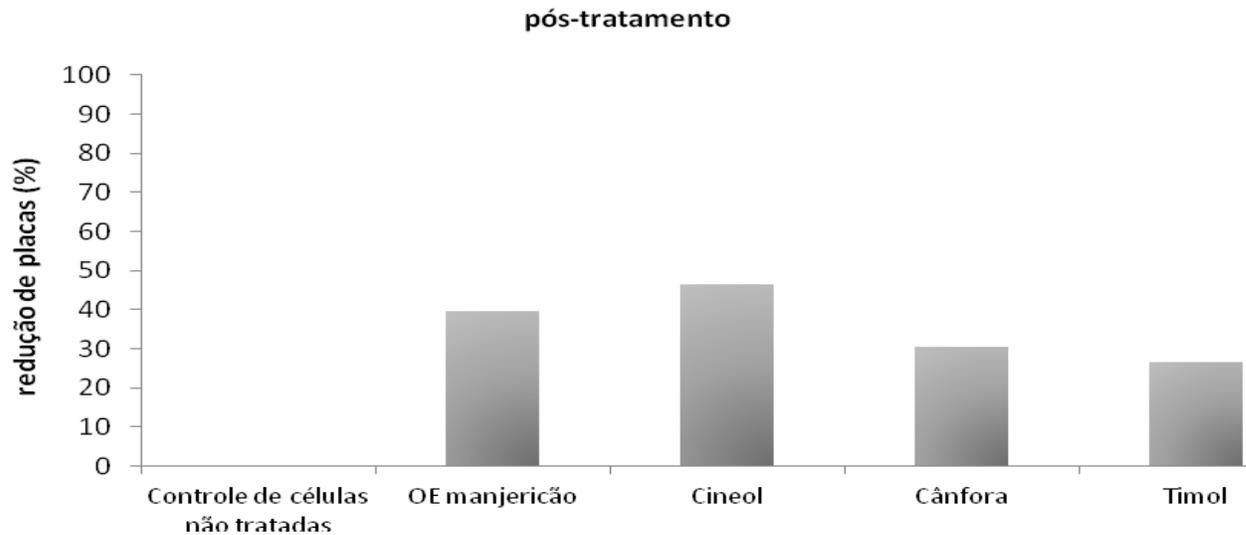


Figura 3- Atividade antiviral do óleo essencial de manjeriço e monoterpenos frente ao vírus da diarreia viral bovina durante a replicação intracelular do vírus. CMNTs dos compostos foram adicionadas às células infectadas após a penetração do vírus e mantidas por 3 dias. O número de placas de vírus foi determinado 3 dias após a infecção e comparado com o controle de células não tratadas. Os resultados foram expressos como a porcentagem de redução de placas. Esses experimentos foram repetidos independentemente e os dados apresentados como a média de três experimentos.

5 CAPÍTULO 2

Atividade antiviral *in vitro* de plantas condimentares contra o calicivírus felino (FCV)

Atividade antiviral *in vitro* de plantas condimentares contra o calicivírus felino (FCV)

Antiviral activity of plants used as condiments against the feline calicivirus (FCV)

Thaís Felli Kubiça; Sydney Hartz Alves; Rudi Weiblen; Andréia Henzel; Mathias Martins;
Luciane Teresinha Lovato

RESUMO

O calicivírus felino (FCV) é um importante patógeno de gatos que causa lesões ulcerativas orais e infecções respiratórias. Devido à sua facilidade de replicação em cultivo celular, além de similaridades genômicas, bioquímicas e biofísicas com os norovírus (NoVs), o FCV tem sido utilizado como modelo experimental para avaliação de agente antivirais contra estes vírus. Nesse estudo, investigou-se a ação dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Lippia graveolens* HBK (orégano mexicano) e *Thymus vulgaris* L. (tomilho) frente ao FCV, *in vitro*. A toxicidade celular foi testada pelo método de MTT ([3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium]) e os ensaios antivirais foram realizados pelo teste de redução de placas. Em ambos os casos foram usadas células CRFK (*Crandell Reese feline kidney cells*). Os óleos foram: a) incubados com vírus por 1 hora antes da inoculação nas células, b) adicionados às células antes da inoculação viral por 1 hora a 37°C, ou c) adicionados às células depois da inoculação e adsorção viral até a leitura em 18 horas. A concentração citotóxica a 50% (CC₅₀) para os óleos de alecrim, orégano mexicano e tomilho foram: 1300,21µg/ml; 435,92µg/ml e 675,34µg/ml; respectivamente. O óleo essencial de tomilho mostrou o melhor resultado, com índice de seletividade [IS=CC₅₀/CI₅₀ (concentração inibitória de 50%)] de 8,57 para o tratamento b. O óleo de alecrim mostrou atividade antiviral no tratamento a (IS=6,54) e c (IS=6,86). O orégano mexicano apresentou baixa atividade antiviral. Portanto, conclui-se que os óleos essenciais de tomilho e alecrim apresentaram atividade frente ao FCV em diferentes momentos da infecção viral. Por outro lado, a atuação dos óleos sobre o FCV sugere possível ação sobre os NoVs uma, uma vez que o FCV tem sido estudado como modelo para esses na ausência de um sistema de cultivo celular *in vitro*.

Palavras chave: antivirais, FCV, óleos essenciais

ABSTRACT

The feline calicivirus (FCV) is an important pathogen of feline causing oral ulcerative lesions and respiratory disease. This virus has been used as a model to evaluate antiviral compounds against norovirus due to its genomic, biochemistry and biophysical similarities, and also because it is easily cultivated in cell cultures. In this study, the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary), *Lippia graveolens* HBK (mexican oregano) and *Thymus vulgaris* L. (thyme) were examined for their activity towards FCV, *in vitro*. The cytotoxicity was determined by the MTT test ([3-(4,5-dimethylazol-2-yl)-2,5-dimethylthiazolium]) and the antiviral assay were performed by the plaque reduction test. In both cases the CRFK cells (*Crandell Reese feline kidney cells*) were used. The oils were added: a) with the virus for 1 hour before the inoculation on cells, b) to the cells for 1 hour at 37°C, or c) to the cells after virus inoculation and maintained there for 18 hours until the test reading. The cytotoxic concentration at 50% (CC₅₀) for the essential oils of rosemary, mexican oregano, and thyme were: 1300.21 µg/ml; 435.92 µg/ml and 675.34 µg/ml; respectively. The essential oil of thyme showed the best results, with selectivity index (IS=CC₅₀/CI₅₀) of 8.57 for the treatment b. The essential oil of rosemary showed antiviral activity in the treatment a (IS=6.54) and c (IS=6.86). The mexican oregano had low antiviral activity. In conclusion, the essential oils of thyme and rosemary showed antiviral activity against FCV in different times of infection. The essential oils activity on FCV suggest a possible action of the same oils on to the norovirus due to the viruses similarities.

Key words: antiviral, FCV, essential oils

1 INTRODUÇÃO

O calicivírus felino (FCV), pertencente ao gênero *Vesivirus* da família *Caliciviridae*, é um importante patógeno de gatos que encontra-se amplamente distribuído na população felina (RADFORD et al., 2007). O FCV caracteriza-se por ser um vírus não envelopado, de diâmetro de 35-40nm, com um genoma constituído por uma cadeia simples de RNA de 7,7Kb de sentido positivo (MURPHY et al., 2009), o que lhe confere altas taxas de mutações durante a replicação viral (RADFORD et al., 2009). Esse agente, além de ser muito resistente no meio ambiente e facilmente transmitido, é responsável por causar uma das mais importantes doenças respiratórias em gatos, apresentando rinite, traqueobronquite, pneumonia, vesículas no epitélio oral e conjuntivite como suas principais manifestações clínicas (RADFORD et al., 2007). A família *Caliciviridae* também inclui os Norovírus e Sapovírus que são os agentes da gastroenterite infecciosa em humanos; e os Lagovírus, os responsáveis pela doença hemorrágica em coelhos (GREEN et al., 2000; RADFORD et al., 2007).

