Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Vegetal

AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIVÍRICA DE EXTRACTOS AQUOSOS DE PLANTAS DA FLORA AROMÁTICA PORTUGUESA

NADIENY CECÍLIA KINDA BARBOSA DOS SANTOS

Dissertação

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2013

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Vegetal

AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIVÍRICA DE EXTRACTOS AQUOSOS DE PLANTAS DA FLORA AROMÁTICA PORTUGUESA

NADIENY CECÍLIA KINDA BARBOSA DOS SANTOS

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria Filomena Caeiro

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2013

FACULDADE · DE · CIÊNCIAS UNIVERSIDADE · DE · LISBOA

CESAM
Centre for Environmental and Marine Studies
www.cesam.ua.pt

Departamento de Biologia Vegetal

AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIVÍRICA DE EXTRACTOS AQUOSOS DE PLANTAS DA FLORA AROMÁTICA PORTUGUESA

NADIENY CECÍLIA KINDA BARBOSA DOS SANTOS

TESE DE MESTRADO

2013

Esta dissertação foi realizada no Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro – Pólo FCUL e no Departamento de Biologia Vegetal da FCUL, sob a orientação da Professora Doutora Maria Filomena Caeiro, no âmbito do Mestrado em Biologia Molecular e Genética da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL).

AGRADECIMENTOS

À Professora Maria Filomena Caeiro, minha orientadora, pela sua orientação científica, amizade, simpatia, generosidade e acima de tudo pela paciência e todo apoio.

À Professora Lia Ascensão e ao Professor António Pedro de Matos, por toda a disponibilidade prestada.

À Teresa Granja, à Ruth, e à Mariana Duarte, pela simpatia, apoio e por terem tornado o trabalho laboratorial bastante agradável.

À Célia, pelo enorme carinho, amizade e protecção quando cá cheguei.

À Cláudia Gonçalves, à Egídia e à D. Manuela, pelo companheirismo, amizade e pelo espírito crítico constante.

À Marta, à Joana Chora, à Alexandra Carvalho, pelo carinho, apoio e todos os ensinamentos técnicos e laboratoriais.

À minha amiga e colega de estágio Mónica Barra, pelo apoio inestimável, carinho e companheirismo. Obrigada por tudo!

Aos meus Pais e à minha irmã, pelo apoio e pelas palavras de incentivo durante este trajecto.

Às minhas filhas, por serem a minha força motora e a razão do meu viver.

Ao meu marido, pelo apoio que sempre me deu, pelo carinho e pela amizade.

À Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pela sua excelente formação, pelos maravilhosos e árduos anos que me proporcionou.

RESUMO

O objectivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a actividade antiviral de extractos aquosos de 3 espécies da família Asteraceae pertencentes à flora aromática portuguesa. Os extractos foram identificados por E3, E4, E6 e E8, tendo sido utilizado o ensaio colorimétrico do MTT para a determinação da sua citotoxicidade em células Vero. Determinaram-se os valores correspondentes à Concentação máxima não citotóxica (CMNC), a que inviabiliza 10% das células (CC10) e a que inviabiliza 50% das células (CC50). Fizeram-se ensaios de efeito virucida incubando suspensões do vírus da Encefalomiocardite murina (EMCV) com e sem os diferentes extractos e determinando, após titulação, as taxas de inactivação viral correspondentes, e a concentração que reduz em 50% o título das suspensões virais (CI50). Estudou-se ainda o efeito dos extractos em células infectadas, adicionando-os 30 minutos após o período de adsorção e titulando o vírus produzido nessas condições e em condições controlo (células infectadas não tratadas); devido à dificuldade na determinação da CMNC, foram utilizadas nestas experiências concentrações inferiores às da CC10. O extracto E6 foi o mais citotóxico com valores de CC50 igual a 270±0,02µg/ml e não apresentou acção directa sobre as partículas virais. Os restantes extractos mostraram acção directa sobre as partículas virais com valores de CI50 compreendidos entre 5±0,12 e 600±0,2µg/ml. Todos os extractos apresentaram percentagens de inibição da produção viral superior a 45%, tendo o extracto E6 atingido 96,8% de inibição. Estes resultados indicam que estes extractos, e de forma relevante o E6, actuam durante a replicação viral na célula hospedeira. Foi considerada a possibilidade de interferirem com a síntese de RNA viral, pelo que se extraiu RNA de células infectadas tratadas e não tratadas com os extractos para investigar a presença do genoma do EMCV através de um RT-PCR com *primers* específicos para uma região do RNA viral. A obtenção de produtos de amplificação a partir de todas as amostras de RNA, incluindo as das células infectadas na presença do extracto E6, mostrou que não é este o passo do ciclo replicativo do EMCV a ser afectado. Esta é a primeira vez que se relata a actividade antiviral de extractos aquosos de espécies da família Asteraceae frente ao EMCV.

Palavras-chave: Asteraceae, actividade antiviral, citotoxicidade, EMCV.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the in vitro antiviral activity of aqueous extracts of three species belonging to the family Asteraceae from the Portuguese aromatic flora. The extracts that were identified by E3, E4, E6, and E8 have been used for the MTT colorimetric assay to determine their cytotoxicity on Vero cells. They were determined the valuescorresponding to the maximum non-cytotoxic concentration (CMNC) , the concentration causing either 10 % (CC10) and 50% (CC50) inhibition of growth of normal cells. Virucidal effect tests were performed by incubating suspensions of murine encephalomyocarditis virus (EMCV) with and without the different extracts and determining after titration, rates corresponding to viral inactivation and the concentration that reduces by 50% the title of the viral suspensions (IC50). It was also studied the effect of the extracts in infected cells by adding them to infected cells 30 minutes after the adsorption period and titrating the virus produced in these conditions and control conditions (untreated infected cells). Due to the difficulty in determining the CMNC, were used in these experiments concentrations lower than CC10. The extract E6 was the most cytotoxic with CC50 values equal to 270 ± 0.02µg/ml and showed no direct action against virus particles. The remaining extracts showed direct action on virus particles presenting IC50 values between 5±0.12 and 600±0.20 µg/ml. All extracts showed inhibition of viral yield over 45 % and the extract E6 reached 96.8 % inhibition. These results indicate that these extracts, and significantly E6, acting during viral replication in the host cell. To evaluate if the virus RNA synthesis was affected, RNA was extracted from treated and not treated infected cells. These RNA samples were then assayed for the presence of the EMCV genome, by RT- PCR with specific *primers* for a region of the virus RNA. The amplification products obtained from all RNA samples, including RNA from infected cells in the presence of the extract E6, showed that this step of EMCV replication was not affected. This is the first time that reports the antiviral activity of aqueous extracts of Asteraceae species against EMCV.

Keywords: Asteraceae, antiviral activity, cytotoxicity, EMCV

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC –	*American Type Culture Collection*
CC50 –	Concentração que inibe 50% da viabilidade celular
CI50 –	Concentração inibitória de 50%
CMNC –	Concentração Máxima Não Citotóxica
CO_2 -	Dióxido de carbono
DMSO –	Dimetilsulfóxido
DNA –	Ácido desoxirribonucleico
FBS –	Soro fetal bovino
***g* –**	Aceleração gravítica
ICTV –	*International Committee on Taxonomy of Virus*
IS -	Índice de Selectividade
KDa -	KiloDalton
Kb –	Kilobases
mg –	Miligrama
ml –	Mililitro
mM –	Milimolar
MTT –	Brometo de 3 - [4,5-dimetil-tiazol-1-il] -2,5-difenil-tetrazólio
nm–	Nanómetro (10^{-9} metros)
ºC –	Graus Celsius
P24, 48, 96 –	Placa de cultura de 24, 48 e 96 poços
pb –	Pares de bases
PBS –	*Phosphate Buffered Saline*
PCR –	*Polymerase Chain Reaction*
pfu –	Unidades formadoras de placas
pH –	Simétrico decimal da concentração hidrogeniónica molar
RNA –	Ácido ribonucleico

rpm –	Rotações por minuto
RT-PCR -	*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*
SSC –	Solução de citrato de sódio
v/v -	Concentração volume por volume
% -	Percentagem
µl –	Microlitro
E3 –	Extracto aquoso de flores de *Helichrysum italicum*
E4 –	Extracto aquoso de caules/folhas de *Helichrysum italicum*
E6 –	Extracto aquoso de caules/folhas de *Solidago virgaurea*
E8 –	Extracto aquoso de flores de *Santolina impressa*

Esta dissertação foi redigida de acordo com as regras da antiga ortografia.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS……... iii

RESUMO……... iv

ABSTRACT…… v

LISTA DE ABREVIATURAS……..... vi

1. INTRODUÇÃO…….. 1

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA……. 3

2.1. Família *Picornaviridae*…….. 3

2.2. Vírus da Encefalomiocardite murina (EMCV)……. 3

2.2.1. Estrutura……3

2.2.2. Ciclo replicativo…….. 4

2.2.3. Patogénese…….. 5

2.3. Plantas aromáticas……6

2.3.1. Família Asteraceae……... 7

2.3.1.1. *Helichrysum italicum*……7

2.3.1.2. *Solidago virgaurea*……8

2.3.1.3. *Santolina impressa*…….. 8

3. MATERIAIS E MÉTODOS…… 9

3.1. Cultura celular……... 9

3.2. Manutenção celular: propagação e criopreservação……. 9

3.2.1. Propagação celular…….. 9

3.2.2. Criopreservação de células……...10

3.3. Extractos aquosos de plantas da flora portuguesa…….. 10

3.4. Vírus……11

3.4.1. Produção de vírus……11

3.4.2. Títulação de vírus…… 12

3.5. Determinação da citotoxicidade dos extractos aquosos…… 12

3.6. Actividade dos extractos aquosos sobre as partículas virias (Efeito Virucida)……. 13
3.7. Efeito dos extractos aquosos no ciclo replicativo…… 14
3.8. Análise das proteínas celulares e virais…….. 15
3.9. Extracção de RNA e hibridação por Dot – Blot…….. 15
3.10. Amplificação por RT-PCR ……..... 16

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO……. 18
4.1. Avaliação da citotoxicidade…… 18
4.2. Efeito virucida…….. 21
4.3. Acção dos extractos no ciclo replicativo…… 23
4.4. Análise de proteínas virais……... 24
4.5. Detecção de RNA viral por Dot-blot e por RT-PCR…..……...…… 26

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS…… 28

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS……. 29

7. ANEXOS …… 34

1. INTRODUÇÃO

As zoonoses são consideradas um grande problema de saúde pública, pois representam cerca de 75% das doenças infecciosas emergentes no mundo. Estudos demonstram que 60% dos patógenos animais têm múltiplos hospedeiros. A disseminação dessas doenças está directamente relacionada com a capacidade do agente etiológico se manter em condições viáveis na fonte de infecção (Ávila-Pires, F.D., 1989; Spyrou, V. et al, 2004).

A saúde humana e animal sempre estiveram interligadas. No entanto, os processos sociais e agro-pecuários ocorridos nos últimos anos proporcionaram um contacto ainda maior entre a população humana e os animais domésticos e silvestres. Esse contacto facilitou a disseminação de agentes infecciosos para novos hospedeiros e ambientes (Oberste, M.S. et al, 2009; Billinis, C., 2009; Carocci, M. et al, 2012).

O vírus da Encefalomiocardite murina (EMCV) é um picornavírus pertencente ao género *Cardiovirus* e apresenta uma distribuição mundial (Denis, P. et al, 2006; Acheson, N.H., 2007; Brandão, G.C. et al, 2011). Os roedores (incluindo ratos) são considerados os hospedeiros naturais deste vírus, transmitindo-os a hospedeiros como os suínos, bovinos, equídeos, macacos e o homem (LaRue, R. et al, 2003; Bai, J. et al, 2012). A infecção pelo EMCV geralmente é assintomática, podendo causar lesões cardíacas, pancreáticas, falha reprodutiva e alterações no sistema nervoso central (SNC) (Billinis, C., 2009; Gasparian, A.V. et al, 2010). Apesar de ser um vírus de roedores, o EMCV infecta um diversificado leque de vertebrados, tornando-se assim num potencial agente zoonótico (Guillemard, E. et al, 1996; De Palma, A.M., et al, 2008; Carocci, M. et al, 2012; Lau, S.K.P. et al, 2012).

O controlo de roedores é importante na redução da probabilidade de infecção e a falta de fármacos eficazes para o tratamento, leva à procura do conhecimento sobre o valor terapêutico das plantas com propriedades medicinais. A flora portuguesa é muito rica em espécies aromáticas, cujos extractos aquosos apresentam enorme actividade antioxidante e antimicrobiana (Proença da Cunha, A. et al, 2007; Figueiredo, A.C. et al, 2007). Embora haja uma grande demanda pelos produtos naturais, a carência de pesquisas científicas gera inúmeros problemas relacionados com a acção destes extractos na actividade biológica das células. O tratamento das infecções virais continua a ser um desafio, devido a dificuldade de se desenvolver drogas antivirais capazes de inibir a multiplicação viral sem afectar a célula hospedeira (Faccin, L.C. et al, 2008).

Com este trabalho pretendeu-se avaliar *in vitro* a actividade antiviral de extractos aquosos de 3 espécies (*Helichrysum italicum* Miller, *Solidago virgaurea* L. e *Santolina*

impressa L.) da família Asteraceae pertencentes à flora aromática portuguesa. Teve como objectivos específicos:

- Determinar a citotoxicidade destes extractos relativamente às células hospedeiras (células Vero) utilizadas para a replicação do EMCV;
- Estudar o efeito directo dos extractos sobre as partículas virais;
- Estudar a sua acção no ciclo replicativo do vírus.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Família *Picornaviridae*

A família *Picornaviridae* é composta por pequenos vírus ubiquitários, que circulam na natureza, quer entre as comunidades humanas, quer entre as animais (Koenen, F. et al, 1999; Rotbart, H.A., 2002). Compreende 17 géneros: *Aphthovirus*, *Aquamavirus*, *Avihepatovirus*, *Cardiovirus*, *Cosavirus*, *Dicipivirus*, *Enterovirus*, *Erbovirus*, *Hepatovirus*, *Kobuvirus*, *Megrivirus*, *Parechovirus*, *Salivirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus* e *Tremovirus* (Adams, M.J. et al, 2012).

