EDUARDO GIMENES PALAZZI

**AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS NA
DIMINUIÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL DO
BoHV-1-COLORADO EM EMBRIÕES MURINOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia.

São Paulo
2015

EDUARDO GIMENES PALAZZI

**AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS NA
DIMINUIÇÃO DA REPLICAÇÃO VIRAL DO
BoHV-1-COLORADO EM EMBRIÕES MURINOS
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete Jose Vicente

Co-orientadora: Profa. Dra. Edviges Maristela Pituco

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontrasse disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na biblioteca digital de teses e dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Palazzi, Eduardo Gimenes.

Avaliação dos produtos naturais na diminuição da replicação viral do BoHV-1 Colorado em embriões murinos experimentalmente infectados / Eduardo Gimenes Palazzi. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Elisabete José Vicente.

Co-orientador: Profa. Dra. Edviges Maristela Pituco

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Reprodução animal.

Versão do título para o inglês: Evaluation of natural products in the reduction of viral replication of BoHV-1 Colorado in murine embryos experimentally infected.

1. Herpesvírus bovino 2. Modelo experimental 3. Extrato etanólico e aquoso 4. Óleo essencial 5. Produção de embriões 6. Controle sanitário I. Vicente, Profa. Dra. Elisabete José II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB030/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Eduardo Gimenes Palazzi

Título: Avaliação dos produtos naturais na diminuição da replicação viral do BoHV-1
Colorado em embriões murinos experimentalmente infectados

Orientador(a): Profa. Dra. Elisabete José Vicente

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 31 / 03 / 2015, considerou

☒ Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a)	Assinatura
	Nome	CLAUDIA DEL FAVA
	Instituição	INSTITUTO Biotécnico
Examinador(a)	Assinatura
	Nome	MARIA HELENA ROSSI
	Instituição	INSTITUTO Biotécnico
Examinador(a)	Assinatura
	Nome	SORAYA AYRE CALDEIRA
	Instituição	INSTITUTO BUTANTAN
Examinador(a)	Assinatura
	Nome	ALEXANDRE WAGNER SILVA ALBEDEL
	Instituição	UNIVERSIDADE DE MOÇAMBIQUE
Examinador(a)	Assinatura
	Nome	Elisabete José Vicente
	Instituição	ICB/USP

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 124/12 sobre o projeto: “Avaliação dos produtos naturais na diminuição da replicação viral do BoHV-1-Colorado em embriões murinos experimentalmente infectados” sob a responsabilidade de **Eduardo Gimenes Palazzi**, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA).

São Paulo, 27 de novembro de 2013

Ricardo Spacagna Jordão
Coordenador da CETEA-IB

Dedico este trabalho
ao milagre e
ao amor.
Milagre
chamado Luigi
e
Amor
chamado Adriana.

AGRADECIMENTOS

Ao amor, pois sem ele não existe o homem!

Ao velho e apaixonante Instituto Biológico de São Paulo. Minha casa por anos. Vou sentir saudades!

À Professora Dra Magali D'Angelo que se foi abruptamente e deixou um vazio muito grande. Espero que encontre paz e alegria no céu.....

As Profa. Dra Elisabete José Vicente por ter-me “adotado” em momento tão difícil e possibilitado a continuidade do projeto com alto padrão. Um amor de pessoa!

A Profa Dra Edviges Maristela Pituco que me apoiou desde o início, seja pelo suporte técnico quanto ao suporte intelectual. Sua participação em meu desenvolvimento científico analítico foi simplesmente fundamental. Minha imensa e eterna gratidão.

Ao Departamento de Pós graduação Interunidades em Biotecnologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo pelo apoio de sempre. Em especial a Dra Ana Clara Guerrini Schenberg pelo apoio imensurável

À Adriana de Oliveira Palazzi por me aguentar “desde o berçário até a pós”. Eu disse que iria melhorar e parar de estudar, mas não consigo. Sou feliz assim!!!

Aos meus heróis super fantásticos. Meus pais, Pércio e Luzia, minhas irmãs Simone e Cristiane que sempre torceram por mim assim como eu.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular, Mayra Alves, Danielle Pavão, Mariana Picolomini, Andrea Galupo e ao Flavio Souza que fazem parte desta trajetória de vida.

Ao Prof. Paulo Michel Roehe da FEPAGRO Saúde Animal - IPVDF & ICBS-UFRGS (do Rio Grande do Sul) pela simpatia e por não pensar duas vezes quando o assunto é ajudar.

A todos os funcionários do Instituto Biológico de São Paulo. Esta tese tem um pedaço de cada uma destas pessoas que cruzaram nosso caminho. Sem pessoas de suporte, nada funciona.

A todos do Laboratório de Vírus dos Bovídeos. Especialmente à Dra Edviges Maristela Pitucco, Dra Eliana De Stefano, Dra Adriana, Dra Liria Hiromi Okuda, Dra Michele dos Santos Lima, à pesquisadora Maira Martins, a Sra Alizete pelo extremo profissionalismo e a colaboração fundamental.

A todos do Laboratório de Química e Farmacologia de Produtos Naturais, à Dra Joana D'Arc, Dra Edlayne Gonzalez, Dra Maria Helena Rossi, Dra Maria Maia Braggio, Dra Mitsue Haraguchi e a Dra Daiane Hansen pelo suporte inestimável com os Produtos Naturais.

À Leda, Meire, Magali, Leandro e ao Dr Ricardo do Laboratório de Produção de Imunobiológicos. Por estarem sempre dispostos a ajudar e por cederem gentilmente o biotério do laboratório de imunobiológicos por mais quatro anos.

À Rosa Maria Piatti, do Laboratório de doenças bacterianas da reprodução, por ser tão atenciosa e pela disponibilidade enfim um amor de pessoa que merece todo nosso respeito.

À Helena da Intervet por ceder uma gama de hormônios para testes vinculado à maturação *in vitro*.

Aos meus grandes companheiros de ontem e hoje: Joni, Deco e Zeck.

Às pesquisadoras do Instituto Biológico Simone e Cristiane que sempre se prontificam a ajudar. Excelentes pesquisadoras.

Ao Professor Plínio pelo grande ajuda com o texto, ideias e correções.

Aos funcionários do Instituto Biológico por colaborarem com o bom funcionamento do Instituto e sempre serem cordiais e prestativos.

À Judite e Isabela por dividirem o espaço do laboratório comigo e sempre me tratarem com carinho, respeito e profissionalismo.

A todos os professores da Biotecnologia, em especial para Profa. Heloiza Ramos Barbosa, Profa. Luiziana Ferreira da Silva, Profa. Júlia Baruque Ramos, Prof. José Gregório Cabrera Gomez, Prof. José Antonio Visintin e Prof. José Antônio Jerez por terem contribuído de forma primorosa na minha trajetória acadêmica e de vida.

À Profa. Maria Elena Infante Malachias por ter me surpreendido como “professora” e pessoa, por sua simplicidade mesmo com a imensa bagagem de conhecimento e sabedoria e pelo enorme carinho que possui com seus alunos. Viva Maturana!!!

À Eliane, Fábila, Arthur e Marcos da Secretaria de Biotecnologia pela eficiência, simpatia, simplicidade e por sempre estarem dispostos a ajudar.

À Biblioteca do ICB pelos serviços de qualidade e, em especial, às bibliotecárias Tereza Cristina Soutto Mayor e a Mônica da Silva do Amaral pelo extraordinário apoio com a tese.

À Dra Juliana Bortolatto Scrivanti da Faculdade de Medicina da USP pela gentileza e pré-disposição em ajudar com ensinamentos relacionados à TE em camundongos.

À Dra Claudia Del Fava e Dra Silvia Galletti por colaborarem de forma significativa na resolução de problemas relacionada à tese, além de serem, é claro, pessoas excepcionais.

À Dra. Meire Cristina Nogueira de Andrade da UNESP, ao Dr. Osmar Malaspina da UNESP de Rio Claro por cederem, gentilmente e respectivamente, fotos de *Agaricus blazei* e de colmeia para este trabalho

À Dra. Ana Eugênia e ao Dr. João Justi do Instituto Biológico de SP por auxiliarem com indicações de pesquisadores para colaborar com a tese.

À Dra. Isabela Cristina Simoni do Instituto Biológico de São Paulo por ceder fotos de *Melissa officinalis* de seu lindo canteiro no Instituto.

À Dra. Maria Judite B. Fernandes e Dra. Isabela por compartilharem o laboratório de Biologia celular do Instituto Biológico de São Paulo e por sempre estarem a disposição para ajudar.

Ao Gaspar e Edson do ICB/USP pela colaboração eficiente relacionada à Microscopia Eletrônica.

Ao CNPq pelo apoio fundamental e essencial para a realização deste trabalho.

Tente outra vez

Veja!
Não diga que a canção
Está perdida
Tenha fé em Deus
Tenha fé na vida
Tente outra vez!...

Beba! (Beba!)
Pois a água viva
Ainda tá na fonte
(Tente outra vez!)
Você tem dois pés
Para cruzar a ponte
Nada acabou!
Não! Não! Não!...

Tente!
Levante sua mão sedenta
E recomece a andar
Não pense
Que a cabeça aguenta
Se você parar
Não! Não! Não!
Não! Não! Não!...

Há uma voz que canta
Uma voz que dança
Uma voz que gira
(Gira!)
Bailando no ar

Queira! (Queira!)
Basta ser sincero
E desejar profundo
Você será capaz
De sacudir o mundo
Vai!
Tente outra vez!

Tente! (Tente!)
E não diga
Que a vitória está perdida
Se é de batalhas
Que se vive a vida
Tente outra vez!...

(Raul Seixas)

RESUMO

PALAZZI, E. G. **Avaliação dos produtos naturais na diminuição da replicação viral do BoHV-1 Colorado em embriões murinos experimentalmente infectados.** 2015. 148 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

As biotécnicas da reprodução animal, amplamente difundidas no Brasil, tem possibilitado maior controle em relação à transmissão de agentes patogênicos, porém, a transmissão de doenças continua a ser uma preocupação justificável para a busca de melhores meios de controle. O objetivo do trabalho foi o de avaliar a diminuição da replicação viral (BoHV-1 Colorado) em embriões murinos após tratamentos com Produtos Naturais (PN). Trabalhamos com '3 grupos' de PN, totalizando 18 tratamentos: Óleos Essenciais (OE) de *Chamomilla recutita*, *Allium sativum*, *Zingiber officinale*, *Syzygium aromaticum*, *Illicium verum* Hook f., *Punica granatum* e *Melissa officinalis*; Extratos Etanólicos (EE) das mesmas plantas anteriores com acréscimo de *Pterodon emarginatus* (casca e semente) e Extrato Aquoso (EA) de Própolis e *Agaricus blazei*. Inicialmente encontramos concentrações não tóxicas em células MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) relacionada a cada PN (*ampla sintonia*) para posteriormente verificarmos as concentrações não tóxicas para os zigotos/embriões murinos (*sintonia fina*). Após encontrarmos as concentrações não tóxicas, os zigotos foram divididos em quatro grupos: G₁ (Controle), G₂ (expostos aos vírus BoHV-1 Colorado à 10⁸ TCID₅₀/mL), G₃ (expostos aos PN) e G₄ (expostos aos vírus e PN). Os grupos foram mantidos a 37,5 °C em meio TCM199 (100 µL) com 10% de soro fetal bovino em estufa a 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após 24h, analisamos a taxa de clivagem (Teste Exato de Fisher_p<0,05), a morfologia (por microscopia óptica), a n-PCR e a titulação dos embriões em co-cultura com células MDBK após mais 72h do tratamento com os PN (Teste de Mann Whitney_ p<0,05). Dentre as 18 análises, os embriões murinos tratados com EA de Própolis, EE de *Punica granatum* e de *Pterodon emarginatus* (Casca) apresentaram resultados satisfatórios: sem alterações morfológicas, taxa de clivagem semelhante aos controles e apesar da constatação da partícula viral junto aos embriões pela n-PCR, houve diminuição da concentração viral após tratamentos com estes extratos, o que sugere interferência destes tratamentos no ciclo viral do BoHV-1 Colorado.

Palavras-chave: Herpesvírus bovino. modelo experimental .extrato etanólico e aquoso. óleo essencial. produção de embriões. controle sanitário.

ABSTRACT

PALAZZI, E. G. **Evaluation of natural products in the reduction of viral replication of BoHV-1 Colorado in murine embryos experimentally infected** 2015. 148 p. Ph. D. Thesis (Biotechnology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The biotechniques of animal reproduction, widely spread in Brazil, increases in bigger control in relation the pathogenic agents, but, the transmission of the sickness continues to be a justified concern to the rise of searches in better ways to control these diseases. The objective of work was to evaluate the reduction of viral replication (BoHV-1 Colorado) in murine embryos after treatments with Natural Products (NP). We worked with 3 groups of NP totalizing 18 treatments. Essential Oil of *Chamomilla recutita*, *Allium sativum*, *Zingiber officinale*, *Syzygium aromaticum*, *Illicium verum Hook f.*, *Punica granatum* e *Melissa officinalis*; Ethanollic Extracts (EE) of the same previous plants with add of *Pterodon emarginatus* (cover and seeds) and Aqueous Extract (AE) of propolis and *Agaricus blazei*. Inittialy we found non-toxic concentrations in MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) cells related in each NP (broad line) then we verify nontoxic concentrations for zygotes/embryos murines (fine line). After finding the non-toxic concentrations, the zygotes were divided in four groups, G₁ (Control), G₂ (exposed to the virus BoHV-1 Colorado à 10⁸ TCID₅₀/mL), G₃ (exposed to the NP), and G₄ (exposed to the virus and NP) The Groups were kept in the temperature 37, 5 °C in TCM 199 (100ul) with 10% of fetal bovine serum in incubator with 5% of CO₂ and 95% of moisture . After 24hs , we analised the rate of cleavage (Fisher's exact test_p<0,05), the morphology (by optics microscopy) a n-PCR and the titration of embryos in co-culture with cells MDBK, after 72h of treatment with the NP (Mann Whitney's test_ p<0,05). Among the 18 analyzes, murine embryos treated with EA Propolis, EE *Punica granatum* and *Pterodon emarginatus* (bark) demonstrated satisfactory results: no morphological changes, cleavage rate similar to controls, and although the concentration of the viral particle with the embryos by n-PCR, _the viral decreased the concentration after treatment, suggesting interference of these treatments in the viral cycle of BoHV-1 Colorado.

Keywords: Bovine herpesvirus. experimental model. ethanollic and aqueous extract. essential oil. production of embryos. sanitary control.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CPE: Efeito Citopático
DNA: Ácido desoxirribonucleico
EA: Extrato aquoso
eCG: Gonadotrofina coriônica equina
EE: Extrato Etanólico
FIV: Fertilização *in vitro*
FSH: Hormônio folículo estimulante
G1: Grupo controle
G2: Grupo exposto aos vírus
G3: Grupo exposto aos produtos naturais
G4: Grupo exposto aos vírus e aos produtos naturais
h: Horas
hCG: Gonadotrofina coriônica humana
IB: Instituto Biológico de São Paulo
IBR: Rinotraqueíte infecciosa bovina
IETS: Sociedade Internacional de Transferências de Embrião
IPV: Vulvovaginite pustular infecciosa
Kpb: Mil pares de bases
LH: Hormônio luteinizante
LS: Lavagem sequencial
LVB: Laboratório de viroses de bovídeos do Instituto Biológico de SP
MDBK: Madin Darby Bovine Kidney - Linhagem estabelecida de rim bovino
ME: Microscopia eletrônica
MIV: Maturação *in vitro*
mL: Mililitros
MP: Membrana plasmática
n-PCR: nested PCR
°C: Graus célsius
OE: Óleo essencial
OIE: Organização Mundial de Saúde Animal
PBS: Solução Salina Fosfatada Tamponada
PCR: Reação em cadeia da Polimerase
pH: Potencial hidrogeniônico

PIV: Produção *in vitro*
PN: Produtos naturais
rpm: Rotações por minuto
SFB: Soro Fetal Bovino
TCID: Dose Infectante 50% em cultura de tecido
TCM 199: Meio de Cultivo celular 199
TE: Transferência embrionária
TT: Tratamento com tripsina
UI: Unidade Internacional
ZP: Zona pelúcida

Observação: Visto terem seu uso consagrado na literatura técnica algumas abreviaturas e siglas seguem as iniciais de sua grafia no idioma inglês.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	33
Figura 2 - <i>Chamomilla recutita</i>	35
Figura 3 - <i>Allium sativum</i>	35
Figura 4 - <i>Zingiber officinale</i>	36
Figura 5 - <i>Syzygium aromaticum</i>	36
Figura 6 - <i>Illicium verum</i> Hook. f.....	37
Figura 7 - <i>Punica granatum</i>	38
Figura 8 - <i>Melissa officinalis</i>	39
Figura 9 - <i>Pterodon emarginatus</i> (Sucupira).....	40
Figura 10 - <i>Agaricus blazei</i>	41
Figura 11 - Colmeia de abelhas.....	42
Figura 12 - Extração por hidrodestilação.....	49
Figura 13 - Extração do óleo em funil de separação.....	49
Figura 14 - Fruto de <i>Punica granatum</i> (Romã) em corte.....	51
Figura 15 - Pericarpo triturado em Mixer.....	52
Figura 16 - Obtenção de pericarpo de Romã em pó.....	52
Figura 17 - Separação por filtração.....	53
Figura 18 – Rotaevaporador.....	53
Figura 19 - Aplicação, intraperitonealmente, de hormônios hCG e eCG.....	58
Figura 20 - Câmara de Eutanásia.....	59
Figura 21 - Procedimento de coleta dos ovidutos.....	60
Figura 22 - Coleta dos zigotos.....	60
Figura 23 - Monocamadas de células MDBK em cultura com TCM199 acrescentado em 10% de SFB.....	78
Figura 24 - Monocamadas de células MDBK inoculadas com 5% de óleo essencial de <i>Allium sativum</i>	78
Figura 25 - Monocamadas de células MDBK inoculadas com 10% de óleo essencial de <i>Melissa officinalis</i> após 24h.....	79

Figura 26 - Monocamadas de células MDBK inoculadas com 4% de Extrato Etanólico de <i>Punica granatum</i> após 24h.....	79
Figura 27 - tratamento com OE de alho (G4_{oe}).....	82
Figura 28 - tratamento com OE de Melissa (G4_{oe}).....	83
Figura 29 - tratamento com OE de camomila (G3_{oe}).....	83
Figura 30 - Embrião do grupo G1_{ee} (controle)_ sem alterações morfológicas após 24h de incubação.....	86
Figura 31 - Embrião do grupo G3_{ee} (<i>Chamomilla recutita</i>)_ aspecto normal, com uma clivagem após 24h de incubação.....	86
Figura 32 - Grupo G2_{ee}(vírus)_ sem clivagem após 24h de incubação.....	86
Figura 33 - Grupo G4_{ee}(<i>Chamomilla recutita</i>)_ sem clivagem após 24h de incubação.....	86
Figura 34 - Grupo G1_{ee} (controle)_ sem alterações morfológicas após 24h de incubação.....	87
Figura 35 - Grupo G4_{ee} (<i>Allium sativum</i>)_ com alterações morfológicas após 24h de incubação.....	87
Figura 36 - Grupo G4_{ee} (<i>Zingiber officinale</i>)_ com alteração morfológica após 24h de incubação.....	88
Figura 37 - Grupo G4_{ee}(<i>Zingiber officinale</i>)_ com alteração morfológica após 24h de incubação.....	88
Figura 38 - Grupo G4_{ee} (<i>Syzygium aromaticum</i>)_ com alteração morfológica após 24h de incubação.....	89
Figura 39 - Grupo G4_{ee} (<i>Syzygium aromaticum</i>)_ evidenciando bloqueio celular após 24h de incubação.....	89
Figura 40 - Grupo G4_{ee} (<i>Illicium verum</i> Hook. f)_ afrouxamento da ZP (setas) após 24h de incubação.....	89
Figura 41 - Grupo G4_{ee} (<i>Illicium verum</i> Hook. f)_ blastômeros assimétricos após 24h de incubação.....	89
Figura 42 - Grupo G4_{ee} (<i>Punica granatum</i>)_ com dois blastômeros e, em detalhe, a ZP conservada.....	90
Figura 43 - Grupo G4_{ee} (<i>Punica granatum</i>)_ blastômeros simétricos, com citoplasma uniforme após 24h de incubação.....	90

Figura 44 - Grupo G4_{ee} (<i>Punica granatum</i>)_ após 48h de incubação.....	90
Figura 45 - Grupo G4_{ee} (<i>Punica granatum</i>)_ após 72h de incubação.....	90
Figura 46 - Grupo G4_{ee} (<i>Melissa officinalis</i>)_ após 24h de incubação.....	91
Figura 47 - Grupo G4_{ee} (<i>Melissa officinalis</i>)_ após 24h de incubação.....	91
Figura 48 - Grupo G4_{ee} (<i>Pterodon emarginatus</i>-C)_ após 24h de incubação.....	92
Figura 49 - Grupo G4_{ee} (<i>Pterodon emarginatus</i>-S)_ após 24h de incubação....	93
Figura 50 - Grupo G4_{ea} (<i>Agaricus blazei</i>)_ após 24h de incubação.....	104
Figura 51 - Grupo G4_{ea} (<i>Agaricus blazei</i>)_ após 72h de incubação.....	104
Figura 52 - Grupo G4_{ea} (Própolis)_ após 24h de incubação.....	105
Figura 53 - Cultura MDBK inoculadas com embrião do grupo G1_{oe} (<i>Allium sativum</i>).....	110
Figura 54 - Cultura MDBK inoculadas com embrião do grupo G4_{oe} (<i>Chamomilla recutita</i>).....	110
Figura 55 - Cultura MDBK inoculadas com embrião do grupo G4_{ee} (<i>Punica granatum</i>) com discreto CPE.....	110
Figura 56 - Cultura MDBK inoculadas com embrião do grupo G4_{ee} (<i>Pterodon emarginatus</i>-C), sem CPE.....	111
Figura 57 - Cultura MDBK inoculadas com embrião do grupo G4_{ee} (<i>Zingiber officinale</i>), com intenso CPE.....	111
Figura 58 - Cultura MDBK inoculadas com embrião do grupo G2_{ee} (<i>Zingiber officinale</i>) com intenso CPE.....	111
Figura 59 - Detecção de produtos amplificados das amostras de embriões (E) dos ensaios dos grupos G1, G2, G3 e G4 com Extratos de <i>Zingiber officinale</i>, <i>Chamomilla recutita</i> <i>Syzygium aromaticum</i> e Própolis. nested-PCR.....	112
Figura 60 - Detecção de produtos amplificados das amostras de embriões (E) dos ensaios dos grupos G1, G2, G3 e G4 com Extratos de Própolis, <i>Illicium verum</i> Hook f, <i>Allium sativum</i>, <i>Punica granatum</i> e <i>Pterodon emarginatus</i>-C (Sucupira Casca). nested-PCR.....	113

Figura 61 - Detecção de produtos amplificados das amostras de embriões (E) dos ensaios dos grupos G1, G2, G3 e G4 com Extratos de <i>Pterodon emarginatus-C</i> (Sucupira Casca), <i>Melissa officinalis</i> , <i>Agaricus blazei</i> e <i>Pterodon emarginatus-S</i> (Sucupira Semente) nested-PCR.....	114
Figura 62 - Embrião do grupo G1 (controle). ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática.....	115
Figura 63 - Embrião do grupo G1 (controle). ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática.....	116
Figura 64 - Embrião do grupo G1 (controle).). Em destaque htereocromatina e C: carioteca.....	116
Figura 65 - Embrião do grupo G2 (vírus) ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática.....	117
Figura 66 - Embrião do grupo G2 (vírus) ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática.....	117
Figura 67: Embrião do grupo G2 (vírus). C: carioteca; poros da carioteca..	118
Figura 68 - Embrião do grupo G2 (vírus) no citosol. Destaque para as partículas virais.....	118
Figura 69 - Embrião do grupo G4 _{ee} <i>Punica granatum</i> . ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática.....	119
Figura 70 - Embrião do grupo G4 _{ee} <i>Punica granatum</i> . ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática. Setas vermelhas: perturbação da MP; Setas verdes: mitocôndrias.....	119
Figura 71 - Embrião do grupo G4 _{ee} <i>Punica granatum</i> . ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática. Setas verdes: mitocôndrias.....	120
Figura 72 - Embrião do grupo G4 _{ea} de <i>Própolis</i> . ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática.....	120
Figura 73 - Embrião do grupo G4 _{ea} de <i>Própolis</i> . ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática.....	121
Figura 74 - Embrião do grupo G4 _{ea} de <i>Própolis</i> . C: carioteca. Destaque: inúmeras partículas viras na região da carioteca.....	121
Figura 75 - Embrião do grupo G4 _{ee} de <i>Pterodon emarginatus-Casca</i> . ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática.....	122