Vacinas vivas e inativadas estão disponíveis para aplicação em gatos domésticos, no entanto, embora muitas vezes a gravidade da doença seja reduzida por essas, a vacinação não é capaz de proteger frente à infecção, o que leva os animais a desenvolverem o estado de portadores (RADFORD et al., 2007). Somando-se a isso, estudos revelam que as vacinas disponíveis, além de não protegerem contra todos os isolados (DAWSON et al., 1993), não previnem a forma virulenta sistêmica associada a FCV, pois surtos foram relatados em animais vacinados (HURLEY et al., 2003). Apesar de alguns antivirais apresentarem eficácia contra o FCV em cultura de células, seu uso na prática clínica fica impossibilitado devido à alta toxicidade exibida por esses

(POVEY, 1978). Dessa forma, o tratamento de gatos infectados é realizado de forma sintomática (RADFORD et al., 2007).

Além de sua importância clínica, o FCV tem merecido destaque no estudo dos norovírus, uma vez que, na ausência de um sistema de cultura de células para a propagação desses, o FCV tem sido utilizado como um possível modelo experimental (ESCOBAR-HERRERA et al., 2007). Além de replicar-se eficientemente *in vitro*, o FCV também compartilha algumas propriedades biológicas com os calicivírus humanos, o que permite a sua utilização para o estudo de estratégias gerais de replicação (ESCOBAR-HERRERA et al., 2007).

Os norovírus apresentam características estruturais similares aos calicivírus e o tamanho aproximado do genoma de 7.7 kb (GREEN et al., 2000). O norovírus humano foi identificado pela primeira vez em um surto de diarreia em uma escola elementar em Norwalk, Ohio, Estados Unidos em 1968 (ADDLER & ZICKL, 1969). A infecção de humanos por norovírus induz sintomas de vômito severo, diarreia aquosa, náusea, cólicas abdominais, febre e mal-estar geral (HUTSON et al., 2004). Em alguns estudos epidemiológicos na Europa e Austrália o norovírus foi reconhecido como a causa de quase todos os surtos (>96%) de diarreia não-bacteriana ocorridos (MEAD et al., 1999). O norovírus já foi detectado também em outros países da Ásia e da América, incluindo o Brasil (MIAGOSTOVICH et al., 2004). Devido à inexistência de antivirais contra os norovírus, o tratamento é realizado sintomaticamente.

Extratos e óleos essenciais das plantas *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Lippia graveolens* (orégano mexicano) e *Thymus vulgaris* (tomilho) já foram testados para sua atividade antiviral frente a alguns vírus (NOLKEMPER et al., 2006; SCHNITZLER et al., 2007; KOCH et al., 2008; PILAU et al., 2011). Estas plantas são comumente utilizadas

como condimentos na culinária e também na medicina popular. O óleo essencial de *Lippia graveolens* (orégano mexicano) apresentou atividade antiviral frente a diversos vírus RNA e DNA com eficiência variável entre eles (PILAU et al., 2011). Além disso, extratos aquosos de *Rosmarinus officinalis* e *Thymus vulgaris* inibiram a multiplicação do HSV-1 sensível e resistente ao aciclovir e HSV-2 quando incubados com os vírus antes da inoculação em células em um ensaio virucida (NOLKEMPER et al., 2006). Diante das considerações feitas acima, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antiviral dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Lippia graveolens* (orégano mexicano) e *Thymus vulgaris* (tomilho) frente ao FCV, *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Thymus vulgaris* (tomilho) foram comprados de Essential 7 (Roswell, New Mexico, USA); já o óleo essencial de *Lippia graveolens* (orégano mexicano) foi adquirido da Agroindustrial Don Pablo (Chihuahua, México). As análises qualitativas e semiquantitativas dos principais constituintes químicos dos óleos essenciais foram realizadas através das técnicas de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), as quais forneceram os espectros de massa da maioria dos componentes dos óleos essenciais, conforme mencionado no trabalho de Pozzatti e colaboradores (2008).

Para os ensaios, os óleos essenciais foram inicialmente diluídos em metanol até uma concentração de $0,64\text{g ml}^{-1}$ (solução I). A partir dessa, realizou-se então uma diluição 1:100 em meio essencial mínimo (MEM), a fim de se obter uma concentração final de $6400\ \mu\text{g ml}^{-1}$ (solução II). A solução II foi utilizada como diluição de trabalho para os testes de citotoxicidade e atividade antiviral.

2.2 Cultivo celular e vírus

Células de linhagem de rim felino (*Crandell-Reese feline kidney cells* = CRFK) (CRANDELL et al., 1973) foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina, estreptomicina e anfotericina B, nas concentrações de $100\ \text{U ml}^{-1}$, 100 e $2,5\ \mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente. As culturas de células foram preparadas em placas de poliestireno rígido de 96 cavidades para os ensaios de citotoxicidade e 12 cavidades para os testes de atividade antiviral; e mantidas em estufa a 37°C contendo 5% de CO_2 . A cepa SV 65/90 do calicivírus felino (FCV) foi fornecida pelo Setor de Virologia da UFSM (HENZEL et al., no prelo). Os estoques dos vírus foram preparados e titulados de acordo com a metodologia descrita por Bidawid et al. (2003) e as alíquotas mantidas a -70°C até o momento do uso.

2.3 Ensaio de citotoxicidade

MEM acrescido de SFB e concentrações crescentes dos óleos essenciais numa faixa de 25 a $3200\ \mu\text{g/ml}$ foram adicionados à monocamada pré-formada de células CRFK, em placas de 96 poços (NUNC - Roskilde, Dinamarca), em um total de seis

repetições para cada concentração. Controles celulares e de toxicidade do metanol foram incluídos. Após 18 horas de incubação a 37°C e 5% CO₂, o meio de cultivo foi removido e a toxicidade dos óleos essenciais de alecrim, orégano mexicano e tomilho frente à células CRFK foi determinada através do ensaio colorimétrico com 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium] (MTT) (M2128, Sigma) de acordo com a metodologia descrita por Mosmann (1983) e modificada por Cueto et al. (2011). As concentrações citotóxicas dos óleos essenciais que reduziram o número de células viáveis em 50% (CC₅₀) foram estabelecidas por curvas dose-resposta. Adicionalmente, determinou-se a concentração máxima não tóxica (CMNT) para os óleos essenciais em estudo.

2.4 Ensaio Antiviral

A atividade dos óleos essenciais frente ao FCV foi detectada por ensaio de inibição de placas de acordo com a metodologia descrita por Astani et al. (2010), com algumas modificações (BIDAWID et al., 2003; ESCOBAR-HERRERA et al., 2007). Os testes foram realizados em placas de 12 poços, usando concentrações não tóxicas dos óleos essenciais, 24,9 PFU/poço (plaque forming units = unidades formadoras de placa/poço) de suspensão de vírus e carboximetilcelulose a 0.8%. Três protocolos foram aplicados: a) diferentes concentrações não tóxicas dos óleos essenciais foram incubadas com o vírus por 1 hora antes da inoculação (ensaio virucida); b) concentrações não tóxicas dos óleos essenciais foram adicionadas às células e incubadas por 1 hora a 37°C antes da adsorção viral (ensaio de pré-tratamento); c) diferentes concentrações não tóxicas dos óleos essenciais foram adicionadas às

células após a inoculação do FCV e mantidas por 18 horas até a leitura dos ensaios (ensaio de pós-tratamento).