O nome picornavírus (pico: pequeno; rna: ácido ribonucleico) foi introduzido em 1963 para designar esta família viral que é formada por pequenas partículas virais (24 – 30nm) sem invólucro, com cápside icosaédrica, replicação citoplasmática, genoma de RNA de cadeia simples e polaridade positiva – ssRNA+ – com aproximadamente 7,2 a 8,4 kb de comprimento que permite a tradução directa do RNA numa poliproteína utilizando a sequência IRES localizada na região 5' (Fig. 1) (Canneli, E. et al, 2010; Carocci, M. et al, 2012).

São resistentes ao éter, clorofórmio e aos detergentes não iónicos, deferindo cada género pela sua labilidade térmica e estabilidade ao pH (Acheson, N.H., 2007; Jones,M.S. et al, 2007).

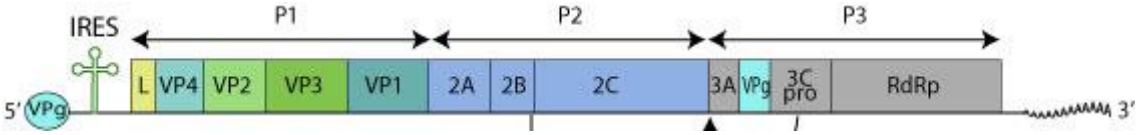


Fig.1 – Organização genómica do EMCV. (Adaptado de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/99.html)

2.2. Vírus da Encefalomiocardite murina (EMCV)

O vírus EMCV pertence ao género *Cardiovirus* conjuntamente com o Theilovirus. Dependendo da proteína a ser considerada, a percentagem de identidade entre os dois vírus pode variar de 20 a 70%. As proteínas L e 2A (Fig. 1), consideradas como proteínas virais de segurança ou factores de virulência são as que apresentam maior divergência nos dois vírus (Chiu, C.Y. et al, 2008; Carocci, M. et al, 2012).

2.2.1. Estrutura

A cápside do EMCV é composta por 4 proteínas estruturais: VP1, VP2, VP3 e VP4. As proteínas VP1, VP2 e VP3 estão parcialmente expostas à superfície do virião, enquanto a VP4 está voltada para a parte interna. Estas proteínas de superfície são os

principais antígenos responsáveis por induzir a produção de anticorpos neutralizantes (LaRue, R. et al, 2003; Acheson, N.H., 2007; Gasparian, A.V. et al, 2010).

O genoma (Fig. 1) tem aproximadamente 7,8Kb, sendo a região 5'UTR (*5'untranslated region*) a maior e altamente estruturada com cerca de 800 a 1200 nucleotídeos. Esta região contém sequências que controlam a replicação e a sequência IRES que permite a tradução do genoma a partir de uma interacção com ribossomas, estando ligada covalentemente a 20 aminoácidos de uma proteína denominada VPg (*virion protein, genome linked*) que funciona como um iniciador para a síntese de RNA. Alterações na região 5'UTR resultam em modificações do factor de virulência e sensibilidade a temperatura (Gasparian, A.V. et al, 2010; Lau, S.K.P. et al, 2012).

A região 3'UTR (*3'untranslated region*) apresenta cerca de 120 nucleotídeos e contém uma estrutura secundária relacionada com o controlo da síntese do RNA viral. As moléculas de RNA genómico (mRNA) possuem uma cauda poli(A) com cerca de 20 a 70 nucleótidos, ligada à região 3'UTR, cuja função pode estar relacionada com a infecciosidade viral (Denis, P. et al, 2006; Bai, J. et al, 2012).

2.2.2. Ciclo replicativo

Como já foi dito anteriormente, a replicação do EMCV (Fig.2) ocorre no citoplasma das células hospedeiras. A partícula viral liga-se a um receptor celular específico, entrando assim para o interior da célula. Ainda não se sabe como ocorre este processo de internalização e nem onde se dá a perda da proteína VP4, que deixa o RNA viral exposto através de um processo que envolve alterações estruturais na cápside (Chiu, C.Y. et al, 2008; Carocci, M. et al, 2012). Uma vez que o RNA viral funciona como mRNA, a tradução é feita directamente pelos ribossomas da célula, formando uma poliproteína que é clivada por uma protease viral designada 3C (21,6 KDa) pertencente a essa poliproteína (Weber, F. et al, 2006; De Palma, A.M. et al, 2008). Esta poliproteína origina todas as proteínas estruturais da cápside e também as proteínas necessárias para que ocorra o processo de replicação. Após a formação destas proteínas (entre elas a polimerase), começam a surgir cadeias de RNA de polaridade negativa que vão servir de molde para a formação de novas cadeias de RNA viral de polaridade positiva. Este evento ocorre em pequenas vesículas que se acumulam no citoplasma, sendo estas o local de síntese do mRNA (Carocci, M. et al, 2012). Quando há um número suficiente de proteínas estruturais já sintetizadas, inicia-se a montagem da cápside. A proteína P1 (proteína precursora da cápside) é clivada para formar um promotor imaturo, o qual se organiza em pentâmeros, dando origem posteriormente às proteínas VP0, VP1 e VP3. O vírus torna-se infeccioso quando ocorre a clivagem da proteína VP0, formando-se VP2 e VP4. Esta clivagem só

acontece depois do RNA estar envolvido pela cápside. A saída dos vírus da célula ocorre por lise celular (Acheson, N.H., 2007). O ciclo replicativo de uma única partícula viral pode levar de 6 a 10 horas, dependendo da temperatura, pH e do tipo de célula hospedeira (Carocci, M. et al, 2012).

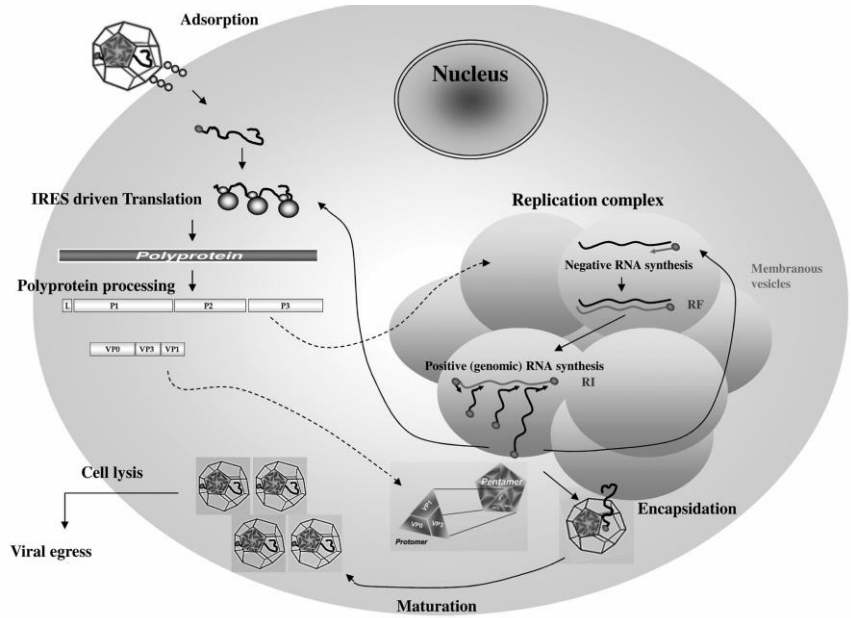


Fig. 2 – Ciclo de replicação viral do vírus da Encefalomiocardite murina (Carocci, M. et al, 2012)

2.2.3. Patogénese

A infecção pelo EMCV ocorre por ingestão de alimentos e água contaminada, com transmissão fecal – oral. Este vírus é muito resistente e pode permanecer infeccioso por vários dias, mesmo em um ambiente hostil. Existe uma considerável variação na intensidade e localização das lesões provocadas pelo EMCV, na ampla gama de hospedeiros susceptíveis. No entanto, este vírus tem sido melhor estudado em roedores, suínos e macacos (Spyrou, V. et al, 2004; Billinis, C., 2009; Canelli, E. et al, 2010; Brandão, G.C. et al, 2011).

Os sintomas gerais em primatas não humanos são principalmente a falha respiratória associada a insuficiência cardíaca aguda, culminando com a morte. A infecção placentária com perda fetal pode ocorrer, levando a uma alta mortalidade induzida por doenças do miocárdio e sistema nervoso (Guillemard, E. et al, 1996; Denis, P. et al, 2006; Cannelli, E. et al, 2010).

Nos suínos, o EMCV geralmente induz miocardite aguda com morte súbita. A miocardite é caracterizada por inflamação cardíaca e necrose dos cardiomiócitos. Outros sintomas têm sido observados, tais como anorexia, apatia e dispneia. Leitões infectados experimentalmente apresentaram febre alta seguida de morte, num período

de 2 a 11 dias. A mortalidade antes do desmame pode subir para 100%, diminuindo com a idade (LaRue, R. et al, 2003; Bai, J, et al, 2012).

Em roedores, a infecção pelo EMCV pode ser assintomática mas em ratinhos geralmente induz encefalite, paralisia dos membros, miocardite ou diabetes do tipo 1. Pode levar a distúrbios reprodutivos, lesões testiculares e às vezes alterações nas glândulas salivares e lacrimais. A susceptibilidade à infecção difere de acordo com a espécie de ratinho, a idade, a estirpe viral e a dose de inóculo. A infecção com doses elevadas de EMCV leva ao aparecimento de diabetes em 3 a 4 dias. Esta diabetes parece ser principalmente devido a destruição aguda das células β do pâncreas, por replicação viral, sem envolvimento do sistema imunológico. Quando a infecção ocorre com doses baixas do vírus, o sistema imunitário, especialmente macrófagos, desempenham um papel central na destruição das células β. Inactivação de macrófagos antes da infecção viral, impede que o EMCV induza diabetes (Rotbart, H.A. et al, 2002; Spyrou, V. et al, 2004; Billinis, C., 2009; Carocci, M. et al, 2012).

Em humanos, foram reportados casos de 2 pacientes no Péru que apresentaram sintomas febris, náuseas, dispneia e cefaleia, tendo sido detectado em um dos pacientes anticorpos para o EMCV. Isto apoia fortemente o papel do EMCV na infecção humana e doença febril (Oberste, M.S. et al, 2009). Alguns casos de infecção foram documentados na literatura antiga como doença caracterizada por calafrios, rigidez do pescoço, delírios, alucinações, tendo o vírus sido isolado em amostras de sangue, fezes e secreções nasofaríngeas (Jones, M.S. et al, 2009). Outros *cardiovírus* pertencentes à espécie *Theilovirus*, foram isolados em amostras de fluídos nasais de crianças e adultos, sendo estas infecções predominantes na infância e envolvendo o sistema respiratório e gastrointestinal (Chiu, O.Y. et al, 2008; Himeda, T. et al, 2012).

2.3. Plantas aromáticas

As plantas representam uma fonte importante de produtos bioactivos para a humanidade e o uso de produtos naturais com propriedades medicamentosas é tão antigo como a civilização humana (Proença da Cunha, A. et al, 2007; Christaki, E. et al, 2012; Abdallah, F.M. et al, 2013). Nas últimas décadas, a ciência tem vindo a validar práticas de medicina tradicional e a reforçar esse conhecimento pela identificação dos compostos activos e dos respectivos mecanismos de acção (Premanathan, M. et al, 1992, 1999; Sintayehu, B. et al, 2012; Rani, C. et al, 2012; Shelar, P.S. et al, 2012).

As plantas aromáticas elaboram e acumulam produtos do metabolismo secundário em diferentes estruturas secretoras especializadas. Estes metabolitos secundários representam a expressão das vantagens competitivas apuradas pela capacidade

adaptativa de cada espécie ao seu ecossistema, ao longo da evolução (Astani, H. et al, 2011; Christaki, E. et al, 2012; Rani, C. et al, 2012).

A presença em Portugal de diversos microclimas provocados por relevos, latitude, exposição solar, natureza do solo e proximidade do mar, são características que permitem a existência de uma flora diversificada, nomeadamente em plantas aromáticas endémicas (Proença da Cunha, A. et al, 2007). Das 3800 espécies que compõem o território nacional, cerca de 500 são aromáticas e/ou medicinais, podendo parte delas constituir uma alternativa para sistemas agrícolas sustentáveis ou para rentabilização de terrenos marginais para a agricultura (Figueiredo, A.C. et al, 2007).

2.3.1. Família Asteraceae

A família Asteraceae é considerada uma das maiores famílias de plantas angiospérmicas, com cerca de 30.000 espécies. Tem uma distribuição cosmopolita, ocorrendo em todos os continentes, excepto na Antártida (Lourens, A.C.U. et al, 2008). As espécies desta família são ricas em estruturas secretoras, apresentando uma enorme variedade de actividades biológicas e farmacológicas que lhes conferem um estatuto importante (Demir, H. et al, 2009).

2.3.1.1. *Helichrysum italicum*

O nome do género, *Helichrysum* (Miller), é derivado das palavras gregas “helios” que significa sol e “chryos” que significa ouro, devido à cor das flores das plantas que o integra. Inclui perto de mil espécies que apresentam diferentes nomes de acordo com as suas características botânicas, organolépticas ou distribuição geográfica (Aslan, M. et al, 2007; Lourens, A.C.U. et al, 2008). *Helichrysum italicum* é uma planta (arbusto) aromática com 50-70 cm de altura (Fig. 3), utilizada na medicina tradicional, principalmente pelas suas propriedades anti-inflamatórias, anti-alérgicas e anti-microbianas (Appendino, G. et al, 2007; Morone-Fortunato, I. et al, 2010).

Fig. 3 - *Helichrysum italicum* (Morone-Fortunato, I. et al, 2010)

2.3.1.2. *Solidago virgaurea*

Solidago virgaurea L. é a única espécie do género *Solidago* nativa da Europa, onde é conhecida por vara-dourada. O termo *Solidago* vem do latim, *solidare*, solidificar, enquanto *virgaurea* se refere à cor dourada das suas flores (Fig. 4). É uma espécie perene e resistente com cerca de 80 cm de altura, que ocorre em solos drenados e arenosos (Proença da Cunha, A. et al, 2007).Tem sido tradicionalmente utilizada na medicina popular no tratamento de processos inflamatórios e/ou infecciosos do tracto urinário, como a nefrolitíase e doenças da próstata (Demir, H. et al, 2009).

