Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada
Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2015;36(1):117-122
ISSN 1808-4532

Atividade *in vitro* de plantas condimentares (*Rosmarinus officinalis* L., *Lippia graveolens* HBK e *Thymus vulgaris* L.) contra o calicivírus felino

Thaís Felli Kubiça1; Sydney Hartz Alves1*; Rudi Weiblen2; Andréia Henzel2; Mathias Martins2; Luciane Terezinha Lovato1

[1] Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil.
[2] Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, (UFSM), Camobi, Santa Maria, RS, Brasil.

RESUMO

O calicivírus felino (FCV) é um importante patógeno de gatos que causa lesões ulcerativas orais e infecções respiratórias. O vírus tem sido utilizado como modelo experimental para avaliação de agente antivirais contra norovírus (NoVs). Nesse estudo, investigou-se a ação dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) frente ao FCV, *in vitro*. A toxicidade celular foi testada pelo método de MTT e os ensaios antivirais pelo teste de redução de placas. Três protocolos foram aplicados: a) diferentes concentrações não tóxicas dos óleos essenciais (CNTOE) foram incubadas com o vírus por 1 hora antes da inoculação (ensaio virucida); b) CNTOE foram adicionadas às células CRFK e incubadas por 1 hora antes da adsorção viral (ensaio de pré-tratamento); c) CNTOE foram adicionadas às células após a inoculação do FCV e mantidas por 18 horas (ensaio de pós-tratamento). A CC_{50} para os óleos de alecrim, orégano mexicano e tomilho foram: 1300,21 µg mL^{-1}; 435,92 µg mL^{-1} e 675,34 µg mL^{-1}; respectivamente. O óleo essencial de tomilho apresentou índice de seletividade [$IS=CC_{50}/CI_{50}$] de 8,57 para o ensaio de pré-tratamento e 6,2 no ensaio virucida. O óleo de alecrim mostrou atividade antiviral no ensaio virucida (IS=6,54) e de pós-tratamento (IS=6,86). O orégano mexicano apresentou IS de 5,75 no ensaio virucida e 5,59 no de pós-tratamento. Conclui-se que os óleos essenciais de tomilho e alecrim apresentaram atividade frente ao FCV em diferentes momentos da infecção viral.

Palavras-chave: Norovírus. FCV. óleos essenciais. Citotoxicidade. MTT. ensaio de placa.

Autor correspondente: Sydney Hartz Alves, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Av. Roraima 1000, CEP: 97105-900, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: sydneyalves.ufsm@gmail.com

INTRODUÇÃO

O calicivírus felino (FCV) é o agente etiológico de uma das mais importantes doenças respiratórias em felinos, apresentando conjuntivite, rinite, traqueobronquite, pneumonia e vesículas no epitélio oral como suas principais manifestações clínicas (Radford *et al*., 2007). Este vírus está classificado no gênero *Vesivirus*; na família *Caliciviridae*, que também inclui os gêneros *Norovirus* e *Sapovirus*, que são agentes de gastroenterite infecciosa em humanos; e *Lagovirus*, responsáveis pela doença hemorrágica em coelhos (Radford *et al*., 2007).

O FCV, além de ser muito resistente no meio ambiente e facilmente transmitido, caracteriza-se por apresentar altas taxas de mutações durante a replicação intracelular; fato que dificulta o controle e profilaxia da doença (Dawson *et al*., 1993; Radford *et al*., 2007). Somando-se a isso, os felinos podem manter o vírus persistentemente por longos períodos após a infecção e excretá-los nas secreções oronasais (Radford *et al*., 2007). Vacinas vivas e inativadas estão disponíveis para aplicação em gatos domésticos, entretanto sua eficácia na proteção contra manifestações clínicas têm sido questionada (Dawson *et al*., 1993; Hurley *et al*., 2003; Radford *et al*., 2007). Não existem antivirais comercialmente disponíveis para o tratamento da calicivirose felina (Radford *et al*., 2007). Alguns produtos naturais testados apresentaram atividade antiviral *in vitro* (Su *et al*., 2010; Shionoiri *et al*., 2012), entretanto ainda não há reconhecimento da sua atividade *in vivo*. Dessa forma, o tratamento de gatos infectados é realizado apenas de forma sintomática (Radford *et al*., 2007).