Para os três protocolos, as células foram fixadas e coradas com formol e cristal violeta após 18 horas de incubação. Baseando-se no número de placas observado nas monocamadas de controle de vírus (culturas não tratadas), as concentrações dos óleos essenciais que inibiram o número de placas em 50% (CI_{50}) foram determinadas por curvas dose-resposta. O índice de seletividade (IS) foi obtido a partir da relação CC_{50}/CI_{50} .

A avaliação dos valores de IS fornecidos pelos ensaios antivirais seguirá a proposta estabelecida por Amoros et al. (1992), a qual estabelece que um valor de índice de seletividade (IS), ou índice terapêutico (IT), maior que quatro é o apropriado para um composto poder ser classificado com potencial atividade antiviral.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As atividades antimicrobianas e antivirais de extratos e óleos vegetais tem formado base para aplicações na conservação de alimentos crus e processados, medicina alternativa e terapias naturais (JIANG et al., 2011). Alguns óleos essenciais que são comumente usados como condimentos na culinária tem exibido um alto nível de atividade antiviral (JASSIM & NAJI, 2003), no entanto, a ação desses frente a vírus de animais, em especial o calicivírus felino (FCV), ainda não foi explorada.

Nesse estudo, avaliou-se a atividade antiviral dos óleos essenciais de alecrim, orégano mexicano e tomilho em diferentes momentos do ciclo replicativo do FCV. Os

dados obtidos com os testes de citotoxicidade e inibição viral, realizados em cultivo celular, estão apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3.

A ação tóxica exibida pelos óleos essenciais frente às células CRFK foi relativamente baixa quando comparada a outros estudos já realizados (NOLKEMPER et al., 2006; CUETO et al., 2011). Em uma avaliação de dois tipos de extratos etanólicos de própolis observou-se o elevado efeito citotóxico exibido por estas amostras ($CC_{50}=227-343\mu\text{g/ml}$) frente a diferentes tipos de cultivos celulares, dentre eles as células de rim felino (CRFK) (CUETO et al., 2011). Ainda, concentrações tóxicas dos extratos aquosos de alecrim e tomilho que reduziram a viabilidade das células RC-37 em 50% (TC_{50}) foram determinadas em torno de $60\mu\text{g/ml}$ em um estudo com diversas espécies da família *Lamiaceae* (NOLKEMPER et al., 2006). A comparação dos resultados demonstra a baixa toxicidade das amostras testadas no presente trabalho, principalmente para o óleo essencial de alecrim cuja CC_{50} foi de $1300,21\mu\text{g/ml}$ (Tabela 1).

Os óleos essenciais de orégano mexicano (Tabela 2) e tomilho (Tabela 3) apresentaram resultados de CI_{50} abaixo ou muito próximo de $100\mu\text{g/ml}$. Cos et al. (2006) recomenda valores de CI_{50} inferiores a $100\mu\text{g/ml}$ para que um produto natural seja considerado promissor frente a doenças infecciosas. No entanto, o valor preditivo mais importante para a futura aplicação desses óleos essenciais é o seu índice de seletividade (IS) (ASTANI et al., 2010), sendo que valores de IS maiores que quatro seriam apropriados para qualquer candidato a antiviral apresentar potencial de atividade antiviral, segundo Amoros et al. (1992).

De acordo com essa sugestão, todos os óleos essenciais analisados apresentaram algum nível de atividade em diferentes momentos da replicação do FCV,

sendo que o tomilho, além de apresentar uma moderada ação virucida frente ao vírus testado (IS=6,2), exibiu uma atividade antiviral mais expressiva (IS=8,57) quando as células foram pré-tratadas com esse antes da infecção (Tabela 3). Estudos realizados anteriormente com esta planta e seu principal componente, o timol; tem revelado que as atividades antimicrobianas do óleo essencial de tomilho podem ser atribuídas, em parte, à presença de alto teor desse constituinte (HELANDER et al., 1998; SARTORATTO et al., 2004; SCHNITZLER et al., 2007).

A forte ação exibida pelo *Thymus vulgaris* L. frente ao *Enterococcus faecium*, bem como a presença do timol (79,15%) como o componente principal das partes aéreas dessa planta, foi relatada em uma análise da composição e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas aromáticas utilizadas no Brasil (SARTORATTO et al., 2004). Neste caso, a ação antimicrobiana do timol poderia ser atribuída às suas características fenólicas que levaria a desequilíbrios nas atividades das membranas bacterianas (HELANDER et al., 1998). O óleo essencial de tomilho apresentou o timol como um de seus compostos majoritários com uma concentração de 21,0% (POZATTI et al., 2008), que pode ser considerada baixa se comparada àquela citada acima.

Por outro lado, Schnitzler et al. (2007) ao avaliar a susceptibilidade de isolados clínicos de herpes simplex tipo 1 resistente ao aciclovir frente a óleos essenciais, dentre eles o de tomilho; demonstraram uma significativa redução de infectividade (95,9% a 99,9%) induzida pelos óleos essenciais quando adicionados ao HSV antes da infecção (ação virucida). Além disso, em um ensaio antiviral com extratos aquosos de espécies da família *Lamiaceae* frente aos vírus herpes simplex tipos 1 e 2 demonstrou-se que o pré-tratamento desses vírus com os extratos antes da infecção inibiu significativamente

a formação de placas (>90%) e que o tomilho, que apresentou índices de seletividade maiores que 800, foi um dos mais potentes (NOLKEMPER et al., 2006).

Considerando que os óleos essenciais são uma complexa mistura de compostos com baixo peso molecular e que os componentes ativos desses podem consistir de carboidratos lipofílicos, os quais interagem com a membrana lipídica (COX et al., 2000; INOUE et al., 2004; REICHLING et al., 2006;), pode-se deduzir que essas substâncias, que são ativas frente às bactérias, podem ser capazes de exibir uma atividade similar contra envelopes virais (SCHNITZLER et al., 2007). No entanto, o FCV é um vírus não envelopado, o que constitui numa diferença estrutural em relação aos vírus citados anteriormente, fato que pode ter contribuído para a maior sensibilidade do HSV a ação antiviral dos extratos ou óleos essenciais de *Thymus vulgaris*.

Nos ensaios de pré e pós tratamento do FCV (Tabelas 1, 2 e 3), pode-se observar que o alecrim foi um dos óleos essenciais que apresentou os melhores resultados, com índices de seletividade de 6,54 e 6,86, respectivamente (Tabela 1). Em uma análise da composição química do óleo essencial de *R. officinalis* identificou-se o 1,8-cineol (26,54%) e a cânfora (12,88%), além do α -pineno (20,14%), canfeno (11,38%) e β -pineno (6,95%) como os constituintes majoritários, inferindo que a atividades antimicrobianas exibidas por essa planta podem ser atribuídas a um efeito sinérgico desses componentes (JIANG et al., 2011). Entretanto, esses componentes naturais podem apresentar variabilidade em suas proporções devido às diferenças de localização e variações sazonais, o que acaba refletindo em disparidades nas suas atividades frente a micro-organismos (CELIK TAS et al., 2007).