Fig.4 – *Solidago virgaurea*

(Adaptado de https://middlepath.com.au/plant/Golden-Rodsolidago-virgaurea%20Herb-of-Joy.php)

2.3.1.3. *Santolina impressa*

Santolina impressa é uma espécie endémica de Portugal continental, restrita à região do Estuário do Sado, sensivelmente desde Sétubal a Sines (Fig. 5). O termo Santolina deriva de vocábulos latinos Sactum Linun que significa linho santo. São utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças gastrointestinais e como repelente de insectos (Proença da Cunha, A. et al, 2007; Rivero-Guerra, A.O., 2010).

Fig. 5 – *Santolina impressa*

(Adaptado de http://www.flora-on.pt/index.php?q=Santolina+impressa)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho com cultivo de células e vírus exige uma série de cuidados para que os riscos de contaminação sejam reduzidos. Todos os procedimentos foram realizados numa câmara de fluxo laminar classe II (Biohazard), de forma a manter as condições de assepsia e segurança. A superfície da área de trabalho e as mãos da operadora foram limpas com álcool a 70% (v/v) antes, durante e após aos procedimentos. A câmara foi irradiada com luz ultravioleta durante 30 minutos, antes e após ao término dos procedimentos. Utilizou-se material estéril e o material de vidro foi esterilizado a vapor, utilizando uma autoclave (121ºC, 15 minutos). Os meios de cultura foram suplementados com antibióticos, de forma a inibir a propagação de microrganismos contaminantes. Os reagentes foram armazenados a 4 – 12ºC e previamente aquecidos a 37ºC, antes de cada utilização.

3.1. Cultura Celular

A cultura de células é uma técnica básica de manutenção das células *in vitro*. Neste trabalho utilizaram-se células VERO que são células de linhagem contínua isoladas do epitélio renal de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), proveniente da American Type Culture Collection (ATCC) com referência CCL81. Esta linhagem celular é comumente utilizada em estudos de virologia, por serem células permissivas a uma grande diversidade de vírus.

3.2. Manutenção celular: propagação e criopreservação

3.2.1. Propagação celular

Para manter as células em cultura é necessário utilizar técnicas básicas que evitem a morte celular no interior do frasco de cultivo. O processo de subcultura de células de um frasco para o outro é também chamado de “passagem”. O número de passagens refere-se ao número de vezes que a cultura foi subcultivada (Freshney, R.I., 1987).

As células VERO foram cultivadas em frascos T25 e T75 (Nunc) a 37ºC em meio independente de CO_2 (CO_2 Independent Medium, Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco), 0,1% de sulfato de gentamicina a 50µg/ml e glutamax a 5µg/ml. As células aderem à superfície do frasco/placa de cultura e crescem em monocamada. Quando as células atingiram uma alta densidade e a monocamada apresentou mais de 90% de confluência, procedeu-se à passagem (subcultura) das células.

O meio foi removido do frasco de cultura e as células foram lavadas por duas vezes com 2,5 ml de PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco) para remover possíveis inibidores e/ou competidores que pudessem dificultar o passo seguinte (Tripsinização),

ligando-se à enzima tripsina e impedindo-a de agir sobre as ligações intercelulares. Adicionou-se 0,5 ml de tripsina (Gibco), sendo os frascos incubados a 37ºC durante 5 minutos, de forma a obter-se a dissociação nas junções celulares. Por fim, adicionou-se 5 ml de meio independente de CO_2 com FBS a 10% para homogeneizar a suspensão celular. A distribuição da suspensão celular em novos frascos/placas foi feita tendo em conta a área de cada tipo de frasco/placa e completou-se o seu volume com meio independente de CO_2 com FBS a 10%, sendo incubados a 37ºC.

Os frascos foram rotulados com a data, tipo celular, número da passagem e nome da manipuladora. Observou-se o crescimento celular após 24 e 48 horas através de um microscópio óptico invertido com contraste de fase (Zeiss IM), procedendo a uma nova subcultura sempre que a camada celular atingisse a confluência.

3.2.2. Criopreservação de células

Células em cultura por longos períodos acabam perdendo as suas características fenotípicas, pois após várias divisões, há grande probabilidade de ocorrerem demasiadas alterações no seu DNA (Freshney, R.I., 1987; Ekwall, B. et al, 1990). Manter células congeladas significa atrasar em anos, quaisquer alterações que poderiam ocorrer quando em cultura. Nessa temperatura, todas as reacções bioquímicas nas células ficam paralisadas impedindo qualquer alteração na cultura criopreservada.

De forma a manter um *stock* celular, procedeu-se ao congelamento de células na qual a suspensão celular foi obtida da mesma forma que no subcultivo celular. Esta suspensão celular foi em seguida centrifugada durante 5 minutos a 2000*g*, decantou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspendido em 4 ml de meio de congelação (90% de FBS e 10% de DMSO). Distribuíram-se várias alíquotas em criotubos e estes foram congelados numa criobox a -80ºC, permitindo assim um congelamento lento com descida de temperatura na ordem de 1 a 2ºC por minuto.

O processo de descongelação foi feito rapidamente, colocando os criotubos a 37ºC. As células foram colocadas em frascos de cultivo com meio independente de CO_2 com FBS a 20%. Após 24 horas, substituiu-se o meio por meio independente de CO_2 com FBS a 10%, de forma a retirar as células mortas e o DMSO que é um crioprotector tóxico para as células. O frasco foi mantido a 37ºC até ocorrer a confluência celular e subsequentemente foi feito o subcultivo.

3.3. Extractos aquosos de plantas da flora portuguesa

Neste estudo foram utilizados extractos aquosos de folhas/caules e/ou flores de *Helichrysum italicum* Miller, *Solidago virgaurea* L. e *Santolina impressa* L, pertencentes

a família Asteraceae. Estes extractos liofilizados foram cedidos pela Professora Doutora Lia Ascensão (Centro de Biotecnologia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal, FCUL) e posteriormente guardados a -20ºC.

As soluções *stock* foram preparadas na concentração de 100mg/ml em DMSO e guardadas a 4ºC, sendo depois diluídas em meio independente de CO_2 com FBS a 2%, consoante o tipo de concentração a ser utilizada.

Os extractos aquosos foram identificados por **E3** (flores de *Helichrysum italicum*), **E4** (folhas/caules de *Helichrysum italicum*), **E6** (folhas/caules de *Solidago virgaurea*) e **E8** (flores de *Santolina impressa*).

3.4. Vírus

Neste trabalho foi utilizado o vírus da Encefalomiocardite murina (EMCV), proveniente da American Type Culture Collection (ATCC), referência VR-129B. Os vírus foram mantidos em suspensões em meio independente de CO_2 com FBS a 2% e conservados a -80ºC.

3.4.1. Produção de vírus

Os vírus foram produzidos em frascos T75 subconfluentes, nos quais foi rejeitado o meio de cultura sendo as células infectadas com 2 ml de suspensão viral com aproximadamente de 10^4 pfu. O processo de adsorção viral foi feito colocando os frascos a 37ºC, durante 30-60 minutos. Posteriormente adicionou-se 12 ml de meio independente de CO_2 com FBS a 2% e os frascos foram mantidos a 37ºC até ocorrer o efeito citopático total, que foi observado ao microscópio óptico invertido, normalmente após 24 horas.

A colheita do vírus foi feita decantando o conteúdo do frasco para um tubo *Falcon*, que foi centrifugado a 3000g durante 5 minutos. Recolheu-se o sobrenadante (vírus extracelular) para um novo tubo e adicionou-se 1 ml de PBS ao sedimento, sendo em seguida efectuado um processo de clarificação para a obtenção do vírus intracelular.

A clarificação envolveu 2 ciclos de congelação/descongelação (-80ºC/37ºC) de forma a ocorrer a lise celular e consequentemente a libertação das partículas virais. Por fim, centrifugou-se a 4000*g* durante 5 minutos para separar os detritos celulares do vírus intracelular (sobrenadante), sendo este transferido para um novo tubo microtubo.

O vírus extracelular e intracelular foi titulado, sendo posteriormente armazenado em alíquotas a -80ºC para manutenção do *stock* viral.

3.4.2. Titulação de vírus

A quantificação do número de partículas infecciosas numa suspensão viral baseia-se no princípio de que um vírus, ao infectar uma célula e após a sua descendência ser transmitida às células vizinhas, por ir provocar a morte a essas células, irá formar "placas" de lise.

Foram feitas diluições sucessivas da suspensão viral em meio independente de CO_2 com FBS a 2%, num factor de diluição 1:10 de 10^0 até 10^{-7}, sendo inoculada em duplicado 100µl de cada uma das diluições num poço de uma placa P48, e um poço só com o meio independente de CO_2 com FBS a 2% (testemunho).

A placa foi incubada a 37ºC durante 30 minutos (adsorção viral), sendo de seguida adicionado 400µl de meio independente de CO_2 com FBS a 2% contendo 2% de Sephadex G50, que são esferas de agarose que permitem aos novos viriões produzidos, infectarem somente as células vizinhas, ao evitarem que se espalhem por toda a monocamada celular.

A P48 foi incubada a 37ºC durante 48 horas, posteriormente as células foram fixadas com formaldeído a 10 % (v/v) e incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos com agitação. De seguida, rejeitou-se o conteúdo dos poços, sendo estes lavados com água corrente.

A coloração das células foi feita utilizando cristal violeta a 0,2% durante 15 minutos, sendo em seguida a placa lavada com água corrente e posta a secar.

O cálculo da concentração de partículas virais foi feita utilizando a média do somatório das duas últimas diluições onde se contam placas (zonas de morte celular) e multiplicadas pelo inverso da diluição usada como inóculo. O resultado foi ainda multiplicado pelo inverso da fracção de mililitro usada, para se obter o título em unidades formadoras de placas (PFU).

3.5. Determinação da citotoxicidade dos extractos aquosos

A citotoxicidade dos extractos foi analisada pelo método MTT, que é um ensaio colorimétrico baseado na capacidade das células viáveis reduzirem metabolicamente o sal de tetrazolium, por meio da enzima mitocondrial desidrogenase sucínica, em cristais de formazam de cor azul-púrpura que se acumulam no citoplasma celular (Mosmann, T., 1983).

Em placas de 96 poços, foram colocadas $1x10^4$ células/poço ressuspendidas em 0,2 ml de meio independente de CO_2 com FBS a 10%. A placa foi incubada a 37ºC por um período de 24 horas, sendo depois o meio rejeitado dos poços por inversão de placa, para logo se adicionarem 4 réplicas de 0,2 ml de meio com das diferentes concentrações de cada extracto (10µg/ml a 2000µg/ml). Foram deixados poços só

com meio independente de CO_2 com FBS a 2%, que serviram de testemunhos. A placa voltou a ser incubada a 37ºC por 6 ou 48 horas, permitindo assim que os produtos actuassem na monocamada celular, sendo esta observada diariamente ao microscópio invertido para verificação de alterações morfológicas. Posteriormente, o meio com os extractos foram rejeitados e os poços lavados com meio independente de CO_2.

Foi adicionado a cada poço, 0,1 ml da solução de MTT diluída 1:10 em meio independente de CO_2 com FBS a 2%, partindo de uma solução de 5 mg/ml em água, sendo a placa novamente incubada a 37ºC durante 2 horas, de forma a permitir o metabolismo do MTT. Passado este tempo, a solução foi removida por inversão suave da placa e os cristais de formazan formados, foram ressuspendidos em 0,1 ml de DMSO. A placa foi incubada no escuro por 30 minutos, para que a dissolução dos cristais formados ocorresse.

Os poços foram analisados num espectrofotómetro com comprimento de onda de 570nm e filtro de referência de 630nm, onde os valores de absorvência foram considerados indicadores da viabilidade celular, tendo sido calculada a CMNC, CC10 e CC50, que correspondem a Concentração Máxima Não Citotóxica, concentração que inviabiliza 10% e 50% das células, respectivamente.

O ensaio foi realizado em triplicado para as 48 horas e uma única vez para as 6 horas, nas mesmas condições, tendo-se achado a média dos valores obtidos nas três experiências ± desvio padrão.

3.6. Actividade dos extractos aquosos sobre as partículas virais (Efeito Virucida)

Para avaliação do efeito virucida sobre o EMCV, foi determinada a capacidade do extracto aquoso inactivar directamente a partícula viral. Suspensões com 500µl de EMVC (10^6 pfu) foram incubadas sem extracto e com diferentes concentrações dos extractos, à temperatura ambiente durante 1 hora com agitação. Foram em seguida feitas diluições (10^0 a 10^{-5}) e as amostras foram inoculadas em placas para a quantificação do título viral. A percentagem de inibição viral foi calculada de acordo com Cheng et al. (2002): [1 – (título viral com o extracto aquoso) / (título viral do controlo)] x 100%.

O ensaio foi realizado em triplicado e os resultados expressos como a média das três experiências ± desvio padrão. Foram calculados os CI50 (concentração inibitória que reduz em 50% o título viral) e o IS (índice de selectividade) que constitui uma medida de comparação entre compostos que contrasta a capacidade da droga em inibir a

replicação viral, com o efeito tóxico no metabolismo celular do hospedeiro (IS= CC50/CI50) (Cos, P. et al, 2006).

Estas amostras também serviram para a análise de proteínas das partículas virais.

3.7. Efeito dos extractos aquosos no ciclo replicativo

Esta experiência foi realizada tendo em conta quatro vertentes: 1) recolha de amostras destinadas a microscopia electrónica de transmissão; 2) extracção de RNA para amplificação, por RT-PCR, de uma região do RNA viral presente nas células infectadas; 3) obtenção de lisados celulares para detecção de RNA viral por Dot-Blot e 4) avaliação do efeito dos extractos aquosos no ciclo replicativo, por titulação dos vírus produzidos.