Figura 76 - Embrião do grupo G4_{ee} de <i>Pterodon emarginatus</i>-C. Destaque : Complexo Golgiense (seta azul)	122
---	------------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Plantas utilizadas para obtenção dos Óleos essenciais.....	50
Tabela 2 - Plantas utilizadas para obtenção dos Extratos Etanólicos.....	51
Tabela 3 - Primers das reações de PCR e <i>nested</i> PCR para BoHV-1 Colorado.....	64
Tabela 4 - Produtos Naturais e respectivas concentrações testadas em zigotos murinos.....	69
Tabela 5 - Produtos Naturais e respectivas concentrações não tóxicas em células MDBK.....	80
Tabela 6 - Produtos Naturais e respectivas concentrações não tóxicas aos embriões murinos.....	81
Tabela 7 - Porcentagem das taxas de clivagens dos ensaios com Óleos Essenciais.....	84
Tabela 8 - Resultado da análise estatística (Taxa de Clivagem) em relação aos grupos $G1_{oe} \times G2_{oe}$, $G1_{oe} \times G3_{oe}$ e $G1_{oe} \times G4_{oe}$.....	84
Tabela 9 - Constatação de alteração morfológica entre respectivos EE e seus grupos.....	85
Tabela 10 - Análise estatística comparativa da Taxa de Clivagem entre os grupos tratados com EE.....	94
Tabela 11 - Porcentagem das taxas de clivagens dos ensaios com EE.....	94
Tabela 12 - Constatação de alteração morfológica entre respectivos EA e seus grupos.....	104
Tabela 13 - Taxa de Clivagem_ Resultado da análise estatística dos EA conforme respectivos grupos.....	105

Tabela 14 - Comparação das taxas de clivagens dos ensaios com Extratos Aquosos.....	106
Tabela 15 - Relação entre as médias das titulações dos embriões (2E e 4E) submetidos aos tratamentos com os PN e suas respectivas análises estatísticas.....	109

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Detalhamento dos testes com OE, vírus e os zigotos murino.....	71
Quadro 2 - Detalhamento dos testes com EE, EA, vírus e os zigotos murinos.....	73
Quadro 3 - Detalhamento das Lavagens (TT).....	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE CLIVAGEM DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS AO BoHV-1 COLORADO E AO EE DE <i>Chamomila recutita</i> APÓS 24h.....	95
Gráfico 2 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE CLIVAGEM DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS AO BoHV-1 COLORADO E AO EE DE <i>Allium sativum</i> APÓS 24h.....	96
Gráfico 3 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE CLIVAGEM DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS AO BoHV-1 COLORADO E AO EE DE <i>Zingiber officinale</i> APÓS 24h.	97
Gráfico 4 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE CLIVAGEM DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS AO BoHV-1 COLORADO E AO EE DE <i>Syzygium aromaticum</i> APÓS 24h.....	98
Gráfico 5 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE CLIVAGEM DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS AO BoHV-1 COLORADO E AO EE DE <i>Illicium verum</i> Hook. f APÓS 24h.....	99
Gráfico 6 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE CLIVAGEM DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS AO BoHV-1 COLORADO E AO EE DE <i>Punica granatum</i> APÓS 24h..	100
Gráfico 7 -AVALIAÇÃO DA TAXA DE CLIVAGEM DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS AO BoHV-1 COLORADO E AO EE DE <i>Melissa officinalis</i> APÓS 24h..	101
Gráfico 8 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE CLIVAGEM DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS AO BoHV-1 COLORADO E AO EE DE <i>Pterodon emarginatus</i>-C APÓS 24h.....	102
Gráfico 9 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE CLIVAGEM DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS AO BoHV-1 COLORADO E AO EE DE <i>Pterodon emarginatus</i>-S APÓS 24h.....	103
Gráfico 10 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE CLIVAGEM DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS AO BoHV-1 COLORADO E AO E.E. DE <i>Agaricus blazei</i> APÓS 24h...	106
Gráfico 11 - AVALIAÇÃO DA TAXA DE CLIVAGEM DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS AO BoHV-1 COLORADO E AO E.E. DE <i>Própolis</i> APÓS 24h.....	107

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	28
1.1 PIV e Sanidade Animal.....	29
1.2 Doença.....	30
1.3 Etiologia.....	31
1.4 Transmissão	32
1.5 Metabolismo das Plantas.....	32
1.6 Metabolismo secundário em destaque: Óleos essenciais	33
1.7 Produtos Naturais (PN).....	34
1.7.1 <i>Chamomilla recutita</i>	34
1.7.2 <i>Allium sativum</i>	35
1.7.3 <i>Zingiber officinale</i>	35
1.7.4 <i>Syzygium aromaticum</i>	36
1.7.5 <i>Illicium verum</i> Hook f.....	37
1.7.6 <i>Punica granatum</i>	37
1.7.7 <i>Melissa officinalis</i>	38
1.7.8 Plantas do gênero <i>Pterodon</i>	39
1.7.9 <i>Agaricus blazei</i>	40
1.7.10 <i>Própolis</i>	41
2 HIPÓTESE.....	43
3 OBJETIVOS.....	45
3.1 Objetivo geral.....	46
3.2 Objetivos específicos.....	46
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 Obtenção dos Óleos Essenciais, Extratos Etanólicos e Aquosos.....	48
4.1.1 <i>Óleos essenciais</i>	48
4.1.2 <i>Extratos Etanólicos</i>	50
4.1.2.1 <u>EE de <i>Pterodon emarginatus</i> (Sucupira/Casca e Semente)</u>	53
4.1.3 <i>Extratos Aquosos</i>	54
4.1.3.1 <u>EA de <i>Agaricus blazei</i></u>	54
4.1.3.2 <u>EA <i>Própolis</i></u>	54
4.2 Preparação das concentrações dos Produtos Naturais (PN).....	55
4.2.1 <i>Preparação das concentrações de OE</i>	55

4.2.2 Preparação das concentrações dos EE e EA.....	55
4.3 Exposição dos zigotos murinos aos PN e ao vírus <i>in vitro</i> durante 24h..	55
4.4 Linhagem estabelecida de rim bovino (MDBK).....	56
4.5 Vírus	56
4.5.1 Titulação dos vírus.....	57
4.6 Métodos de detecção do BoHV-1 em cultivo de células.....	57
4.7 Animais.....	57
4.7.1- Camundongo Swiss.....	57
4.7.2 Superestimulação ovariana.....	58
4.7.3 Coleta dos zigotos.....	59
4.7.4 Contaminação dos zigotos murinos com BoHV-1 Colorado e exposição aos Produtos Naturais não miscíveis (Óleos Essenciais) ao meio de cultura <i>in vitro</i>	60
4.7.5 Contaminação dos zigotos murinos com BoHV-1 Colorado e exposição aos Produtos Naturais(Extrato Etanólico e Extrato Aquoso) miscíveis ao meio de cultura <i>in vitro</i>	61
4.8 Métodos de detecção do BoHV-1 nas amostras em cultivo de células....	61
4.8.1 Detecção do BoHV-1-Colorado nas amostras pela nested-PCR.....	62
<u>4.8.1.1 Identificação viral do BoHV-1 Colorado.....</u>	<u>62</u>
<u>4.8.1.2 Extração do DNA</u>	<u>62</u>
<u>4.8.1.3 Iniciadores.....</u>	<u>63</u>
<u>4.8.1.4 Reações de PCR.....</u>	<u>64</u>
4.9 Avaliação da localização da partícula viral por microscopia eletrônica...	65
4.10 Avaliação da taxa de clivagem e morfologia dos zigotos murinos.....	66
4.11 Análise estatística da taxa de clivagem.....	66
4.12 Análise estatística da titulação.....	67
4.13 Determinação da citotoxicidade dos Produtos Naturais em células MDBK_Experimento 1.....	67
4.13.1 Óleo Essencial.....	67
4.13.2 Extrato Etanólico.....	68
4.13.3 Extrato Aquoso.....	68

4.14 Determinação da toxicidade dos Produtos Naturais em zigotos murinos <i>in vitro</i> após 24h de exposição_Experimento 2.....	68
4.15 Avaliação da morfologia e taxa de clivagem dos embriões murinos submetidos ao tratamento dos Produtos Naturais_Experimento 3.....	70
4.15.1 Óleos Essenciais.....	70
4.15.2 Extratos Etanólicos (<i>ee</i>) e Extratos Aquosos (<i>ea</i>).....	72
4.16 Co-cultura dos embriões murinos em células MDBK após LS e TT _Experimento 4.....	74
4.17 Avaliação da presença do vírus BoHV-1 após uso dos PN pela técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (n-PCR)_ Experimento 5.....	76
4.18 Análise da morfologia dos embriões murinos com auxílio da microscopia eletrônica de transmissão _Experimento 6.....	76
5 RESULTADOS.....	77
5.1 Determinação da citotoxicidade dos Produtos Naturais em células MDBK_Experimento 1.....	78
5.2 Determinação da toxicidade dos Produtos Naturais em zigotos murinos <i>in vitro</i> após 24h de exposição_Experimento 2.....	80
5.3 Avaliação da morfologia e taxa de clivagem dos embriões murinos submetidos ao tratamento dos Produtos_Experimento 3.....	81
5.3.1 Análise morfológica_OE.....	81
5.3.2 Análise estatística_OE.....	83
5.3.3 Análise morfológica_EE.....	84
5.3.3.1 <u>Chamomilla recutita</u>	86
5.3.3.2 <u>Allium sativum</u>	87
5.3.3.3 <u>Zingiber officinale</u>	88
5.3.3.4 <u>Syzygium aromaticum</u>	89
5.3.3.5 <u>Illicium verum</u> Hook. f.....	89
5.3.3.6 <u>Punica granatum</u>	90
5.3.3.7 <u>Melissa officinalis</u>	91
5.3.3.8 <u>Pterodon emarginatus-C</u> (Sucupira Casca).....	92
5.3.3.9 <u>Pterodon emarginatus-S</u> (Sucupira Semente).....	93
5.3.4 Análise estatística_EE.....	93

<u>5.3.4.1 Chamomilla recutita</u>	95
<u>5.3.4.2 Allium sativum</u>	96
<u>5.3.4.3 Zingiber officinale</u>	97
<u>5.3.4.4 Syzygium aromaticum</u>	98
<u>5.3.4.5 Illicium verum Hook. f.</u>	99
<u>5.3.4.6 Punica granatum</u>	100
<u>5.3.4.7 Melissa officinalis</u>	101
<u>5.3.4.8 Pterodon emarginatus-C (Sucupira Casca)</u>	102
<u>5.3.4.9 Pterodon emarginatus-S (Sucupira Semente)</u>	103
<u>5.3.5 Análise morfológica_EA</u>	103
<u>5.3.5.1 Agaricus blazei</u>	104
<u>5.3.5.2 Própolis</u>	104
<u>5.3.6 Análise estatística_EA</u>	105
<u>5.3.6.1 Agaricus blazei</u>	106
<u>5.3.6.2 Própolis</u>	107
5.4 Co-cultura dos embriões murinos em células MDBK após LS e TT _Experimento 4	107
5.5 Avaliação da presença do vírus BoHV-1 após uso dos Produtos Naturais pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase n- PCR_Experimento 5	112
5.6 Análise da morfologia dos embriões murinos com auxílio da microscopia eletrônica de transmissão_Experimento 6	114
6 DISCUSSÃO	123
7 CONCLUSÕES	139
REFERÊNCIAS	141

1.1 PIV e Sanidade Animal

A transferência de embriões (TE) bovinos é uma biotecnologia da reprodução animal, amplamente difundida no Brasil, que tem possibilitado a produção de embriões com alto potencial genético e maior controle em relação à transmissão de agentes patogênicos. Inicialmente, o grande entrave para a produção *in vitro* de embriões (PIV) em grandes quantidades e a respectiva TE era a conservação dos embriões até o momento da transferência e o número de receptoras muito abaixo em relação ao número de embriões que podiam ser produzidos pela fertilização *in vitro* (FIV). Com o advento da criopreservação, este problema foi resolvido ocasionando vertiginoso impulso na comercialização de embriões na mesma proporção que aumentou a inquietação com aspecto sanitário dos mesmos (FERREIRA, 2003). Ou seja, apesar de maior controle em relação à transmissão de agentes patogênicos empregando-se biotecnologia da reprodução, menor custo em relação ao transporte de animais, há, ainda, paradoxalmente, potencial para a transmissão de doenças apresentado por transferência de embriões de bovinos o que continua a ser uma preocupação justificável para as agências reguladoras (STRINGFELLOW; GIVENS; WALDROP, 2004).

Por isso, iniciou-se uma combinação de testes e tratamentos de embriões. Porém, poucos se estabeleceram eficazmente/efetivamente. Dentre os tratamentos estabelecidos e sugeridos pela International Embryo Transfer Society (IETS) há a Lavagem Sequencial (LS) e o Tratamento de Tripsina (TT) que possuem alcance externo ao embrião (STRINGFELLOW; GIVENS, 2000) e não possuem efetividade em ensaios *in vitro* (PALAZZI, 2010).

Consequentemente, torna-se relevante a avaliação de novas estratégias sanitárias, tanto externas quanto internas ao embrião e/ou oócitos, empregando-se princípios ativos de produtos naturais para diminuir a concentração viral. Portanto, neste trabalho é apresentado uma proposta de interferência no ciclo do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) que é um patógeno que demanda grande preocupação.

1.2 Doença

O BoHV-1 pertence a família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e ao gênero *Varicellovirus*. O BoHV-1 tem sido associado a diversas manifestações clínicas em bovinos, que incluem a rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), vulvovaginite pustular/balanopostite pustular infecciosa (IPV/IPB), abortos e infecção generalizada em neonatos. A IBR pode apresentar-se de forma subclínica, leve ou severa, e resultar em morbidade de até 100%, com mortalidade geralmente ausente ou baixa (<5%). As manifestações clínicas incluem febre, depressão, anorexia, dispnéia, taquipnéia, tosse e descargas nasais serosas, que podem tornar-se mucopurulentas com a progressão da enfermidade e a ocorrência de infecções bacterianas secundárias. A inflamação local pode levar ao bloqueio das vias respiratórias superiores. Pela dificuldade respiratória, os animais tendem a forçar a respiração pela boca levando à salivação abundante. A mucosa nasal pode se apresentar hiperêmica e com lesões vesiculares e erosivas. A característica mais importante e perigosa de todos os herpesvírus é a capacidade de causarem infecções inaparentes ou latentes. A latência é caracterizada pela ausência de replicação viral e de sinais clínicos, e dura toda a vida do hospedeiro o que facilita a disseminação da doença (FLORES, 2007).

O BoHV-1, assim como outros membros da subfamília *Alphaherpesvirinae*, estabelece a infecção latente em gânglios sensoriais, podendo ser periodicamente reativado sob condições de estresse ou tratamentos com corticoides. O vírus em latência não é detectado por procedimentos virológicos convencionais e o animal pode apresentar subsequentes e intermitentes episódios de excreção viral, não acompanhados de sinais clínicos, resultando na disseminação e perpetuação da infecção nos rebanhos (DIAS et al., 2008).

A rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) possui distribuição mundial, amplamente disseminada entre os rebanhos bovinos. Somente alguns países da Europa conseguiram excluir a doença, em decorrência de rígido programa de erradicação da IBR (ACKERMANN; WEBER; WYLER, 1990).

Segundo dados sorológicos e virológicos realizados, o BoHV-1 está disseminado por todas as regiões do Brasil, atingindo elevados índices de infecção nos rebanhos com consequências econômicas significativas (PITUCO et al., 1999). Em 1996, o Laboratório de Virose de Bovídeos do Instituto Biológico (LVB),

observou que 34% das amostras de soro bovino enviadas ao laboratório para diagnóstico de IBR reagiram positivamente para BoHV-1. Já, entre janeiro de 2001 a dezembro de 2002, o LVB constatou que dos 398 fetos recebidos de vários Estados, de rebanhos com problemas reprodutivos, 1,51% (6/398) foram positivos para BoHV-1 e que de 11.892 amostras de soro recebidas, 48% (5694/11892) foram sororeagentes.

O LVB avaliou, também, pela amostragem recebida na rotina entre janeiro de 2009 a julho de 2010, a dinâmica da infecção, pela pesquisa de anticorpos contra BoHV-1 em soro de bovinos com problemas reprodutivos de 317 propriedades compreendendo 20 estados brasileiros. Das amostras analisadas, 64,26% (3.069/4.776) foram reagentes contra o BoHV-1, o que revelou alta frequência de ocorrência de animais portadores destes vírus (LIMA et al., 2010).

1.3 Etiologia

O BoHV-1 é um vírus de fita dupla de DNA de aproximadamente 137-139 kpb (FIELDS e KNIPE, 1992; ROIZMANN et al., 1992). Os herpesvírus possuem quatro características constantes e principais: 1. Codificam um grande número de enzimas relacionadas com o metabolismo de nucleotídeos, síntese do ácido nucléico e processamento de proteínas; 2. A síntese do DNA viral e a montagem do capsídeo ocorrem no núcleo da célula hospedeira e a aquisição do envelope viral ocorre durante o trânsito dos nucleocapsídeos através da membrana nuclear ou através de organelas citoplasmáticas envelopadas (como Complexo Golgiense); 3. A produção da progênie viral pode ser acompanhada da destruição irreversível da célula infectada; 4. São capazes de permanecer latentes nos seus hospedeiros naturais. Nas células infectadas de forma latente os genomas virais se mantêm na forma circular episomal ocorrendo pouca ou nenhuma expressão gênica. Esses genomas retêm a capacidade de replicar, que ocorre por ocasião da reativação da infecção latente (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2001; FLORES, 2007).

A capacidade de estabelecer latência é uma característica interessante para a perpetuação dos vírus, pois se estabelecem em gânglios sensoriais, principalmente os trigêmeos. Já, o ciclo lítico pode ser ativado devido ao estresse à vacinação, transporte, etc (QUINCOZES, 2005).

1.4 Transmissão

Segundo Flores (2007), o vírus é disseminado pelas secreções respiratórias, oculares e genitais ao ser excretado em grandes quantidades por animais durante a infecção aguda. A dose mínima para infectar uma fêmea foi calculada em torno de 10^2 TCID₅₀/ml e, os animais, na fase infectante, excretam durante 15-16 dias títulos de até 10^7 TCID₅₀/ml. Após a infecção, ocorre a replicação do vírus nas células epiteliais das membranas mucosas e a disseminação do BoHV-1 pelo organismo por 3 vias: célula-a-célula, nervosa e sanguínea.

A transmissão célula-a-célula é recorrente nos herpesvírus e ocorre sem fase extracelular, através de pontes intercelulares (GAP junctions), e por essa razão os vírus ficam inacessíveis à ação de anticorpos específicos (ENGELS; ACKERMANN, 1996; LEMAIRE; PASTORET; THIRY, 1994; MEYER, 2001; STRAUB, 1991).

A volta ao ciclo lítico ocorre, por exemplo, quando o animal é submetido a alguma situação de estresse. Quando há o estabelecimento de latência, os vírus não são detectados pelos exames tradicionais e podem persistir por vários anos em animais sendo estes considerados fonte de infecção (FLORES, 2007).

1.5 Metabolismo das Plantas

Metabolismo refere-se ao conjunto de reações químicas que ocorrem, continuamente, na célula. As rotas metabólicas são determinadas por enzimas específicas que são essenciais neste direcionamento. Primariamente, as reações visam produzir energia (ATP), poder redutor (NADPH) e biossíntese de moléculas fundamentais a sobrevivência da célula vegetal (SANTOS, 2010).

Esta primeira rota recebe o nome de metabolismo primário. Vegetais, microorganismos e, em menor escala, animais, entretanto, apresentam específicos metabólicos diferenciados (enzimas e coenzimas, por exemplo) para a produção e acúmulo de substâncias diferentes do metabolismo primário. Costuma-se chamar este metabolismo de secundário. Embora não essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e perpetuação de sua espécie, em seu ecossistema (WINK, 1990).

A figura 1 ilustra como a origem de todos os metabólitos secundários é vinculada a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos (SANTOS, 2010)

Figura 1 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.
Fonte: Simões et al., 2010.

1.6 Metabólito secundário em destaque: Óleos essenciais

Este grupo é citado em exclusividade, pois são compostos que podem ser extraídos das plantas por processos de destilação, sendo o principal a hidrodestilação. São misturas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Sua principal característica é a volatilidade, diferindo-se, portanto, dos óleos fixos, misturas de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes. São solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter, recebendo, por isso, a denominação de óleos etéreos. Apresentam solubilidade limitada em água, mas o suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas hidrolatos. Além disso, possuem sabor ácido e picante, cores entre incolor a

amarelado/marrom claro (exceto a camomila), instabilidade na presença de luz, ar, calor, umidade e metais e, finalmente, são opticamente ativos (SIMÕES, 2010).

Quimicamente, constituem-se de misturas de substâncias de baixo peso molecular, formados por compostos como terpenos, sesquiterpenos, fenólicos, fenilpropanoicos, alifáticos não terpênicos, heterocíclicos; e funções químicas de alcoóis, cetonas, aldeídos, ácidos, ésteres, óxidos, acetatos, cada qual com sua característica e ação. Sua função nas plantas está relacionada à comunicação química no reino vegetal e atuam como armas de defesa química contra o reino animal (WOLFFENBUTTEL, 2007).

1.7 Produtos Naturais (PN)

Os produtos naturais a serem utilizados foram obtidos de plantas ou derivados, com algum tipo de indicação de ação antiviral, preferencialmente.

1.7.1 *Chamomilla recutita*

Planta herbácea, anual, aromática, de até um metro de altura com folhas pinatissectas (Figura 2). Popularmente conhecida como camomila, camomila dos alemães, camomila comum, etc (LORENZI; MATOS, 2002a). Nativa dos campos da Europa e aclimatada em algumas regiões da Ásia e nos países latino-americanos como o Brasil (SIMÕES, 2010). A infusão aquosa das flores ou próprio óleo essencial são empregados em pomadas e cremes e em preparações farmacêuticas para promover cicatrização da pele, alívio da inflamação de gengivas e como antivirótico no tratamento do herpes- propriedades estas devido ao abisabolol (JAKOVLEV et al., 1979).

Figura 2 - *Chamomilla recutita*
Fonte: LORENZI e MATOS, 2002a.

1.7.2 *Allium sativum*

Erva bulbosa, pequena, de cheiro forte e característico, perene, com bulbo formado de 8-12 bulbilhos (Figura 3). Conhecida no Brasil como alho. Originária, provavelmente, da Europa, é largamente cultivada em todo o mundo para uso de condimento de alimentos desde a antiguidade (LORENZI; MATOS, 2002b). Numerosas pesquisas farmacológicas têm mostrado a existência no alho propriedades antitrombótica, antifúngica, antibacteriana, antioxidante, hipotensora, cardioprotetora, hipoglicemiante e antiviral contra herpes simples tipos 1 e 2 (BLOCK e AHMAD, 1984).

Figura 3 - *Allium sativum*
Foto: Palazzi, E.G. (2014).

1.7.3 *Zingiber officinale*

Erva rizomatosa, ereta, com cerca de 50 cm de altura (Figura 4). Seu rizoma possui cheiro e sabor picante, agradável. Originária da Ásia e cultivada no Brasil

onde é conhecida como gengibre. Utilizada desde a época da antiga civilização greco-romana. Possui as seguintes ações: estimulante digestiva, antimicrobiana na região da garganta, anti-inflamatória, anti-reumática, antialérgica e antiviral (WRIGHT, 2002).

Figura 4 - *Zingiber officinale*
Foto: Palazzi, E.G. (2014).

1.7.4 *Syzygium aromaticum*

Árvore sempre verde, copa alongada, de até 8m de altura. Flores pedunculadas, aromáticas, frutos do tipo drupa elipsóide de cor vermelha. Popularmente chamado de cravo-da-índia (Figura 5). É originário da Índia e cultivado em vários países tropicais, inclusive o Brasil (sul da Bahia) (REIS et al., 2006). Estudos fitoquímicos do cravo registram como principal componente a presença de até 90% de óleo essencial, composto quase totalmente de eugenol acompanhado por cerca de 60 componentes em pequena concentração. Apresenta ação antioxidante, plaquetária (protetora contra trombose) antibacteriana, antifúngica e antiviral contra o herpes simples (SOUSA, 1991).

Figura 5 - *Syzygium aromaticum*
Foto: Palazzi, E.G. (2014).

1.7.5 *Illicium verum* Hook. f.