Celiktas et al. (2007), ao testar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos metanólicos de *Rosmarinus officinalis* coletados de três regiões distintas da

Turquia em quatro diferentes intervalos de tempos durante o ano, observou que os óleos obtidos das regiões de Canakkale e Izmir, nas quais foi quantificada uma maior concentração de cânfora (9,9%-24,1%) em relação à região de Mersin (5,8-12,6%), apresentaram uma melhor atividade frente aos micro-organismos testados. Embora o 1,8- estivesse presente em elevada concentração nas amostras da região de Mersin (50-60%), sugeriu-se que os altos valores de MIC (concentração inibitória mínima) e MBC (concentração bactericida mínima) pudessem estar relacionados, além da ausência do composto verbenona, à baixa concentração de cânfora.

A cânfora (28,59%) e o 1,8-cineol (26,31%) foram os compostos detectados em maior concentração na amostra do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* utilizado para a realização do presente trabalho (POZATTI et al., 2008). A concentração de cada um destes compostos equivale ou apresenta-se superior às concentrações descritas acima (CELIK TAS et al., 2007, JIANG et al., 2011). É interessante ressaltar aqui também que estes dois compostos apresentaram alta atividade antiviral quando testados isoladamente frente ao BVDV (Capítulo 1 desta dissertação). Então, é possível que a ação antiviral exibida pelo óleo essencial de alecrim (Tabela 1) se deve à presença destes constituintes majoritários.

Dentre os óleos analisados, o orégano mexicano foi o que apresentou os piores valores de índice de seletividade ($IS < 6$) (Tabela 2). Ensaio de avaliação da ação do óleo essencial de orégano mexicano frente a diferentes vírus humanos e animais mostraram uma maior atividade exibida por esse frente aos vírus envelopados (PILAU et al., 2011). Os herpesvírus, vírus sincicial respiratório e vírus da diarreia viral bovina que foram inibidos por este óleo essencial possuem envelope lipídico envolvendo o nucleocapsídeo (BRUGGEMANN et al., 2006; ARNS et al., 2007; RIDPATH & FLORES,

2007). Por outro lado, o rotavírus que é um vírus não envelopado como o FCV, não apresentou sensibilidade à ação antiviral do óleo essencial de *Lippia graveolens*. Então, de acordo com os dados aqui apresentados e aqueles obtidos por Pilau et al. (2011) a presença de envelope parece ser um fator que contribui muito para a atividade antiviral do óleo essencial de *Lippia graveolens*.

O carvacrol é um dos componentes majoritários do óleo essencial de *Lippia graveolens*, mas estudos sobre a relação de sua atividade frente a micro-organismos e a presença do constituinte carvacrol em concentração majoritária tem produzido resultados díspares. Um estudo comparativo da atividade antimicrobiana de duas amostras de *Lippia graveolens* da Guatemala demonstrou que o óleo essencial proveniente da amostra em que o principal componente quantificado foi o carvacrol, foi mais eficaz do que a amostra com maior concentração de timol (SALGUEIRO et al., 2003). Em outra situação, testes antivirais realizados com carvacrol isoladamente apresentaram atividade antiviral muito abaixo daquela apresentada pelo óleo essencial de *Lippia graveolens* frente a alguns vírus envelopados, enquanto este constituinte apresentou alta atividade antiviral frente ao rotavírus, que não possui envelope (PILAU et al., 2011).

Baseados na discussão apresentada, a moderada atividade anti-FCV exibida pelos óleos essenciais aqui estudados, bem como a baixíssima toxicidade expressada por esses e a facilidade de obtenção destes óleos são potenciais que devem ser levados em consideração. Principalmente se considerarmos as altas taxas de mutações do FCV, sua elevada resistência no meio ambiente, a questionável eficácia das vacinas atualmente disponíveis e a inexistência de um tratamento específico para esse vírus (RADFORD et al., 2007).

Em adição, a ação virucida exibida pelos óleos do presente estudo sobre o FCV sugere uma possível atividade sobre os norovírus humanos, uma vez que o FCV tem sido estudado como modelo experimental para a avaliação de compostos com eficácia frente aos NoVs (STEINMANN et al., 2004; GEHRKE et al., 2004). Além do mais, o norovírus é transmitido pela via fecal-oral, principalmente através da ingestão de alimentos contaminados, contato com gotículas de vômito ou superfícies contaminadas (FRANKHAUSER et al., 2002). Compostos naturais com atividade antimicrobiana que possam ser adicionados a alimentos estão em constante demanda (SU et al. 2010). Então, mesmo apresentando moderada atividade antiviral sobre o FCV; a possível atividade antiviral contra o norovírus, baixa toxicidade e facilidade de obtenção como é o caso dos óleos essenciais aqui estudados justificam estudos mais detalhados destes óleos e de seus componentes majoritários.

4 CONCLUSÕES

Os óleos essenciais testados neste artigo, em especial o de tomilho e de alecrim, demonstraram atividade antiviral frente ao FCV em diferentes momentos da replicação, evidenciando seu potencial, tanto para o desenvolvimento de novos compostos naturais para o tratamento de doenças de animais de estimação quanto para o controle da transmissão dos NoVs humanos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, J.L.; ZICKL, R. Winter vomiting disease. **J Infect Dis.**, v.119, n.6, p.668-673, 1969.

AMOROS, M. et al. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal Nat Prod.** v.55, n.12, p.1732-40, dec. 1992.

ARNS, C.W. et al. *Paramyxoviridae*. In: FLORES, E.F. (Org.). **Virologia veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2007. p.659-686.

ASTANI, A. et al. Comparative Study on the Antiviral Activity of Selected Monoterpenes Derived from Essential Oils. **Phyther. Res.** v.24, p. 673–679, 2010.

BIDAWID, S. et al. A feline kidney cell line-based plaque assay for feline calicivirus, a surrogate for Norwalk virus. **Journal of Virological Methods.** v.107, p.163-167, 2003.

BRUGGEMANN, R. et al. Antiviral activity og *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinem extract against human and bovine herpesviruses in cell culture. **Brazilian Journal of Microbiology.** v.37, p.561-565, 2006.

CELIK TAS, O.Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry.** v.100, p.553-559, 2007.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept' **Journal of Ethnopharmacology.** v.106, n.3, p.290-302, 2006.

COX, S.D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **J. Appl. Microbiol.** v.88, p.170–175, 2000.

CRANDELL, R.A. Feline viral rhinotracheitis (FVR). **Advances in Veterinary Science & Comparative Medicine.** v. 17, p. 201-224, 1973.

CUETO, A.P., ALVES, S.H., PILAU, M., WEIBLEN, R., KUBIÇA, T.F., LOVATO, L.T. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. **Ciência Rural**. v.41, n.10, p.1800-1806, out. 2011.

DAWSON, S. et al. Typing of feline calicivirus isolates from different clinical groups by virus neutralisation tests. **The Veterinary Record**. v. 133, p. 13-17, 1993.

DEZENGRINI, R. **Soroprevalência de infecções víricas em cães de Santa Maria, RS; e seleção e caracterização de linhagens celulares resistentes ao vírus da diarreia viral bovina**. 2006. 63f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

ESCOBAR-HERRERA, J. et al. A carboxymethyl-cellulose plaque assay for feline calicivirus. **Journal of Virological Methods**. v.146, p.393-396, 2007.

FANKHAUSER, R.L. et al. Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. **Journal of Infectious Diseases**. v.186, p.1-7, 2002.

GEHRKE, C.; STEINMANN, J.; GORONCY-BERMES, P. Inactivation of feline calicivirus, a surrogate of norovirus (formerly Norwalk-like viruses), by different types of alcohol in vitro and in vivo. **J Hosp Infect**. v.56, n.1, p.49-55, 2004.

