



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 Alves^{1*}; 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: $1300,21 \mu\text{g mL}^{-1}$; $435,92 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $675,34 \mu\text{g mL}^{-1}$; 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.

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, diarreia aquosa,

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

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 orégano 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 37°C contendo 5% de CO₂. 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 -70°C 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 ^g	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 37°C e 5% de CO₂, determinou-se a viabilidade celular através da leitura da densidade óptica em espectrofotômetro (λ = 540 nm) (Bidawid *et al.*, 2003). As concentrações citotóxicas dos óleos essenciais que reduziram o número de células viáveis em 50% (CC₅₀) 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 37°C antes da inoculação (ensaio virucida); b) concentrações não tóxicas dos óleos essenciais foram adicionadas às células, incubadas por 1 hora a 37°C 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).

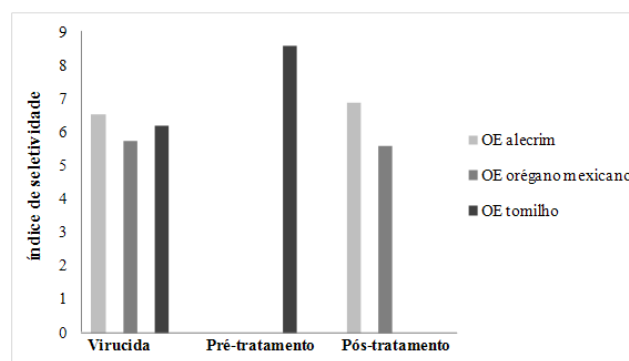


Fig.1 - Atividade antiviral dos óleos essenciais (OE) de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), orégano mexicano (*Lippia graveolens*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) frente ao calicivírus felino (FCV), expressa em valores de índice de seletividade, em diferentes momentos da infecção viral.

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 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tab. 1). Extratos aquosos de alecrim e tomilho apresentaram CC_{50} de aproximadamente 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 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 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 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 diarreia 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% (CC₅₀) 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=CC₅₀/CI₅₀) 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, Adegbinrin 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 essential 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.

Aceito em 5 de fevereiro de 2014

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