A árvore do *Illicium verum* Hook f. pode atingir até 5 metros de altura produzindo pequenas flores amarelas e folhas largas de coloração verde intenso, entretanto, o que mais caracteriza esta planta são seus frutos na forma de estrela, com proeminentes pontas, de cor acastanhada, sendo que em seu interior inserem-se as sementes. São conhecidas popularmente como anis. Apresenta flores decorativas que exalam aroma agradável, e são bastante apreciadas em chás, bebidas alcoólicas e na culinária (DUARTE, 2010). Os frutos e sementes (Figura 6) são utilizados pelas indústrias farmacêuticas, de perfumarias e de bebidas. Não é plantado comercialmente no Brasil, e é a base para o fármaco Tamiflu, utilizado para combater a gripe A (gripe suína) sendo originário do Sul da China (ZHAI et al., 2009).

Figura 6 - *Illicium verum* Hook. f.
Foto: Palazzi, E.G. (2014).

1.7.6 *Punica granatum*

Arbusto ramoso de até 3 m de altura, com folhas simples, cartáceas, dispostas em grupo de 2 ou 3, de 4-8 cm de comprimento. Flores solitárias constituídas de corola vermelho-alaranjada e um cálice esverdeado, duro e coriáceo. Frutos do tipo baga, globóides, medindo até 12 cm, com numerosas sementes envolvidas por arilo róseo, cheio de um líquido adocicado (Figura 7). Provavelmente

originária da Ásia e espalhada em toda a região do Mediterrâneo e cultivada em quase todo o mundo, inclusive no Brasil, onde recebe o nome de romã (LORENZI; MATOS, 2002c).

Seus frutos são comestíveis, sendo o uso do pericarpo, que é a parte externa do fruto, para tratamento de inflamações na boca e na garganta. A análise fitoquímica desta planta registra, além dos alcaloides, a presença de até 28% de taninos nas cascas do caule e dos frutos e, em menor quantidade, nas folhas; na semente foi registrada 7% de um óleo fixo, que entre seus ácidos graxos está principalmente o ácido punícico (SOUSA et al., 1991).

Os ensaios farmacológicos realizados com extratos do pericarpo mostraram: atividade contra bactérias patogênicas, inibição do crescimento de tumores experimentais, enquanto os taninos do pericarpo se mostraram ativos contra o vírus HVS-2 do herpes genital, inibindo sua replicação e bloqueando, em cultura de células, a adsorção nas células já testadas (LORENZI; MATOS, 2002c).

Figura 7 - *Punica granatum*

Foto: Palazzi, E.G. (2014)

1.7.7 *Melissa officinalis*

Planta herbácea perene, aromática, ramificada desde a base, ereta ou de ramos ascendentes, de 30-60 cm de altura, nativa da Europa e Ásia e cultivada no Brasil (Figura 8) desde tempos remotos para fins medicinais, tendo sido introduzida no Brasil a mais de um século (COUTO, 2006). No Brasil é conhecida popularmente como melissa, cidreira ou melissa romana (LORENZI; MATOS, 2002d). Suas folhas e inflorescências são empregadas na forma de chá, de preferência com a planta

fresca, como calmante nos casos de ansiedade, insônia e também como medicação contra dispepsia, estados gripais, bronquite crônica, cefaléias, enxaqueca, dores de origem reumática, para normalizar as funções gastrintestinais e, externamente, no tratamento de manifestações virais, sendo que seus taninos diferem dos normalmente encontrados em outras plantas, atribuindo-se a estes, forte ação virustática, principalmente sobre o Vírus Herpes Simplex I causador do herpes labial (LORENZI; MATOS, 2002d).

Figura 8 - *Melissa officinalis*

Foto: Simoni, I.C. (2014).

1.7.8 Plantas do gênero *Pterodon*

As plantas do gênero *Pterodon* (*Fabaceae/Leguminosae*) (Figura 9), conhecidas popularmente como “sucupira branca” ou “faveira”, encontram-se distribuídas pela região central do Brasil e são frequentemente utilizadas na medicina popular por suas propriedades antirreumáticas, analgésicas e antiinflamatórias. Nos últimos anos, o interesse por estas plantas tem aumentado consideravelmente (HANSEN et al., 2010).

Os efeitos biológicos dos diferentes fitoextratos e metabólitos puros têm sido investigados em vários modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Uma amostra do extrato etanólico da casca e outra da semente de sucupira foram cedidas por colaboradora que atualmente realiza trabalhos no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto Biológico (IB) de São Paulo.

Figura 9 - *Pterodon emarginatus* (Sucupira): árvore, fruto e semente.

Foto: Hansen, D. (2014)

1.7.9 *Agaricus blazei*

Agaricus blazei (Figura 10) é um basidiomiceto, nativo do Brasil, e tem sido frequentemente utilizada na medicina popular, principalmente na forma de chá. O corpo de frutificação de *A. blazei* contém 85-87% de água. Quando desidratado, este fungo é rico em proteínas (40-45%), hidratos de carbono (38-45%), fibras (6-8%), lipídios(3-4%) e vitaminas, tais como B1, B2 e niacina. Ele também contém ergosterol, que é convertido em vitamina D2. O potássio é o conteúdo mineral principal de *Agaricus blazei* (OLIVEIRA, 2002).

Popularmente, este fungo é usado contra o estresse físico e mental, osteoporose e úlcera gástrica, como estimulante da imunidade e para a redução do colesterol. Também é utilizado como antioxidante, antimutagênico, e anticarcinogênico. O extrato aquoso apresenta inibição sobre a partícula viral, durante o ciclo replicativo. Ensaios demonstraram que *A. blazei* inibiu o efeito citopático do Vírus da Encefalite Equina (BRUGGEMANN et al., 2006).

Figura 10 - *Agaricus blazei*

Foto: Andrade, M. C. N. (2014).

1.7.10 Própolis

A própolis é um produto de composição complexa constituída de material gomoso, resinoso e balsâmico. É elaborada a partir de substâncias colhidas pelas abelhas melíferas em diferentes partes das plantas e é de composição complexa, podendo conter mais de 400 compostos químicos diferentes. Depois de transportadas até a colmeia (Figura 11), estas substâncias sofrem a adição de cera, pólen e produtos do metabolismo das abelhas, como enzimas salivares, alterando a sua constituição inicial.

As abelhas usam própolis para recobrir a parede da colmeia, reforçar favos, preencher fissuras, restringir a entrada e embalsamar animais (REIS et al., 2000). O uso da própolis pelo homem é muito antigo, talvez pelo fato desta mistura apresentar diferentes atividades destacando-se a antibacteriana, a antifúngica, a citostática, a imunoestimulante, a anti-inflamatória e a antiviral como as mais conhecidas (LEVY, 1999).

Figura 11 - Colmeia de abelhas
Foto: Malaspina, O. (2014).

2 HIPÓTESE

O tratamento com Produtos Naturais (PN) na Reprodução Animal/Fertilização *in vitro* (FIV) pode ser uma alternativa para a diminuição da replicação viral do herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), *in vitro*, tornando-se um complemento importante à lavagem sequencial (LS) e ao tratamento com tripsina (TT) em Centrais de FIV de bovinos.

3.1 Objetivo geral

Avaliar qual o potencial que os tratamentos com Produtos Naturais possuem em reduzir a replicação viral em embriões murinos (usados como modelo para embriões bovinos) infectados experimentalmente com BoHV-1 Colorado.

3.2 Objetivos específicos

- a) Estabelecer concentrações de extratos de Produtos Naturais (PN) não citotóxicas em relação às células MDBK e, posteriormente, aos embriões murinos *in vitro*;
- b) Verificar a eficiência dos PN, *in vitro*, em relação à diminuição da replicação viral do BoHV-1-Colorado em embriões murinos através da análise morfológica e taxa de clivagem, da n-PCR, da co-cultura em células MDBK e da titulação viral;
- c) Caso ocorra diminuição da replicação viral decorrente do sucesso de determinado tratamento, estabelecer características morfológicas dos zigotos/embriões com a microscopia eletrônica;
- d) Estabelecer quais tratamentos são eficientes pela análise do item “b” e “c”.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A seguir, será feita a descrição das técnicas e os materiais necessários para a realização deste trabalho.

4.1 Obtenção dos Óleos Essenciais, Extratos Etanólicos e Aquosos

A obtenção dos produtos de plantas e sua aplicação na presente pesquisa têm como ponto crucial a polaridade uma vez que os zigotos murinos localizam-se em meio aquoso (meio de cultura celular). Os óleos essenciais são as substâncias mais apolares, enquanto o extrato aquoso é mais polar em meio aquoso e o produto extraído pelo etanol (extrato etanólico), de polaridade intermediária. Segue a descrição dos procedimentos para o óleo essencial, extrato etanólico e extrato aquoso.

4.1.1 Óleos essenciais

A obtenção do óleo essencial segue o preceito básico da hidrodestilação. Para tanto utilizamos o aparelho Clevenger MA 553 Marconi (Figura 12), adaptado a um balão de fundo redondo com capacidade de 1.000 mL (MING et al., 1999). As diferentes partes das plantas, já secas, foram trituradas usando Processador Walita Master RI7620. Algumas necessitaram ser peneiradas, como o caso da *Punica granatum*. Adicionamos ao balão de fundo redondo 500 mL de água e as plantas relacionadas neste trabalho.

Ligamos o balão ao condensador formando um recipiente fechado conectado por meio de um tubo a uma serpentina refrigerada por água (processo semelhante ao de um alambique). Aquecemos diretamente o balão de fundo redondo em manta elétrica por, aproximadamente, 180 min. Com o aquecimento ocorreu ruptura da parede celular, liberando o óleo essencial e iniciando-se o processo de volatilização da água e do óleo essencial. Com isso, o vapor de água arrasta o óleo essencial, passando pelo tubo ligado à serpentina, ocasionando a condensação do óleo essencial e da água.

Na outra extremidade, colocamos um erlenmeyer para captação do hidrolato (mistura de água + óleo). Depois de obtido o hidrolato, o óleo foi extraído com 50 mL hexano em funil de separação (Figura 13). A extração foi repetida por 3 vezes. A

fração orgânica obtida foi tratada com sulfato de sódio anidro para a retirada inicial de resquícios de água.

Após 5 minutos em repouso, a solução foi filtrada em funil e filtro para retirada do excesso de sulfato de sódio anidro e acondicionada em frascos de 50 mL, coberta com papel alumínio perfurado e protegida da luz por, aproximadamente, 10 dias objetivando a evaporação total da água e obtenção do óleo essencial puro. A tabela 1 faz a discriminação das partes utilizadas, massas e locais de coleta/aquisição de cada planta utilizada para obtenção dos óleos essenciais.

Após a produção, os óleos Essenciais de *Chamomilla recutita*, *Allium sativum*, *Zingiber officinale*, *Syzygium aromaticum*, *Illicium verum* Hook f., *Punica granatum* e *Melissa officinalis* foram acondicionados em recipientes e conservados em geladeira para testes de toxicidade e avaliação da diminuição da taxa viral do BoHV-1 em embriões murinos.

Figura 12 - Extração por hidrodestilação. Foto: Santos, V. M. S.(2011).

Figura 13 - Extração do óleo em funil de separação. Foto: Santos, V. M. S.(2011).

Tabela 1 - Plantas utilizadas para obtenção dos Óleos essenciais

Nome da Planta	Parte utilizada	Massa (Kg)	Local da aquisição
<i>Chamomilla recutita</i>	folhas e flores	1,5	Mercado Municipal do Sacomã-São Paulo
<i>Allium sativum</i>	bulbos de alho	1,78	Mercado Municipal do Sacomã São Paulo
<i>Zingiber officinale</i>	rizoma seco	0,84	Mercado Municipal do Sacomã São Paulo
<i>Syzygium aromaticum</i>	botões florais	0,96	Mercado Municipal do Sacomã São Paulo
<i>Illicium verum</i> Hook. f	flores	0,75	Supermercado da zona Sul de São Paulo
<i>Punica granatum</i>	pericarpo	6,5	Mercado Municipal de São Paulo-Centro
<i>Melissa officinalis</i>	folhas	1,69	Mercado Municipal do Sacomã São Paulo

4.1.2 Extratos Etanólicos

Partes das plantas (Figura 14 e Tabela 2) foram trituradas (Figura 15) e colocadas em béqueres, após serem peneirados (Figura 16), por 72 horas com etanol absoluto 97 °GL. Após este período, o líquido foi filtrado (Figura 17) e colocado em pequeno balão e levado ao rotaevaporador (Figura 18). Sob pressão reduzida e temperatura de 50 °C houve a separação do extrato e o etanol. O solvente recuperado foi novamente adicionado às mesmas partes das plantas trituradas e submetidas à maceração por mais 24 horas, sendo, em seguida, filtrado e evaporado, como descrito anteriormente. Este procedimento foi repetido novamente, por mais duas vezes, num total de três extrações. Os extratos obtidos foram reunidos formando o extrato hidroalcoólico.

Tabela 2 - Plantas utilizadas para obtenção dos Extratos Etanólicos

Nome da Planta	Parte utilizada	Massa (Kg)	Local da aquisição
<i>Chamomilla recutita</i>	folhas e flores	0,3	Mercado Municipal do Sacomã-São Paulo
<i>Allium sativum</i>	bulbos de alho	0,3	Feira livre -São Paulo
<i>Zingiber officinale</i>	rizoma seco	0,3	Feira livre -São Paulo
<i>Syzygium aromaticum</i>	botões florais	0,3	Mercado Municipal do Sacomã São Paulo
<i>Illicium verum</i> Hook. f	Flores	0,3	Supermercado da zona Sul de São Paulo
<i>Punica granatum</i>	Pericarpo	2,5	Mercado Municipal de São Paulo-Centro
<i>Melissa officinalis</i>	Folhas	0,3	Mercado Municipal do Sacomã São Paulo

Figura 14 – Fruto de *Punica granatum* (Romã) em corte. Foto: Palazzi, E. P.(2011).

Figura 15 – Pericarpo triturado em Mixer. Foto: Palazzi, E. P.(2011).

Figura 16 - Obtenção de pericarpo de Romã em pó. Foto: Palazzi, E. P.(2011).

Figura 17 - Separação por filtração. Foto: Palazzi, E. G.(2011).

Figura 18 - Rotaevaporador. Foto: Santos, V. M. S.(2011).

4.1.2.1 EE de *Pterodon emarginatus* (Sucupira/Casca e Semente)

Os extratos etanólicos da casca e semente de *Pterodon emarginatus* foram gentilmente cedidos pela pesquisadora Profa. Dra. Daiane Hansen da Universidade Federal de Goiás (UFG), atualmente no IB.

Os frutos foram coletados durante os meses de setembro e outubro na Fazenda Eldorado, Urutaí, estado de Goiás. A espécie *Pterodon emarginatus* (Pe) (exsicata) foi identificada no Instituto de Botânica de São Paulo, Herbário SP, por botânico responsável. Os frutos de Pe foram separados em duas partes, o fruto total

(contendo óleo, semente) e a casca que circunda o fruto e chamados, a partir desta fase de fruto e casca, respectivamente.

Aproximadamente 150 g dos frutos em separado foram moídos em moedor doméstico e extraídos em 400 mL etanol absoluto, incubados por 10 minutos sob agitação, seguido de filtração em papel filtro pregueado. Os extratos foram evaporados em rotaevaporador Buchi R-210 sob pressão e temperatura reduzidos. Este procedimento foi repetido por 3 vezes. O extrato etanólico da casca de Pe (EE-c Pe) bem como o Extrato Etanólico das sementes (EEs-Pe) foram estocados a 4 °C.

4.1.3 Extratos Aquosos

Os ‘produtos’ *Agaricus blazei* e própolis foram adquiridos em farmácias do município de São Paulo. Foram diluídos em solução fisiológica e filtrados em membrana de 0,22 µm.

4.1.3.1 EA de *Agaricus blazei*

Foi adquirido o cogumelo *Agaricus blazei* da **HERBARIUM LABORATÓRIO BOTÂNICO LTDA** (Registro no Ministério da Agricultura sob nº 4.8697.0078). Segundo o laboratório responsável, o produto, de ocorrência natural das regiões serranas da Mata Atlântica do sul do Estado de São Paulo, é protéico e apresenta inúmeras vitaminas associadas. Foi desidratado e acondicionado em blisters contendo 30 cápsulas a caixa.

4.1.3.2 EA de Própolis

Foi adquirido a própolis da **Apis Flora®** (Registro no Ministério da Agricultura SIF/DIPOA sob nº 0052/3733) Segundo fabricante, o extrato de própolis foi diluído em água purificada, não contém quantidade significativa de valor calórico, carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, fibra alimentar e sódio. O produto leva o selo da “Associação de Diabetes Juvenil”, certificando que o produto é livre de impurezas e pode ser usado por diabéticos.

4.2 Preparação das concentrações dos Produtos Naturais (PN)

Foram realizadas diluições dos extratos dos produtos naturais para verificarmos quais concentrações não são tóxicas, inicialmente para as células MDBK ('ampla sintonia' ou 'sintonia grossa') e zigotos murinos ('sintonia fina') e, posteriormente, análise do bloqueio viral.

4.2.1 Preparação das concentrações de OE

Os óleos essenciais obtidos de cada planta foram diluídos em óleo mineral estéril. Inicialmente foram feitas as seguintes diluições: 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% e 1%. Em um segundo momento, usamos concentrações menores: $10^{-1}\%$, $10^{-2}\%$, $10^{-3}\%$, $10^{-4}\%$, $10^{-5}\%$, $10^{-6}\%$ e $10^{-7}\%$.

4.2.2 Preparação das concentrações dos EE e EA

Os extratos etanólicos obtidos de cada planta, o própolis e *Agaricus blazei* foram diluídos em solução fisiológica estéril. Inicialmente foram feitas as seguintes diluições: 20%, 10%, 5%, 4%, 3% e 2%. Posteriormente, usamos concentrações menores: 1%, $10^{-1}\%$, $10^{-2}\%$, $10^{-3}\%$, $10^{-4}\%$, $10^{-5}\%$, $10^{-6}\%$ e $10^{-7}\%$.

4.3 Exposição dos zigotos murinos aos PN e ao vírus *in vitro* durante 24h

Os zigotos, durante o período de 24 h, *in vitro* em placa de cultivo de poliestireno Ø40x11mm (Zellkultur Schale, Berlim Alemanha), foram divididos em grupos descritos a seguir: zigotos controle sem exposição aos extratos e aos vírus (Grupo G1); zigotos expostos aos vírus (Grupo G2); zigotos expostos aos Produtos Naturais (óleos essenciais, extratos etanólicos e extratos aquosos_Groupo G3); zigotos expostos aos Produtos Naturais e aos vírus (óleos essenciais, extratos etanólicos e extratos aquosos_grupo G4). Esta descrição de grupos (G1, G2, G3 e G4) é um padrão seguido em todos os tratamentos e experimentos. As tabelas 7, 11 e 14 fornecem os números de zigotos utilizados no experimentos.

4.4 Linhagem estabelecida de rim bovino (MDBK)

As células MDBK foram cedidas, gentilmente, pela Dra Adriana Hellmeister de Campos Nogueira, Dra Eliana De Stefano, Dra Liria Hiromi Okuda, Dra Michele dos Santos Lima, Dra Maira de Sousa Nunes Martins sob responsabilidade da Dra Edviges Maristela Pituco do Laboratório de Viroses de Bovídeos do Centro de Sanidade Animal do Instituto Biológico. As células em questão, da linhagem de epitélio renal bovino “*Madin Darby Bovine Kidney*” (MDBK), foram adquiridas da “*American Type Culture Collection*” (ATCC, Manassas, EUA).

As células foram cultivadas em monocamadas em garrafas de poliestireno próprias para cultivo celular (TPP, *Techno Plastic Products AG*®, Switzerland) em meio de crescimento, composto por Meio Essencial Mínimo (MEM – Nutricell®, Campinas, Brasil), tamponado com 25 mM de ácido 4-(2- hidroxietil)-1-piperazineetanossulfônico (HEPES – Biosolve®, Westford, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino esterilizado e inativado (SFB – Nutricell®, Campinas, Brasil) e mantidas em estufa à temperatura de 37 °C e 5% de CO₂.

Para a manutenção da linhagem, o repique das células foi realizado entre três e cinco dias, usualmente na proporção 1:3, utilizando-se solução de Tripsina-Versene (Sigma- Aldrich®, Steinheim, Alemanha) para a individualização das células. Para obtenção das suspensões de células utilizadas nas reações de VN, o repique foi realizado da mesma forma, sendo que a contagem das células para preparação da diluição necessária (3x10⁶/mL) foi efetuada em câmara de Neubauer (Optik Labor®, Friedrichshofen, Alemanha) (SILVA, 2011).

4.5 Vírus

Vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, amostra Colorado com título de 10⁸ TCID₅₀/mL, mantida em meio Eagle MEM sem soro à – 80 °C. A amostra foi cedida pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) & **Instituto de Ciências Básicas da Saúde**- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICBS-UFRGS).

4.5.1 Titulação dos vírus

Volumes de 0,1 mL contendo 3×10^4 (30.000) células MDBK foram distribuídos em cada cavidade de placas de microtitulação com 96 poços. As placas foram incubadas a 37-38 °C em estufa com 5% de CO₂ e, após 24 horas, lavadas com solução salina de Hanks. Os monocamadas foram inoculadas com 0,1mL de diluições de base 10 variando de 10⁻¹ a 10⁻⁸ das amostras dos sobrenadantes das culturas e do lisado celular. As placas foram novamente incubadas nas condições já descritas e examinadas após 24 e 48 horas para a verificação da ocorrência de Efeito Citopático (CPE). Os títulos foram calculados em dose infectante por cultura de tecido 50% (TCID₅₀/ml) expressa em logaritmo decimal (REED e MUENCH, 1938).

4.6 Métodos de detecção do BoHV-1 em cultivo de células

As amostras foram inoculadas em monocamadas de células MDBK e, após 48h de incubação a 38 °C em estufa com 5% de CO₂ e 95% de umidade, foi verificada a presença ou não de efeito citopático (CPE). O BoHV-1 Colorado induz um CPE focal, com arredondamento das células e subsequente lise.

4.7 ANIMAIS

Foram utilizados 280 camundongos Swiss da colônia do biotério da **ANILAB - Animais de Laboratório Criação e comércio LTDA- Paulínia-SP**.

4.7.1 Camundongo swiss

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno contendo cama de maravalha de pinho branco autoclavada (121 °C/30 minutos) e recebendo dieta peletizada. Foi utilizado o biotério de Imunobiológicos do Instituto Biológico de São Paulo. O biotério apresenta entrada de ar e luz natural e temperatura ambiente com foto período relativo à latitude -23° 32' 51'', longitude de 46° 38' 10'' nas estações

outono-inverno e primavera-verão. Foram utilizadas fêmeas púberes, nulíparas, entre 6 a 8 semanas de idade, acasaladas com machos inteiros da mesma linhagem e idade, após superestimulação ovariana. Foram mantidos 6 animais por caixa até o momento do acasalamento, quando foram colocadas 2 fêmeas para cada macho.

4.7.2 Superestimulação ovariana

Os hormônios utilizados para superestimulação ovariana foram a gonadotrofina coriônica equina (eCG/PMSG) (Folligon[®] 5000 UI- International B.V.Boxmeer-Holanda) e a gonadotrofina coriônica humana (hCG) (NOVORMON[®] 5000- International B.V.Boxmeer-Holanda). Os hormônios liofilizados foram ressuspensos em solução fisiológica esterilizada de 0,9% de NaCl na concentração de 25 UI/mL e mantidos protegidos da luz, aliquotados e congelados (-20°C) até o momento do uso. Foram injetados com agulha de 16x0,5 mm, intraperitonealmente, por animal, 0,2 mL (5UI) de cada hormônio (figura 19). Inicialmente, as fêmeas receberam 0,2 mL de eCG/PMSG e após 46-48 horas receberam 0,2 mL de hCG. Após a aplicação do hCG foram colocadas 2 fêmeas para cada macho para acasalamento e depois de 16-18 h foi realizada a coleta dos zigotos (Esquema 1) (HOGAN; CONSTANTINI; LACY, 1986).

Figura 19 - Aplicação, intraperitonealmente, de hormônios hCG e eCG. Foto: Palazzi, E. P.(2012).