GREEN, K.Y. et al. Taxonomy of the caliciviruses, **J. Infect. Dis**. v.181, p.S322–S330, 2000.

HELANDER, I.M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **J. Agric. Food Chem**. v.46, p.3590-3595, 1998.

HENZEL, A. et al. 2012. Isolation and identification of feline calicivirus and feline herpesvirus in Southern Brazil. **Braz. J. Microbiol**. No prelo.

HURLEY, K.F.; SYKES, J.E. Update on feline calicivirus: new trends. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.33, p.759-772, 2003.

HUTSON, A.M.; ATMAR, R.L.; ESTES, M.K. Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. **Trends Microbiol.**, v.12, n.6, p.279-287, 2004.

INOUE, Y. et al. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 237, p.325–331, 2004.

JASSIM, S.A.; NAJI, M.A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **J Appl-Microbiol.**, v.95, n.3, p.412-427, 2003.

JIANG, Y. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology.** v.32, p.63-68, 2011.

KOCH, C. et al. Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. **Phytomedicine.** v.15, p.71-78, 2008.

MEAD, P.S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerg Infect Dis.**,v.5, n.5, p.607-625, 1999.

MIAGOSTOVICH, M.P. et al. Molecular detection of foodborne norovirus outbreak, Brasília, Federal District, Brazil. In: XV Encontro Nacional de Virologia, 2004, São Pedro, SP. **Vírus reviews & research.** Rio de Janeiro: Imprinta Express Ltda, 2004. 276p. p 95.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.** v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

MURPHY, F.A. et al. **Veterinary virology.** San Diego: Academic Press, 1999. 629p.

NOLKEMPER, S. et al. Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against Herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. **Planta Med,** v.72, n.15, p.1378-82, dec. 2006.

PILAU, M. R. et al. Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. **Brazilian Journal of Microbiology.** vol.42, n.4, p. 1616-1624, 2011.

POZZATTI, P. et al. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. **Can J Microbiol**, v.54, n.11, p.950-956, nov. 2008.

POVEY R.C. Effect of orally administered ribavirin on experimental feline calicivirus infection in cats, **Am. J. Vet. Res.** v.39, p.1337–1341, 1978.

RADFORD, A.D. et al. Feline Calicivirus. **Vet Res**, v.38, n.2, p.319-35, feb 13. 2007.

REICHLING, J. et al. Virucidal activity of a beta-triketone-rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture. **Planta Med**, v.71, p.1123–1127, 2005.

RIDPATH, J.F.; FLORES, E. F. *Flaviviridae*. In: FLORES, E.F. (Org.) **Virologia veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2007. p.565-590

SALGUEIRO, L.R. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. **Planta Med**, v.69, n.1, p.80-83 jan. 2003.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used Brazil **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.275-280, 2004

SCHNITZLER, P.; KOCH, C.; REICHLING, J. Susceptibility of Drug-Resistant Clinical Herpes Simplex Virus Type 1 Strains to Essential Oils of Ginger, Thyme, Hyssop and Sandalwood. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p.1859-1862, may. 2007.

STEINMANN J. Surrogate viruses for testing virucidal efficacy of chemical disinfectants. **J Hosp Infect.**, v.56, Suppl 2, p.S49-54, 2004.

SU, S.; HOWELL, A.B.; D`SOUZA, D.H. Antiviral effects of cranberry juice and cranberry proanthocyanidins on foodborn viral surrogates – A time dependence study in vitro, **Food Microbiology**, v.27,p.985-991, 2010.

SUPPAKUL, P et al. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packing. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.51, p.3197-3207, 2003.

Tabela 1 - Citotoxicidade e antiviral do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) frente ao calicivírus felino (FCV).

Óleo essencial de alecrim	CC₅₀^a ± DP^b	CI₅₀^c ± DP	IS^d
Tratamento A ^e	1300,21 ± 8,39	198,72 ± 4,43	6,54
Tratamento B ^f	1300,21 ± 8,39	s/ativ.	-
Tratamento C ^g	1300,21 ± 8,39	189,51 ± 3,15	6,86

^a Concentração citotóxica (µg/ml) para 50% do cultivo celular.

^b Desvio padrão.

^c Concentração inibitória (µg/ml) para 50%

^d Índice de seletividade (=CC₅₀/CI₅₀).

^e O vírus foi incubado com diferentes concentrações não tóxicas do óleo essencial de alecrim antes da inoculação nas células (ensaio virucida).

^f As células foram pré-tratadas com o óleo essencial de alecrim antes da infecção viral (pré-tratamento).

^g O óleo essencial de alecrim foi adicionado somente após a adsorção viral (pós-tratamento).

Tabela 2 - Citotoxicidade e antiviral do óleo essencial de *Lippia Graveolens* (orégano mexicano) frente ao calicivírus felino (FCV).

Óleo essencial de orégano mexicano	CC₅₀^a ± DP^b	CI₅₀^c ± DP	IS^d
Tratamento A ^e	435,92 ± 6,42	75,83 ± 2,22	5,75
Tratamento B ^f	435,92 ± 6,42	s/ativ.	-
Tratamento C ^g	435,92 ± 6,42	77,97 ± 2,98	5,6

^a Concentração citotóxica (µg/ml) para 50% do cultivo celular.

^b Desvio padrão.

^c Concentração inibitória (µg/ml) para 50%

^d Índice de seletividade (=CC₅₀/CI₅₀).

^e O vírus foi incubado com diferentes concentrações não tóxicas do óleo essencial de alecrim antes da inoculação nas células (ensaio virucida).

^f As células foram pré-tratadas com o óleo essencial de alecrim antes da infecção viral (pré-tratamento).

^g O óleo essencial de alecrim foi adicionado somente após a adsorção viral (pós-tratamento).

Tabela 3 - Citotoxicidade e antiviral do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho) frente ao calicivírus felino (FCV).

Óleo essencial de tomilho	CC ₅₀ ^a ± DP ^b	CI ₅₀ ^c ± DP	IS ^d
Tratamento A ^e	675,34 ± 7,63	108,87 ± 4,39	6,20
Tratamento B ^f	675,34 ± 7,63	78,81 ± 3,27	8,57
Tratamento C ^g	675,34 ± 7,63	s/ativ.	-

^a Concentração citotóxica (µg/ml) para 50% do cultivo celular.

^b Desvio padrão.

^c Concentração inibitória (µg/ml) para 50%

^d Índice de seletividade (=CC₅₀/CI₅₀).

^e O vírus foi incubado com diferentes concentrações não tóxicas do óleo essencial de alecrim antes da inoculação nas células (ensaio virucida).

^f As células foram pré-tratadas com o óleo essencial de alecrim antes da infecção viral (pré-tratamento).

^g O óleo essencial de alecrim foi adicionado somente após a adsorção viral (pós-tratamento).

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

No geral, óleos essenciais e os compostos em estudo exibiram uma baixa toxicidade frente aos cultivos celulares testados.

Os óleos essenciais e compostos testados nesse estudo apresentaram atividade antiviral frente ao BVDV e FCV.

Dentre os monoterpenos testados para o BVDV, a cânfora foi o composto que apresentou o maior índice de seletividade.

A atividade antiviral frente ao BVDV foi observada quando o vírus foi incubado com os compostos antes da infecção (ensaio virucida).

Apesar do óleo essencial de manjerição ter exibido uma elevada porcentagem de inibição, seu índice de seletividade não foi satisfatório.

Em relação aos óleos essenciais testados para o FCV, o tomilho seguido do alecrim foram os óleos que mostraram os melhores resultados.