Além de sua importância clínica, o FCV tem merecido destaque como um modelo no estudo de estratégias gerais de replicação dos norovírus (NoVs), uma vez que não há um sistema de cultura de células para a propagação desses (Steinmann *et al*., 2004; 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). A infecção de humanos por norovírus induz sintomas de vômito severo, diarréia aquosa,

náusea, cólicas abdominais, febre e mal-estar geral (Hutson *et al*., 2004). Devido à inexistência de antivirais contra os norovírus, o tratamento é realizado sintomaticamente.

Extratos ou óleos essenciais de plantas comumente utilizadas como condimentos na culinária e medicina popular 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). Extratos aquosos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e tomilho (*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). O óleo essencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) apresentou atividade antiviral frente a diversos vírus RNA e DNA (Pilau *et al*., 2011). Diante desses argumentos, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antiviral dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), orégano mexicano (*Lippia graveolens*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) frente ao FCV, *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Óleos essenciais

Os óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) foram comprados de Essential 7 (Roswell, New Mexico, USA); o óleo essencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) foi adquirido da Agroindustrial Don Pablo (Chihuahua, Chihuahua, México) (Pozzatti *et al*., 2008). As análises qualitativas e semiquantitativas dos principais constituintes químicos dos óleos essenciais, realizadas através das técnicas de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), estão relatadas no trabalho de Pozzatti *et al*. (2008). De acordo com essas determinações, o 1,8-cineol (28,59%) e a cânfora (26,31%) estão presentes em concentração majoritária no óleo essencial de alecrim, enquanto que o carvacrol (56,8%) é o principal constituinte do óleo essencial de óregano mexicano. O tomilho apresenta como principais constituintes o gama-terpineno (64%) e timol (21%) (Pozzatti *et al*., 2008).

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

Cultivo celular e vírus

Células de linhagem de rim felino (*Crandell-Rees Feline Kidney cells* = CRFK) foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina, estreptomicina e anfotericina B, nas concentrações de 100 U mL^{-1}, 100 e 2,5 µg mL^{-1}, respectivamente. As culturas de células foram preparadas em placas de poliestireno de 96 cavidades, para os ensaios de citotoxicidade, e 12 cavidades, para os testes de atividade antiviral; e mantidas em estufa a 37oC 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*., 2012). Os estoques dos vírus foram preparados e titulados conforme já descrito (Bidawid *et al*., 2003) e as alíquotas mantidas a -70oC até o momento do uso.

Ensaio de citotoxicidade

A toxicidade dos óleos essenciais de alecrim, orégano mexicano e tomilho frente às células CRFK foi determinada através do ensaio colorimétrico com 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazolium (MTT) de acordo com a metodologia descrita por Mosmann (1983) e modificada por Cueto *et al*. (2011). Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Citotoxicidade e atividade antiviral dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), orégano mexicano (*Lippia graveolens*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) frente ao calicivírus felino (FCV)

Óleo essencial		Ensaio virucida [a]		Ensaio de pré-tratamento [b]		Ensaio de pós-tratamento [c]	
	CC_{50} [d]	CI_{50} e	CMNT[f]	CI_{50}	CMNT[f]	CI_{50}	CMNT[f]
Alecrim	1300,21	198,72	200	s/a [f]	200	189,51	200
Orégano mexicano	435,92	75,83	100	s/a [g]	100	77,97	100
Tomilho	675,34	108,87	100	78,81	100	s/a [g]	100

[a] O vírus foi incubado com diferentes concentrações não tóxicas dos óleos essenciais de alecrim, orégano mexicano e tomilho antes da inoculação nas células.