Esquema 1 - Etapas do processo de superovulação

4.7.3 Coleta dos zigotos

Os animais foram anestesiados em uma câmara de CO₂ (Figura 20A e 20B) (PASSOS et al., 2002). O ventre do animal foi higienizado com uma solução de álcool etílico a 70% antes da incisão (Figura 21A). Foi feita uma abertura na pele e peritônio para a coleta dos ovidutos (Figuras 21B à 21D). Os ovidutos foram mantidos aos pares, em gotas de 200 µl de meio de lavagem tamponado (Cultilab®- Campinas, SP) (Figura 22A) em placa de petri esterilizadas até que todos os animais fossem eutanasiados. Com o auxílio de uma lupa (Coleman) e duas agulhas 16x0,5 mm esterilizadas, os ovidutos (Figura 22B) foram abertos (40X) (Figuras 22C e 22D), os zigotos foram coletados e rapidamente transportados para uma nova gota de meio de lavagem (200 µL). Os zigotos foram lavados por 30 segundos em solução de pronase a 0,5% a 37 °C, para total remoção das células do cúmulos. Em seguida, foram lavados em 3 gotas de meio de lavagem acrescido de 1% de soro fetal bovino (SFB) para inativação da enzima (HOGAN; CONSTANTINI; LACY, 1986). Em todos os experimentos desse trabalho, somente foram utilizados embriões com zona pelúcida íntegra.

Figura 20 - Câmara de Eutanásia: A- Campânula de vidro, mangueira de borracha, regulador de pressão e cilindro especial para CO₂; B- Camundongo anestesiado pelo CO₂.

Figura 21 - Procedimento de coleta dos ovidutos. A-Higienização do abdômen do animal; B e C- Abertura da pele; D- Abertura do peritônio; E-Oviduto (indicado pela tesoura). Foto: Palazzi, E. P.(2012).

Figura 22 - Coleta dos zigotos. A-Ovidutos logo após a coleta em meio de lavagem; B- Ovidutos visualizados sob lupa (40X); C-Utilização de agulhas para abertura dos ovidutos; D-Zigotos observados sob lupa (40X). Foto: Palazzi, E. P.(2011).

4.7.4 Contaminação dos zigotos murinos com BoHV-1 Colorado e exposição aos Produtos Naturais não miscíveis (Óleos Essenciais) ao meio de cultura *in vitro*

Diluímos cada óleo essencial em óleo mineral esterilizado, conforme já descrito. Adicionamos os óleos essenciais diluídos sob as gotas de meio de cultura, com os zigotos murinos e mantivemo-los na estufa com 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa a 37 °C , durante 24h.

Os zigotos murinos foram divididos em quatro grupos para cada óleo essencial: zigotos sem exposição aos óleos essenciais e sem contaminação com vírus (Grupo 1_ **G1_{oe}**); zigotos contaminados com BoHV-1 Colorado e sem adição dos óleos essenciais (Grupo 2_ **G2_{oe}**); zigotos expostos aos óleos essenciais e sem contaminação ao BoHV-1 (Grupo 3_ **G3_{oe}**); zigotos contaminado com BoHV-1 Colorado (título 10^8 TCID₅₀/mL) e exposto aos óleos essenciais (Grupo 4_ **G4_{oe}**).

Todos os grupos permaneceram em estufa em condições descritas acima. Foi feito cálculo para ajuste das concentrações de extrato para cada planta. Usamos 10µL de vírus BoHV-1 Colorado com título 10^8 TCID₅₀/mL nos grupos **G2** e **G4**. Os extratos foram elaborados no Laboratório de Química de Farmacologia de Produtos Naturais do Instituto Biológico de São Paulo sob supervisão da Dra Joana D'Arc Felicio de Souza conforme já descrito.

4.7.5 Contaminação dos zigotos murinos com BoHV-1 Colorado e exposição aos Produtos Naturais (Extrato Etanólico e Extrato Aquoso) miscíveis ao meio de cultura in vitro

Os zigotos murinos foram divididos em quatro grupos para cada novo Produto Natural (Extrato Etanólico e Aquoso): zigotos sem exposição aos extratos e contaminação aos vírus (Grupo 1_ **G1**); zigotos contaminados com BoHV-1 Colorado (Grupo 2_ **G2**); zigotos expostos aos extratos (Grupo 3_ **G3**); zigotos contaminado com BoHV-1 Colorado e exposto aos extratos (Grupo 4_ **G4**). Todos os grupos permaneceram em estufa com 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa a 37°C. Foi feito cálculo para ajuste das concentrações de extrato para cada planta. Usamos 10µL de vírus BoHV-1 Colorado com título de 10^8 TCID₅₀/ml nos grupos **G2** e **G4**. Os extratos foram elaborados no Laboratório de Química de Farmacologia de Produtos Naturais do Instituto Biológico de São Paulo sob supervisão da Dra Joana D'Arc Felicio de Souza conforme já descrito.

4.8 Métodos de detecção do BoHV-1 nas amostras em cultivo de células

Uma amostra aleatória dos zigotos (relativo a todos aos grupos G1, G2, G3 e G4 correspondente a cada PN usado) após 24 h de exposição ao BoHV-1 Colorado

e submetidos à Lavagem Sequencial e Tratamento com Tripsina e uma amostra da gota do meio de cultura (GT) de cada grupo foram inoculadas (10 µl) em monocamadas confluentes de células MDBK em meio Eagle MEM sem soro fetal bovino, com bicarbonato e 100µg/ml de gentamicina. As culturas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂, 95% de umidade a 38 °C para a verificação da presença ou não de efeito citopático (CPE) após 72 h e posterior titulação.

4.8.1 Detecção do BoHV-1-Colorado nas amostras pela nested-PCR

Os protocolos utilizados para detecção dos vírus pela nested-PCR, extração e amplificação do DNA das amostras e protocolo utilizado para realização da eletroforese seguiram a metodologia preconizada no Manual de Padrões para Testes Diagnósticos e Vacinas da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2008). O protocolo foi realizado pela Dra Líria Okuda do LVB do Instituto Biológico (IB).

4.8.1.1 Identificação viral do BoHV-1 Colorado

O protocolo para a identificação do BoHV-1 seguiu as seguintes etapas: Extração do DNA, Iniciadores (primers específicos) e Reações de PCR.

4.8.1.2 Extração do DNA

As amostras de lavado de embrião foram submetidas à extração do DNA viral total com o Trizol® LS Reagent (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante.

Para cada 75 µL de amostra de lavado de embrião, foram adicionados 225 µL de Trizol LS Reagent® (Invitrogen), e após agitação em vórtex por 15 segundos, incubados a 30 °C durante 5 minutos sob agitação constante (850 g). Em seguida foram adicionados 60 µL de clorofórmio (Merck®), homogeneizados e novamente

incubadas a temperatura de 30 °C por 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 12.000xg a 4 °C, por 15 minutos.

Após esta etapa, com o auxílio de uma micropipeta, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 90 µL de etanol 100% (ETOH 100%), deixando incubar por 3 minutos. Em seguida os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 5.000 xg. O sobrenadante foi aspirado cuidadosamente com o auxílio de uma micropipeta e em seguida o *pellet* passou pela etapa de lavagem adicionando-se 300 µL citrato de sódio em 10% de etanol e incubado por 15 minutos sob agitação constante (850 g) em temperatura ambiente. Depois de transcorrido este tempo, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 5.000xg. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e em seguida repetiu-se a etapa anterior.

Com auxílio de uma micropipeta, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 300 µL de Etanol 75% e incubado por 10 minutos sob agitação constante (850 g) em temperatura ambiente. Transcorrido esse tempo, os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos a 5.000 xg. Descartou-se o sobrenadante e para secagem do *pellet* os tubos foram mantidos abertos em temperatura ambiente por 10 minutos. Acrescentou-se 45 µL de NaOH (8 milimolar). Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 12.000xg a 4 °C. Transferiu-se para um novo tubo 30 µl do sobrenadante e acrescentou-se 7,5 µL de uma solução tampão (HEPES). As amostras de DNA extraídas foram estocadas a – 70 °C até a etapa de amplificação.

4.8.1.3 Iniciadores

A identificação do BoHV-1 foi realizada utilizando primers específicos desenhados a partir da região codificadora da glicoproteína I (WHITBECK et al., 1988).

A tabela abaixo (Tabela 3) mostra os *primers* utilizados nas diferentes reações de PCR e *nested-PCR* para BoHV-1.

Tabela 3 - Primers das reações de PCR e *nested* PCR para BoHV-1 Colorado.

Primer	Posição	Seqüência	Produto (bp)
PCR (externos)			
Primer 1	624-645	5'-CACGGACCTGGTGGACAAGAAG-3'	468
Primer 2	1070-1091	5'CTA CCG TCA CGT GAG TGG TAC G3'	
Nested-PCR (interno)			
Primer 3	663-680	5'-AGCCGAGTACCTGCGCAG-3'	344
Primer 4	990-1007	5'-TTCCGAAGAGCTGTTGTACA-3'	

Fonte: WHITBECK et al., 1988

4.8.1.4 Reações de PCR

A reação de PCR foi realizada seguindo as especificações preconizadas no kit comercial PCR Master Mix (PROMEGA). A reação foi realizada num volume total de 25 µL, contendo PCR Master Mix 1X (50u/ml Taq DNA Polymerase; 400 µM de cada DNTP e 3,0 mM MgCl₂), 0,5 µM de cada primer e 5 µL de DNA.

Para a reação de *nested*-PCR (segunda amplificação), seguiu-se também o protocolo preconizado para o kit comercial PCR Master Mix (PROMEGA) num volume total de 25 µL contendo PCR Master mix (50u/ml Taq DNA Polymerase; 400 µM de cada DNTP e 3,0 mM MgCl₂), 0,5 µM de cada primer e 2 µL de DNA já amplificado.

As condições de temperatura e ciclos para as reações de amplificação do DNA (PCR) e a *nested*-PCR foram:

Ciclo:

1. 94 °C – 5 min	} 35 x	4. 72 °C - 1 min
2. 94 °C – 50 seg		5. 72 °C – 5 min
3. 60 °C – 50 s		6. 10 °C - Hold

O produto de cada amplificação foi analisado em gel de agarose a 2%, preparado em tampão TAE 1X e submetido à eletroforese com voltagem constante de 100 V, por 1 hora. A presença de amplicons foi evidenciada após coloração com brometo de etídio (5 µg/mL) e visualização em luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos de DNA foi comparado com um padrão de peso molecular apresentando incrementos de 100 pb (DNA *ladder* de 100 pb – Fermentas[®]). O tamanho esperado do produto da PCR é de 468 bp, porém a reação de *nested* –PCR produz um produto de 344 bp.

4.9 Avaliação da localização da partícula viral por microscopia eletrônica

Após o período de 24h, os zigotos murinos foram lavados em PBS e fixados por 1 hora em glutaraldeído 2,5% em tampão PBS 0,1 M e pH 7,4. Foram emblocados em agarose 2% (blocos de aproximadamente 2mm²) e preparados para serem cortados.

O protocolo a seguir foi realizado pelo Sr. Gaspar Ferreira de Lima do ICB/USP: três lavagens de 15 minutos em tampão PBS seguida por pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% em PBS durante 1 hora e três lavagens de 15 minutos em água destilada. Imersão de 1 hora em uranila a 0,5% em água destilada e novamente três lavagens de 15 minutos em água.

Em seguida, para desidratação, 15 minutos de lavagem em acetona 50%, depois 15 minutos em acetona 70%, mais 15 minutos em acetona 90% e finalmente dois banhos de 10 minutos seguidos por um último de 15 minutos em acetona 100%. Os zigotos murinos foram colocados na resina Spurr e após 72 horas foram cortados com o ultramicrotomo em corte semi-fino (2 µm). Essas secções semi-finas foram coradas com azul de toluidina a 2% em solução de borato de sódio 1% em água destilada.

Para análise ultra-estrutural, por microscopia eletrônica, os blocos foram seccionados e os cortes ultrafinos recolhidos em telas de níquel. As telas foram lavadas em BSA com tween 20 em PBS, pH 7,0, incubadas em cloreto de amônio 5 mM (para bloquear e evitar a ligação inespecífica de anticorpos em grupamento aldeídico livre presente nas células fixadas) e lavadas em BSA com tween 20 em PBS, pH 7,0.

A seguir as telas foram incubadas com anticorpo primário anti-BoHV-1 1:80 em PBS/BSA 1% por 4 horas, lavadas em BSA com tween 20 em PBS, pH 7,0, incubadas com anticorpo secundário anti IGg bovino (proteína A-ouro)1:10 em PBS/BSA 1%, lavadas em PBS, pH7,0 e fixadas com glutaraldeído 2,5% em água. Após lavagem em água as telas foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. No início e final do processamento as telas foram tratadas com metaperiodato de sódio (solução saturada) (KNUTTON, 1995; PADRÓN, 1998 apud ATHAYDE, 2007).

As telas foram gravadas com auxílio do microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1010 no ICB/USP sob supervisão do Sr Edson Rocha de Oliveira. Verificamos a morfologia dos zigotos/embriões murinos e a posição das partículas virais relativas aos tratamentos que tiveram sucesso nos experimentos 3, 4 e 5.

4.10 Avaliação da taxa de clivagem e morfologia dos zigotos murinos

A taxa de clivagem e análise da morfologia foram feitas após 24 horas de cultura *in vitro* pela proporção de zigotos murinos clivados e comparação com controle. Para a melhor observação da clivagem e morfologia, os zigotos murinos foram retirados do meio TCM 199 com 10% de Soro Fetal Bovino, *in vitro*, lavados em solução de manutenção à 37 °C e colocados em uma gota de 100 µL. Colocamos, aproximadamente, 10 zigotos por gota para facilitar a visualização das clivagens e morfologia. A avaliação foi realizada em lâminas sob microscópio óptico invertido no aumento de 10x e 100x.

4.11 Análise estatística da taxa de clivagem

Para análise estatística foi usado o teste Exato de Fisher. Com auxílio deste teste foi avaliado se houve diferença significativa entre os grupos de zigotos: G1xG2, G1xG3 e G1xG4. Foi usado o programa GraphPad Instat Version 3.05, 35 bit for Win 95/NT.

Adotamos grau de confiança de 0,05 ($\alpha=5\%$).

4.12 Análise estatística da titulação

Para a verificação da variação da titulação dos grupos analisados foi usado o teste de Mann-Whitney. Os zigotos e as gotas correspondentes após 24 h de tratamento foram colocados em co-cultura em células MDBK. Ao decorrer mais 72 h, foi feita a titulação de cada grupo para avaliação da quantidade de partículas virais após os tratamentos. Foi usado o programa GraphPad InStat Version 3.05, 35 bit for Win 95/NT. Adotamos grau de confiança de 0,05 ($\alpha=5\%$).

4.13 Determinação da citotoxicidade dos Produtos Naturais em células MDBK_Experimento 1

Foram realizados testes de citotoxicidade dos Produtos Naturais em células MDBK com a finalidade de encontrar um parâmetro (ampla sintonia) não tóxico para os zigotos com o objetivo de que a concentração encontrada para cada PN não interfira na morfologia e taxa de clivagem. Usou-se placa de 96 poços e diluições a seguir. Para estes testes foram analisados os efeitos citopático dos PN sobre as células MDBK. Os testes foram repetidos 7 vezes para cada um dos 18 PN referentes aos 'três grupos': 1) Óleos essenciais; 2) Extratos etanólicos e 3) Extratos aquosos.

4.13.1 Óleo Essencial

Os óleos essenciais de *Chamomilla recutita* (Camomila), *Allium sativum* (alho), *Zingiber officinale* (gengibre), *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia), *Illicium verum* Hook. f (anis estrelado), *Punica granatum* (Romã), *Melissa officinalis* (melissa), foram diluídos em óleo mineral esterilizado nas seguintes concentrações: 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, $10^{-1}\%$, $10^{-2}\%$, $10^{-3}\%$, $10^{-4}\%$, $10^{-5}\%$, $10^{-6}\%$ e $10^{-7}\%$. Estas concentrações foram testadas em células MDBK cultivadas em placas de 96 poços, com 120 μ L de meio de cultura TCM 199, em estufa durante 24h, a 37 °C e 5% de CO₂.

4.13.2 Extrato Etanólico

Os extratos etanólicos de *Chamomilla recutita* (camomila), *Allium sativum* (alho), *Zingiber officinale* (gengibre), *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia), *Illicium verum* Hook. f (anis estrelado), *Punica granatum* (romã), *Melissa officinalis* (melissa), *Pterodon emarginatus* Casca (sucupira casca) e *Pterodon emarginatus* Semente (sucupira semente) foram diluídos em solução fisiológica esterilizada nas seguintes concentrações: 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, $10^{-1}\%$, $10^{-2}\%$, $10^{-3}\%$, $10^{-4}\%$, $10^{-5}\%$, $10^{-6}\%$ e $10^{-7}\%$. 10 μL de cada uma das concentrações acima foram adicionadas às células MDBK cultivadas em placas de 96 poços em estufa, durante 24h, a 37 °C e 5% de CO_2 , sendo que cada poço continha 110 μL de meio de cultura TCM 199. Ou seja, ao final cada poço continha, ao final, 120 μL (meio de cultura+extrato).

4.13.3 Extrato Aquoso

Os Extratos de própolis da Apis Flora[®] (Extrato Aquoso de Própolis sem álcool) e *Agaricus blazei* (HERBARIUM LABORATÓRIO BOTÂNICO LTDA) foram diluídos em solução fisiológica estéril nas seguintes concentrações: 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, $10^{-1}\%$, $10^{-2}\%$, $10^{-3}\%$, $10^{-4}\%$, $10^{-5}\%$, $10^{-6}\%$ e $10^{-7}\%$. 10 μL de cada uma das concentrações acima foram adicionadas às células MDBK cultivadas em placas de 96 poços em estufa, durante 24h, a 37 °C e 5% de CO_2 , sendo que cada poço continha 110 μL de meio de cultura TCM 199. Ou seja, ao final cada poço continha, ao final, 120 μL (meio de cultura+extrato).

4.14 Determinação da toxicidade dos Produtos Naturais em zigotos murinos *in vitro* após 24h de exposição_Experimento 2

Com base no experimento 1 (ajuste da toxicidade em células MDBK_ ampla sintonia), realizamos testes de citotoxicidade em zigotos murinos (Tabela 4) com a finalidade de encontrar a concentração ideal (fina sintonia) para os produtos naturais encontrados neste trabalho. Lembrando que para os OE as diluições foram feitas

como já descrito acima, em óleo mineral estéril. Para o EE e o EA as diluições foram feitas em meio de cultura. Os testes foram repetidos por 4 vezes para cada PN.

Tabela 4 - Produtos Naturais e respectivas concentrações testadas em zigotos murinos

	Produto Natural	Concentrações testadas*
1	<i>Chamomilla recutita</i> (Camomila)_ OE	0,001%; 0,0001%; 0,00001%
2	<i>Allium sativum</i> (alho) _ OE	0,01%; 0,001%; 0,0001%
3	<i>Zingiber officinale</i> (gengibre) _ OE	0,1%; 0,01%; 0,001%
4	<i>Syzygium aromaticum</i> (cravo da Índia) _ OE	0,01%; 0,001%; 0,0001%
5	<i>Illicium verum</i> Hook. f (anis estrelado) _ OE	0,001%; 0,0001%; 0,00001%
6	<i>Punica granatum</i> (Romã) _ OE	0,1%,0,01%, 0,001%
7	<i>Melissa officinalis</i> (melissa) _ OE	0,1%,0,01%, 0,001%
8	<i>Chamomilla recutita</i> (Camomila)_ EE	0,1%; 0,01%; 0,001%
9	<i>Allium sativum</i> (alho) _ EE	1%; 0,1%; 0,01%
10	<i>Zingiber officinale</i> (gengibre)_ EE	0,01%; 0,001%; 0,0001%
11	<i>Syzygium aromaticum</i> (cravo da Índia) _ EE	0,1%; 0,01%; 0,001%
12	<i>Illicium verum</i> Hook. f (anis estrelado) _ EE	1%; 0,1%; 0,01%
13	<i>Punica granatum</i> (Romã)_ EE	0,01%; 0,001%; 0,0001%
14	<i>Melissa officinalis</i> (melissa) _ EE	0,1%,0,01%, 0,001%
15	<i>Pterodon emarginatus</i> _S (Sucupira Casca)_ EE	0,1%; 0,01%; 0,001%
16	<i>Pterodon emarginatus</i> _C (Sucupira Semente)_ EE	1%; 0,1%; 0,01%
17	<i>Agaricus blazei</i> _ EA	1%, 0,1%,0,01%
18	Própolis_ EA	1%, 0,1%,0,01%

- Produtos Naturais e respectivas concentrações testadas para verificação da toxicidade em zigotos murinos durante 24h para simular o tempo de maturação in vitro. Gotas de 110µL.

- OE: Óleo Essencial; EE: Extrato Etanólico; EA: Extrato Aquoso;

- *Diluições a partir do Produto Natural puro.

4.15 Avaliação da morfologia e taxa de clivagem dos embriões murinos submetidos ao tratamento dos Produtos Naturais_ Experimento 3

4.15.1 Óleos Essenciais

Os zigotos coletados_ mantidos em placa de cultivo de poliestireno Ø40x11mm (Zellkultur Schale, Berlim Alemanha) sob gotas de meio de cultura TCM199 suplementado com 10% de SFB {testado no LVB contra os vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1)} e 0,2% de piruvato de sódio_ foram divididos em grupos segundo diluições não tóxicas encontradas no experimento 2 (diluições dos óleos essenciais em óleo mineral esterilizado): controle (**G1_{oe}**_ zigotos murinos foram mantidos em 100 µL de meio de cultura descrito acima + 20 µL de solução fisiológica estéril sob 100 µL de óleo mineral filtrado); exposto aos vírus (**G2_{oe}**_ zigotos murinos foram mantidos em 100 µL de meio de cultura descrito acima + 10 µL da suspensão de vírus na com título de 10^8 TCID₅₀/mL +10 µL de solução fisiológica estéril sob 100 µL de óleo mineral filtrado); expostos aos produtos naturais/OE (**G3_{oe}**_ zigotos murinos foram mantidos em 100 µL de meio de cultura descrito acima + 20µL de solução fisiológica estéril sob diferentes óleos essenciais diluídos em óleo mineral filtrado com volume final de 100 µL); exposto aos produtos naturais/OE e aos vírus (**G4_{oe}**_ zigotos murinos foram mantidos em 100µL de meio de cultura descrito acima + 10 µL da suspensão de vírus com título de 10^8 TCID₅₀/mL +10 µL de solução fisiológica estéril sob diferentes óleos essenciais diluídos em óleo mineral filtrado com volume final de 100 µL)(Quadro1).

Quadro 1_ Detalhamento dos testes com OE, vírus e os zigotos murinos.

CONTROLE (C)_ G1oe	EXPOSTO AOS VÍRUS (E)_ G2oe
<p>A</p> <p>0 horas</p> <p>20µL solução salina esterilizada (SSE) para padronização</p> <p>Zigotos</p> <p>Óleo mineral esterilizado</p> <p>Gota com meio TCM199 acrescido de 10% de SFB, penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (10 µg/mL), sob óleo mineral e solução salina esterilizados (SSE).</p>	<p>B</p> <p>0 horas</p> <p>10µL da suspensão de vírus BoHV1-Colorado</p> <p>10µL SSE para padronização</p> <p>Zigotos</p> <p>Óleo mineral esterilizado</p> <p>Gota com 100µL de meio TCM199 acrescido de 10% de SFB, penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (10 µg/mL), sob óleo mineral esterilizado + SSE + vírus</p>
<p>24 horas</p> <p>Avaliação da morfologia e taxa de clivagem</p>	<p>24 horas</p> <p>Avaliação da morfologia e taxa de clivagem</p>
EXPOSTO AO PRODUTO NATURAL_ G3oe	EXPOSTO AO VÍRUS E AO PRODUTO NATURAL_ G4oe
<p>0 horas</p> <p>Óleo essencial diluído em Óleo mineral esterilizado</p> <p>20µL SSE para padronização</p> <p>Zigotos</p> <p>Óleo mineral esterilizado</p> <p>Gota com meio TCM199 acrescido de 10% de SFB, penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (10 µg/mL), sob óleo mineral e solução salina esterilizados (SSE).</p>	<p>0 horas</p> <p>10µL da suspensão de vírus BoHV1-Colorado</p> <p>Óleo essencial diluído em óleo mineral estéril</p> <p>10µL SSE para padronização</p> <p>Zigotos</p> <p>Óleo mineral esterilizado</p> <p>Gota com 100µL de meio TCM199 acrescido de 10% de SFB, penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (10 µg/mL), sob óleo mineral esterilizado + SSE + vírus</p>
<p>24 horas</p> <p>Avaliação da morfologia e taxa de clivagem</p>	<p>24 horas</p> <p>Avaliação da morfologia e taxa de clivagem</p>

NOTA: **A-** grupo controle (**G1**), não expostos aos vírus e não exposto aos produtos naturais; **B-** grupo contaminado (**G2**), exposto aos vírus; **C-** grupo expostos aos produtos naturais (**G3**), não expostos aos vírus; grupo expostos aos produtos naturais e ao vírus (**G4**).