Para tal inoculou-se 500µl de EMCV (10^6pfu) nos poços de uma placa P6 com uma monocamada subconfluente de células Vero, que foi incubada durante 1 hora a 4ºC (adsorção viral). De seguida a placa foi colocada a 37ºC por 30 minutos, sendo posteriormente retirado o inóculo (vírus não adsorvido). Os poços foram lavados com meio independente de CO_2 com FBS a 2%, para logo se adicionarem 2 ml dos extractos na concentração CMNC. A placa voltou a ser incubada a 37ºC durante 8 horas, sendo depois as células raspadas e aspiradas para um microtubo que foi a centrifugar a 3000*g* durante 5 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante e, nas amostras destinadas à microscopia ressuspendeu-se o *pellet* em glutaradeído a 3 % em tampão cacodilato de sódio (0,1M; pH 7.3), sendo este substituído após 24 horas, por tampão cacodilato. As amostras foram em seguida processadas e as imagens obtidas pelo Doutor António Pedro Alves de Matos (CESAM e Cooperativa de Ensino Superior – Egas Moniz); nas amostras destinadas à extracção de RNA foi adicionado o reagente TRIsure (Bioline), obtido um lisado por agitação forte em vortéx, e armazenadas a -80ºC, até o RNA ser extraído e purificado. Nas restantes amostras adicionou-se PBS e posteriormente foi feita a clarificação e titulação do vírus intracelular, como descrito anteriormente.

Foram também feitas colheitas de células infectadas após 16 e 24 horas de infecção, onde os extractos aquosos foram retirados dos poços após 8 horas de incubação, sendo substituídos por meio independente de CO_2 com FBS a 2%. No final das 16 e das 24 horas pós infecção, as células foram raspadas e aspiradas, tendo sido feita a separação do vírus extracelular (sobrenadante obtido no processo de clarificação) e intracelular (*pellet*) para titulação. Também foram retiradas amostras referentes às 16 horas para a extracção de RNA, seguindo os procedimentos acima descritos.

Foram feitos controlos de células não infectadas e de células infectadas sem incubação com extracto, sendo o ensaio realizado em triplicado nas mesmas

condições. Os resultados foram expressos em títulos e percentagem de inibição da produção de partículas virais infecciosas.

3.8. Análise das proteínas celulares e virais

Neste estudo foram utilizadas amostras obtidas no ensaio do efeito virucida. A electroforese foi realizada com o *kit* NuPAGE® Novex Midi Gels (Invitrogen™), usando o protocolo do fabricante e o equipamento Xcell SureLock™.

As amostras foram descongeladas, retirou-se 60 µl de cada uma delas e adicionou-se 30 µl de tampão de amostra 3x (NuPAGE® LDS Sample Buffer). De seguida, fez-se a desnaturação em banho seco, colocando as amostras a 70ºC durante 10 minutos ao fim dos quais permaneceram em gelo até à sua aplicação no gel (NuPAGE Novex 4 - 12% Bis-Tris Midi Gels). A electroforese foi realizada em tampão de corrida NuPAGE® MES SDS, durante 40 minutos a 200 Volts. Também foram aplicados no gel o marcador de massa molecular Novex Sharp Protein Standard (Invitrogen™), amostras de meio com FBS a 2% e de vírus não tratado.

A coloração foi feita com a solução de azul de Comassie, tendo o gel sido incubado *overnight*. Depois utilizou-se a solução de descoloração (10% ácido acético e 40% metanol).

3.9. Extracção de RNA e hibridação por Dot-Blot

A extracção de RNA foi efectuada com TRIsure (Bioline) e para a sua purificação utilizou-se o *kit* Direct-Zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research). Todos os procedimentos foram feitos seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. As amostras de RNA (45µl) foram distribuídas em alíquotas e congeladas a -80ºC até posterior utilização. Foi feita uma electroforese em gel de agarose para averiguar a integridade do RNA.

O Dot Blot é uma técnica utilizada para detectar biomoléculas, que consiste na sua imobilização (no nosso caso, RNA) em suporte adequado (frequentemente membrana de nylon), por aplicação directa de um pequeno volume de amostra e posterior detecção por sonda/s. Foram aplicadas amostras do ciclo replicativo colhidas às 8H, 16H, 24H (células com vírus intracelular) e 24H (sobrenadantes das culturas com vírus extracelular), amostras de RNA extraídos às 8H e 16H pós infecção e 2 amostras de RNA controlo, previamente diluídas com SSC (Solução de citrato de sódio) 6X, a partir de uma solução de SSC 20X (NaCl 3M, citrato de sódio 0,3 M pH 7.0). As amostras com os extractos foram tratadas com proteinase K a 20mg/ml (concentração final de 0,5mg/ml). Todas as amostras foram desnaturadas a 70ºC durante 10 minutos e colocadas a seguir em gelo até a sua aplicação. Embebeu-se a membrana em SSC

6X, tendo esta sido colocada sobre papel de filtro Whatman 3MM™ seco no interior do sistema.

Aplicou-se primeiro 400µl de SSC 6X e ligou-se o vácuo para se confirmar a funcionalidade do sistema. Após sucção, aplicou-se cada amostra na respectiva fenda, incluindo o controlo negativo (SSC 6X) e quando se completou a filtração das mesmas, desmontou-se o sistema, tendo logo em seguida sido removida a membrana. Esta foi colocada durante 2 minutos em papel de filtro Whatman 3MM™ saturado de solução desnaturante (1,5M NaCl, 0,5M NaOH) e posteriormente 2 minutos em papel de filtro Whatman 3MM™ saturado de solução neutralizante (Tris HCl 1M pH 7.0, NaCl 1,5M, EDTA 1mM). Por fim, secou-se a membrana à temperatura ambiente e fixou-se o RNA durante 1hora numa estufa a 80ºC. Conservou-se a membrana a 4ºC até a sua hibridação.

Para a hibridação foi utilizado o *kit* de marcação, hibridação e detecção Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter *Kit* I (Roche). A técnica de marcação utilizada baseia-se na incorporação de nucleótidos marcados com digoxigenina em DNA sintetizado de novo, com primers ao acaso, tendo como molde uma molécula específica de DNA desnaturado. A sonda marcada foi um fragmento de cDNA (produto de RT-PCR) do EMCV amplificada com os *primers* EMCV-F (TGGTGTCTTTGGTGCGGCCC) e EMCV-R (TGTCTCGTGCCGGAGGCCAT), que flanqueiam parte da região VP2 do genoma deste vírus (Carvalho, A., 2011). Foi feita uma pré-hibridação com o objectivo de bloquear locais de ligação inespecíficos na membrana. A imunodetecção da sonda, baseou-se na utilização de um anticorpo específico anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina (anti-Dig-AP). O protocolo utilizado nesta técnica seguiu as instruções do fabricante.

3.10. Amplificação por RT- PCR

Nesta técnica utilizou-se o *kit* OneStep RT-PCR (Qiagen) e a mistura de reacção de 5µl contendo 1µl de RNA e os *primers* EMCV-F e EMCV-R referidos anteriormente, seguiu o protocolo do fabricante. Esta mistura foi submetida às seguintes condições de amplificação: 30 minutos (50ºC) para a activação da transcriptase reversa, 15 minutos (95ºC) para a inactivação da transcriptase reversa e activação da HotStarTaq, acompanhada da desnaturação do cDNA, seguindo-se 34 ciclos de desnaturação (30 segundos a 94ºC), hibridação com os primers (30 segundos a 57ºC) e polimerização do DNA (1 minuto a 72ºC), terminando-se com um passo final de polimerização a 72ºC durante 10 minutos. As amostras amplificadas, foram submetidas a uma electroforese em gel de agarose (1%) com marcador de massa molecular 1Kb GeneRuler

(Fermentas) e sujeitas a uma corrente eléctrica de 70mA, durante 50 minutos. Os géis foram fotografados com uma câmara DC 120 Zoom Digital (Kodak Digital Science).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade é um conjunto de alterações da homeostase celular que leva a uma série de modificações que irão interferir na capacidade adaptativa das células, bem como na sobrevivência, multiplicação e realização das suas funções metabólicas (Nardone R.M.,1977). Desta forma, perante uma amostra citotóxica pode ser observada a desorganização da monocamada celular, acompanhada do aspecto granuloso e arredondado das células. A intensidade da lesão dependerá da concentração do material testado, o tempo de exposição, o tipo de célula, entre outras (Ekwall, B. et al, 1990). Os testes de citotoxicidade *in vitro* são essenciais para verificar a toxicidade de novos compostos na fase inicial de desenvolvimento de drogas antivirais, pois o equilíbrio entre os efeitos farmacológicos e toxicológicos é um requisito importante para a sua aplicabilidade como agente terapêutico (Cos, P. et al, 2006).

Não foi possível determinar com rigor a CMNC de cada extracto a partir do seu perfil de citotoxicidade, por este não ser muito coerente. As incoerências devem-se a dificuldade em distribuir células uniformemente nos poços de uma P96, pelo facto dos próprios compostos também absorverem radiação no comprimento de onda utilizado e fundamentalmente pelos valores estarem nos extremos da recta. Adoptou-se a CC10 como o valor mais próximo à CMNC, e determinou-se este e o CC50 de cada extracto (Quadro1) através de uma linha de tendência/regressão linear (Anexos 1 e 2).

Quadro 1: Valor da CC10 e CC50 para os extractos aquosos estudados

Extracto	Tempo de incubação	CC10 (µg/ml)	CC50 (µg/ml)
E3	6 horas	>700	--------
	48 horas	750±0,02	1000±0,04
E4	6 horas	300	450
	48 horas	100±0,05	400±0,02
E6	6 horas	150	220
	48 horas	100±0,03	270±0,02
E8	6 horas	1000	--------
	48 horas	850±0,02	>2000±0,05

O ensaio do MTT mostrou que não há uma diferença muito significativa no perfil de citotoxicidade dos extractos entre as exposições de 6 e 48 horas (Figs.6 a 9). Tomou-se como linha de referência a incubação de 48 horas, de forma a obter uma maior segurança a nível dos métodos estatísticos.

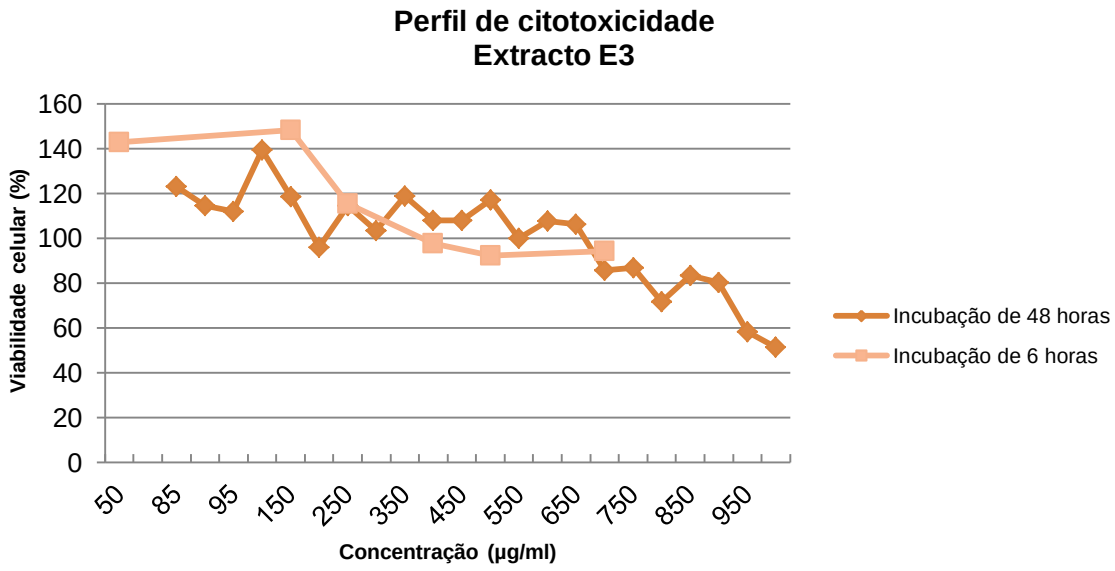


Fig.6 – Perfil de citotoxicidade do extracto aquoso de *Helichrysum italicum* (flores) em células Vero, após 6h e 48h de incubação.

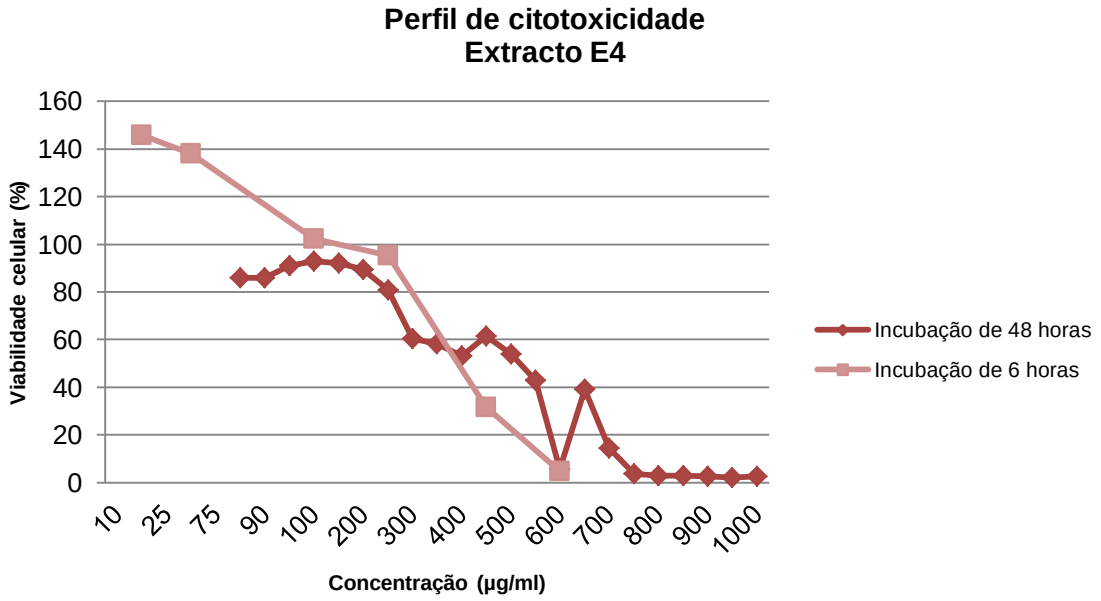


Fig.7 – Perfil de citotoxicidade do extracto aquoso de *Helichrysum italicum* (caules e folhas) em células Vero, após 6h e 48h de incubação.