[b] As células foram pré-tratadas com os óleos essenciais de alecrim, orégano mexicano e tomilho antes da infecção viral.

[c] Os óleos essenciais de alecrim, orégano mexicano e tomilho foram adicionados somente após a adsorção viral.

[d] Concentração citotóxica (µg/mL) para 50% do cultivo celular.

[e] Concentração inibitória (µg/mL) para 50%.

[f] Valores de concentração máxima não tóxica (CMNT), em µg/mL, obtidos para cada óleo essencial no ensaio de citotoxicidade.

[g] Sem atividade.

A solução II, descrita acima, foi diluída em MEM iniciando-se em 1:2 até 1:256, para obter-se concentrações decrescentes dos óleos essenciais (3200 a 25µg mL^{-1}). Estas diluições foram então adicionadas à monocamada pré-formada de células CRFK, em placas de 96 poços, em um total de seis repetições para cada concentração. Foram incluídos como controles poços contendo apenas células e MEM e poços contendo MEM com 1% de metanol, sem óleo. Após 18 horas de incubação à 37oC e 5% de CO_2, determinou-se a viabilidade celular através da leitura da densidade ótica em espectrofotômetro (λ = 540 nm) (Bidawid *et al*., 2003). As concentrações citotóxicas dos óleos essenciais que reduziram o número de células viáveis em 50% (CC_{50}) foram estabelecidas por curvas dose-resposta. Adicionalmente, a concentração máxima não tóxica (CMNT) para cada óleo essencial em estudo foi determinada pelo ensaio colorimétrico com MTT.

Ensaio antiviral

Os protocolos dos tratamentos a serem utilizados na avaliação da atividade dos óleos essenciais frente ao FCV (ensaio virucida, ensaio de pré-tratamento das células e ensaio de pós-tratamento) foram feitos de acordo com a metodologia descrita por Astani *et al*. (2010). Os ensaios de placa foram realizados de acordo com Bidawid *et al*. (2003) com pequenas modificações (Escobar-Herrera *et al*., 2007).

Os testes foram realizados com as seguintes concentrações dos óleos essenciais (obtidas a partir da CMNT): a) alecrim: 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL; b) orégano mexicano e tomilho: 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL. A suspensão viral continha concentração final de vírus/ poço de 24,9 PFU (plaque forming units = unidades formadoras de placa/poço) (Escobar-Herrera *et al*., 2007). A carboximetilcelulose foi preparada com MEM e soro fetal bovino apresentando uma concentração final de 0,8%. Três protocolos foram aplicados: a) diferentes concentrações não tóxicas dos óleos essenciais foram incubadas com o vírus por 1 hora a 37ºC antes da inoculação (ensaio virucida); b) concentrações não tóxicas dos óleos essenciais foram adicionadas às células, incubadas por 1 hora a 37ºC e retiradas antes da adsorção viral (ensaio de pré-tratamento); c) diferentes concentrações não tóxicas dos óleos essenciais diluídas em carboximetilcelulose, contendo MEM e soro fetal bovino, foram adicionadas às células após a inoculação do FCV e mantidas por 18 horas até a leitura dos ensaios (ensaio de pós-tratamento). Poços contendo apenas células e MEM; assim como poços contendo células com MEM e 1% de metanol, mas sem óleo, foram utilizados como controle nos ensaios de redução de placa.

Para os três tratamentos, as células foram fixadas e coradas com formol e cristal violeta após 18 horas de incubação. Os ensaios foram realizados em um total de seis repetições para cada concentração de óleo essencial. A inibição de replicação viral foi calculada a partir da fórmula: % de inibição da replicação viral = 1 – (número médio de placas virais nas cavidades com óleo essencial/número médio de placas virais nas cavidades sem óleo essencial) x 100 (Dezengrini *et al*., 2010). A concentração de cada óleo essencial capaz de inibir 50% do número de placas virais (CI_{50}) e o índice de seletividade (IS) foram calculados por análise de regressão linear, considerando-se a equação da reta adequada quando o valor de R2 foi igual ou superior a 0,9. O IS é a relação entre a CC_{50} do óleo essencial (obtido pelo MTT) e CI_{50}, sendo este valor utilizado para estimar a segurança de determinado composto.