4.15.2 Extratos Etanólicos (*ee*) e Extratos Aquosos (*ea*)

Os zigotos coletados, mantidos em gotas de meio TCM 199 suplementado com 10% de SFB livre do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e BoHV-1 e 0,2% de piruvato de sódio, sob óleo mineral esterilizado, foram divididos nos seguintes grupos: controle (**G1_{ee}** ou **G1_{ea}** com 100 µL de meio TCM199+10% de SFB+ 20 µL de solução fisiológica estéril), expostos aos vírus (**G2_{ee}** ou **G2_{ea}** com 100 µL de meio TCM199+10% de SFB + 10 µL da suspensão de vírus com título de 10^8 TCID₅₀/mL +10 µL de solução fisiológica estéril); expostos aos PN (**G3_{ee}** ou **G3_{ea}** com 100 µL de meio TCM199+10% de SFB+ 10 µL de determinado PN + 10 µL de solução fisiológica esterilizada); expostos aos produtos naturais e aos vírus (**G4_{ee}** ou **G4_{ea}** com 100 µL de meio TCM199+10% de SFB+ 10 µL de determinado PN + 10 µL da suspensão de vírus com título de 10^8 TCID₅₀/mL).

As culturas foram mantidas em estufa a 5% de CO₂, 90% de umidade e 37 °C. Após 24 h de contaminação os zigotos foram separados em subgrupos para avaliação da morfologia e taxa de clivagem (Quadro 2).

Quadro 2 - Detalhamento dos testes com EE, EA, vírus e os zigotos murinos.

CONTROLE $G1_{ee}$ ou $G1_{ea}$	EXPOSTO AOS VÍRUS $G2_{ee}$ ou $G2_{ea}$
<p>A</p> <p>0 horas</p> <p>20μL solução salina esterilizada (SSE) para padronização</p> <p>Zigotos</p> <p>Óleo mineral esterilizado</p> <p>Gota com meio TCM199 acrescido de 10% de SFB, penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (10 μg/mL), sob óleo mineral e solução salina esterilizados (SSE).</p>	<p>B</p> <p>0 horas</p> <p>10μL da suspensão de vírus BoHV1-Colorado</p> <p>10μL SSE para padronização</p> <p>Zigotos</p> <p>Óleo mineral esterilizado</p> <p>Gota com 100μL de meio TCM199 acrescido de 10% de SFB, penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (10 μg/mL), sob óleo mineral estéril + SSE + vírus</p>
<p>24 horas</p> <p>Avaliação da morfologia e taxa de clivagem</p>	<p>24 horas</p> <p>Avaliação da morfologia e taxa de clivagem</p>
EXPOSTO AO PRODUTO NATURAL $G3_{ee}$ ou $G3_{ea}$	EXPOSTO AO VÍRUS E AO PRODUTO NATURAL $G4_{ee}$ ou $G4_{ea}$
<p>C</p> <p>0 horas</p> <p>10μL de extrato de Produto Natural (PN)</p> <p>10μ SSE para padronização</p> <p>Zigotos</p> <p>Óleo mineral esterilizado</p> <p>Gota com 100μL de meio TCM199 acrescido de 10% de SFB, penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (10 μg/mL), sob óleo mineral esterilizado + SSE+ PN</p>	<p>D</p> <p>0 horas</p> <p>10μL de extrato de PN</p> <p>10μL da suspensão de vírus BoHV1-Colorado</p> <p>Zigotos</p> <p>Óleo mineral esterilizado</p> <p>Gota com 100μL de meio TCM199 acrescido de 10% de SFB, penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (10 μg/mL), sob óleo mineral esterilizado + PN + vírus</p>
<p>24 horas</p> <p>Avaliação da morfologia e taxa de clivagem</p>	<p>24 horas</p> <p>Avaliação da morfologia e taxa de clivagem</p>

NOTAS: **A-** grupo controle ($G1$), não exposto aos vírus e aos PN; **B-** grupo contaminado ($G2$), exposto aos vírus; **C-** grupo exposto ao PN ($G3$), não exposto aos vírus; grupo exposto ao produto natural e ao vírus ($G4$). Siglas: EE ou ee_extrato Etanólico; EA ou ea_extrato aquoso.

4.16 Co-cultura dos embriões murinos em células MDBK após LS e TT

Experimento 4

Cada grupo [controle (G1), exposto aos vírus (G2); exposto aos produtos naturais (G3); exposto aos produtos naturais e aos vírus(G4)], após 24h, período que simula a duração da MIV, tiveram, para controle da manutenção da titulação inicial, os sobrenadantes (sobrenadante do grupo G1: 1GT; sobrenadante do grupo G2: 2GT; sobrenadante do grupo G3: 3GT; sobrenadante do grupo G4: 4GT) inoculados/incubados (0,3 mL) em monocamadas confluentes de células MDBK mantidas em meio TCM 199 suplementado com bicarbonato e 100 µg/mL de gentamicina, em estufa de CO₂ à 5%, 95% de umidade à 37 °C. Já os embriões murinos (E_ embrião do grupo G1: 1E; embrião do grupo G2: 2E; embrião do grupo G3: 3E; embrião do grupo G4: 4E) passaram pela lavagem sequencial (LS) que consiste na passagem dos zigotos por 10 gotas de 200 µL de meio TCM199 (Cultilab®-Campinas, SP) acrescido de 10% de SFB penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (10 µg/mL) (Quadro 3-A1). Em seguida, passaram pelo tratamento com tripsina que consiste na troca das duas gotas centrais de meio de cultura da seqüência de lavagem, por duas gotas de solução de tripsina a 0,25% em citrato de sódio, pH 7,6 (Quadro 3-A2). Após os dois tratamentos os embriões murinos também foram inoculados/incubados (0,3 mL) em monocamadas confluentes de células MDBK mantidas em meio TCM 199 suplementado com bicarbonato e 100 µg/mL de gentamicina, em estufa de CO₂ à 5%, 95% de umidade à 37 °C. Estes procedimentos tiveram intuito de tentar eliminar qualquer partícula viral externa ao embrião.

Quadro 3 - Detalhamento das Lavagens

NOTAS: A1- Zigotos submetidos à Lavagem Sequencial (**LS**); A2- Zigotos submetidos ao Tratamento com Tripsina (**TT**).

Após 72h em co-cultura, foi observado o CPE. Posteriormente o meio e as células foram centrifugados a 800 g por 20 minutos. Os sobrenadantes dessas culturas foram coletados para a titulação do vírus em microplaca de 96 como já descrito anteriormente.

4.17 Avaliação da presença do vírus BoHV-1 após uso dos PN pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (n-PCR)_ Experimento 5

Os embriões de cada grupo [controle (G1), expostos aos vírus (G2); expostos aos produtos naturais (G3); expostos aos produtos naturais e aos vírus (G4)], após 24 h, foram submetidos aos tratamentos de LS e TT e, posteriormente, coletados para a realização da n-PCR.

4.18 Análise da morfologia dos embriões murinos com auxílio da microscopia eletrônica de transmissão _Experimento 6

Alguns embriões de cada grupo [controle (G1), expostos aos vírus (G2); expostos aos produtos naturais (G3); expostos aos produtos naturais e aos vírus (G4)], após 24 h, foram coletados para a realização da microscopia eletrônica, como descrito anteriormente.

5.1 Determinação da citotoxicidade dos Produtos Naturais em células MDBK_Experimento 1

As análises morfológicas foram realizadas com auxílio do microscópio óptico invertido no aumento de 40x e 100x. Células MDBK, controles, apresentaram aspecto fusiforme, sem granulações no citoplasma, ausência de lise, contato entre as células em toda extensão da membrana plasmática e células preenchendo todo fundo do frasco (Figura 23). Já, as alterações provocadas pelos Produtos Naturais, devido à toxicidade às células MDBK foram notados pela presença de degenerações e, principalmente, granulações intensas, lises, aspectos irregulares e/ou arredondados (Figuras 24, 25 e 26).

Figura 23 - Monocamadas de células MDBK em cultura com TCM199 acrescentado em 10% de SFB (100x, 4X zoom).

Figura 24 - Monocamadas de células MDBK inoculadas com 5% de óleo essencial de *Allium sativum*. Células arredondadas, com granulação situada na região periférica e em processo de degeneração (100x, 4.7Xzoom).

Figura 25 - Monocamadas de células MDBK inoculadas com 10% de óleo essencial de *Melissa officinalis* após 24 h. Inúmeras células lisadas, com granulação e em processo de degeneração (100x, 4.1Xzoom).

Figura 26 - Monocamadas de células MDBK inoculadas com 4% de Extrato Etanólico de *Punica granatum* após 24 h. Intensa granulação e processo de degeneração avançado (100x, 5.7Xzoom).

Após 24 h obtivemos as seguintes concentrações não tóxicas para as células MDBK (Tabela 5)

Tabela 5 - Produtos Naturais e respectivas concentrações não tóxicas em células MDBK.

	Produto Natural	Concentração não tóxica (Menor ou igual a)
1	<i>Chamomilla recutita</i> (camomila)_ OE	$\leq 0,0001\%$
2	<i>Allium sativum</i> (alho) _ OE	$\leq 0,001\%$
3	<i>Zingiber officinale</i> (gengibre) _ OE	$\leq 0,01\%$
4	<i>Syzygium aromaticum</i> (cravo da Índia) _ OE	$\leq 0,001\%$
5	<i>Illicium verum</i> Hook. f (anis estrelado) _ OE	$\leq 0,0001\%$
6	<i>Punica granatum</i> (romã) _ OE	$\leq 0,01\%$
7	<i>Melissa officinalis</i> (melissa) _ OE	$\leq 0,01\%$
8	<i>Chamomilla recutita</i> (camomila)_ EE	$\leq 0,01\%$
9	<i>Allium sativum</i> (alho) _ EE	$\leq 0,1\%$,
10	<i>Zingiber officinale</i> (gengibre)_ EE	$\leq 0,001\%$
11	<i>Syzygium aromaticum</i> (cravo da Índia) _ EE	$\leq 0,01\%$
12	<i>Illicium verum</i> Hook. f (anis estrelado) _ EE	$\leq 0,1\%$
13	<i>Punica granatum</i> (romã)_ EE	$\leq 0,001\%$
14	<i>Melissa officinalis</i> (melissa) _ EE	$\leq 0,01\%$
15	<i>Pterodon emarginatus</i> _C (sucupira casca) _ EE	$\leq 0,01\%$,
16	<i>Pterodon emarginatus</i> _S (sucupira semente) _ EE	$\leq 0,1\%$
17	<i>Agaricus blazei</i> _ EA	$\leq 0,1\%$
18	Própolis_ EA	$\leq 0,1\%$

Observações: - Para EE ou EA_foram usados 10µL das concentrações acima em 110 µL de meio;

- Para OE_foram usados 10µL das concentrações acima em 110 µL de óleo mineral estéril.

5.2 Determinação da toxicidade dos Produtos Naturais em zigotos murinos in vitro após 24 h de exposição_ Experimento 2

Após 24 h foram encontradas as seguintes concentrações não tóxicas para os embriões murinos (Tabela 6):

Tabela 6 - Produtos Naturais e respectivas concentrações não tóxicas aos embriões murinos.

	Produto Natural	Concentração não tóxica (Menor ou igual a)
1	<i>Chamomilla recutita</i> (Camomila)_ OE	$\leq 0,0001\%$
2	<i>Allium sativum</i> (alho) _ OE	$\leq 0,001\%$
3	<i>Zingiber officinale</i> (gengibre) _ OE	$\leq 0,01\%$
4	<i>Syzygium aromaticum</i> (cravo da Índia) _ OE	$\leq 0,001\%$
5	<i>Illicium verum</i> Hook. f (anis estrelado) _ OE	$\leq 0,0001\%$
6	<i>Punica granatum</i> (Romã) _ OE	$\leq 0,001\%$
7	<i>Melissa officinalis</i> (melissa) _ OE	$\leq 0,01\%$
8	<i>Chamomilla recutita</i> (Camomila) _ EE	$\leq 0,01\%$
9	<i>Allium sativum</i> (alho) _ EE	$\leq 0,1\%$
10	<i>Zingiber officinale</i> (gengibre) _ EE	$\leq 0,001\%$
11	<i>Syzygium aromaticum</i> (cravo da Índia) _ EE	$\leq 0,01\%$
12	<i>Illicium verum</i> Hook. f (anis estrelado) _ EE	$\leq 0,1\%$
13	<i>Punica granatum</i> (Romã) _ EE	$\leq 0,001\%$
14	<i>Melissa officinalis</i> (melissa) _ EE	$\leq 0,01\%$
15	<i>Pterodon emarginatus</i> _C (Sucupira Casca) _ EE	$\leq 0,1\%$
16	<i>Pterodon emarginatus</i> _S (Sucupira Semente) _ EE	$\leq 0,1\%$
17	<i>Agaricus blazei</i> _ EA	$\leq 0,1\%$
18	Própolis_ EA	$\leq 0,1\%$

- Para EE ou EA_foram usados 10 µL das concentrações acima em 110 µL de meio;

- Para OE_foram usados 10 µL das concentrações acima em 110 µL de óleo mineral estéril.

5.3 Avaliação da morfologia e taxa de clivagem dos embriões murinos submetidos ao tratamento dos Produtos_ Experimento 3

5.3.1 Análise morfológica_ OE

Todos os grupos G1_{oe} (*controle*) e G3_{oe} (*expostos aos produtos naturais/OE*) relativo a todos os testes referentes aos óleos essenciais não apresentaram

alterações morfológicas. Porém, constatou-se CPE em todos os embriões contaminados com BoHV-1 Colorado dos grupos G2_{oe} (exposto aos vírus). O mesmo ocorreu com todos os embriões submetidos aos tratamentos com todos os óleos essenciais, grupos G4_{oe} (exposto aos produtos naturais/OE e aos vírus). Observamos, dentre as inúmeras alterações morfológicas, citoplasma com granulação e aspecto degenerativo (Figura 27), blastômeros assimétricos, falha da divisão celular (Figura 28). Não foram visualizadas alterações na zona pelúcida ao microscópio óptico de todos os grupos controle (Grupo G1_{oe}). Também não foram verificados alterações dos grupos não expostos aos vírus e testados com óleos essenciais (grupos G3_{oe}), após 24 h (Figura 29).

Figura 27 - tratamento com OE de alho (G4_{oe}) - Zigoto citoplasma degenerando e aumento do espaço periplasmático, após 24 h de incubação (100x, 5,7 x zoom)

Figura 28 - tratamento com OE de Melissa (G4_{oe}) - Zigoto com falha na divisão celular, após 24 h de incubação (100x, 5,7 x zoom)

Figura 29 - tratamento com OE de camomila (G3_{oe}) - Zigoto com aspecto normal e com dois blastômeros proveniente de uma clivagem após 24 h de incubação (100x, 5 x zoom)

5.3.2 Análise estatística_OE

Com base nas taxas de clivagens (Tabela 7), após 24 h da coleta dos zigotos murinos, obtivemos a significância dos grupos (Tabela 8), indicando que não houve diminuição da replicação viral ou efeito bloqueador do BoHV-1 Colorado em nenhum tratamento:

Tabela 7 - Porcentagem das taxas de clivagens dos ensaios com Óleos Essenciais

OE	G1 _{oe} XG2 _{oe}	G1 _{oe} XG3 _{oe}	G1 _{oe} XG4 _{oe}
<i>Chamomilla recutita</i>	(210/267= 78%)x(55/269= 20%)	(210/267= 78%)x(145/198= 73%)	(210/267= 78%)x(129/261= 49%)
<i>Allium sativum</i>	(194/272= 71%)x(132/224= 59%)	(194/272= 71%)x(172/260= 66%)	(194/272= 71%)x(187/309= 60%)
<i>Zingiber officinale</i>	(162/219= 74%)x(141/273= 51%)	(162/219= 74%)x(145/221= 65%)	(162/219= 74%)x(196/352= 55%)
<i>Syzygium aromaticum</i>	(211/305= 69%)x(148/245= 60%)	(211/305= 69%)x(125/199= 63%)	(211/305= 69%)x(124/264= 46%)
<i>Illicium verum</i> Hook.	(164/249= 65%)x(124/251= 49%)	(164/249= 65%)x(145/243= 60%)	(164/249= 65%)x(122/267= 45%)
<i>Punica granatum</i>	(187/241= 77%)x(148/269= 55%)	(187/241= 77%)x(169/236= 71%)	(187/241= 77%)x(194/380= 51%)
<i>Melissa officinalis</i>	(238/371= 64%)x(112/217= 51%)	(238/371= 64%)x(162/226= 71%)	(238/371= 64%)x(201/377= 53%)

SIGLAS: OE ou _{oe} _ Óleo Essencial; G1_grupo controle; G2_grupo exposto ao BoHV-1; G3_grupo exposto ao _{oe}.; G4_grupo exposto ao BoHV-1 e ao _{oe}.

Tabela 8 - Resultado da análise estatística (Taxa de Clivagem) em relação aos grupos G1_{oe}XG2_{oe}, G1_{oe}XG3_{oe} e G1_{oe}XG4_{oe}.

OE	G1 _{oe} XG2 _{oe}	G1 _{oe} XG3 _{oe}	G1 _{oe} XG4 _{oe}
<i>Chamomilla recutita</i>	D.S.	D.N.S.	D.S.
<i>Allium sativum</i>	D.S.	D.N.S.	D.S.
<i>Zingiber officinale</i>	D.S.	D.N.S.	D.S.
<i>Syzygium aromaticum</i>	D.S.	D.N.S.	D.S.
<i>Illicium verum</i> Hook. f	D.S.	D.N.S.	D.S.
<i>Punica granatum</i>	D.S.	D.N.S.	D.S.
<i>Melissa officinalis</i>	D.S.	D.N.S.	D.S.

TESTE ESTATÍSTICO USADO: Teste exato de Fisher com nível de significância (α) igual a 5%;

SIGLAS: D.S._Diferença Significativa ($p < 0,05$); D.N.S._ Diferença Não Significativa ($p > 0,05$);

PARA ANÁLISE DO GRUPO TESTE G1XG4: **Cor verde= tratamento favorável**; **Cor vermelha= não favorável**.

5.3.3 Análise morfológica_EE

Como foram feitos testes de toxicidade dos EE em relação aos embriões murinos, todos os ensaios dos grupos G3_{ee} não apresentaram, portanto, alterações morfológicas. O mesmo ocorreu com os grupos G1_{ee} (controles) que não foram expostos aos vírus. Já os grupos expostos aos vírus tiveram alterações morfológicas como aumento do espaço do periplasma (Figura 32), citoplasma com degeneração

(Figura 35), falha na divisão celular (Figura 46 e 47), blastômeros assimétricos (Figuras 36 e 37) e rompimento/irregularidades nas ZP (Figuras 33 e 40).

Inicialmente, destacamos a tabela 9 que evidencia, de forma objetiva, se houve pelo menos uma alteração morfológica nos grupos testados. Posteriormente segue descrição de cada EE e seus respectivos grupos.

Tabela 9 - Constatação de alteração morfológica entre respectivos EE e seus grupos.

EE	G1 _{ee}	G2 _{ee}	G3 _{ee}	G4 _{ee}
<i>Chamomilla recutita</i>	S.A.M.	C.A.M.	S.A.M.	C.A.M.
<i>Allium sativum</i>	S.A.M.	C.A.M.	S.A.M.	C.A.M.
<i>Zingiber officinale</i>	S.A.M.	C.A.M.	S.A.M.	C.A.M.
<i>Syzygium aromaticum</i>	S.A.M.	C.A.M.	S.A.M.	C.A.M.
<i>Illicium verum</i> Hook.	S.A.M.	C.A.M.	S.A.M.	C.A.M.
<i>Punica granatum</i>	S.A.M.	C.A.M.	S.A.M.	S.A.M.
<i>Melissa officinalis</i>	S.A.M.	C.A.M.	S.A.M.	C.A.M.
<i>Pterodon emarginatus</i> _C (Sucupira Casca)	S.A.M.	C.A.M.	S.A.M.	S.A.M.
<i>Pterodon emarginatus</i> _S (Sucupira Semente)	S.A.M.	C.A.M.	S.A.M.	C.A.M.

-SIGLAS: EE ou _{ee}... Extrato Etanólico; G1_grupo controle; G2_grupo exposto ao BoHV-1; G3_grupo exposto ao EE.; G4_grupo exposto ao BoHV-1 e ao EE.

-Para análise do G4_{ee}:

C.A.M. Com pelo menos uma Alteração Morfológica (cor vermelha)

S.A.M. Sem Alteração Morfológica (cor verde)

5.3.3.1 *Chamomilla recutita*

Nos grupos G1_{ee} e G3_{ee} não encontramos alterações morfológicas (Figuras 30 e 31). Já nos grupos G2_{ee} e G4_{ee} observamos alterações morfológicas importantes nos embriões como aumento de espaço periplasmático (Figura 32) e rompimento da Zona Pelúcida (ZP) quando associamos o extrato de *Chamomilla recutita* ao BoHV-1 Colorado (Figura 33).

Figura 30 - Embrião do grupo **G1_{ee}** (controle)_sem alterações morfológicas após 24 h de incubação (100x, 5,7Xzoom)

Figura 31 - Embrião do grupo **G3_{ee}** (*Chamomilla recutita*)_ aspecto normal, com uma clivagem após 24 h de incubação. Possível observar os dois corpúsculos polares (setas amarelas) (100x, 5,7Xzoom)

Figura 32 - **Grupo G2_{ee}** (vírus)_ sem clivagem após 24 h de incubação. Aumento do espaço periplasmático (seta em vermelho) (100x, 5,7Xzoom)

Figura 33 - **Grupo G4_{ee}** (*Chamomilla recutita*)_ sem clivagem após 24 h de incubação. Rompimento da ZP (seta em Roxo) (100x, 5,7Xzoom)

5.3.3.2 *Allium sativum*

Tanto o grupo G1_{ee} quanto o grupo G3_{ee} não ocasionaram alterações morfológicas, como já descrito (Figura 34). O grupo G4_{ee} demonstrou ocasionar alterações morfológicas como aumento de espaço periplasmático (Figura 34), granulação e perda das características normais da ZP.

Figura 34 - **Grupo G1_{ee}** (controle)_ sem alterações morfológicas após 24 h de incubação. ZP intacta e blastômeros simétricos (100x, 5,7Xzoom)

Figura 35 - **Grupo G4_{ee}** (*Allium sativum*)_com alterações morfológicas após 24 h de incubação. Granulação (seta 1), ZP irregular (seta 2) e aumento do espaço do periplasma (seta 3) (100x, 5,7Xzoom)

5.3.3.3 *Zingiber officinale*

O grupo teste, G4_{ee}, teve alterações morfológicas sendo a mais comum a formação de blastômeros assimétricos (Figuras 36 e 37).

Figura 36 - **Grupo G4_{ee}** (*Zingiber officinale*)_com alteração morfológica após 24 h de incubação.Com dois blastômeros assimétricos (100x, 5,7Xzoom).

Figura 37 - **Grupo G4_{ee}** (*Zingiber officinale*)__com alteração morfológica após 24 h de incubação. Com inúmeros blastômeros assimétricos(100x, 5,1Xzoom).

5.3.3.4 *Syzygium aromaticum*

O grupo teste, G4_{ee}, sofreu alterações morfológicas como processo degenerativo (Figura 38), rompimento da ZP e bloqueio da divisão celular (Figura 39).

Figura 38 - **Grupo G4_{ee}** (*Syzygium aromaticum*) com alteração morfológica após 24 h de incubação. Degeneração celular com contração do citoplasma (seta amarela)(100x, 5,7Xzoom).

Figura 39 - **Grupo G4_{ee}** (*Syzygium aromaticum*) evidenciando bloqueio celular após 24 h de incubação. Em destaque (setas vermelhas) os dois corpúsculos polares evidenciando maturação e fertilização (100x, 5,7Xzoom)

5.3.3.5 *Illicium verum* Hook. f

O grupo G4_{ee} de *Illicium verum* Hook. f sofreu alterações morfológicas como processo degenerativo, irregularidade (afrouxamento) da ZP (Figura 40), bloqueio da divisão celular e blastômeros assimétricos (Figura 41).

Figura 40 - **Grupo G4_{ee}** (*Illicium verum* Hook. f) afrouxamento da ZP (setas) após 24 h de incubação. Setas azuis destacando a ZP irregular (100x, 5,7Xzoom)

Figura 41 - **Grupo G4_{ee}** (*Illicium verum* Hook. f) blastômeros assimétricos após 24 h de incubação. (100x, 5,7Xzoom).

5.3.3.6 *Punica granatum*

No grupo G4_{ee} **não** observamos alterações morfológicas. Os embriões apresentaram ZP intacta (Figura 42), citoplasma com aspecto uniforme sem alterações, sem falhas nas divisões celulares e espaço do periplasma considerado normal (Figuras 43, 44 e 45).