Os óleos essenciais de tomilho e alecrim apresentaram atividade frente ao FCV em diferentes momentos da infecção viral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASTANI, A. et al. Comparative Study on the Antiviral Activity of Selected Monoterpenes Derived from Essential Oils. **Phytother. Res.** v.24, p. 673–679, 2010.

BAGINSKI, S.G. et al. Mechanism of action of a pestivirus antiviral compound. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.97, n.14, p.7981-7986, 5 jul. 2000.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology.** v.46, p. 446-475, 2008.

BARICEVIC, D.; BARTOL, T. The biological/pharmacological activity of the *Origanum* genus. **Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles**, v. 25, p.177-213, 2002.

BINNS, S.H. et al. A study of feline upper respiratory tract disease with reference to prevalence and risk factors for infection with feline calicivirus and feline herpesvirus. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.2, p.123-133, 2000.

BHATTACHARYYA, R. et al. *Phyllanthus amarus* clone with significant activity against bovine diarrhoea virus - a surrogate model of Hepatitis C virus. **Current Science**, v.84, n.4, p.529-533, 2003.

BITSCH, V.; RONSHOLT, L. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.**, v.11, p. 627–640, 1995.

BUCKWOLD, V. E. et al. Bovine viral diarrhea virus as a surrogate model of Hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents. **Antiviral research**, v.60, n.1, p.1-15, sep. 2003.

CELIK TAS, O. Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v.100, p.553-559, 2007.

DAMBOLENA, J.S. et al. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin

production by *Fusarium verticillioides*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.11, p.410-414, 2010.

DAWSON, S., et al. Typing of feline calicivirus isolates from different clinical groups by virus neutralisation tests. **The Veterinary Record**, v.133, p.13-17, 1993.

DE CLERCQ, E. Strategies in the design of antiviral drugs. **Nat Rev Drug Discov**, v.1, n.1, p.13-25, jan. 2002.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, n.22, p. 308-316, 2000.

DOULTREE, J.C. et al. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. **J Hosp Infect**, v.41, p.51-57, 1999.

DUNFORD, N.T.; VAZQUEZ, R.S. Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grow under controlled conditions. **Journal of Applied Horticulture**, v.7, n.1, p.20-22, 2005.

ESCOBAR-HERRERA, J. et al. A carboxymethyl-cellulose plaque assay for feline calicivirus. **Journal of Virological Methods**, v.146, p.393-396, 2007.

FANKHAUSER, R.I. et al. Molecular epidemiology of Norwalk like viruses in outbreaks of gastroenteritis in the United States. **J Infect Dis**, v.178, p.1571-1578, 1998.

GASKELL, C.J. Efficacy of an inactivated feline calicivirus (FCV) vaccine against challenge with United Kingdom field strains and its interaction with the FCV carrier state. **Research in Veterinary Science**, v.32, p.23-26, 1982.

GREEN, K.Y., et al. Taxonomy of the caliciviruses, **J. Infect. Dis.**, v.181, p.S322–S330, 2000.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Biodiversidade**: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O et al. (Org). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade-UFRGS/Ed. da UFSC, 2003. cap.1, p.13-28.

HELANDER, I.M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p.3590-3595, 1998.

HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p.1027–1031, 2002.

HOUE, H. Economic impact of BVDV infection in dairies. **Biologicals** v.31, p.137-143, 2003.

HURLEY, K.F.; SYKES, J.E. Update on feline calicivirus: new trends. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, p. 759-772, 2003.

HUSSAIN, A.I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**. v.108, p.986-995, 2008.

JASSIM, S.A.; NAJI, M.A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **J Appl-Microbiol.**, v.95, n.3, p.412-427, 2003.

JIANG, Y. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v.32, p.63-68, 2011.

KOCH, C. et al. Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. **Phytomedicine**. v.15, p.71-78, 2008.

LAGES, S.L.S.; RAMAKRISHNAN, M.A.; GOYAL, S.M. In-vivo efficacy of hand sanitisers against feline calicivirus: a surrogate for norovirus. **Journal of Hospital Infection**, v.68, p.159-163, 2008.

LAURITZEN, C.G. et al. The evolving role of springs in craniofacial surgery: the first 100 clinical cases. **Plast Reconstr Surg**, v.121, n.2, p.545-554, 2008.

LEE, S.J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry** v.91, p.131-137. 2005.

LIANG, T.J. et al. Pathogenesis, natural history, treatment, & prevention of hepatitis C. **Ann Intern Med.**, v.132, n.4, p.296-305, 2000.

LINDSAY, K.L., **Hepatology**, v.26, p.71S-77S, 1997.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Flaviviridae: the viruses and their replication. In KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B. (Ed.) *Fields virology*, 4th ed., vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa, 2001. p.991–1041.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2002. 512p.

MAIN, J.; McCARRON, B.; THOMAS, H.C. Antiviral Chem. **Chemother.**, v.9, p.449-460, 1998.

MALIK et al., 2006. Comparative efficacy of ethanol and isopropanol against feline calicivirus, a norovirus surrogate. **Am J Infect Control**, v.34,n.1, Feb, p.31-5. 2006.

NOLKEMPER, S. et al. Antiviral Effect of Aqueous Extracts from Species of the Lamiaceae Family against *Herpes simplex* Virus Type 1 and Type 2 *in vitro*. **Planta Med.**, v.72, p.1378-1382, 2006.

PASCUAL, M.E. et al. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**. v.76, p.201-214, 2001.

PILAU, M. R. et al. Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. *Brazilian Journal of Microbiology*. vol.42, n.4, p. 1616-1624, 2011.

PINO, J.A. et al. Analysis of the essential oil of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Hbk). **Nahrung**, v.33, p.289-295, 1989.

POVEY, R.C., Effect of orally administered ribavirin on experimental feline calicivirus infection in cats, **Am. J. Vet. Res**, v.39, p.1337–1341, 1978.

POZZATTI, P. et al. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. **Can J Microbiol**, v.54, n.11, p.950-956, nov. 2008.

RADFORD, A.D. et al. Feline Calicivirus. **Vet Res**, v.38, n.2, p.319-35, feb 13. 2007.

RIDPATH, J.F.; FLORES, E.F. **Flaviviridae**. In: FLORES, E. (Ed.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2007. p.565-590.

RICE, C. M. **Flaviviridae**: the viruses and their replication. In: **Virology** (Eds.) FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. Lippincott: Philadelphia, p.931–959, 1996.

SALGUEIRO, L.R. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. **Planta Med**, v.69, n.1, p.80-83, jan, 2003.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used Brazil **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.275-280, 2004.

SCHNITZLER, P.; KOCH, C.; REICHLING, J. Susceptibility of Drug-Resistant Clinical Herpes Simplex Virus Type 1 Strains to Essential Oils of Ginger, Thyme, Hyssop and Sandalwood. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p.1859-1862, may, 2007.

SIANI, A. C. et al. Óleos Essenciais. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 76, p. 38-43, 2000.

SIEBENGA, J.J. et al. Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 Variants 2001e2007. **Journal of Infectious Diseases**, v.200, p.802 e 812, 2009.

STUYVER, L.J. et al. Ribonucleoside Analogue That Blocks Replication of Bovine Viral Diarrhea and Hepatitis C Viruses in Culture. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. p.244-254, jan., 2003.

SU, S.; HOWELL, A.B.; D`SOUZA, D.H. Antiviral effects of cranberry juice and cranberry proanthocyanidins on foodborn viral surrogates – A time dependence study in vitro, **Food Microbiology**, v.27, p.985-991, 2010.

SUPPAKUL, P et al. Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packing. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.51, p.3197-3207, 2003.