RESULTADOS

No ensaio colorimétrico com MTT, verificou-se que os óleos essenciais de orégano mexicano e tomilho não apresentaram toxicidade frente às células CRFK até a concentração de 100 µg mL^{-1} (CMNT). O óleo essencial de alecrim, apresentou a menor toxicidade (CC_{50} de 1330,21 µg mL^{-1}) e somente foi possível observar ação tóxica ao cultivo celular testado a partir de 200 µg mL^{-1} (Tab. 1). Dessa forma, foi estabelecido que as concentrações utilizadas nos ensaios antivirais seriam 200 µg mL^{-1}, 100 µg mL^{-1}, 50 µg mL^{-1}, 25 µg mL^{-1} para o óleo essencial de alecrim; e 100 µg mL^{-1}, 50 µg mL^{-1}, 25 µg mL^{-1}, 12,5 µg mL^{-1} para os óleos de orégano mexicano e tomilho. Os valores das concentrações citotóxicas dos óleos essenciais que reduziram o número de células viáveis em 50% (CC_{50}), estabelecidas por curvas dose-resposta, estão apresentados na Tabela 1.

Em cada tratamento (ensaio virucida, de pré e pós-tratamento), foi possível determinar a concentração de cada óleo essencial capaz de inibir 50% do número de placas virais (CI_{50}) e o índice de seletividade (IS). Considerando os resultados de CI_{50} e o limite preconizado por Cos *et al*. (2006), o qual estabelece valores de CI_{50} inferiores a 100 µg mL^{-1} para que um produto natural seja considerado promissor como antiviral, todos os óleos em estudo demonstraram ação frente ao FCV em algum dos tratamentos. O orégano mexicano e tomilho, no geral, apresentaram valores de CI_{50} abaixo ou em torno 100 µg mL^{-1} (Tab. 1). Dessa forma, no ensaio virucida, os três óleos testados inibiram a replicação do FCV, com valores de IS de 6,54; 5,75 e 6,2 para o alecrim, orégano mexicano e tomilho, respectivamente (Fig. 1). Entretanto, a maior ação antiviral foi verificada quando as células foram pré-tratadas com o óleo essencial de tomilho, resultando em índice de seletividade de 8,57 (Fig. 1). No ensaio de tratamento após a infecção viral, o IS para o óleo essencial de alecrim foi de 6,86 e para o orégano mexicano de 5,59 (Fig. 1), ambos superiores ao que é citado na literatura (Tsuchiya *et al*.,1985; De Clercq, 1993).

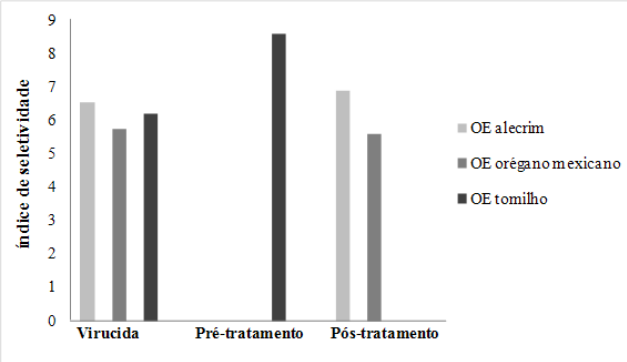

Fig.1 - Atividade antiviral dos óleos essenciais (OE) de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), orégano mexicano (*Lippia graveolens*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) frente ao calicivírus felino (FCV), expressa em valores de índice de seletividade, em diferentes momentos da infecção viral.