Figura 42 - Grupo G4_{ee} (*Punica granatum*)_ com dois blastômeros e, em detalhe, a ZP conservada (100x, 5,7Xzoom).

Figura 43 - Grupo G4_{ee} (*Punica granatum*)_ blastômeros simétricos, com citoplasma uniforme após 24 h de incubação. Presença dos dois corpúsculos polares na região apical da foto (100x, 5,7Xzoom).

Figura 44 - Grupo G4_{ee} (*Punica granatum*)_ após 48 h de incubação. Com duas clivagens e 4 células (100x, 5,7Xzoom).

Figura 45 - Grupo G4_{ee} (*Punica granatum*)_ após 72 h de incubação. Com três clivagens e 8 células (100x, 5,7Xzoom).

5.3.3.7 *Melissa officinalis*

O grupo G4_{ee} de *Melissa officinalis* sofreu inúmeras alterações morfológicas sendo as duas principais mudanças nas características dos embriões: irregularidade (afrouxamento) da ZP (Figura 46) e bloqueio da divisão celular (Figura 47).

Figura 46 - **Grupo G4_{ee}** (*Melissa officinalis*)_ após 24 h de incubação. Com ZP alterada (setas brancas) (100x, 5,7Xzoom).

Figura 47 - **Grupo G4_{ee}** (*Melissa officinalis*)_ após 24 h de incubação. Em destaque, falha na divisão celular (setas vermelhas (100x, 5,3 X zoom).

5.3.3.8 *Pterodon emarginatus*-C (Sucupira Casca)

Não observamos alterações morfológicas no grupo G4_{ee}. O grupo apresentou embriões com boa coloração citoplasmática, ZP intacta, sem falhas nas divisões celulares e espaço do periplasma normal (Figura 48).

Figura 48 - **Grupo G4_{ee}** (*Pterodon emarginatus*-C)_após 24 h de incubação. Embrião sem alterações morfológicas (100x5,7 X zoom).

5.3.3.9 *Pterodon emarginatus*-S (Sucupira Semente)

O grupo G4_{ee} de *Pterodon emarginatus*-S sofreu inúmeras alterações morfológicas. A mais comum foi blastômeros irregulares/assimétricos e degenerativos (Figura 49).

Figura 49 - Grupo G4_{ee} (*Pterodon emarginatus*-S) após 24 h de incubação. Embrião com blastômeros irregulares e degenerando (100x5,7 X zoom).

5.3.4 Análise estatística_EE

Serão, a seguir, apresentados os resultados estatísticos dos ensaios dos EE. Como foram feitos testes de toxicidade visando concentrações aceitáveis aos zigotos, todos os ensaios dos grupos G1_{ee}xG3_{ee} não apresentaram, portanto, diferenças significativas (Tabela 10), enquanto que a análise de todos os grupos expostos ao BoHV-1 Colorado (G2_{ee}) com os controles (G1_{ee}), G1_{ee}xG2_{ee}, apresentaram diferença significativa em relação a taxa de clivagem (Tabela 11). Abaixo, as tabelas 8 e 9 fornecem um panorama geral das taxas de clivagem e análise estatística. Em seguida, as descrições de cada extrato.

Tabela 10 - Análise estatística comparativa da Taxa de Clivagem entre os grupos tratados com EE.

EE	G1 _{ee} XG2 _{ee}	G1 _{ee} XG3 _{ee}	G1 _{ee} XG4 _{ee}
<i>Chamomilla recutita</i>	D.S.	D.N.S.	D.N.S.
<i>Allium sativum</i>	D.S.	D.N.S.	D.S.
<i>Zingiber officinale</i>	D.S.	D.N.S.	D.S.
<i>Syzygium aromaticum</i>	D.S.	D.N.S.	D.S.
<i>Illicium verum</i> Hook.	D.S.	D.N.S.	D.S.
<i>Punica granatum</i>	D.S.	D.N.S.	D.N.S.
<i>Melissa officinalis</i>	D.S.	D.N.S.	D.S.
<i>Pterodon emarginatus</i> _C (Sucupira Casca)	D.S.	D.N.S.	D.N.S.
<i>Pterodon emarginatus</i> -S (Sucupira Semente)	D.S.	D.N.S.	D.N.S.

TESTE ESTATÍSTICO USADO: Teste exato de Fisher com nível de significância (α) igual a 5%;

SIGLAS: D.S._Diferença Significativa ($p < 0,05$); D.N.S._ Diferença Não Significativa ($p > 0,05$);

PARA ANÁLISE DO GRUPO TESTE G1XG4: Cor verde= favorável; Cor vermelha= não favorável.

Tabela 11 - Porcentagem das taxas de clivagens dos ensaios com EE.

EE	G1 _{ee} XG2 _{ee}	G1 _{ee} XG3 _{ee}	G1 _{ee} XG4 _{ee}
<i>Chamomilla recutita</i>	(210/252=83%)x(114/198=58%)	(210/252=83%)x(184/236=78%)	(210/252=83%)x(197/255=77%)
<i>Allium sativum</i>	(176/280=63%)x(128/303=42%)	(176/280=63%)x(137/226=61%)	(176/280=63%)x(80/152=53%)
<i>Zingiber officinale</i>	(196/252=78%)x(126/273=46%)	(196/252=78%)x(149/213=70%)	(196/252=78%)x(154/232=66%)
<i>Syzygium aromaticum</i>	(237/336=71%)x(81/156=52%)	(237/336=71%)x(126/197=64%)	(237/336=71%)x(93/198=47%)
<i>Illicium verum</i> Hook.f	(138/183=75%)x(180/485=37%)	(138/183=75%)x(134/198=68%)	(138/183=75%)x(183/293=63%)
<i>Punica granatum</i>	(254/336=76%)x(234/370=63%)	(254/336=76%)x(75/104=72%)	(254/336=76%)x(206/274=75%)
<i>Melissa officinalis</i>	(145/190=76%)x(79/175=45%)	(145/190=76%)x(164/232=71%)	(145/190=76%)x(62/187=33%)
Sucupira Casca	(147/177=83%)x(126/204=62%)	(147/177=83%)x(213/280=76%)	(147/177=83%)x(230/292=79%)
Sucupira Semente	(174/230=76%)x(117/226=52%)	(174/230=76%)x(143/207=69%)	(174/230=76%)x(314/448=70%)

SIGLAS: EE ou_{ee}_ Extrato Etanólico; G1_grupo controle; G2_grupo exposto ao BoHV-1; G3_grupo exposto ao _{oe}; G4_grupo exposto ao BoHV-1 e ao _{oe}. 'Sucupira' = *Pterodon emarginatus*.

5.3.4.1 *Chamomilla recutita*

Após 24 horas de exposição ao extrato de *Chamomilla recutita* e contaminação dos zigotos murinos ao BoHV-1 Colorado foram constatados as seguintes taxas de clivagens: G1_{ee} igual a 83% (210/252); G2_{ee} igual a 58% (114/198); G3_{ee} igual a 78% (184/236) e G4_{ee} igual a 77% (197/255). Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) com relação à taxa de clivagem entre os grupos G1_{ee}xG2_{ee} (Gráfico 1). Já os grupos G1_{ee}xG3_{ee} e os grupos G1_{ee}xG4_{ee} não apresentaram diferença significativa (Tabelas 10 e 11).

AVALIAÇÃO DA TAXA DE CLIVAGEM DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS AO BoHV-1 COLORADO E AO EE DE *Chamomilla recutita* APÓS 24 h.

Gráfico 1 - Taxa de clivagem de zigotos murinos após 24 h. EE ou ee_ extrato etanólico de *Chamomilla recutita*. Grupo G1_{ee}: controle; Grupo G2_{ee}: exposto ao vírus; Grupo G3_{ee}: exposto ao extrato etanólico; Grupo G4_{ee}: exposto ao vírus e ao extrato etanólico.

5.3.4.2 *Allium sativum*

Após 24 horas de exposição ao extrato de *Allium sativum* e contaminação dos zigotos murinos ao BoHV-1 Colorado foram constatados as seguintes taxas de clivagens: G1_{ee} igual a 63% (176/280); G2_{ee} igual a 42% (128/303); G3_{ee} igual a 61% (137/226) e G4_{ee} igual a 53% (80/152). Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) com relação à taxa de clivagem entre os grupos G1_{ee}xG2_{ee} (Gráfico 2) e entre os grupos G1_{ee}xG4_{ee} (Tabelas 10 e 11).

AValiação da taxa de clivagem de zigotos murinos expostos ao BoHV-1 Colorado e ao EE de *Allium sativum* após 24 h.

Gráfico 2 - Taxa de clivagem de zigotos murinos após 24 h. EE ou ee_ extrato etanólico de *Allium sativum*. Grupo G1_{ee}: controle; Grupo G2_{ee}: exposto ao vírus; Grupo G3_{ee}: exposto ao extrato etanólico; Grupo G4_{ee}: exposto ao vírus e ao extrato etanólico.

5.3.4.3 *Zingiber officinale*

Após 24 horas de exposição ao extrato de *Zingiber officinale* e contaminação dos zigotos murinos ao BoHV-1 Colorado foram constatados as seguintes taxas de clivagens: G1_{ee} igual a 78% (196/252); G2_{ee} igual a 46% (126/273); G3_{ee} igual a 70% (149/213) e G4_{ee} igual a 66% (154/232). Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) com relação à taxa de clivagem entre os grupos G1_{ee}xG2_{ee} (Gráfico 3) e entre os grupos G1_{ee}xG4_{ee} (Tabelas 10 e 11).

AValiação da taxa de clivagem de zigotos murinos expostos ao BoHV-1 Colorado e ao EE de *Zingiber officinale* após 24 h.

Gráfico 3 - Taxa de clivagem de zigotos murinos após 24 h. EE ou ee_ extrato etanólico de *Zingiber officinale*. Grupo G1_{ee}: controle; Grupo G2_{ee}: exposto ao vírus; Grupo G3_{ee}: exposto ao extrato etanólico; Grupo G4_{ee}: exposto ao vírus e ao extrato etanólico.

5.3.4.4 *Syzygium aromaticum*

Após 24 horas de exposição ao extrato de *Syzygium aromaticum* e contaminação dos zigotos murinos ao BoHV-1 Colorado foram constatados as seguintes taxas de clivagens: G1_{ee} igual a 71% (237/336); G2_{ee} igual a 52% (81/156); G3_{ee} igual a 64% (126/197) e G4_{ee} igual a 47% (93/198). Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) com relação à taxa de clivagem entre os grupos G1_{ee}xG2_{ee} (Gráfico 4) e entre os grupos G1_{ee}xG4_{ee} (Tabelas 10 e 11).

AValiação da taxa de clivagem de zigotos murinos expostos ao BoHV-1 Colorado e ao EE de *Syzygium aromaticum* após 24 h.

Gráfico 4 - Taxa de clivagem de zigotos murinos após 24 h. EE ou ee_ extrato etanólico de *Syzygium aromaticum*. Grupo G1ee: controle; Grupo G2ee: exposto ao vírus; Grupo G3ee: exposto ao extrato etanólico; Grupo G4ee: exposto ao vírus e ao extrato etanólico.

5.3.4.5 *Illicium verum* Hook. f

Após 24 horas de exposição foram constatados as seguintes taxas de clivagens: G1_{ee} igual a 75% (138/183); G2_{ee} igual a 37% (180/485); G3_{ee} igual a 68% (134/198) e G4_{ee} igual a 63% (183/293). Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) com relação à taxa de clivagem entre os grupos G1_{ee}xG2_{ee} (Gráfico 5) e entre os grupos G1_{ee}xG4_{ee} (Tabelas 10 e 11).

AVALIAÇÃO DA TAXA DE CLIVAGEM DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS AO BoHV-1 COLORADO E AO EE DE *Illicium verum* Hook. f APÓS 24 h.

Gráfico 5 - Taxa de clivagem de zigotos murinos após 24 h. EE ou ee_ extrato etanólico de *Illicium verum* Hook. f. Grupo G1_{ee}: controle; Grupo G2_{ee}: exposto ao vírus; Grupo G3_{ee}: exposto ao extrato etanólico; Grupo G4_{ee}: exposto ao vírus e ao extrato etanólico.

5.3.4.6 *Punica granatum*

Após 24 horas de exposição ao extrato de *Punica granatum* e contaminação dos zigotos murinos ao BoHV-1 Colorado foram constatados as seguintes taxas de clivagens: G1_{ee} igual a 76% (254/336); G2_{ee} igual a 63% (234/370); G3_{ee} igual a 72% (75/104) e G4_{ee} igual a 75% (206/274). Não foi constatada diferença significativa ($p < 0,05$) com relação à taxa de clivagem entre os grupos G1_{ee}xG2_{ee}, G1_{ee}xG3_{ee} e grupo teste G1_{ee}xG4_{ee} (Gráfico 6) (Tabelas 10 e 11).

AVALIAÇÃO DA TAXA DE CLIVAGEM DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS AO BoHV-1 COLORADO E AO EE DE *Punica granatum* APÓS 24 h.

Gráfico 6 - Taxa de clivagem de zigotos murinos após 24 h. EE ou ee_ extrato etanólico de *Punica granatum*_Grupo G1_{ee}: controle; Grupo G2_{ee}: exposto ao vírus; Grupo G3_{ee}: exposto ao extrato etanólico; Grupo G4_{ee}: exposto ao vírus e ao extrato etanólico.

5.3.4.7 *Melissa officinalis*

Após 24 horas de exposição ao extrato de *Melissa officinalis* e contaminação dos zigotos murinos ao BoHV-1 Colorado foram constatados as seguintes taxas de clivagens: G1_{ee} igual a 76% (145/190); G2_{ee} igual a 45% (79/175); G3_{ee} igual a 71% (164/232) e G4_{ee} igual a 33% (62/187) (gráfico 7). Verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) com relação à taxa de clivagem G1_{ee} x G4_{ee} (Tabelas 10 e 11).

AVALIAÇÃO DA TAXA DE CLIVAGEM DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS AO BoHV-1 COLORADO E AO EE DE *Melissa officinalis* APÓS 24 h.

Gráfico 7 - Taxa de clivagem de zigotos murinos após 24 h. EE ou ee_ extrato etanólico de *Melissa officinalis* _Grupo G1ee: controle; Grupo G2ee: exposto ao vírus; Grupo G3ee: exposto ao extrato etanólico; Grupo G4ee: exposto ao vírus e ao EE.

5.3.4.8 *Pterodon emarginatus*-C (Sucupira Casca)

Após 24 horas de exposição ao extrato de semente de *Pterodon emarginatus*-C (Sucupira Casca) e contaminação dos zigotos murinos ao BoHV-1 Colorado foram constatados as seguintes taxas de clivagens: G1_{ee} igual a 76% (145/190); G2_{ee} igual a 52% (117/226); G3_{ee} igual a 69% (143/207) e G4_{ee} igual a 70% (314/448) (gráfico 7). Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à taxa de clivagem G1_{ee} x G4_{ee} (Tabelas 10 e 11).

AValiação da taxa de clivagem de zigotos murinos expostos ao BoHV-1 COLORADO e ao EE de *Pterodon emarginatus*-C após 24 h.

Gráfico 8 - Taxa de clivagem de zigotos murinos após 24 h. EE ou ee_ extrato Etanólico de *Pterodon emarginatus*-C (Sucupira Casca)_Grupo G1ee: controle; Grupo G2ee: exposto ao vírus; Grupo G3ee: exposto ao extrato etanólico; Grupo G4ee: exposto ao vírus e ao extrato etanólico.

5.3.4.9 *Pterodon emarginatus*-S (Sucupira Semente)

Após 24 horas de exposição ao extrato de Casca de *Pterodon emarginatus*-S (Sucupira Semente) e contaminação dos zigotos murinos ao BoHV-1 Colorado foram constatados as seguintes taxas de clivagens: G1_{ee} igual a 83% (147/177); G2_{ee} igual a 62% (126/204); G3_{ee} igual a 76% (213/280) e G4_{ee} igual a 79% (230/292) (gráfico 8). Verificou-se diferença ($p < 0,05$) com relação à taxa de clivagem G1_{ee}xG4_{ee} (Tabelas 10 e 11).

AValiação DA TAXA DE CLIVAGEM DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS AO BoHV-1 COLORADO E AO EE DE *Pterodon emarginatus*-S APÓS 24 h.

Gráfico 9 - Taxa de clivagem de zigotos murinos após 24 h. EE ou ee_ extrato etanólico de *Pterodon emarginatus*-S (Sucupira Semente)_Grupo G1ee: controle; Grupo G2ee: exposto ao vírus; Grupo G3ee: exposto ao extrato etanólico; Grupo G4ee: exposto ao vírus e ao extrato etanólico.

5.3.5 Análise morfológica_EA

Devido aos testes de toxicidade de EA em relação aos embriões murinos, todos os ensaios dos grupos G3_{ee} não apresentaram, portanto, alterações morfológicas. O mesmo ocorreu com os grupos G1_{ee} (controles) que não foram expostos aos vírus. Já os grupos expostos aos vírus (G2_{ee}) tiveram alterações.

Inicialmente, destacamos a Tabela 12 que fornece um panorama geral da ocorrência das alterações morfológicas ocorridas nos grupos testados. Posteriormente segue descrição de cada Extrato Aquoso de *Agaricus blazei* e Extrato Aquoso de *Própolis* e seus respectivos grupos.

Tabela 12 - Constatação de alteração morfológica entre respectivos EA e seus grupos.

EA	G1 _{ea}	G2 _{ea}	G3 _{ea}	G4 _{ea}
<i>Agaricus blazei</i>	S.A.M.	C.A.M.	S.A.M.	S.A.M.
Própolis	S.A.M.	C.A.M.	S.A.M.	S.A.M.

-SIGLAS: EA ou _{ea} - Extrato Aquoso; G1_grupo controle; G2_grupo exposto ao BoHV-1; G3_grupo exposto ao _{ea}; G4_grupo exposto ao BoHV-1 e ao _{ea}.

-Para análise do G4_{ea}:

C.A.M. Com pelo menos uma Alteração Morfológica (cor vermelha);

S.A.M. Sem Alteração Morfológica (cor verde).

5.3.5.1 *Agaricus blazei*

Não foi encontrado, para o grupo teste, grupo G4_{ea}, alterações morfológicas. Os embriões apresentaram citoplasma com aspecto uniforme sem alterações da ZP, sem falhas nas divisões celulares e espaço do periplasma considerado normal (Figuras 50 e 51).

Figura 50 - **Grupo G4_{ea}** (*Agaricus blazei*)_ após 24 h de incubação. Embrião com duas células iguais, citoplasma com coloração uniforme, ZP íntegra (100x5,7 X zoom).

Figura 51 - **Grupo G4_{ea}** (*Agaricus blazei*)_ após 72 h de incubação. Embrião com oito células iguais e aspecto normal (100x5,7 X zoom).

5.3.5.2 Própolis

O grupo teste, G4_{ea}, não apresentou alterações morfológicas. Os embriões apresentaram citoplasma com aspecto uniforme, sem falhas nas divisões celulares, espaço do periplasma considerado normal e sem alterações da ZP (Figura 52).

Figura 52 - **Grupo G4_{ea}** (Própolis)_ após 24 h de incubação. Embrião com duas células iguais, citoplasma com coloração uniforme, ZP íntegra (100x5,7 X zoom).

5.3.6 Análise estatística_EA

Apresentaremos a seguir os resultados estatísticos dos ensaios dos extratos aquosos. Devido aos testes de toxicidade visando níveis de desenvolvimento aceitáveis aos zigotos, todos os ensaios entre os grupos G1_{ea}xG3_{ea} não apresentaram diferenças significativas, enquanto que a análise de todos os grupos expostos ao BoHV-1 Colorado (G2_{ea}) com os controles (G1_{ea}), G1_{ea}xG2_{ea}, apresentaram diferença significativa na taxa de clivagem (Tabela 13). Abaixo, as tabelas 13 e 14 fornecem um panorama geral das taxas de clivagem e análise estatística. Em seguida, as descrições de cada extrato, *Agaricus blazei* e Própolis.

Tabela 13 - Taxa de Clivagem_ Resultado da análise estatística dos EA conforme respectivos grupos

EA	G1 _{ea} xG2 _{ea}	G1 _{ea} xG3 _{ea}	G1 _{ea} xG4 _{ea}
<i>Agaricus blazei</i>	D.S.	D.N.S.	D.N.S.
Própolis	D.S.	D.N.S.	D.N.S.

TESTE ESTATÍSTICO USADO: Teste exato de Fisher com nível de significância (α) igual a 5%;

SIGLAS: D.S._Diferença Significativa ($p < 0,05$); D.N.S._ Diferença Não Significativa ($p > 0,05$);

PARA ANÁLISE DO GRUPO TESTE G1XG4:

Cor verde= tratamento favorável; Cor vermelha= não favorável.

Tabela 14 - Comparação das taxas de clivagens dos ensaios com Extratos Aquosos

EA	G1 _{ea} XG2 _{ea}	G1 _{ea} XG3 _{ea}	G1 _{ea} XG4 _{ea}
Agaricus blazei	(232/288=81%)x(148/324=46%)	(232/288=81%)x(218/286=76%)	(232/288=81%)x(275/369=75%)
Própolis	(154/201=77%)x(138/262=53%)	(154/201=77%)x(224/273=82%)	(154/201=77%)x(185/250=74%)

SIGLAS: EA ou ea_ Extrato Aquoso; G1_grupo controle; G2_grupo exposto ao BoHV-1; G3_grupo exposto ao ea.; G4_grupo exposto ao BoHV-1 e ao ea.

5.3.6.1 Agaricus blazei

Após 24 horas de exposição ao extrato *Agaricus blazei* e contaminação dos zigotos murinos ao BoHV-1 Colorado foram constatados as seguintes taxas de clivagens: G1_{ea} igual a 81% (232/288); G2_{ea} igual a 46% (148/324); G3_{ea} igual a 76% (218/286) e G4_{ea} igual a 75% (275/369). Não foi constatada diferença significativa ($p < 0,05$) com relação à taxa de clivagem entre os grupos G1_{ea}XG2_{ea}, G1_{ea}XG3_{ea} e grupo teste G1_{ea}XG4_{ea} (Gráfico 10) (Tabela 13).

AVALIAÇÃO DA TAXA DE CLIVAGEM DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS AO BoHV-1 COLORADO E AO E.A. DE *Agaricus blazei* APÓS 24 h.

Gráfico 10 - Taxa de clivagem de zigotos murinos após 24 h. EA ou ea_ extrato Aquoso de *Agaricus blazei*. Grupo G1ea: controle; Grupo G2ea: exposto ao vírus; Grupo G3ea: exposto ao extrato aquoso; Grupo G4ea: exposto ao vírus e ao extrato aquoso.

5.3.6.2 Própolis

Após 24 horas de exposição ao extrato de Própolis e contaminação dos zigotos murinos ao BoHV-1 Colorado foram constatados as seguintes taxas de clivagens: G1_{ea} igual a 77% (154/201); G2_{ea} igual a 53% (138/262); G3_{ea} igual a 82% (224/273) e G4_{ea} igual a 74% (185/250). Não foi constatada diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à taxa de clivagem entre os grupos G1_{ea}xG2_{ea}, G1_{ea}xG3_{ea} e grupo teste G1_{ea}xG4_{ea} (Gráfico 11) (Tabela 13).

AVALIAÇÃO DA TAXA DE CLIVAGEM DE ZIGOTOS MURINOS EXPOSTOS AO BoHV-1 COLORADO E AO E.A. DE Própolis APÓS 24 h.

Gráfico - 11 Taxa de clivagem de zigotos murinos após 24 h. EA ou ea_ extrato aquoso de Própolis. Grupo G1ea: controle; Grupo G2ea: exposto ao vírus; Grupo G3ea: exposto ao extrato aquoso; Grupo G4ea: exposto ao vírus e ao extrato aquoso.

5.4 Co-cultura dos embriões murinos em células MDBK após LS e TT _ Experimento 4

Foi realizado a comparação pela média de 4 ensaios entre os grupos 2E (grupos G2_embriões expostos ao BoHV-1 Colorado) e 4E (grupos G4_ embriões expostos ao BoHV-1 Colorado e aos P.N.) conforme tabela 15. Os embriões (E) e gotas (GT) dos grupos controles, grupos G1, e grupos submetidos aos produtos naturais, grupos G3, não apresentaram presença de partículas virais e CPE após

72h (Figura 53). Todos os embriões dos grupos G2 (2E) e as gotas relacionadas (2GT) apresentaram CPE. Os grupos testes (4E) dos óleos essenciais apresentaram CPE com desprendimento do fundo da garrafa de, praticamente, todas as células MDKB após 72 h de incubação (Figura 54). Já a incubação dos embriões (4E) tratados com Extrato Etanólico de *Melissa officinalis*, *Punica granatum* e *Pterodon emarginatus*-C (Sucupira Casca) apresentaram CPE discreto (Figura 55) ou nenhum CPE (Figura 56) que é compatível com diminuição significativa das partículas virais constatada pela titulação viral após 72 h.