TAIRA, O. et al. Expression of feline interferon-alpha subtypes in *Escherichia coli*, and their antiviral activity and animal species specificity, **J. Vet. Med. Sci**, v.67, p.543–545, 2005.

THIEL, H.J.; PLAGEMANN, P.G.W.; MOENNIG, V. Pestiviruses. In: **Virology** (Ed.) FIELDS, B.N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. Lippincott: Philadelphia, 1996. p. 1059–1073.

WAGNER, E.K.; HEWLETT, M.J. **Basic Virology**. Malden, MA, USA: Blackwell Science. 1999

WANNISSORN, B. et al. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia*, v.76, p.233-236, 2005.

WHITBY, K. et al. Action of celgosivir (6)-butanoyl castanospermine) against the pestivirus BVBV: implications for the treatment of hepatitis C. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**. v.15, p.141-151, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **Hepatitis C. Fact Sheet Number 164**, 2000.

YANAGIDA, K. et al. Inhibition of bovine viral diarrhea virus (BVDV) by mizoribine: synergistic effect of combination with interferon-alpha. **Antiviral Research**. v.64, n.3, p.195-201, dec. 2004.

ZHANG, N. et al. Inhibition of bovine viral diarrhea virus in vitro by xanthohumol: Comparisons with ribavirin and interferon- α and implications for the development of anti-hepatitis C virus agents. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 38, p.332-340, 2009.

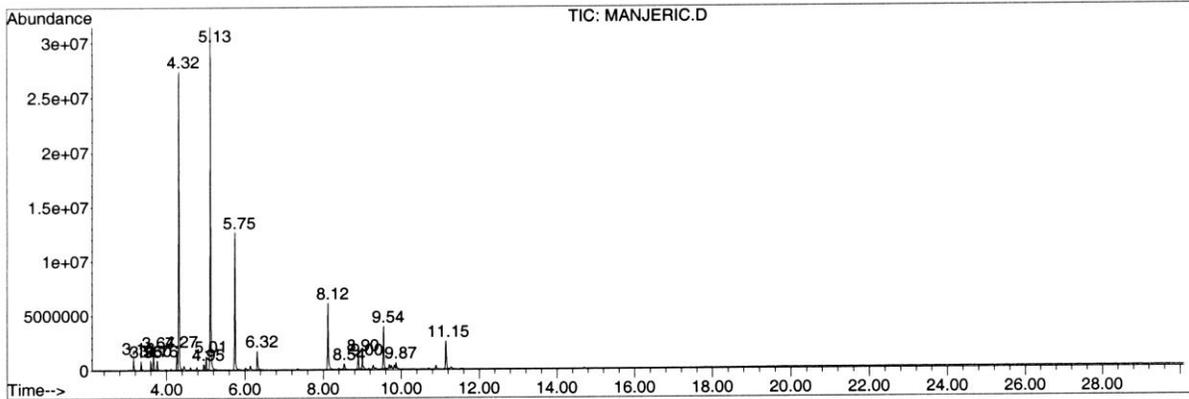
8 ANEXOS

8.1 Anexo 1 – Cromatogramas dos óleos essenciais

8.1.1 – Cromatograma do óleo essencial de *Ocimum basilicum* (manjeriço)

Area Percent Report -- Sorted by Signal

Information from Data File:
 File : D:\HPCHEM\1\DATA\GERAL\MANJERIC.D
 Operator : T.G.SCHWANZ
 Acquired : 29 Aug 2006 11:28 pm using AcqMethod GERAL
 Sample Name: MANJERIC
 Misc Info :
 Vial Number: 10
 CurrentMeth: D:\HPCHEM\1\METHODS\GERAL.M

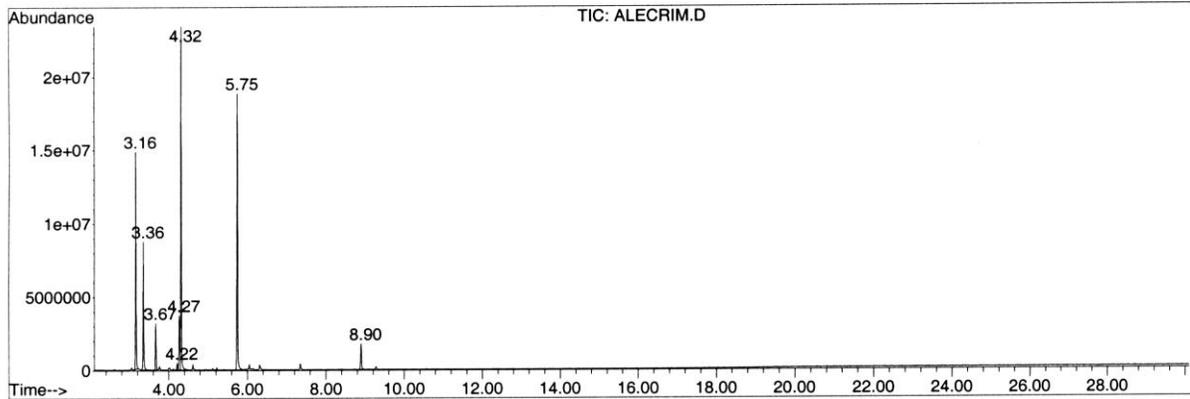


Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
3.160	14330994	1.131	3.623
3.354	11569113	0.913	2.925
3.599	11548071	0.911	2.920
3.669	22634798	1.787	5.722
3.765	12515900	0.988	3.164
4.270	22957015	1.812	5.804
4.320	299111275	23.609	75.619
4.954	7389836	0.583	1.868
5.014	17176741	1.356	4.343
5.129	395549264	31.221	100.000
5.750	162203582	12.803	41.007
6.317	26711411	2.108	6.753
8.122	102360642	8.079	25.878
8.539	10691405	0.844	2.703
8.896	21202082	1.673	5.360
9.003	17151494	1.354	4.336
9.545	61263974	4.836	15.488
9.866	6050459	0.478	1.530
11.146	44528943	3.515	11.257

8.1.2 – Cromatograma do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim)

Area Percent Report -- Sorted by Signal

Information from Data File:
 File : D:\HPCHEM\1\DATA\GERAL\ALECRIM.D
 Operator : T.G.SCHWANZ
 Acquired : 29 Aug 2006 9:42 pm using AcqMethod GERAL
 Sample Name: ALECRIM
 Misc Info :
 Vial Number: 8
 CurrentMeth: D:\HPCHEM\1\METHODS\GERAL.M



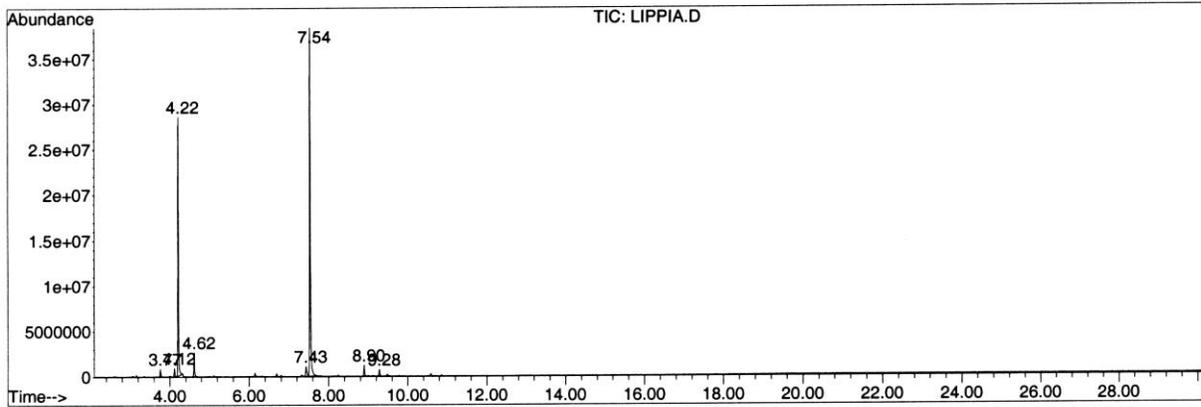
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
3.163	183651393	19.814	69.308
3.355	109021776	11.762	41.144
3.670	40234983	4.341	15.184
4.216	6696750	0.722	2.527
4.271	50129022	5.408	18.918
4.320	264976909	28.588	100.000
5.751	243859245	26.309	92.030
8.897	28319813	3.055	10.688