DISCUSSÃO

As atividades antimicrobianas e antivirais de extratos e óleos vegetais têm apresentado 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), tem sido pouco explorada.

A toxicidade dos óleos essenciais frente às células CRFK foi relativamente baixa quando comparada a outros estudos já realizados (Nolkemper *et al*., 2006; Cueto *et al*., 2011); principalmente para o óleo essencial de alecrim, cuja CC_{50} foi de 1300,21 µg mL $^{-1}$ (Tab. 1). Extratos aquosos de alecrim e tomilho apresentaram CC_{50} de aproximadamente 60 µg mL^{-1} em células RC-37 (Nolkemper *et al*., 2006). Os óleos essenciais das três plantas testadas apresentaram algum nível de atividade antiviral, sendo que a CI_{50} dos óleos essenciais de orégano mexicano e de tomilho (Tab. 1) ficou abaixo ou muito próxima de 100 µg mL^{-1}; que é o limite recomendado por Cos *et al*. (2006) para que um produto natural seja considerado promissor como antiviral. 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 dois são considerados indicativos de atividade antiviral (Tsuchiya *et al*.,1985; De Clercq, 1993). De acordo com essa sugestão, todos os óleos essenciais analisados apresentaram atividade, sendo que o tomilho, além de apresentar ação virucida frente ao vírus testado (IS=6,2), exibiu uma atividade antiviral ainda mais expressiva (IS=8,57) quando inoculado nas células antes da infecção (Fig. 1). Atividade antiviral do óleo essencial de tomilho assim como de seu extrato aquoso já foi demonstrada frente ao herpes simplex tipo 1 resistente ao aciclovir e vírus herpes simplex tipos 1 e 2 (Nolkemper *et al*., 2006, Schnitzler *et al*. 2007). Frente a esses vírus a atividade foi observada quando os compostos foram adicionados aos vírus antes da infecção (Nolkemper *et al*., 2006; Schnitzler *et al*., 2007).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de tomilho tem sido atribuída ao constituinte majoritário timol que, por possuir características fenólicas, pode desencadear um desequilíbrio nas atividades das membranas bacterianas (Helander *et al*., 1998). 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 (Cox *et al*., 2000), pode-se deduzir que essas substâncias possam ser capazes de exibir atividade similar contra envelopes virais (Schnitzler *et al*., 2007). Contudo, outro mecanismo deve explicar o efeito sobre o FCV, pois este não possui envelope.

Por outro lado, a atividade antimicrobiana exibida pelo óleo essencial de alecrim talvez possa ser atribuída a um efeito sinérgico de seus componentes majoritários (Jiang *et al*., 2011). Esta inferência foi postulada por Jiang *et al*. (2011), quando realizaram uma análise da composição química deste óleo e identificaram 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. 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 microrganismos (Celiktas *et al*., 2007). Em nossas condições, o óleo essencial de alecrim apresentou índices de seletividade de 6,54 e 6,86 nos ensaios de pré e pós-tratamento do FCV, respectivamente (Fig. 1). A cânfora (28,59%) e o 1,8-cineol (26,31%) foram os compostos detectados em maior concentração na amostra do óleo essencial 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 (Celiktas *et al*., 2007; Jiang *et al*., 2011). É possível que a ação antiviral exibida pelo óleo essencial de alecrim seja devido 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) (Fig. 1). Ensaios 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 tais como herpesvírus, vírus sincicial respiratório e vírus da diarréia viral bovina (Pilau *et al*., 2011). É possível que a pouca atividade frente ao FCV deva-se a ausência de envelope.