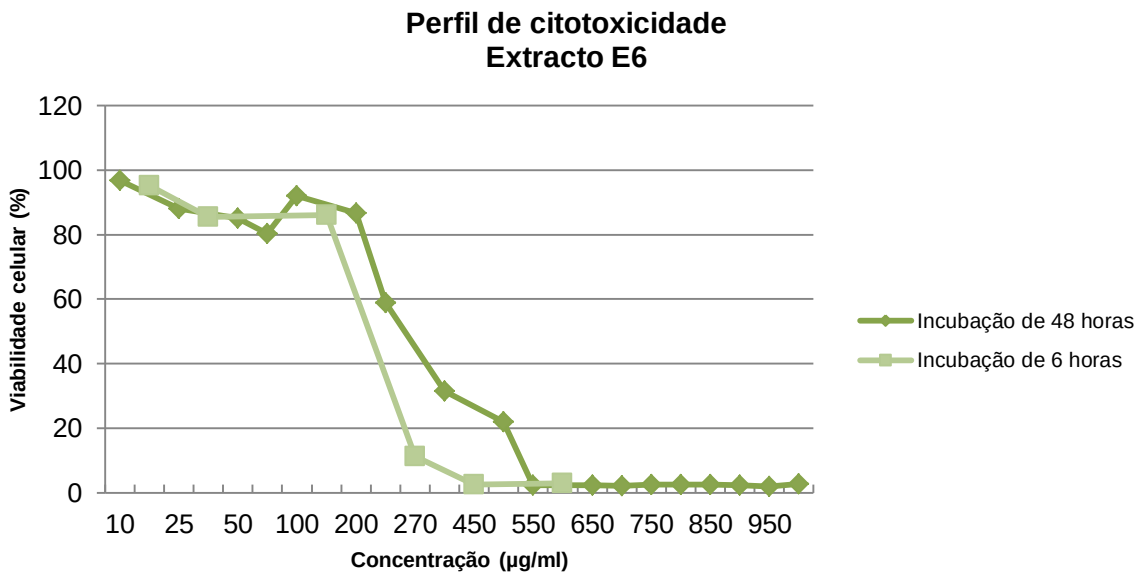


Fig.8 – Perfil de citotoxicidade do extracto aquoso de *Solidago virgaurea* (caules e folhas) em células Vero, após 6h e 48h de incubação.

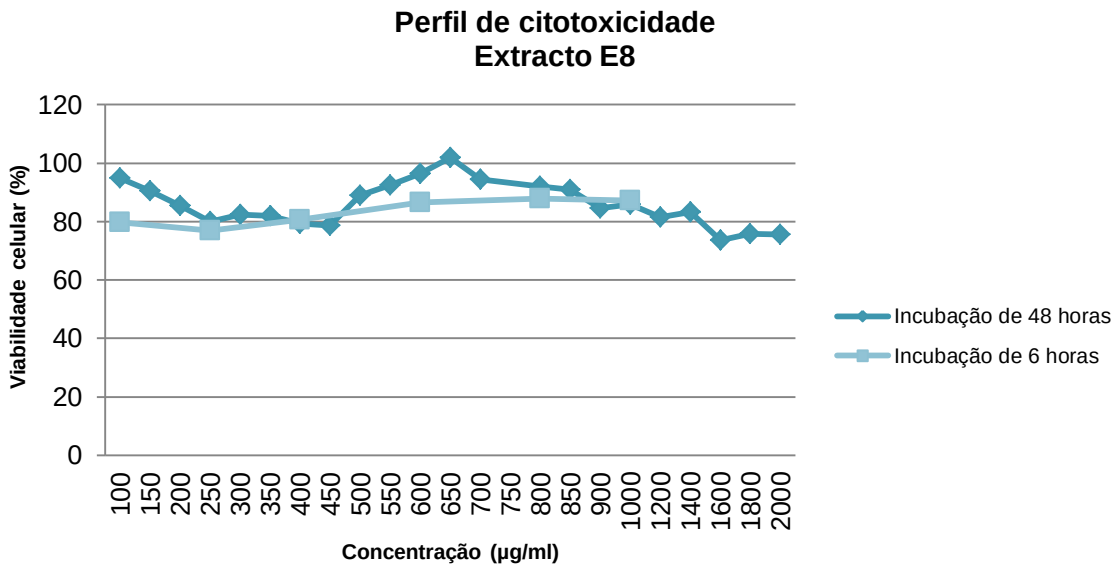


Fig.9 – Perfil de citotoxicidade do extracto aquoso de *Santolina impressa* (flores) em células Vero, após 6h e 48h de incubação.

O extracto E3 e E8 apresentaram uma CC10 de 750±0,02µg/ml e 850±0,02µg/ml, respectivamente. Tanto o extracto E4 como o extracto E6, exibiram um CC10 de 100µg/ml (Quadro 1).

No geral, o extracto E6 foi o mais citotóxico com CC50 igual a 270±0,02µg/ml, seguido do extracto E4 com CC50 igual a 400±0,02µg/ml. Os extractos E3 e E8 foram os menos citotóxicos com CC50 igual a 1000±0,04µg/ml e >2000±0,05µg/ml respectivamente (Quadro1).

A comparação destes resultados com os encontrados na literatura é dificultada por inúmeros factores, tais como modelo celular utilizado, tipo de extracto/composto, parte da planta utilizada, ano de colheita das plantas, diferentes tempos de incubação, etc., que variam de estudo para estudo.

Os extractos E4 e E6 demonstraram efeitos citotóxicos mais baixos (CC50<500µg/ml), comparando com resultados de outros estudos em células Vero com plantas da família Bignoniaceae, onde foram testados 18 extractos etanólicos com actividade antiviral contra os vírus HSV1, Vaccinia e EMCV (Brandão, G.C. et al, 2010, 2011). Os extractos etanólicos não apresentaram citotoxicidade até a concentração de 500µg/ml, à semelhança dos extractos E3 e E8.

Faccin, L.C. et al (2008) no estudo da clorofilina (derivado sintético da clorofila) como inibidor da multiplicação de poliovírus (também um *Picornaviridae*) em células HEp-2, obtiveram CC50 <25µg/ml após 5 dias de incubação com o derivado sintético.

Astani, A. et al (2011) avaliou a actividade antiviral de sesquiterpenos (constituintes de óleos essenciais) contra a infecção do HSV1 em células Vero, onde obtiveram valores de CMNC≤100µg/ml.

Resende, F. (2012) utilizou no seu estudo de actividade anti-herpética, os extractos aquosos E3, E4 e E6 em células Vero, tendo obtido valores de CC50 de 830µg/ml para o extracto E3 e 600µg/ml para o extracto E4 relativamente próximos aos obtidos neste estudo, excepto para o extracto E6 que obteve um CC50 de 710µg/ml.

4.2. Efeito virucida

Para avaliar se os extractos aquosos apresentavam um potencial antiviral, estudou-se o efeito destes directamente nas partículas virais (efeito virucida), com concentrações quer inferiores quer superiores à CC10 (Anexos 3). A diminuição das concentrações teve como finalidade saber até onde se pode reduzir a concentração sem que haja perda da actividade antiviral, de modo a que se possa trabalhar com menores concentrações do extracto.

A determinação do título viral foi feita através do ensaio de redução de placas virais em células Vero, e expresso em percentagem de redução da infecciosidade do EMCV (Fig. 10) em relação ao controlo (vírus não tratado).

Todos extractos exibiram uma percentagem de inibição da infecciosidade ≥50% com concentrações inferiores à CC10, excepto o extracto E6 que só atingiu aproximadamente 50% de inibição com a dose correspondente ao CC50 (Fig.10). Numa primeira abordagem, o extracto E6 mostrou não ter efeito directo sobre as partículas virais, enquanto que os restantes extractos evidenciaram uma percentagem de inibição da infecciosidade moderada.

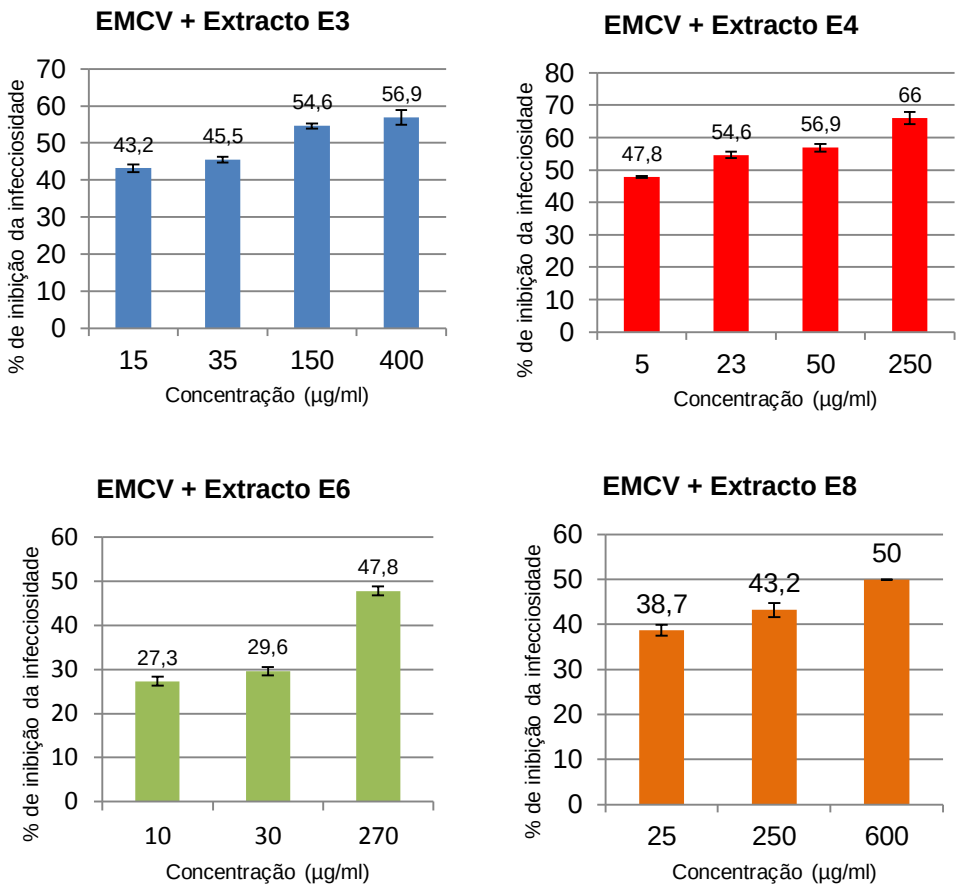


Fig.10 – Representação gráfica da percentagem de inibição da infecciosidade do EMCV pelos diferentes extractos aquosos estudados.

A determinação da concentração inibitória de 50% da produção de partículas virais (CI50), mostrou que o extracto E4 é o mais eficaz, pois é aquele que apresenta o CI mais baixo, seguido do extracto E3 (Quadro 2). Com base nos valores de CC50 e CI50, foi calculado o valor do Índice de Selectividade (IS) que representa o grau de segurança para a utilização de uma substância *in vitro*. Este parâmetro farmacológico foi calculado através da razão entre o CC50 e o CI50 de cada extracto.

O extracto E4 apresentou um IS igual a 80, seguido do extracto E3 com IS igual a 28,5. Embora não tenha sido possível determinar o CC50 do extracto E8, podemos afirmar que o seu IS será superior ao IS estimado. O extracto E6 apresentou um IS igual a 1, comprovando realmente que não possui efeito virucidal (Quadro 2).

Os IS encontrados neste trabalho são elevados quando comparados com valores encontrados por outros autores com os mesmos extractos mas diferentes vírus (Resende, F., 2012).

Quadro 2: Valores de CC50, CI50 e IS

Extractos	CC50 (µg/ml)	CI50 (µg/ml)	IS
E3	1000	35	28,5
E4	400	5	80,0
E6	270	270	1,0
E8	>2000	600	>3,3

4.3. Acção dos extractos no ciclo replicativo

Foi feito um estudo do efeito destes extractos no ciclo replicativo deste vírus. Foram usadas concentrações inferiores à CC10 (Anexo 4), pelos motivos referidos no ponto anterior.

Todos os extractos exibiram uma percentagem de inibição na produção de vírus intracelular >58% considerando o vírus intracelular detectado às 8 horas pós infecção, tendo o extracto E6 atingido 99% de inibição. Às 16 e 24 horas pós infecção, ocorreu um decréscimo na percentagem de inibição na produção do vírus intracelular, mas mesmo assim o extracto E6 manteve com uma percentagem de inibição >90%. Contabilizando o vírus total (EMCV intracelular + EMCV extracelular) colhido às 24 horas pós infecção, todos os extractos apresentaram percentagens de inibição >45%, onde o extracto E6 atingiu 96,8% de inibição na produção de vírus (Fig. 11).

Apesar do extracto E6 não ter efeito virucida aceitável, ficou comprovado neste trabalho que actua no ciclo replicativo deste vírus, apresentando uma inibição elevada. Tendo em conta a forma como estas experiências foram realizadas, sendo os extractos adicionados às células infectadas apenas 30 minutos após o período de adsorção, pressupõem-se que haja entrada do vírus, mas que por qualquer motivo este seja impedido de replicar correctamente. Este ensaio é bastante significativo, pois permite saber se um extracto tem actividade inibitória após a entrada do vírus na célula. Neste caso permite ainda saber que esse efeito actua sobre a formação de partículas virais infecciosas, mesmo sem evidenciar o efeito virucida.

A presença de RNA viral na cápside é necessária para que ocorra a fase de maturação (fase necessária para a geração das partículas virais infecciosas), onde a proteína VP0 é clivada para formar as proteínas VP2 e VP4. Esta clivagem é considerada autocatalítica e poderá resultar do local de activação das moléculas de água por um resíduo de histidina que se encontra na proteína VP2 (Carocci,M. et al, 2012). Existe a possibilidade do extracto 6 estar a actuar a nível da proteína VP0, evitando assim a sua clivagem.