No entanto, os embriões (4E) tratados com Extrato Etanólico (Grupos G4_{ee}) de *Chamomilla recutita*, *Allium sativum*, *Zingiber officinale*, *Syzygium aromaticum*, *Illicium verum* Hook e *Pterodon emarginatus*-S (Sucupira Semente) apresentaram CPE característico e intenso, semelhante à co-cultura dos embriões murinos em MDBK e expostos ao BoHV-1 Colorado (Grupos G2) (Figuras 57 e 58).

As médias relacionadas de cada Produto Natural referentes aos grupos 2E e 4E e suas respectivas significâncias estão expostos na Tabela 15.

Tabela 15 - Relação entre as médias das titulações dos embriões (2E e 4E) submetidos aos tratamentos com os PN e suas respectivas análises estatísticas.

	PN	$\bar{X}$		Análise Estatística
		2E	4E	
OE	<i>Chamomilla recutita</i>	1,74x10 ⁷	2,45x10 ⁷	P= 0.6532; p>0,05; D.N.S.
	<i>Allium sativum</i>	2,91x10 ⁷	6,58x10 ⁶	P= 0.8824; p>0,05; D.N.S.
	<i>Zingiber officinale</i>	1,14x10 ⁷	3,08x10 ⁷	P= 0.5594; p>0,05; D.N.S.
	<i>Syzygium aromaticum</i>	3,39x10 ⁷	1,32x10 ⁸	P= 0.8846; p>0,05; D.N.S.
	<i>Illicium verum</i> Hook. f.	3,39x10 ⁷	1,32x10 ⁷	P= 0.6606; p>0,05; D.N.S.
	<i>Punica granatum</i>	1,63x10 ⁷	3,54x10 ⁷	P= 0.8846; p>0,05; D.N.S.
	<i>Melissa officinalis</i>	3,39x10 ^{7,5}	1,20x10 ⁷	P= 0.9999; p>0,05; D.N.S.
EE	<i>Chamomilla recutita</i>	1,74x10 ⁶	8,85x10 ⁶	P= 0.8827; p>0,05; D.N.S.
	<i>Allium sativum</i>	2,84x10 ⁷	5,33x10 ⁶	P= 0.7704; p>0,05; D.N.S.
	<i>Zingiber officinale</i>	3,08x10 ⁷	1,32x10 ⁷	P= 0.8834 ; p>0,05; D.N.S.
	<i>Syzygium aromaticum</i>	6,58x10 ⁶	8,66x10 ⁶	P= 0.3429; p>0,05; D.N.S.
	<i>Illicium verum</i> Hook.	6,04x10 ⁷	3,62x10 ⁷	P= 0.4652; p>0,05; D.N.S.
	<i>Punica granatum</i>	3,70x10 ⁷	6,51x10 ²	P= 0.0286; p<0,05; D.S.
	<i>Melissa officinalis</i>	1,37x10 ⁷	1,32x10 ⁴	P= 0.0286; p<0,05; D.S.
	<i>Pterodon emarginatus-C</i>	2,08x10 ⁷	3,79x10 ²	P= 0.0286; p<0,05; D.S.
	<i>Pterodon emarginas-S</i>	1,37x10 ⁷	9,20x10 ⁶	P= 0.3095; p>0,05; D.N.S.
	<i>Agaricus blazei</i>	1,30x10 ⁷	1,86x10 ⁷	P= 0.6606; p>0,05; D.N.S.
EA	<i>Própolis</i>	6,04x10 ⁷	1,63x10 ³	P= 0.0286; p<0,05; D.S.

- Siglas: PN_Produto Natural; OE Óleo Essencial; EE Extrato Etanólico; EA Extrato Aquoso;

$\bar{x}$: média de quatro titulações (TCID₅₀/mL); 2E: embriões dos grupos G₂; 4E: embriões dos grupos G₄;

-Observação: foi usado o teste Mann-Whitney ($\alpha=0,05$).

Figura 53 - Cultura MDBK inoculadas com embrião do grupo G1_{oe} (*Allium sativum*) (100x, 5,1Xzoom)

Figura 54 - Cultura MDBK inoculadas com embrião do grupo G4_{oe} (*Chamomilla recutita*) (100x, 5,7Xzoom).

Figura 55 - Cultura MDBK inoculadas com embrião do grupo G4_{ee} (*Punica granatum*) com discreto CPE (seta) (100x, 4,1Xzoom)

Figura 56 - Cultura MDBK inoculadas com embrião do grupo G4_{ee} (*Pterodon emarginatus*-C), sem CPE (100x, 4,7Xzoom)

Figura 57 - Cultura MDBK inoculadas com embrião do grupo G4_{ee} (*Zingiber officinale*), com intenso CPE (100x, 5,7Xzoom).

Figura 58 - Cultura MDBK inoculadas com embrião do grupo G2_{ee} (*Zingiber officinale*) com intenso CPE (100x, 5,7Xzoom).

5.5 Avaliação da presença do vírus BoHV-1 após uso dos Produtos Naturais pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase n- PCR_Experimento 5

Cada grupo (G1_controle, G2_exposto aos vírus; G3_exposto aos produtos naturais; G4_exposto aos produtos naturais e aos vírus), após 24h de incubação dos zigotos, tiveram os embriões coletados para a realização da n-PCR. Os extratos selecionados foram EE e EA, pois todos os resultados preliminares com OE foram desfavoráveis em relação à morfologia dos embriões e à co-cultura em MDBK. Constatou-se que todos os grupos G2 e G4 foram positivos para todas as amostras, demonstrando a presença da partícula viral sem considerar a viabilidade. Enquanto todos os embriões dos grupos G1 e G3, que não foram expostos aos vírus, permaneceram negativos.

Legenda das canaletas:

- ✚ **M** – Padrão de peso molecular - DNA *ladder* de 100 pb FERMENTAS ;
- ✚ **01 à 04** –Embriões (E) dos ensaios com ***Zingiber officinale***, sendo 1= 1E do ensaio do grupo G1, 2=2E do ensaio do grupo G2, 3=3E do ensaio do grupo G3 e 4=4E do ensaio do grupo G4 ;
- ✚ **05 à 08** –Embriões (E) dos ensaios com ***Chamomilla recutita***, sendo 5= 1E do ensaio do grupo G1, 6=2E do ensaio do grupo G2, 7=3E do ensaio do grupo G3 e 8=4E do ensaio do grupo G4 ;
- ✚ **09 à 12** – Embriões (E) dos ensaios com ***Syzygium aromaticum***, sendo 9= 1E do ensaio do grupo G1, 10=2E do ensaio do grupo G2, 11=3E do ensaio do grupo G3 e 12=4E do ensaio do grupo G4;
- ✚ **13 à 14** – Embriões (E) dos ensaios com ***Própolis***, sendo 13= 1E do ensaio do grupo G1 e 14=2E do ensaio do grupo G2;
- ✚ **(+)** – Controle positivo;

Figura 59 - Detecção de produtos amplificados das amostras de embriões (E) dos ensaios dos grupos G1, G2, G3 e G4 com Extratos de *Zingiber officinale*, *Chamomilla recutita*, *Syzygium aromaticum* e *Própolis*. nested-PCR.

Legenda das canaletas:

- **M** – Padrão de peso molecular - DNA *ladder* de 100 pb FERMENTAS ;
- **15 à 16** – Embriões (E) dos ensaios com ***Própolis***, sendo 15= 3E do ensaio do grupo G3 e 16=4E do ensaio do grupo G4;
- **17 à 20** –Embriões (E) dos ensaios com ***Illicium verum Hook f.***, sendo 17= 1E do ensaio do grupo G1, 18=2E do ensaio do grupo G2, 19=3E do ensaio do grupo G3 e 20=4E do ensaio do grupo G4 ;
- **21 à 24** – Embriões (E) dos ensaios com ***Allium sativum***, sendo 21= 1E do ensaio do grupo G1, 22=2E do ensaio do grupo G2, 23=3E do ensaio do grupo G3 e 24=4E do ensaio do grupo G4;
- **25 à 28** – Embriões (E) dos ensaios com ***Punica granatum***, sendo 25= 1E do ensaio do grupo G1, 26=2E do ensaio do grupo G2, 27=3E do ensaio do grupo G3 e 28=4E do ensaio do grupo G4;
- **29 à 31** – Embriões (E) dos ensaios com ***Pterodon emarginatus-C* (Sucupira Casca)**, sendo 29= 1E do ensaio do grupo G1, 30=2E do ensaio do grupo G2 e 31=3E do ensaio do grupo G3;
- **(-)** – Controle negativo;
- **(+)** – Controle positivo;

Figura 60 - Detecção de produtos amplificados das amostras de embriões (E) dos ensaios dos grupos G1, G2, G3 e G4 com Extratos de Própolis, *Illicium verum Hook f.*, *Allium sativum*, *Punica granatum* e *Pterodon emarginatus-C* (Sucupira Casca). nested-PCR.

Legenda das canaletas:

- M – Padrão de peso molecular - DNA *ladder* de 100 pb FERMENTAS ;
- 32 – Embriões (E) dos ensaios com *Pterodon emarginatus-C* (Sucupira Casca), sendo 32=4E do ensaio do grupo G4;
- 33 à 36 – Embriões (E) dos ensaios com *Melissa officinalis*., sendo 33= 1E do ensaio do grupo G1, 34=2E do ensaio do grupo G2, 35=3E do ensaio do grupo G3 e 36=4E do ensaio do grupo G4 ;
- 37 à 40 – Embriões (E) dos ensaios com *Agaricus blazei*, sendo 37= 1E do ensaio do grupo G1, 38=2E do ensaio do grupo G2, 39=3E do ensaio do grupo G3 e 40=4E do ensaio do grupo G4;
- 41 à 44 – Embriões (E) dos ensaios com *Pterodon emarginatus-S* (Sucupira Semente), sendo 41= 1E do ensaio do grupo G1, 42=2E do ensaio do grupo G2, 43=3E do ensaio do grupo G3 e 44=4E do ensaio do grupo G4;
- (+) – Controle positivo;

Figura 61 - Detecção de produtos amplificados das amostras de embriões (E) dos ensaios dos grupos G1, G2, G3 e G4 com Extratos de *Pterodon emarginatus-C* (Sucupira Casca), *Melissa officinalis*, *Agaricus blazei* e *Pterodon emarginatus-S* (Sucupira Semente) . nested-PCR.

5.6 Análise da morfologia dos embriões murinos com auxílio da microscopia eletrônica de transmissão_Experimento 6

Cada grupo com resultados considerados favoráveis em relação aos experimentos 3, 4 e 5, após 24 h de incubação dos zigotos, tiveram os embriões coletados para a realização da microscopia eletrônica de transmissão para análise morfológica e possível localização das partículas virais.

Foram separados os grupos de embriões murinos tratados com EE de *Punica granatum* (G4_{ee}), EE de *Pterodon emarginatus-C* (G4_{ee}) e EA de Própolis (G4_{ee}). Além

destes grupos relacionados aos testes da eficiência dos PN, separamos grupo controle ($G1_{ee}$) e grupo exposto aos vírus ($G2_{ee}$) para comparação.

Nos embriões do grupo controle ($G1_{ee}$) e grupo exposto aos vírus ($G2_{ee}$) foi possível verificar a presença de ZP recobrindo todo embrião e sem sinais de alterações, compacta e sem modificação em sua espessura (Figuras 62, 63, 65 e 66). Não encontramos rompimentos na MP (Figuras 62, 63, 65 e 66) destes grupos ($G1$ e $G2$) e microvilosidades em quantidade moderada (Figuras 63 e 66). As ZP de todos os embriões murinos que passaram pelos tratamentos de EE de *Punica granatum*, *Pterodon emarginatus*-C e *Própolis* não se romperam (Figuras 69, 70, 71, 72, 73 e 75), porém os embriões tratados com EA *Própolis* apresentaram irregularidades na região mais externa da ZP com discreta diminuição em sua espessura (Figura 72). Encontramos sinais que sugerem exocitose dos embriões que sofreram os tratamentos acima (Figuras 70, 72, 73 e 75).

Não identificamos alterações nas estruturas celulares encontradas no grupo $G1$, tanto no citosol (Figuras 62 e 63) quanto no núcleo (Figura 64). O mesmo ocorreu com o grupo exposto aos vírus, grupo $G2$ (Figuras 66 e 67), e com os grupos cujos embriões passaram pelos tratamentos. Inclusive foi possível detectar mitocôndrias (Figuras 70 e 71) e Complexos Golgienses (Figura 76) em perfeito estado nos grupos $G4_{ee}$ relativos à embriões murinos tratados com EE de *Punica granatum* e EE de *Pterodon emarginatus*.

Figura 62 - Embrião do grupo $G1$ (controle). ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática. Aumento: 7.500x.

Foi possível detectar partículas virais nos embriões do grupo G2 (Figura 68). Também foi possível a detecção de partículas virais passando pela carioteca do embrião do grupo G4_{ee} tratado com Própolis (Figura 74).

Figura 63 - Embrião do grupo G1 (controle). ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática. Aumento: 100.000x

Figura 64 - Embrião do grupo G1 (controle). Em destaque heterocromatina (seta); C: carioteca. Aumento: 30.000x

Figura 65 - Embrião do grupo G2 (vírus) ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática. Aumento: 12.000x

Figura 66 - Embrião do grupo G2 (vírus) ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática Aumento: 30.000x

Figura 67 - Embrião do grupo G2 (vírus). C: carioteca. Setas verdes: poros. Aumento: 30.000x

Figura 68 - Embrião do grupo G2 (vírus) no citósol. Destaque para as partículas virais (setas) Aumento: 120.000x

Figura 69 - Embrião do grupo G4_{ee} *Punica granatum*. ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática. Aumento: 4.000x

Figura 70 - Embrião do grupo G4_{ee} *Punica granatum*. ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática. Setas vermelhas: perturbação da MP; Setas verdes: mitocôndrias. Aumento: 20.000x

Figura 71 - Embrião do grupo G4_{ec} *Punica granatum*. ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática. Setas verdes: mitocôndrias. Aumento: 20.000x

Figura 72 - Embrião do grupo G4_{ea} de *Própolis*. ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática. Aumento: 40.000x

Figura 73 - Embrião do grupo G4_{ua} de *Própolis* . ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática. Aumento: 75.000x

Figura 74 - Embrião do grupo G4_{ua} de *Própolis* . C: carioteca. Destaque: inúmeras partículas viras na região da carioteca (seta vermelha). Aumento: 30.000x

Figura 75 - Embrião do grupo G4_{ee} de *Pterodon emarginatus*-*Casca*. ZP: zona pelúcida; MP: membrana plasmática. Aumento: 30.000x

Figura 76 - Embrião do grupo G4_{ee} de *Pterodon emarginatus*-*C*. Destaque : Complexo Golgiense (seta azul) Aumento: 30.000x

O histórico das etapas da produção *in vitro* de embriões teve início no século XIX com constatação da penetração de espermatozóide em oócitos de estrela do mar e a formação da primeira célula embrionária por grupos que discutiam a importância do núcleo relacionado à hereditariedade. Oscar Hertwig, em 1875, estudou a fecundação de ouriços do mar (*Toxopneustes lividus*) em seu estado natural e conseguiu registrar cada estágio do processo através de preparações microscópicas coradas. Hermann Fol (em 1877) estudou a fertilização da estrela do mar. Eles concluíram que um núcleo de espermatozóide entrava no óvulo, onde se fundia com seu núcleo (BAXTER; FARLEY, 1979).

Esta investigação inicial sobre a fecundação foi possível e facilitada, pois a fecundação dos invertebrados ocorre externamente.

Porém, ao final da década de 1920, surgiu o primeiro relato sobre a possibilidade de se cultivar embriões de coelhos desde as primeiras clivagens e na década seguinte registrou-se a primeira evidência do nascimento de láparos resultantes do cultivo *in vitro* de embriões. Entretanto, somente na década de 1950, marco na história da FIV, é que se registrou o nascimento do primeiro animal (coelho) gerado a partir da FIV (GONÇALVES et al., 2008).

Em julho de 1978, num pequeno hospital situado no Norte da Inglaterra, nasce Louise Brown, resultado da primeira tentativa bem sucedida de fertilização *in vitro* (FIV) em humanos. Este acontecimento foi um dos marcos da reprodução humana sendo resultado do empenho do ginecologista Patrick Steptoe, pioneiro em laparoscopia, e do cientista Robert Edwards (STEPTOE; EDWARDS, 1978).

Em relação aos animais de produção, surgiram as primeiras notícias sobre MIV e FIV de oócitos bovinos no final da década de 1970 com o nascimento do primeiro bezerro no início da década de 1980 (HANADA; ENYA; SUZUKI, 1986). As técnicas para a fecundação *in vitro* nas espécies de produção, portanto, evoluíram a partir da década, de 1980 (BRACKETT et al., 1982).

Inicialmente, os embriões eram produzidos pela fecundação *in vitro* de oócitos maturados *in vivo*, usando sêmen fresco recém-ejaculado. Os maiores progressos subsequentes incluíram a maturação *in vitro* de oócitos e a fecundação com sêmen congelado e descongelado em bovinos, sendo a criopreservação de embriões fator de destaque na comercialização da transferência de embriões (TE) e da fertilização *in vitro* (FIV) (PALAZZI, 2010).

Assim, a produção comercial de embriões PIV a partir de doadoras vivas se tornou realidade. Devido ao grande potencial de aplicação das biotécnicas da reprodução. A Produção *in Vitro* (PIV) tem sido difundida em diversos países e de forma destacada no Brasil a partir da década de 1990, sendo que hoje o Brasil é reconhecido internacionalmente pela técnica de FIV.

Em 1992, foram propostas pela IETS sugestões sanitárias simples, relativas à certificação para a movimentação de embriões. Subsequentemente, elas foram adotadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e incorporadas ao Código Terrestre de Saúde Animal (GUIENNE et al., 2009).

Vale ressaltar que a produção *in vitro* (PIV) de embriões envolve as etapas de colheita, maturação (MIV) e fecundação (FIV) de oócitos, bem como cultivo ou co-cultivo (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias. É uma biotécnica utilizada, de modo alternativo, para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir, por meio da aspiração *in vivo* de folículos guiada por ultrassonografia, o descarte precoce de fêmeas geneticamente privilegiadas portadoras de alterações adquiridas que impeçam a reprodução de ocorrer de forma natural, ou até mesmo pela transferência de embriões (GONÇALVES et al., 2008).

Paradoxalmente, a biotecnologia da reprodução que permite maior controle das células reprodutivas pode, ao mesmo tempo, ser disseminador de patógenos com maior rapidez e fornecer prejuízos consideráveis em escala mundial, por isso as sugestões da IETS e OIE referentes à sanidade das células embrionárias (PALAZZI et al., 2012; STRINGFELLOW; GIVENS; WALDROP, 2004). Dentre as recomendações, há muito tempo se propões a Lavagem Sequencial (LS) e o Tratamento com tripsina (TT) para diversos patógenos. Porém, a LS e o TT em embriões PIV não possuem efetividade para a eliminação e/ou cessação da viabilidade viral (D'ANGELO, 1998; D'ANGELO et al., 2009; PALAZZI, 2009; PALAZZI, 2010). Por isso, o uso de outras proteases ou de agentes antivirais durante o período de cultura pode ser uma alternativa valiosa para se produzir embriões livres de patógenos (GUIENNE et al., 2009). Um dos fatores limitantes do TT decorre da duração da MIV, onde o patógeno, como vírus, conta a seu favor com 24h para penetração na célula, ou, pelo menos, aderência à ZP. Segundo Flores (2007), a transição entre o processo de adsorção e penetração é muito rápida e ocorre em poucos minutos. Além disso, o ciclo replicativo também é rápido,

ocorrendo entre 24-48 horas (ENGELS; STECK; WYLER, 1981; FIELDS; KNIPE, 1992 apud PAVÃO, 2009)

Justifica-se, portanto, a pesquisa em busca de novos meios através de agentes antivirais com ação intracelular, propósito desta tese.

Posto isto, foi escolhido, após pesquisa bibliográfica e sugestões de especialistas do Instituto Biológico de São Paulo e da Universidade Federal de Goiás em Produtos Naturais, o uso de extratos de plantas ou de compostos produzidos por seres vivos que sinalizassem uma possível ação antiviral. O emprego de plantas medicinais na saúde tem evoluído ao longo dos tempos desde as formas mais simples de tratamento local, até as formas mais tecnologicamente sofisticadas.

Apesar das diferenças, há um fato comum entre elas: a presença da existência de 'algo' que, administrado sob forma de misturas complexa como chás, garrafadas, tinturas, etc, num caso, ou como substância pura isolada, noutro caso, e transformado em comprimidos, gotas, pomadas ou cápsulas, tem a propriedade de provocar reações benéficas no organismo capazes de resultar na recuperação da saúde. Este 'algo' atualmente é chamado de princípio ativo, seja ele constituído de uma única substância existente na planta ou de um conjunto de substâncias que atuam sinergicamente, chamado de complexo fitoterápico (LORENZI; MATOS, 2002h).

Uma questão de extrema relevância é a toxicidade que os produtos naturais podem causar nos embriões que são submetidos aos tratamentos, portanto, em nenhuma hipótese deve ser deixado de lado. Provavelmente já ouvimos o equivocado pensamento que ignora a toxicidade: "Tudo o que vem da natureza não faz mal". Melhor seria afirmarmos que: "Tudo o que vem da natureza, quando utilizado adequadamente, não faz mal à saúde" (WOLFFENBÜTTEL, 2010). Portanto, princípio ativo, toxicidade e redução da taxa viral são características fundamentais para o pesquisador que queira estudar antivirais.

Segundo Simoni (2003), a maioria das doenças infecciosas que afetam o homem e os animais é causada por vírus. As diversas medidas sanitárias adotadas envolvem o controle das doenças através do uso de vacinas. Entretanto, quando o organismo já está infectado dificilmente adotam-se medidas para seu tratamento. Existe um vasto potencial neste campo de pesquisa no Brasil visando o aproveitamento de plantas com valor curativo e que há muito tempo são utilizados pela farmacopeia popular que agora podem ser utilizados como antivirais. Até

recentemente essas doenças são tratadas apenas pelo alívio dos sintomas do que pelo ataque ao vírus propriamente dito. Deste modo, uma das finalidades da quimioterapia antiviral é seletivamente inibir ou as enzimas induzidas pelo vírus ou as codificadas pelo vírus utilizando um produto natural que não afete especificamente as enzimas normalmente envolvidas em processos bioquímicos semelhantes na célula hospedeira. Uma substância (ideal) antiviral deve reunir diversas características como: apresentar grande espectro de atividade antiviral sendo efetivo para um grande grupo de vírus; ter propriedades farmacocinéticas favoráveis para reagir apenas no órgão alvo aonde a infecção viral pode estar localizada. O principal enfoque é escolher um extrato que reduza ou inativa a replicação viral numa concentração que não seja tóxica.

Para os testes antivirais, foram escolhidos embriões murinos, pois o uso de camundongos apresenta-se como um modelo de alta confiabilidade segundo inúmeros trabalhos (MALLEK et al., 1984; NAGY et al., 2003; PALAZZI, 2009, 2010). São animais em que há melhor controle sanitário quando comparados aos animais usados de abatedouros que, muitas vezes, não se sabe, ao certo, a procedência. Sem considerar que só vão para o abate vacas com estágio avançado de idade, existindo, portanto, a dificuldade da análise do teste, pois a inviabilidade dos oócitos pode ser confundida com a ação do vírus ou do antiviral.

Além do maior controle sobre os animais e, consequentemente, da qualidade das células gaméticas e embriões usados, os embriões de camundongos são sensíveis a diferentes patógenos, inclusive ao BoHV-1 Colorado (PALAZZI, 2010), usados neste trabalho, são de fácil acesso, baixo custo (GALUPPO, 2002), além de possibilitarem ensaios *in vivo* com favorável custo/benefício para averiguar se, após tratamento *in vitro*, há a possibilidade do vírus causar a doença no animal receptor. Este modelo possibilita extrapolação do tratamento com os produtos naturais (*in vitro*) para sistema *in vivo*. Sendo que esta extrapolação, *in vivo*, também é de baixo custo, pois usa camundongos fêmeas como receptora ao invés de uma receptora de grande porte que, obviamente, seria muito mais dispendioso, considerando o valor do animal, alimentação, espaço, entre outros fatores.