A atividade anti-FCV exibida pelos óleos essenciais de alecrim, tomilho e orégano mexicano, bem como a baixa toxicidade expressada por esses e sua facilidade de obtenção, são fatores a serem levados em consideração para uso terapêutico; principalmente se considerarmos as altas taxas de mutação do FCV, sua elevada resistência no meio ambiente, a questionável eficácia das vacinas 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 o norovírus humano, 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). O norovírus é transmitido pela via fecal-oral, principalmente através da ingestão de alimentos contaminados, contato com gotículas de vômito ou superfícies contaminadas (Fankhauser *et al*., 2002). Compostos naturais com atividade antimicrobiana que possam ser adicionados a alimentos estão em constante demanda (Su *et al*., 2010). A ação sobre o FCV, a baixa toxicidade e facilidade de obtenção dos óleos essenciais aqui estudados justificam estudos mais detalhados destes óleos e de seus componentes majoritários frente a possível atividade anti-norovírus.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de mestrado. Rudi Weiblen (301953/ 2010-4) e Sydney Hartz Alves (304168/2012-2) são bolsistas de produtividade do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

ABSTRACT

In vitro activity of plants used as condiments (Rosmarinus officinalis L., Lippia graveolens HBK e Thymus vulgaris L.) against the feline calicivirus

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* **(NoVs). In this study, the essential oils of rosemary (***Rosmarinus officinalis* **L.), mexican oregano (***Lippia graveolens* **HBK) and thyme (***Thymus vulgaris* **L.) were examined for their activity towards FCV,** *in vitro***. The cytotoxicity was determined by the MTT test and the antiviral assays were performed by the plaque reduction test. Three protocols were applied: a) different non-toxic concentrations of the essential oils (NTCEO) were incubated with the virus for 1 hour before viral inoculation (virucidal assay); b) NTCEO were added to CRFK cells and incubated for 1 hour before viral adsorption (pre-treatment assay); c) NTCEO were added to cells after virus inoculation and maintained for 18 hours (post-treatment assay). The cytotoxic concentration at 50% (CC_{50}) for the essential oils of rosemary, mexican oregano, and thyme were: 1300.21 µg mL^{-1}; 435.92 µg mL^{-1} and 675.34 µg mL^{-1}; respectively. The essential oil of thyme showed a selectivity index ($IS=CC_{50}/CI_{50}$) of 8.57 at the cell pre-treatment assay and 6.2 at the virucidal assay. The essential oil of rosemary showed antiviral activity at the virucidal assay (IS=6.54) and, also, at the post-treatment assay (IS=6.86). The mexican oregano showed an IS of 5.75 at the virucidal assay and 5.59 at the post-treatment. Therefore, it can be concluded that the essential oils of thyme and rosemary show antiviral activity against FCV in different times of the infection.**

Keywords: *Norovirus*. FCV. Essential oils. Cytotoxicity. MTT. Plaque assay.

REFERÊNCIAS

Astani A, Reichling J, Schnitzler P. Comparative Study on the Antiviral Activity of Selected Monoterpenes Derived from Essential Oils. Phytother Res. 2010;24:673–9.

Bidawid S, Malik N, Adegbunrin O, Sattar SA, Farber JM. A feline kidney cell line-based plaque assay for feline calicivirus, a surrogate for Norwalk virus. J Virol Methods. 2003;107:163-7.

Celiktas OY, Kocabas EEH, Bedir E, Sukan FV, Ozek T, Baser KHC. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chem. 2007;100:553-9.

Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. J Ethnopharmacol. 2006; 106(3):290-302.

Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). J Appl Microbiol. 2000;88:170–5.

Cueto AP, Alves SH, Pilau M, Weiblen R, Kubiça TF, Lovato LT. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarréia viral bovina. Ciênc Rural. 2011;41(10):1800-6.

Dawson SF, McArdle, Bennett M, Carter M, Milton IP, Turner P, Meanger J, Gaskell RM. Typing of feline calicivirus isolates from different clinical groups by virus neutralisation tests. Vet Rec. 1993;133:13-7.

De Clercq E. Antivirals for the treatment of herpesvirus infections. J Antimicrob Chemother. 1993;32(Suppl A):121- 32.