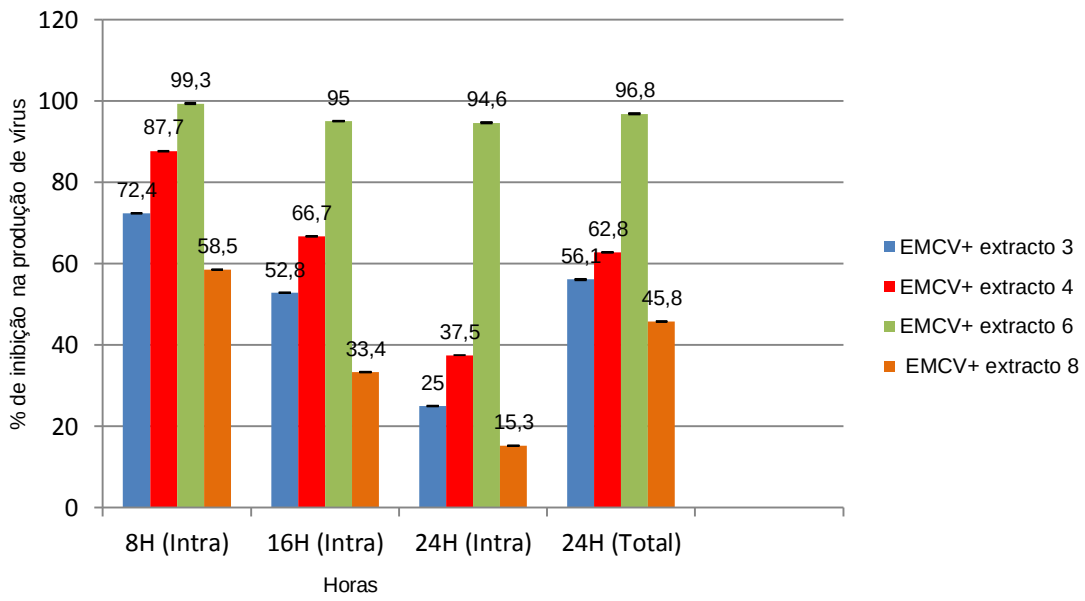


Fig. 11 – Representação gráfica do efeito dos extractos aquosos no ciclo replicativo (Extracto E3: 150µg/ml; extracto E4: 50µg/ml; extracto E6: 10µg/ml; extracto E8: 250µg/ml).

A nível da microscopia electrónica de transmissão não foi possível notar qualquer diferença entre as células infectadas na ausência e na presença do extracto 6 (Fig.12).

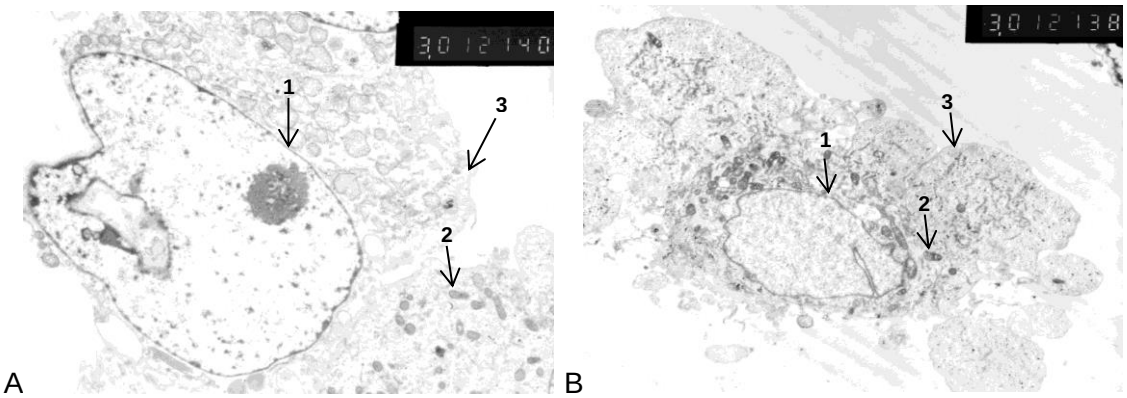


Fig.12 – Células Vero infectadas com EMCV na presença do extracto E6 após 8h de incubação. (A) Células infectadas na ausência do extracto; (B) Células infectadas na presença do extracto; (1) Núcleo; (2) Mitocôndrias; (3) Citoplasma. Fotografia cedida pelo Professor Doutor A.P. de Matos.

4.4. Análise de proteínas virais

Estudos recentes sugerem que a capacidade do EMCV interagir com os resíduos de ácido siálico presentes na superfície celular pode influenciar na ocorrência da infecção, bem ora esta ligação ao ácido siálico não seja necessária em todas estirpes do EMCV. A proteína viral da cápside VP1 está relacionada com a virulência do vírus, pois serve de ligação ao receptor celular e é essencial para que ocorra a adsorção e a entrada do vírus no interior da célula. Mutações que alterem as proteínas da cápside também podem ser deletérias para a montagem das partículas virais, atrasando assim a sua saída da célula, o que provavelmente irá atenuar a sua virulência (Carocci, M. et al, 2012).

Para avaliar uma eventual acção dos extractos nas proteínas das partículas virais, foram feitas electroforeses com as amostras provenientes das experiências de avaliação do efeito virucida (Anexos 3), na qual se utilizou o tampão MES.

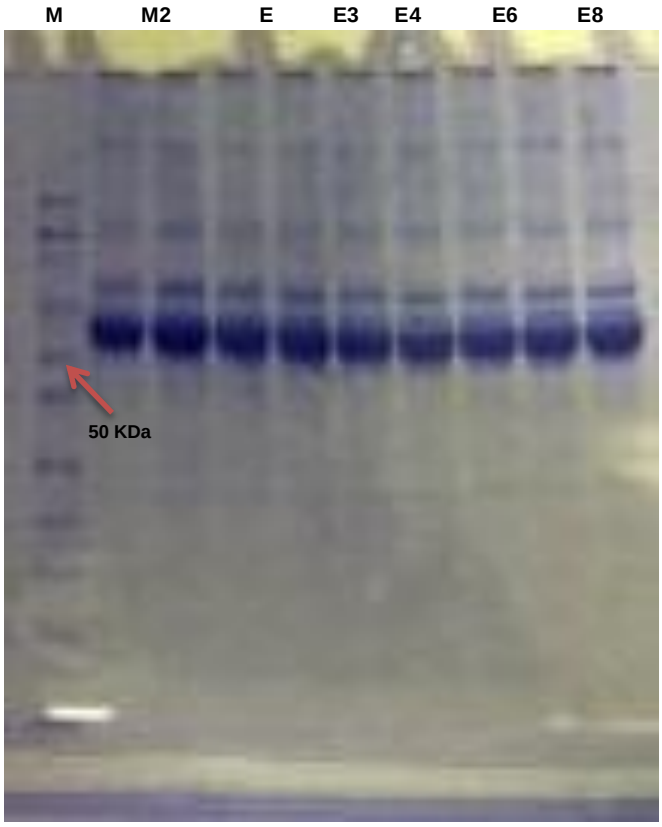


Fig. 13 – Electroforese de proteínas com o *kit* NuPAGE® Novex Midi Gels (Invitrogen™) em tampão MES. (M) Marcador de massa molecular Novex Sharp Protein Standard (Invitrogen™); (M2) Meio CO_2 independente com 2% de FBS. Proteínas de partículas virais incubadas nas seguintes condições: (E) sem extracto (controlo), (E3) com E3 a 150µg/ml; (E4) com E4 a 50µg/ml; (E6) com E6 a 10µg/ml; (E8) com E8 a 250µg/ml. Gel corado com azul de Coomassie.

Não se observou diferenças nítidas no perfil geral dos polipeptídeos entre o controlo (vírus não tratado) e vírus tratados com os extracto (Fig. 13). Ocorreram duas bandas comuns a todas as amostras com cerca de 55 KDa e 70 KDa que são proteínas presentes no meio de cultura com soro fetal bovino. As proteínas do EMCV são todas <52 KDa (Chiu, C.Y. et al, 2008; Carocci, M. et al, 2012), o que implica que as bandas mais visíveis (com massas moleculares mais elevadas) no gel devem ser relativas ao meio de cultura ou contaminantes celulares, uma vez que os viriões utilizados neste trabalho não foram purificados.

É possível afirmar que o não aparecimento destas proteínas no gel, não é devida a acção dos extractos, já que o controlo também não apresenta as bandas relativas a estas proteínas. A técnica utilizada para a detecção destas proteínas não apresentou a sensibilidade adequada, o que deverá ser analisado em estudos posteriores. A escolha da metodologia de visualização de proteínas depende, entre outros factores, da quantidade de proteína presente na amostra. A coloração com azul de Coomassie

ainda que apresente uma gama de linearidade entre a intensidade do sinal e a concentração de proteínas bastante específica é pouco sensível, não devendo ser aplicada em amostras com pouca quantidade de proteína.

4.5. Detecção de RNA viral por Dot-Blot e por RT-PCR

O processo de extracção de RNA é essencial para a execução de diversas análises da expressão génica. Para a obtenção de bons resultados, é vital que o RNA além de puro, esteja na sua forma mais integra possível, pois moléculas fragmentadas originam dados de baixa qualidade e pouco confiáveis, em especial nas técnicas quantitativas.

Após a extracção e purificação do RNA em células infectadas tratadas e não tratadas com os extractos, foi feita uma electroforese em gel de agarose para confirmar a integridade do RNA obtido. Como se observa na Fig.14, o RNA extraído com o reagente TRIsure e o *kit* Direct-Zol™RNA MiniPrep (Zymo Research) foi de boa qualidade.

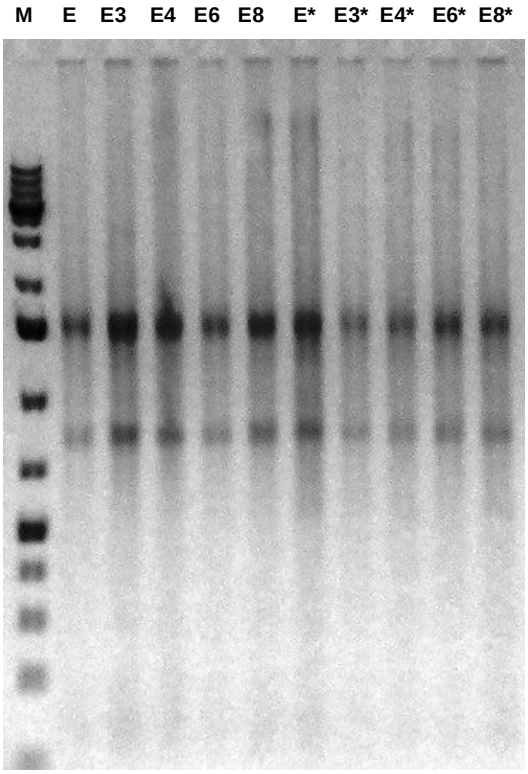


Fig. 14 – Electroforese de RNA intracelular extraído de amostras do ciclo replicativo às 8 e 16 horas pós infecção. (M) Marcador de massa molecular Hyperladder I (Bioline); (E) Controlo (incubado sem extracto) 8H; (E3) Extracto E3 8H; (E4) Extracto E4 8H; (E6) Extracto E6 8H; (E8) Extracto E8 8H; (E*) EMCV 16H, controlo; (E3*) Extracto E3 16H; (E4*) Extracto E4 16H; (E6*) Extracto E6 16H; (E8*) Extracto E8 16H.

Relativamente a amplificação de uma parte da região VP2 do genoma do EMCV com o *kit* OneStep RT-PCR, todas as amostras de RNA ensaiadas amplificaram com elevada sensibilidade e especificidade e um alto rendimento. No geral, notou-se um

pequeno aumento do produto de PCR amplificado com o RNA extraído às 16 horas pós infecção.

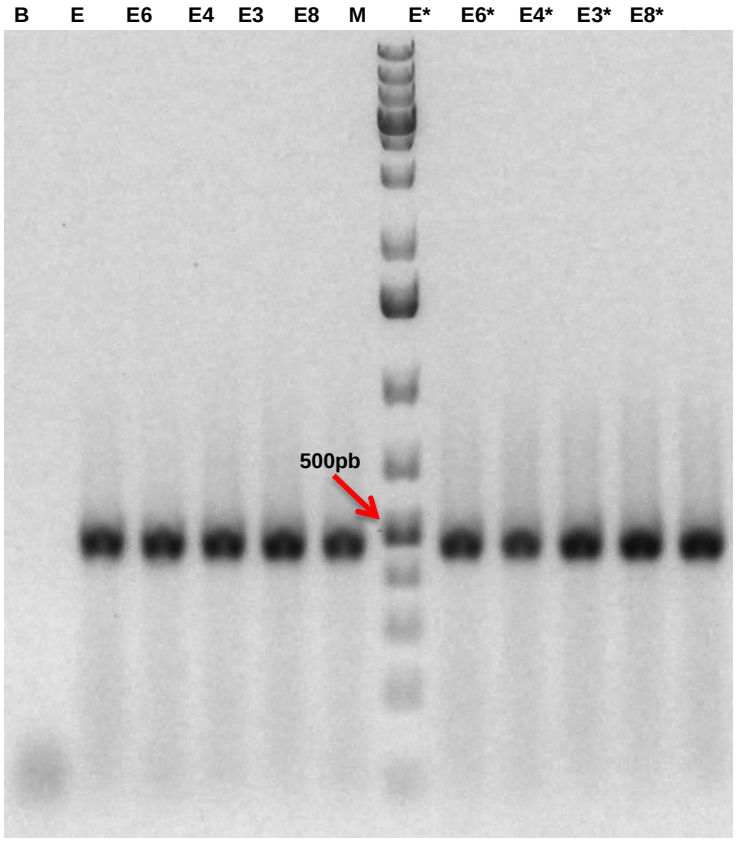


Fig.15 – Electroforese dos produtos de RT-PCR amplificados a partir de amostras de RNA obtidas nas condições indicadas nesta legenda. (B) Branco (controlo da mix); (M) Marcador de massa molecular - 1 Kb GeneRuller (Fermentas); (E) EMCV 8H, controlo; (E3) Extracto E3 8H; (E4) Extracto E4 8H; (E6) Extracto E6 8H; (E8) Extracto E8 8H; (E*) EMCV 16H, controlo; (E3*) Extracto E3 16H; (E4*) Extracto E4 16H; (E6*) Extracto E6 16H; (E8*) Extracto E8 16H.