8.1.3 – Cromatograma do óleo essencial de *Lippia graveolens* (orégano mexicano)

Area Percent Report -- Sorted by Signal

Information from Data File:

File : D:\HPCHEM\1\DATA\GERAL\LIPPIA.D
 Operator : T.G.SCHWANZ
 Acquired : 29 Aug 2006 8:32 pm using AcqMethod GERAL
 Sample Name: LIPPIA
 Misc Info :
 Vial Number: 6
 CurrentMeth: D:\HPCHEM\1\METHODS\GERAL.M



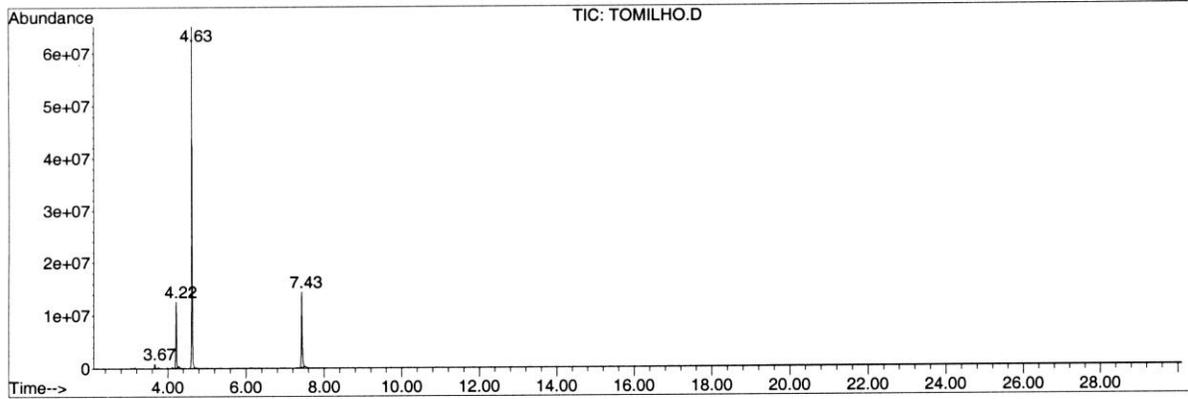
Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
3.766	11432164	1.102	1.942
4.120	12717163	1.226	2.160
4.220	333930111	32.200	56.711
4.620	37411723	3.607	6.354
7.431	22484384	2.168	3.819
7.540	588823976	56.778	100.000
8.897	18737670	1.807	3.182
9.281	11518857	1.111	1.956

8.1.4 – Cromatograma do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (tomilho)

Area Percent Report -- Sorted by Signal

Information from Data File:

File : D:\HPCHEM\1\DATA\GERAL\TOMILHO.D
 Operator : T.G.SCHWANZ
 Acquired : 29 Aug 2006 10:17 pm using AcqMethod GERAL
 Sample Name: TOMILHO
 Misc Info :
 Vial Number: 9
 CurrentMeth: D:\HPCHEM\1\METHODS\GERAL.M



Retention Time	Area	Area %	Ratio %
Total Ion Chromatogram			
3.670	11836842	1.038	1.624
4.217	159340550	13.979	21.858
4.627	728990732	63.953	100.000
7.430	239724160	21.030	32.884

8.2 Anexo 2 – Certificados de análise dos componentes majoritários

8.2.1 – Certificado de análise da cânfora

printacros

Página 1 de 1



Certificate of Analysis

Product 22784
D(+)-Camphor, 97%

D(+)-Camphor, 97%, 100GR

 COB. AC227841000 FAB. 27/08/07
 LOTE A0245003001 VAL. 04/05/17

General Product Data

Version	0
CAS No	464-49-3
Molecular weight	152.24
Molecular formula	C ₁₀ H ₁₆ O
Linear formula	
Flash point (°C)	64

Lot Specific Data
A0245003001

Appearance	WHITE CRYSTALS
Infrared spectrometry	AUTHENTIC
Melting point	176.8°C
Separat. techn. GC	99.06 %
Specific optical rotation	+41° (20°C, 589 nm) (c=10, alcohol)
Retest date	04-05-17

Issued: 12-06-08

A. Vanneste Quality Control Manager

Acros Organics

 Geel West Zone 2, Janssen Pharmaceuticaaan 3a, B-2440 Geel, Belgium
 Tel +32 14/57.52.11 - Fax +32 14/59.34.34 Internet: <http://www.acros.com>
 1 Reagent Lane, Fair Lawn, NJ 07410, USA
 Fax 201-796-1329

8.2.2 – Certificado de análise do 1,8-cineol

printacros

Página 1 de 1



Certificate of Analysis

Product 11034
Cineole,99%

Cineole, 99%, 100GR

COD. AC110341000 FAB. 09/04/08
 LOTE A0258118001 VAL. 02/04/11

General Product Data

Version	0
CAS No	470-82-6
Molecular weight	154.25
Molecular formula	C10 H18 O
Linear formula	
Flash point (°C)	49

Lot Specific Data**A0258118001**

Appearance	clear slightly yellow liquid
Infrared spectrometry	authentic
Separat. techn. GC	99.2 %
Specific gravity	(20°C) 0.923
Refractive index	1.4577 (20°C, 589 nm)
Solubility	(in ethanol (70% v/v)) 1:2
Specific optical rotation	0° (20°C, 589 nm) (neat)
Retest date	02-04-11

Issued: 12-06-08

A. Vanneste Quality Control Manager

Acros Organics Geel West Zone 2, Janssen Pharmaceuticaalaaan 3a, B-2440 Geel, Belgium
 Tel +32 14/57.52.11 - Fax +32 14/59.34.34 Internet: <http://www.acros.com>
 1 Reagent Lane, Fair Lawn, NJ 07410,USA
 Fax 201-796-1329

8.2.3 – Certificado de análise do timol

printacros

Página 1 de 1



Certificate of Analysis

Product 15033**Thymol,99%**

Thymol, 99% , 100GR

COB. AC150331000

FAB. 10/10/07

LOTE A0251806001

VAL. 11/10/09

General Product Data

Version	0
CAS No	89-83-8
Molecular weight	150.22
Molecular formula	C10 H14 O
Linear formula	
Flash point (°C)	102

Lot Specific Data**A0251806001**

Appearance	white crystalline powder
Infrared spectrometry	authentic
Melting point	49.4°C
Separat. techn. GC	99.9 %
Residue after evaporation	<0.05 %
Retest date	11-10-09

Issued: 12-06-08

A. Vanneste Quality Control Manager

Acros Organics	Geel West Zone 2, Janssen Pharmaceuticaaan 3a, B-2440 Geel, Belgium
	Tel +32 14/57.52.11 - Fax +32 14/59.34.34 Internet: http://www.acros.com
	1 Reagent Lane, Fair Lawn, NJ 07410,USA
	Fax 201-796-1329