Dezengrini R, Silva SC, Weiss M, Kreutz LC, Weiblen R, Flores EF. Atividade de três drogas antivirais sobre os herpesvírus bovinos tipos 1,2 e 5 em cultivo celular. Pesq. Vet. Bras. 2010; 30(10):855-60.

Escobar-Herrera J, Medina-Ramírez FJ, Gutiérrez-Escolano AL. A carboxymethyl-cellulose plaque assay for feline calicivirus. J Virol Methods. 2007;146:393-6.

Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, Glass RI. Molecular epidemiology of Norwalk like viruses in outbreaks of gastroenteritis in the United States. J Infect Dis. 1998;178:1571-8.

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. 2004;56:49-55.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ, Thiel HJ. Taxonomy of the caliciviruses, J Infect Dis. 2000; 181:S322–S330.

Helander IM, Alakomi HL, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I. Smid EJ, Gorris LGM, Wright A. Characterization of the action of selected essencial oil components on Gram-negative bacteria. J Agric Food Chem 1998;46(9):3590-5.

Henzel A, Brum MCS, Lautert C, Martins M. Lovato, LT, Weiblen R. Isolation and identification of feline calicivirus and feline herpesvirus in Southern Brazil. Braz J Microbiol. 2012;43(9):560-8.

Hurley KF, Sykes JE. Update on feline calicivirus: new trends. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2003;33(4):759-72.

Hutson AM, Atmar RL, Estes MK. *Norovirus* disease: changing epidemiology and host susceptibility factors. Trends Microbiol. 2004;12(6):279-87.

Jassim SA, Naji MA. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. J Appl- Microbiol. 2003;95(3):412-27.

Jiang Y, Wu N, Fu YJ, Wang W, Luo M, Zhao CJ, Zu YG, Liu XL. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. Environ Toxicol Pharmacol. 2011;32(1):63-8.

Koch C, Reichling J, Schneele J, Schnitzler P. Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. Phytomedicine. 2008;15(1-2):71-8.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65(1-2):55-63.

Nolkemper S, Reichling J, Stintzing FC, Carle R, Schnitzler P. Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against Herpes simplex virus type 1 and type 2 *in vitro*. Planta Med. 2006;72(15):1378-82.

Pilau MR, Alves SH, Weiblen R, Arenhart S, Cueto AP, Lovato LT Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. Braz J Microbiol. 2011;42(4):1616-24.

Pozzatti P, Scheid LA, Spader TB, Atayde ML, Santurio JM, Alves SH. *In vitro* activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible Candida spp. Can J Microbiol. 2008;54(11):950-6.

Povey RC. Effects of orally administered ribavirin on experimental feline calicivirus infection in cats. Am J Vet Res. 1978;39(8):1337–41.

Radford AD, Coyne KP, Dawson S, Porter CJ, Gaskell RM. Feline Calicivirus. Vet Res. 2007;38(2):319-35.

Shionoiri N, Sato T, Fujimori Y, Nakayama T, Nemoto M, Matsunaga T, Tanaka T. Investigation of the antiviral properties of copper iodide nanoparticles against feline calicivirus. J Biosci Bioeng. 2012;113(5):580-6.

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. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(5):1859-62.

Steinmann J. Surrogate viruses for testing virucidal efficacy of chemical disinfectants. J Infect Hosp. 2004;56:49-54.

Su X, Howell AB, D'Souza DH. Antiviral effects of cranberry juice and cranberry proanthocyanidins on foodborne viral surrogates - A time dependence study *in vitro*. Food Microbiol. 2010;27(8):985-91.

Tsuchiya Y, Shimizu M, Hiyama Y, Itoh K, Hashimoto Y, Nakayama M, Horie T, Morita N. Antiviral activity of natural occurring flavonoids *in vitro*. Chem Pharm Bull. 1985;33:3881-6.

Recebido em 17 de julho de 2013

Aceito em 5 de fevereiro de 2014