Os resultados sugerem que houve amplificação em todas as amostras, de uma banda com cerca de 500pb, comprovando que os extractos aquosos ensaiados não actuam a nível da síntese de RNA (Fig. 15).

Gasparian, A.V. et al (2010) no seu estudo com a quinacrina (derivado da 9-aminoacridina – 9AA) como inibidor da produção de proteínas virais e da síntese de RNA viral, em células HeLa infectadas com EMCV e poliovírus, mostrou que este derivado suprime a síntese de RNA viral, actuando a nível da sequência IRES.

Não foi possível analisar adequadamente os resultados da hibridação do RNA transferido por Dot-blot devido a uma falha que ocorreu durante a execução da técnica, embora em algumas partes da membrana tenha sido possível observar hibridação com o RNA intracelular colhido às 16 e 24 horas pós infecção, quer de células incubadas com os extractos, quer de células não tratadas (resultados não apresentados). Esta experiência não foi repetida, uma vez que os resultados estão de acordo com os obtidos por RT-PCR.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A família *Picornaviridae* abrange um extenso número de vírus com elevado interesse clínico quer na medicina humana como na medicina animal, causando significativa morbilidade e mortalidade.

Durante as últimas décadas, vários trabalhos demonstraram a actividade antiviral de extractos vegetais pertencentes a família Asteraceae sobre o HIV, HSV 1 e 2, vírus Coxsackie e vírus Influenza A (Appendino, G. et al, 2007;Lourens, A.C.U. et al, 2088 Demir, H. et al, 2009; Rivero-Guerra, A.O., 2010). Com efeito, quando se pretende desenvolver um agente antiviral é necessário ter em conta que a molécula deve ser activa para várias estirpes, deve apresentar biodisponibilidade sistémica e deve ser absolutamente segura (Cos, P., et al, 2006).

Os extractos aquosos de flores de *Helichrysum italicum* (E3) e de flores de *Santolina impressa* (E8) apresentaram reduzida citotoxicidade em células Vero. O extracto aquoso de folhas e caules de *Solidago virgaurea* (E6) foi o mais citotóxico, seguido do extracto de folhas e caules de *Helichrysum italicum* (E4).

O extracto aquoso de folhas e caules de *Solidago virgaurea* (E6) foi o único que não apresentou efeito directo (inibição da infecciosidade superior a 50%) sobre as partículas virais. Os restantes apresentaram índices de selectividade satisfatórios, tendo o extracto E4 obtido o maior IS (80,0), indicando a existência de uma boa relação entre a actividade antiviral desejável e os efeitos citotóxicos adversos.

Relativamente ao efeito dos extractos no ciclo replicativo, todos actuaram eficazmente quando utilizados em concentrações próximas à CMNC, tendo o extracto de folhas e caules de *Solidago virgaurea* (E6) sido o mais eficaz, com inibições na produção de vírus ≥95%. A existência de extractos com mecanismos de acção diferentes pode ser importante, já que ajuda a prevenir a resistência, criando mais do que um ponto de acção contra à infecção viral. O extracto de folhas e caules de *Solidago virgaurea* (E6), apesar de não efeito virucida, actua significativamente na fase de replicação viral.

A amplificação de RNA extraído de células infectadas tratadas e não tratadas com os extractos, por RT-PCR, com *primers* específicos para parte da região da proteína VP2, mostrou que estes extractos não afectam a síntese de RNA viral.

Esta é a primeira vez que se relata a actividade antiviral de extractos aquosos de espécies da família Asteraceae frente ao EMCV. Mais estudos devem ser feitos de modo a entender o mecanismo de acção destes extractos no processo infeccioso, utilizando técnicas sensíveis para a quantificação de proteínas e RNA.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdallah, F.M., Sobhy,H., Enan, G. 2013. Evaluation of antiviral activity of selected anise oil as an essential oil against bovine herpes virus-1 *in vitro*. Global Veterinaria. 10(5): 496 – 499.

Acheson, N.H. 2007. Fundamentals of molecular virology. Wiley. USA.

Adams, M.J., Carstens, E.B. 2012. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch.Virol. 157(7): 1411 – 1422.

Ahmad, A., Davies, J., Randall, S., Skinner, G.R.B. 1996. Antiviral properties of extract of opuntia streptacantha. Antiviral Research. 30: 75 – 85.

Appendino, G., Ottino, M., Marquez, N., Bianchi, F., Giana, A., Ballero, M., Sterner, O., Fiebich, B.L., Munoz, E.2007. Arzanol, an Anti – inflammatory and Anti-HIV-1 Phloroglucinol α – Pysone from *Helichrysum italicum* ssp. *mycrophyllum*. J.Nat.Prod. 70: 608 – 612.

Aslan, M., Orhan, D.D., Orhan, N., Sezik, E., Yesilada, E. 2007. In vivo antidiabetic ans antioxidant potential of *Helichrysum plicatum* ssp. *plicatum* capitulums in streptozotocin-induced.diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology. 109: 54 – 59.

Astani, A., Reichling, J., Schnitzler, P. 2011. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. Evidence based complementary and alternative medicine. Article ID 253643. pp. 8 – 15.

Ávila-Pires, F.D. 1989. Zoonoses: Hospedeiros e reservatórios. Cadernos de Saúde Pública. 5(1): 82 – 97.

Bai, J., Jiang, K., Zhang, G., Wang, X., Li, Y., Jiang, P. 2012. Pathogenicity and molecular analysis of an Encephalomyocarditis virus isolate from mideastern China. The Canadian Journal of Veterinary Research. 76: 157 – 160.

Billinis, C. 2009. Encephalomyocarditis virus infection in wildlife species in Greece. Journal of Wildlife Diseases. 45(2): 522 – 526.

Brandão, G.C., Kroon, E.G., Santos, J.R., Stehmann, J.R., Lombardi, J.A., Oliveira, A. B. 2011. Antiviral activity of plants occurring in the state of Minas Gerais (Brazil): Part III. J.Chem.Pharm.Res. 3(4): 223 – 236.

Brandão, G.C., Kroon, E.G., Santos, J.R., Stehmann, J.R., Lombardi, J.A., Oliveira, A. B. 2011. Antiviral activity of plants occurring in the state of Minas Gerais (Brazil): Part II – Screening *Bignoniaceae* species. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 20(5): 742 – 750.

Canelli, E., Luppi, A., Lavazza, A., Lelli, D., Sozzi, E., Martin, A.M.M., Gelmetti, D., Pascotto, E., Sandri, C., Magnone, W., Cordioli, P. 2010. Encephalomyocarditis virus infection in an Italian Zoo. Virology Journal. 7: 64.

Carocci, M., Bakkali-Kassimi, L. 2012. The Encephalomyocarditis virus. Virulence. 3(4): 351 – 367.

Carvalho, A. 2011. Rastreio Virológico em espécies selvagens de roedores pertencentes à fauna portuguesa. Mestrado em Microbiologia Aplicada. FCUL.

Cheng, H.Y., Lin, C.C., Lin,T.C. 2002. Antiherpes simplex virus type 2 activity of casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* Linn. Antivir.Res. 55: 447 – 455.

Chiu, C.Y., Greninger, A.L., Kanada, K., Kwok, T., Fischer, K.F., Runckel, C., Louie, J.K., Glaser, C.A., Yagi, S., Schnurr, D.P., Haggerty, T.D., Parsonnet, J., Ganem, D., DeRisi, J.L. 2008. Identification of cardioviruses related to Theiler's murine Encephalomyelitis virus in human infections. PNAS. 105(37): 14124 – 14129.

Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., Florou-Paneri, P. 2012. Aromatic plants as a source of bioactive compounds. Agriculture. 2: 228 – 243.

Cos, P., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., Maes, L. 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro "proof-of-concept". Journal of Ethnopharmacology. 106: 290 – 302.

De Palma, A.M., Vligen, I., Clercq, E., Neyts, J. 2008. Selective inhibitors of Picornavirus replication. Med.Res.Rev. 28(6): 823 – 884.

Demir, H., Açik, L., Bali, E.B., Koç, L.Y., Kaynak, G. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of *Solidago virgaurea* extracts. African Journal of Biotechnology. 8(2): 274 – 279.

Denis, P., Liebig, H.D., Nowotny, N., Billinis, C., Papadopoulos, O., O'Hara, R.S.,Knowles, N.J., Koenen, F. 2006. Genetic variability of Encephalomyocarditis virus (EMCV) isolates. Veterinary Microbiology.113: 1 – 12.

Ekwall, B., Silano,V., Pagunuzzi – Stammati, A., Zucco, F. 1990. Toxicity tests with mammalian cell cultures. In: Bourdeau, P. et al (Eds). Short term toxicity tests for non-genotoxic effects. Scope. Jonh Wiley ans Sons Ltd. Pp. 75 – 97.

Faccin, L.C., Medeiros, J.A.R., Mantovani, M.S., Nozawa, C., Linhares, R.E.C. 2008. Clorofilina inibe a multiplicação de Poliovírus em cultura de células HEP- 2. Ciências Biológicas e da Saúde. 29(1): 75 – 82.

Figueiredo, A.C., Barroso, J.C., Pedro, L.G. 2007. Plantas aromáticas e medicinais: Factores que afectam a produção. Em: Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais. Curso teórico-prático. 3ª ed. FCUL. pp. 19 – 28.

Freshney, R.I. 1987. Culture of animal cells – A manual of basic technique. 2nd edition. Wiley – Liss. New York.

Gasparian, A.V., Neznanov, N., Jha, S., Galkin, O., Moran, J.J., Gudkov, A.V., Gurova,K.V., Komar, A.A. 2010. Inhibition of Encephalomyocarditis virus and Poliovirus replication by quinacrine: Implications for the design and discovery of novel antiviral drugs. Journal of Virology. 84(18): 9390 – 9397.

Guillemard, E., Geniteau-Legendre, M., Kergot, R., Lemaire, G., Petit, J.F., Labarre, C., Quero, A.M. 1996. Activity of nitric oxide-generating compounds against

Encephalomyocarditis virus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 40(4): 1057 – 1059.

Gupta, P., Bajpai, S.K., Chandra, K., Singh, K.L., Tandon, J.S. 2005. Antiviral profile of *Nyctantes arbortristis* L. against encephalitis causing viroses. Indian J.Exp.Biol. 43(12): 1156 – 1160.

Himeda, T., Ohara, Y. 2012.Saffold virus, a novel human with unknown pathogenicity. Journal of Virology. 86(3): 1292 – 1296.

Jones, M.S., Lukashov, V.V., Ganac, R.D., Schnurr, D.P. 2007. Discovery of a novel human picornavirus in a stool sample from a pediatric patient presenting with fever of unknown origin. J.Clin. Microbiol. 45: 2144 – 2150.

Kamińska, T., Kaczor, J., Rzeski, W., Wejksza, K., kandefer-Szerszeń, M., Witek, M. 2004. A comparison of the antiviral activity of three triterpenoids isolated from *Betula alba* bark. Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska. Vol.LIX (section c).

Koenen, F., Vanderhallen, H., Dickinson, N.D., Knowles, N.J. 1999. Phylogenetic analysis of European Encephalomyocarditis viruses: comparison of two genomic regions. Arch.Virol. 144: 893 – 903.

Kuo, Y.C., Lin, L.C., Tsai, W.J., Chou, C.J., Kung, S.H., Ho, Y.H. 2002. Samarangenin B from *Limonium sinense* suppresses Herpes simplex virus type 1 replication in vero cells by regulation of viral macromolecular synthesis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 46(9): 2854 – 2864.

LaRue, R., Myers,S., Brewer, L., Shaw, D.P., Brown, C., Seal, B.S., Njenga, M.K. 2003. A wild type porcine Encephalomyocarditis virus containing a short poly (C) tract is pathogenic to mice, pigs and cynomolgus macaques. Journal of Virology. 77(17): 9136 – 9146.

Lau, S.P.K., Woo, P.C.Y., Yip, C.C.Y., Choi, G.K.Y., Wu, Y., Bai, R., Fan, R.Y.Y., Lai, K.K.Y., Chan, K.H., Yuen, K.Y. 2012. Identification of a novel feline picornavirus from the domestic cat. Journal of Virology. 86(1): 395 – 405.

Lourens, A.C.U., Viljoen, A.M., Van Heerden, F.R. 2008. South African *Helichrysum* species: A review of the traditional uses, biological activity and phytochemistry. Journal of Ethnopharmacology. 119: 630 – 652.

Morone-Fortunato, I., Montemurro, C., Ruta, C., Perrini, R., Sabetta, W., Blanco, A., Lorusso, E. 2010. Essential oils, genetic relationships and in vitro establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *Italicum* from wild Mediterranean germplasm. Industrial Crops and Products. 32(3): 639 – 649.

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

Nardone, R.M. 1977. Toxicity testing in vitro. In: Rothblat, G.H. & Cristofalo, J. (Eds). Growth, nutrition and metabolism of cell in culture. Volume III. Academic Press. New York. pp. 471 – 495.

Oberste, M.S., Gotuzzo, E., Blair, P., Nix, W.A., Ksiazek, T.G., Comer, J.A., Rollin, P., Goldsmith, C.S., Olson, J., Kochel, T.J. 2009. Human febrile illness caused by Encephalomyocarditis virus infection, Peru. Emerging Infectious Diseases. 15(4): 640 – 646.

Premanathan, M., Kathiresan, K., Nakashima, H. 1999. Mangroves halophytes: A source of antiviral substances. South Pacific Study. 19(1-2): 49 – 57.

Premnathan, M., Chandra, K., Bajpai, S.K., Kathiresan, K. 1992. A survey of some Indian marine plants for antiviral activity. Botanica Marina. 35: 321 – 324.

Proença da Cunha, A., Ribeiro, J.A., Roque, O.R. 2007. Plantas aromáticas em Portugal: Caracterização e utilizações. Fundação Calouste Gulbenkian.1ª ed. pp. 55 – 57.

Rani, C., Chawla, S., Mangal, M., Mangal, A.K., Kajla, S., Dhawan, A.K. 2012. *Nyctanthes arbortristis* Linn. (night jasmine): A sacred ornamental plant with immense medicinal potentials. Indian Journal of Traditional Knowledge. 11(3): 427 – 435.

Resende, F. 2012. Avaliação e caracterização da actividade anti-herpética de extractos aquosos de plantas da flora portuguesa. Mestrado em Microbiologia Aplicada. FCUL.

Rivero-Guerra, A.O. 2010. Cytogenetics, geographical distribution pollen stainability and fecundity of *Santolina impressa* (Asteraceae: Anthemideae).Folia Geobotanica. 45(1): 95 – 109.

Rotbart, H.A. 2002. Treatment of picornavirus infections. Antiviral Research.53: 83-98.

Sah, A.K., Verma, V.K. 2012. Phytochemicals and pharmacological potential of *Nyctanthes arbortristis*: a comprehensive review. Int. J. Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. 3(1): 420 – 427.

Shelar, P.S., Reddy, V.K., Shelar, G.S., Reddy, V.S. 2012. Medicinal value of mangroves and its antimicrobial properties – A review. Continental J. Fisheries and Aquatic Science. 6(1): 26 – 37.

Sintayehu, B., Asres, K., Raghavendra, Y. 2012. Radical scavenging activities of the leaf extracts and a flavonoid glycoside isolated from *Cineraria abyssinica* Sch.Bip.Exa.Rich. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2(4): 44 – 49.

Spyrou, V., Maurice. H., Billinis, C., Papanastassopoulou, M., Psalla, D., Nielen, M., Koenen, F., Papadopoulos, O. 2004. Transmission and pathogenicity of Encephalomyocarditis vírus (EMCV) among rats. Vet.Res. 35: 113 – 122.

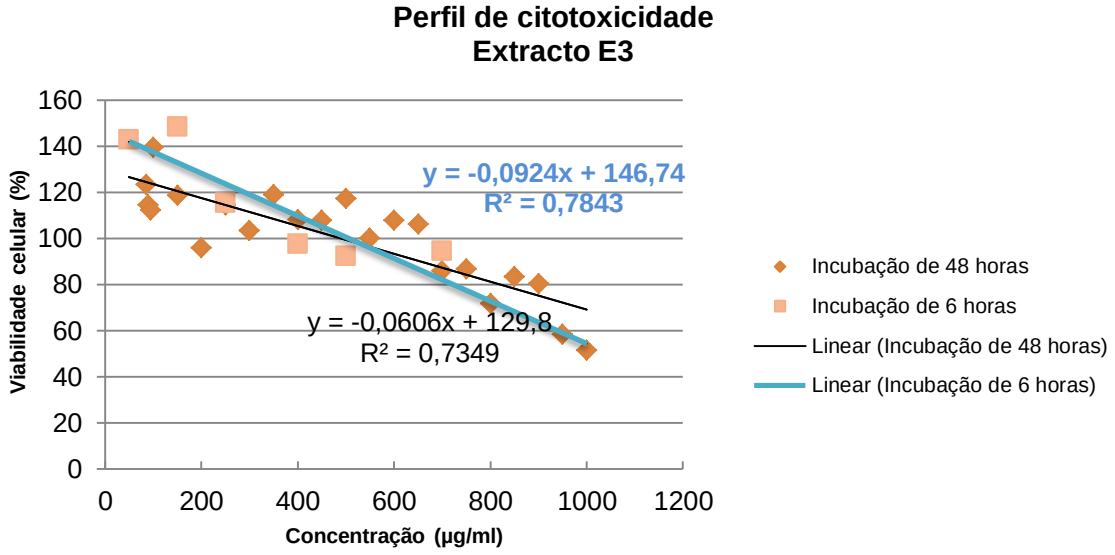
Weber, F., Wagner,V., Rasmussen, S.B., Hartmann, R., Paludan, S.R. 2006. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. Journal of Virology. 80(10): 5059 – 5064.

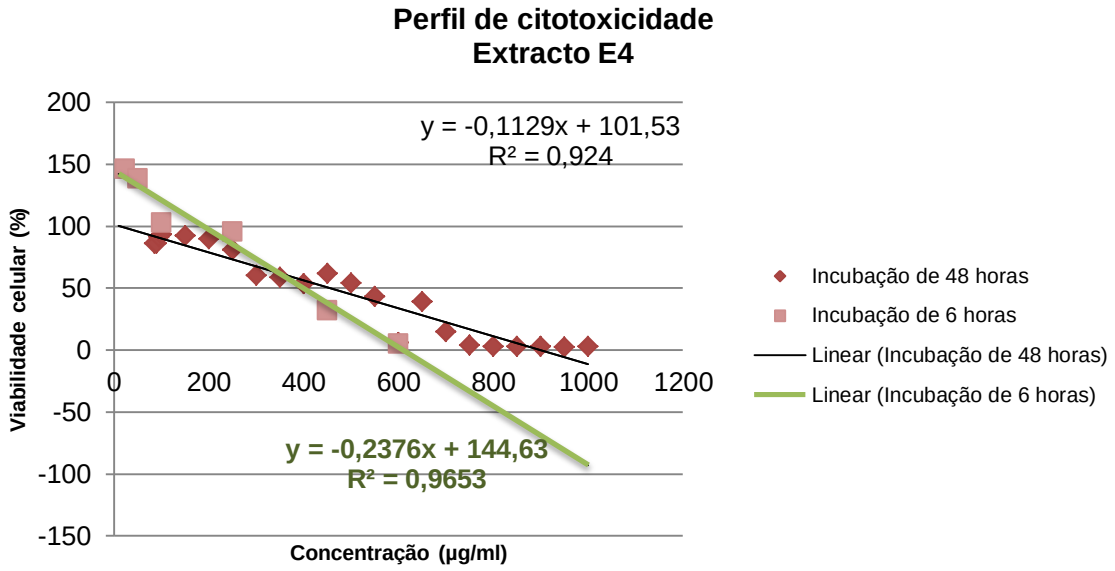
https://middlepath.com.au/plant/Golden-Rod_solidago-virgaurea%20_Herb-of-Joy.php, consultado em 06/10/2013.

http://www.flora-on.pt/index.php?q=Santolina+impressa, consultado em 06/10/2013.

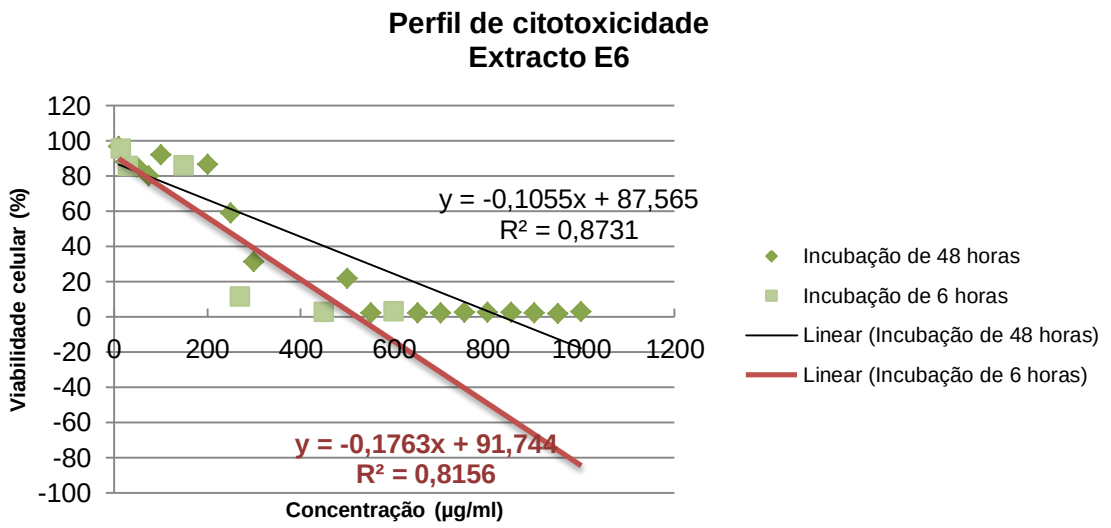
http://viralzone.expasy.org/all_by_species/99.html, consultado em 28/10/2013.

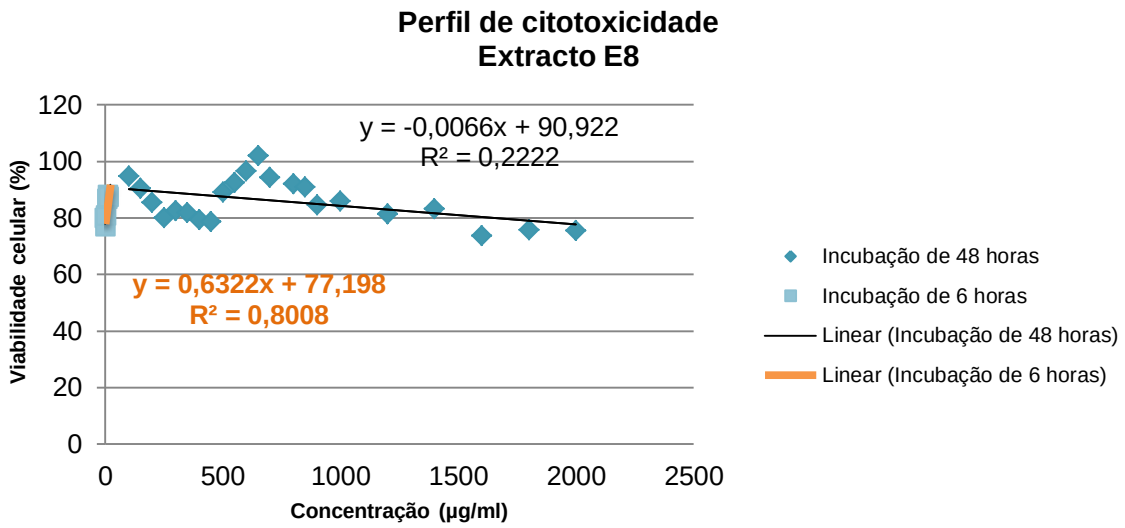
7. ANEXOS





ANEXO 1 – Citotoxicidade dos extractos aquosos E3 e E4 em células Vero após incubação de 6 e 48 horas. Os valores representados no gráfico de regressão linear indicam a média de 3 experiências para a incubação de 48 horas e de uma única experiência para a incubação de 6 horas (4 réplicas por cada experiência).





ANEXO 2 – Citotoxicidade dos extractos aquosos E6 e E8 em células Vero após incubação de 6 e 48 horas. Os valores representados no gráfico de regressão linear indicam a média de 3 experiências para a incubação de 48 horas e de uma única experiência para a incubação de 6 horas (4 réplicas por cada experiência).

Anexo 3: Valores do título e percentagem de inactivação do EMCV pelos extractos aquosos

	Concentração (µg/ml)	Título (pfu)	% de inibição
EMCV (controlo)	--------	$4,4 \times 10^6$	------
EMCV + EXTRACTO E3	15	$2,5 \times 10^6$	43,2±1,01
	35	$2,4 \times 10^6$	45,5±0,73
	150	2×10^6	54,6±0,72
	400	$1,9 \times 10^6$	56,9±2,04
EMCV + EXTRACTO E4	5	$2,3 \times 10^6$	47,8±0,35
	23	2×10^6	54,6±0,97
	50	$1,9 \times 10^6$	56,9±1,21
	250	$1,5 \times 10^6$	66±1,87
EMCV + EXTRACTO E6	15	$3,2 \times 10^6$	27,3±0,05
	30	$3,1 \times 10^6$	29,6±1,78
	270	$2,3 \times 10^6$	47,8±0,77
EMCV + EXTRACTO E8	25	$2,7 \times 10^6$	38,7±1,26
	250	$2,5 \times 10^6$	43,2±1,54
	600	$2,2 \times 10^6$	50±0,07

Os valores das percentagens de inactivação apresentados correspondem a média de 3 experiências independentes ± desvio padrão

Anexo 4: Valores do título e da percentagem de inibição da produção viral na infecção de células Vero com o EMCV na presença dos extractos aquosos.

	EMCV INTRA 8H		EMCV INTRA 16H		EMCV INTRA 24H		EMCV TOTAL 24H	
	Título (pfu)	% de inibição	Título (pfu)	% de inibição	Título (pfu)	% de inibição	Título (pfu)	% de inibição
EMCV (controlo)	$1,3 \times 10^5$	-------	$3,6 \times 10^5$	-------	$7,2 \times 10^5$	-------	$2,8 \times 10^6$	-------
EMCV + EXTRACTO E3 (150µg/ml)	$3,6 \times 10^4$	72,4±0,11	$1,7 \times 10^5$	52,8±0,09	$5,4 \times 10^5$	25±0,12	$1,2 \times 10^6$	56,1±0,07
EMCV + EXTRACTO E4 (50µg/ml)	$1,6 \times 10^4$	87,7±0,07	$1,2 \times 10^5$	66,7±0,03	$4,5 \times 10^5$	37,5±0,04	1×10^6	62,8±0,13
EMCV + EXTRACTO E6 (10µg/ml)	1×10^3	99,3±0,16	$1,8 \times 10^4$	95±0,04	$3,9 \times 10^4$	94,6±0,19	$9,3 \times 10^4$	96,8±0,12
EMCV + EXTRACTO E8 (250µg/ml)	$5,4 \times 10^4$	58,5±0,13	$2,4 \times 10^5$	33,4±0,09	$6,1 \times 10^5$	15,3±0,09	$1,5 \times 10^6$	45,8±0,10

Os valores das percentagens de inibição apresentados correspondem a média de 3 experiências independentes ± desvio padrão.