Protocolos de meios de culturas têm sido utilizados para a maturação *in vitro* de oócitos, meios de fertilização, meios de cultura *in vitro*, etc. Em todos eles há elementos fundamentais no crescimento e desenvolvimento celular como hormônios LH e FSH no meio de maturação, por exemplo, que demonstram aumento da

capacidade de fecundação e melhora o posterior desenvolvimento embrionário. Independentemente da fase das células reprodutivas, para o desenvolvimento, estas células são colocadas em meio de cultura determinado (TCM-199[®], por exemplo), cobertas em óleo mineral estéril sendo levados à estufa em determinada temperatura (39 °C para bovinos) em determinado tempo (22 a 24 h para MIV) em atmosfera 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2008).

Com base nos protocolos de reprodução animal, onde há a necessidade de se usar óleo mineral estéril para evitar a evaporação do meio de cultura na estufa, diluímos os óleos essenciais para a verificação da ação destes produtos naturais sobre o ciclo viral. O objetivo era de que algumas moléculas pudessem se difundir no meio de cultura, atingindo os embriões e, de alguma forma, bloquear ou reduzir a replicação viral.

Como já descrito, o processo de extração do óleo essencial foi por hidrodestilação em um aparelho de Clevenger. O rendimento dos óleos essenciais estudados variou entre 0,0143% e 0,7969% (Tabela 1). Os óleos essenciais são provenientes do metabolismo secundário das plantas e possuem finalidades diversas: autodefesa, atração, proteção contra perda de água e aumento de temperatura foliar. As espécies vegetais não utilizam os óleos essenciais diretamente para a nutrição, sendo estas substâncias extremamente concentradas (WOLFFENBUTTEL, 2010), por isso o rendimento muito abaixo quando comparamos, por exemplo, com o Extrato Etanólico, com variação entre 10,36% a 30,56% (Tabela 2).

Como ponto de partida, foi necessário encontrar uma maneira indireta para determinar níveis não tóxicos de cada PN (óleos essenciais, extratos etanólicos e extratos aquosos) em relação aos embriões murinos. Devido à ausência do uso destes produtos naturais em zigotos/embriões murinos, optamos por, primeiramente, fazer uma 'sintonia grossa', ou 'ampla sintonia', com células MDBK (Experimento 1) e, posteriormente, uma 'sintonia fina' (Experimento 2) com os próprios zigotos/embriões a fim de direcionarmos de maneira objetiva e rápida o nível não tóxico para os embriões murinos de cada um dos produtos naturais (Tabelas 4 e 5).

Os óleos essenciais foram submetidos, como mencionamos, ao que chamamos de 'sintonia grossa' com concentração dos óleos essenciais em óleo mineral estéril muito abaixo das diluições feitas com extratos etanólicos e extratos aquosos (Experimento 1; Tabela 5). Após encontrarmos uma 'faixa de citotoxicidade'

em MDBK para cada óleo essencial, fizemos testes em embriões murinos para verificarmos quais as maiores concentrações possíveis, não tóxicas, para estas células (Experimento 2; Tabela 6) tendo como parâmetro aspecto morfológico e taxa de clivagem. Devido à verificação da concentração não tóxica para os embriões murinos, não encontramos, evidentemente, alterações morfológicas e alterações nas taxas de clivagens em todos os produtos naturais dos grupos G3_{oe} (Figura 29) (expostos aos produtos naturais/OE) e, também, nos grupos controles, G1_{oe}. Já os embriões contaminados com BoHV-1 Colorado dos grupos G2 (exposto aos vírus) e os embriões dos grupos G4_{oe} (exposto aos produtos naturais/OE e aos vírus) sofreram alterações morfológicas (Figuras 27 e 28).

Para a análise estatística em relação às taxas de clivagens dos embriões submetidos aos testes com óleos essenciais, foi utilizado o Teste Exato de Fisher ($\alpha=5\%$). Obtivemos diferença não significativa ($p>0,05$) entre os grupos G1_{oe} e G3_{oe} de todos os embriões tratados com OE o que está de acordo com os dados da análise morfológica indicando nível não tóxico dos OE e sem interferência no desenvolvimento dos embriões dos grupos G3_{oe} em relação aos grupos controles G1_{oe}.

A análise estatística dos grupos G1_{oe}xG2_{oe}, como se esperava, apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) o que mostra a sensibilidade dos embriões murinos ao BoHV-1-Colorado (D'Angelo et al., 2005; PALAZZI, 2010). Porém, a análise estatística entre todos os grupos G1_{oe}xG4_{oe} foram insatisfatório sob o ponto de vista de inibição ou diminuição da viabilidade viral, pois a diferença, também, foi significativa ($p<0,05$) indicando a ação prejudicial dos vírus aos embriões dos grupos tratados com óleos essenciais, grupo G4_{oe}, em relação ao grupo controle, G1_{oe} (Tabelas 7, 8 e 9). Este fato, a ineficácia dos tratamentos com OE em diminuir a replicação viral, é confirmada no experimento 4 que utiliza os embriões dos grupos G2_{oe} e G4_{oe} em co-cultura em células MDBK: todos os testes com todos os tratamentos com OE apresentaram diferença não significativa segundo teste de Mann-Whitney ($p>0,05$), ou seja não houve diminuição na replicação viral do grupo teste G4_{oe} (Tabelas 7 e 8).

Inúmeras pesquisas com óleos essenciais na ação contra diversos patógenos, entretanto, apresentaram resultados diferentes dos nossos em relação à eficiência. Testes *in vitro* dos óleos essenciais de *Origanum majorana* L. (manjerona), *Illicium verum* Hook. f. (anis estrelado) e *Cinnamomum zeylanicum*

Blume (canela) foram avaliados em relação as atividades antimicrobianas de cada um sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e para os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, para observar o crescimento e/ou inibição do micélio. Todos os testes promoveram efeito inibitório satisfatório (FREIRE et al., 2011).

SCHNITZLER et al. (2007) testaram herpes vírus simplex tipo 1 (HSV-1) resistentes ao aciclovir, *in vitro*, quanto à sua susceptibilidade aos óleos essenciais de gengibre, tomilho, sândalo e hissopo. Todos os óleos essenciais exibiram níveis elevados de atividade contra herpes vírus simplex tipo 1 (HSV-1) reduzindo significativamente a formação de placas.

A International Standard Organization (ISO) define óleos essenciais como produtos obtidos de plantas através de destilação por arraste de vapor de água. São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Além de serem chamados de óleos essenciais, podem receber a denominação óleos etéreos ou essências que derivam de suas características físico-químicas como a de, por exemplo, serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente, advindo daí a denominação óleo.

Entretanto sua principal característica é a volatilidade, diferindo, assim, dos óleos fixos, misturas de substâncias lipídicas, obtidas geralmente de sementes. Em água, os óleos voláteis apresentam certa solubilidade, por isso denominamos esta mistura de hidrolato, pois possui a capacidade de disponibilizarem certas moléculas apolares no meio aquoso possibilitando que estas moléculas entrem em contato com diversas células em meio de cultura o que justifica o uso dos óleos essenciais para agirem no processo replicativo dos vírus. Os óleos essenciais possuem muitos componentes, alguns deles chegando a 300, o que faz com que óleos essenciais tenham ação ampla e variada (SIMÕES, 2010).

No entanto, nossos ensaios, com todos os óleos essenciais, mostraram-se ineficazes para inibição e/ou diminuição da replicação viral dos embriões murinos submetidos aos testes. Há a possibilidade de que as moléculas, prováveis inibidoras dos vírus, tenham se solubilizado no meio de cultura, porém não terem ‘alcançado’ os embriões em quantidade suficiente ou não tenham se solubilizado no meio de cultura. Por isso, não realizamos os experimentos 5, 6 e 7 para os óleos essenciais devido aos resultados iniciais (experimentos 3 e 4) serem inviáveis.

Os testes seguintes, com extratos etanólicos e aquosos, possuem uma relativa vantagem: a solubilidade em meio de cultura celular. Tanto o extrato etanólico quanto o extrato aquoso apresentam, em meio de cultura para embriões, solubilidade maior ao meio de cultura dos embriões quando comparados com óleo essencial. Sabe-se que a seletividade depende da polaridade, o conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja preferencialmente extrair determina o solvente ou mistura solvente que mais se aproxima do ótimo de seletividade para determinada extração (SIMÕES, 2010). Porém, por não termos um parâmetro definido em relação ao um grupo de substâncias que poderiam interferir no ciclo replicativo do BoHV-1 em embriões murinos, usamos grupos menos polares ao meio de cultura (como os óleos essenciais) a substâncias mais polares (como os extratos etanólicos e extratos aquosos). É evidente que a possibilidade de maior quantidade de moléculas dissolvidas no meio de cultura, viabilizando melhor alcance às células, aumenta a chance do encontro de princípio ativo eficaz no bloqueio e/ou diminuição da replicação viral. Talvez, por este motivo, encontramos melhores resultados com os extratos etanólicos e aquosos quando comparamos com óleos essenciais.

Em experimentos realizados por outros pesquisadores, o extrato da casca de *Púnica granatum* mostrou ação contra o Herpes simplex vírus 1 e 2 in vitro (ZHANG et al., 1995). Jadhav et al. (2012) pesquisaram inúmeras plantas como a *Azadirachta indica*, a *Curcuma longa* (açafrão da família do gengibre), *Punica granatum* (romã), *Ocimum sanctum*, *Nyctanthes arbortristis*, *Carica papaya* (mamão) e *Holarrhena antidysentrica*. Todas provenientes de Gujarat, Estado da Índia. Foram obtidos 24 extratos, sendo que apenas cinco indicaram ação contra o herpesvírus. Segundo a pesquisa, o pó liofilizado de *Punica granatum* exibiu atividade antiviral promissora.

Em nossa pesquisa, o extrato etanólico do pericarpo de *Punica granatum* mostrou ação contra o herpesvírus bovino tipo 1 ao reduzir a replicação viral. Não houve bloqueio total, pois o resultado da n-PCR acusou a presença da partícula viral em todos os grupos testes, G4_{ee}, e foi detectado CPE em células MDBK, ainda que de forma moderada. Ou seja, segundo resultados da n-PCR (Figura 60), ou os vírus conseguiram passar pela ZP e MP do embrião, encontrando-se no interior da célula, ou, se estabeleceram na região entre a ZP e a MP da célula, ou, pelo menos, se fixaram na ZP apesar dos tratamentos, LS e TT. Pelo mesmo motivo, acreditamos

que todos os grupos G2 e G4 relativos aos EE e EA (G2_{ee} e G4_{ee}; G2_{ea} e G4_{ea}) de todos PN apresentaram resultados positivos em relação a n-PCR.

Uma justificativa plausível para encontrarmos todos os embriões dos grupos que foram submetidos ao BoHV-1 Colorado positivo pela *n-PCR* está diretamente relacionado ao alto título viral que utilizamos (10^8 TCID₅₀/mL). Segundo Stringfellow et al. (2004), há a necessidade de que os títulos virais, *in vitro*, estejam em altas concentrações para promover máximo oportunidade de adsorção vírus-células.

Porém, apesar de encontrarmos resultados positivos (n-PCR), ao realizarmos a co-cultura em células MDBK e a posterior titulação, encontramos diminuição na replicação viral quando comparamos as titulações entre os grupos G2_{ee} e G4_{ee} e entre G2_{ea} e G4_{ea} de alguns PN. Por exemplo, a média das 4 titulações do grupo G2_{ee} de *Punica granatum* foi de $3,70 \times 10^7$ TCID₅₀/mL, enquanto a média das 4 titulações do grupo G4_{ee} *Punica granatum* foi de $6,51 \times 10^2$ o que mostra uma diferença significativa, segundo teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). Fato que está de acordo com 'CPE pouco intenso' (Figura 55) nas células MDBK que receberam os embriões murinos tratados com EE *Punica granatum* e que passaram pela LS e TT. Outro fator importante é que não encontramos diferença significativa na taxa de clivagem relativas aos grupos G1_{ee}xG4_{ee} (Tabelas 10 e 11; Gráfico 6) segundo Teste Exato de Fisher ($p > 0,05$). Resultados favoráveis, também, foram observados em relação à morfologia (Figuras 42, 43, 44 e 45) onde não observamos alterações morfológicas no grupo teste, G4_{ee} de *Punica granatum*. Estes dados refletem a redução drástica das partículas virais pela ação do extrato quando comparamos com um grupo exposto aos vírus e não tratado com EE *Punica granatum*, como por exemplo, o grupo G2_{ee} de *Zingiber officinale* (Figura 58), sem a interferência nos aspectos gerais dos embriões murinos.

É importante salientarmos que não basta um fator ser favorável. Há a necessidade do conjunto de análises (experimentos/testes) serem convergentes para que possamos indicar a possibilidade de um determinado tratamento ser interessante para o bloqueio/diminuição da replicação viral, além da questão do alcance da célula alvo. Por exemplo, a *Chamomilla recutita* apresenta, através da infusão aquosa ou pomadas, ação antiviral no tratamento da herpes em mucosas ou pele propriedade estas devido ao abisabolol (LORENZI; MATOS, 2002a). Porém, em nossos experimentos, cujo zigoto/embrião é a célula alvo, apesar do EE de *Chamomilla recutita* apresentar favorável taxa de clivagem entre os grupos G1_{ee} e

G4_{ee} (Tabelas 10 e 11; Gráfico 1), não obtivemos resultados morfológicos favoráveis em relação aos embriões murinos, pois os mesmos apresentaram importantes alterações em seu aspecto (Tabela 9), inclusive com ruptura da ZP dos zigotos/embriões quando ‘associávamos’ BoHV-1 Colorado ao EE de *Chamomilla recutita* (Figura 33).

Talvez o EE de *Chamomilla recutita* cause desestruturação na estrutura da ZP o que facilita a entrada do BoHV-1 Colorado e, inclusive, potencializa a possível transmissão de outras doenças, uma vez que a ZP é uma barreira importante contra patógenos (WRATHALL; SUTMÖLLER, 1998; STRINGFELLOW, 1998).

Em relação à titulação, também nos deparamos com situação desfavorável, pois encontramos diferença não significativa entre os grupos tratados com EE *Chamomilla recutita*, grupos G2_{ee} e G4_{ee} (Figura 54 e Tabela 15). Situação semelhante ocorreu com o EE de *Melissa officinalis* que obteve apenas um fator favorável, a titulação em MDBK resultou em diminuição da replicação viral (Tabela 15).

Porém não encontramos outros fatores favoráveis com os resultados dos embriões murinos tratados com EE de *Melissa officinalis*. Dentre os fatores desfavoráveis, destacamos: alterações morfológicas como aumento do espaço periplasmático e alteração no aspecto da ZP (Figuras 46 e 47) e baixa taxa de clivagem quando comparamos o grupo controle G1_{ee} com o grupo teste, G4_{ee} (Tabelas 10 e 11; Gráfico 7). Estes dados, sobre os tratamentos dos embriões murinos com EE de *Chamomilla recutita* e EE *Melissa officinalis*, destacam que é necessária extrema cautela quando trabalhamos com a análise de possíveis antivirais relacionados à determinada célula alvo e em relação a um conjunto de fatores que devem ser convergentes, ou seja, favoráveis.

Resultados interessantes referem-se aos tratamentos realizados com EE de *Pterodon emarginatus* (Sucupira), plantas encontradas pela região central do Brasil que são utilizadas, frequentemente, na medicina popular por suas propriedades antirreumáticas, analgésicas e anti-inflamatórias (HANSEN et al., 2010). É interessante, pois há diferença de resultados quando comparamos duas estruturas diferentes da mesma planta, o EE de *Pterodon emarginatus*-C (casca de Sucupira) e o EE de *Pterodon emarginatus*-S (semente de Sucupira). O EE de *Pterodon emarginatus*-S (semente de Sucupira) apresentou resultados favoráveis em relação à taxa de clivagem (entre grupos G1_{ee} e G4_{ee}), diferença não significativa ($p>0,05$).

pelo teste Exato de Fisher (Tabelas 10 e 11; Gráfico 9). Porém, ocorreram alterações morfológicas importantes (Tabela 9; Figura 49), 'CPE agressivo' refletindo a alta quantidade de partículas virais após co-cultura em MDBK (Tabela 15) corroborando a ineficácia do tratamento do E.E. *Pterodon emarginatus*-S (semente) em bloquear ou diminuir a replicação viral. Enquanto que os dados obtidos com EE de *Pterodon emarginatus*-C (casca de Sucupira) apresentaram-se favoráveis em todos os quesitos: sem alterações morfológicas (Tabela 9; Figura 48); diferença não significativa ($p>0,05$) entre o grupo controle (G1_{ee}) e o grupo teste (G4_{ee}) em relação à Taxa de Clivagem (Tabelas 10 e 11; Gráfico 8) e quando comparamos a titulação após co-cultura dos embriões murinos em células MDBK entre o grupo exposto aos vírus sem tratamento (G2_{ee}) com o grupo exposto aos vírus com tratamento do EE *Pterodon emarginatus*-C (casca de Sucupira) observamos diferença significativa, indicando a redução na replicação viral (Tabela 15; Figura 56).

Considerando uma mesma planta, seus metabólitos secundários serão diferentes quando forem extraídos de partes diferentes ou cultivados de formas diferentes ou extraídos de formas diferentes. Esta variação na composição pode ser facilmente entendida ao percebermos que são partes do metabolismo da planta, portanto estão em constante flutuação enquanto houver vida. Assim, as modificações ocorrerão transformando uns compostos em outros, de acordo com a parte da planta, o momento de seu desenvolvimento ou crescimento e o horário do dia e a época do ano de sua colheita (ALVES; PAVANI, 1991). E mesmo após sua extração, devido à complexidade de sua composição, podem sofrer modificações físico-químicas por meio de reações químicas entre seus constituintes e o próprio meio, como a luz e o recipiente (SIMÕES et al., 2010; WOLFFENBÜTTEL, 2010).

Os EE de *Allium sativum* (alho), *Zingiber officinales* (gengibre), *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia) e *Illicium verum* Hook f. (anis estrelado) não apresentaram nenhum quesito de forma satisfatória em relação à Taxa de Clivagem (Tabela 10) e a morfologia dos embriões murinos (Tabela 9). Verificamos, por exemplo, inúmeras alterações morfológicas: granulação e aumento do espaço periplasmático em células submetidas ao tratamento com EE de *Allium sativum*, blastômeros assimétricos de embriões submetidos ao tratamento com EE de *Zingiber officinales* (Figuras 36 e 37), processo degenerativo (Figura 38) e bloqueio celular (Figura 39) de células submetidas ao tratamento com EE *Syzygium*

aromaticum e alterações na ZP (Figura 40) e blastômeros, também, assimétricos (Figura 41) de células submetidas ao tratamento com EE de *Illicium verum Hook f.* Também não houve diminuição da replicação viral em relação a estes extratos (Experimento 4; Tabela 15).

Guardadas as diferenças entre herpesvírus humano e herpesvírus bovino, nossos dados contradizem Lorenzi e Matos (2002a,e) que apresentam *Allium sativum* e *Syzygium aromaticum* com ação contra o herpes simplex tipos 1 e 2, talvez pela especificidade do hospedeiro (humano e animal). Lorenzi e Matos (2002f) destacam que *Zingiber officinales* apresenta apenas ação antiviral, não especificando o agente viral, o mesmo ocorre com *Illicium verum Hook f.* (KOCH et al., 2008). Talvez fatores já destacados possam ter influenciado nos resultados como a forma de extração, a flutuação dos metabólitos secundários no momento da coleta, o momento do desenvolvimento da planta, possível modificação físico química devido o tempo entre a produção e o uso, etc .

Entre todos os PN, o extrato aquoso é o que apresenta maior solubilidade no meio de cultura celular favorecendo o contato com os embriões murinos. Foram analisados EA de *Agaricus blazei* e *Própolis*. *Agaricus blazei* é um basidiomiceto que tem demonstrado atividade antiviral contra inúmeros vírus, entre eles o herpes vírus simplex (PIRAINO; BRANDT, 1999). Em nosso trabalho, o EA de *Agaricus blazei* apresentou bom desempenho por não provocar alterações morfológicas nos embriões (Tabela 12; Figuras 50 e 51), taxa de clivagem não significativa ($p > 0,05$) quando comparamos os grupos G1_{ea} e G4_{ea} (Tabelas 13 e 14; Gráfico 10). Porém, a análise da redução da replicação viral apresentou diferença não significativa entre os grupos G2_{ea} e G4_{ea} (Tabela 15). Isto significa que o objetivo na diminuição da taxa viral, relativa ao tratamento com EE de *Agaricus blazei*, foi insatisfatório. Fato semelhante ocorreu com tratamento do EE de *Chamomilla recutita* que não apresentou todos fatores satisfatórios, por isso excluimos o tratamento de EA de *Agaricus blazei* como possível antiviral para tratamento de células de embriões murinos e, futuramente, bovinos. Em destaque, temos o tratamento dos embriões murinos com EA de *Própolis* contra o BoHV-1 Colorado. *Própolis* é resultante da ação das abelhas na formação da colmeia, elaborado de exsudatos de resinas que as abelhas colhem de determinadas plantas. Apresenta material resinoso e balsâmico coletado dos ramos, flores, pólen, brotos e exudatos de árvores; além desses, na colméia, as abelhas adicionam secreções salivares e enzimas

(LUSTOSA et al., 2008; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO, 2002). Sua composição é ampla e está diretamente relacionada à diversidade de plantas de determinada região. Inúmeras pesquisas apontam os benefícios deste complexo, como, por exemplo, atividades antioxidantes, antineoplásicas, antimicrobianas e antiinflamatórias (CIRASINO; PISATI; FASANI, 1987).

Nossos resultados_ segundo experimentos 3, 4 e 5_ demonstraram que o tratamento dos embriões murinos com EA de Própolis apresentou potencial resultado, visto que não encontramos alterações morfológicas em relação aos embriões (Tabela 12; Figura 52), Taxa de Clivagem satisfatória (Tabelas 13 e 14; Gráfico 11) e diminuição na replicação viral dos embriões murinos tratados com EA de própolis que foram submetidos co-cultura em células MDBK (Tabela 15).

Considerando os experimentos 3, 4 e 5, podemos selecionar os três tratamentos que apresentaram resultados satisfatórios: EE de *Punica granatum*, EE de *Pterodon emarginatus-C* e EA de Própolis. Por isso, somente os embriões murinos tratados com estes extratos foram separados para verificação morfológica dos embriões, após 24 h de tratamento, com auxílio da microscopia eletrônica de transmissão (experimento 6).

Os embriões murinos submetidos à microscopia eletrônica de transmissão (experimento 6) foram os que apresentaram, antes da adição de gel de agarose para posterior fixação em glutaraldeído, melhor aspecto morfológico segundo observação em lupa Coleman. Esta condição foi necessária para que houvesse a possibilidade de cortes visíveis em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1010. Embriões do grupo controle (G1) não tiveram alterações em relação à ZP. O mesmo ocorreu com embriões expostos aos vírus (G2), demonstrando que os vírus não causam modificações na ZP. Com auxílio da microscopia eletrônica de transmissão, muitos autores descrevem a ZP como superfície composta por uma rede de poros circulares ou elípticos que conferem um aspecto de esponja.

Um fator importante da ZP é o diâmetro que pode bloquear a entrada na célula de determinados patógenos. Sabe-se que o diâmetro e o formato possuem diferenças entre as espécies. Além disso, após a maturação do oócito, existe a diminuição de tamanho e profundidade (segundo direcionamento: de fora para dentro) (VANROOSE et al., 2000). Segundo Flores (2007) o diâmetro dos vírions pode variar entre 120-300 nm (devido à variabilidade na simetria do capsídeo e presença ou não de envelope).

Nossos resultados demonstraram a presença dos vírus dentro das células (Figuras 68 e 74).

Estes resultados demonstram a compatibilidade entre o diâmetro do BoHV-1 Colorado e os poros da ZP dos embriões murinos, apesar de Vanroose et al. (2000) considerar que o valor máximo alcançado pelo diâmetro dos poros da ZP de embriões de ratos/camundongos seja 100 nm e, nossos resultados, identificam vírions com diâmetro aproximado de 120 nm (Figuras 68 e 74). Considerando células reprodutoras de bovinos, Ferreira (2003) observou a penetração do vírus rinotraqueíte infecciosa bovina (BoHV-1 Los Angeles e Colorado) em oócitos bovinos expostos experimentalmente aos vírus durante o período de maturação in vitro pela microscopia de transmissão. Mesmo com estas constatações do fato de que o BoHV-1 possui habilidade para transpassar a ZP dos oócitos e embriões de determinadas espécies, é plausível a importância desta estrutura para dificultar a passagens de patógenos (VANROOSE et al., 2000), por isso sua análise é de extrema importância.

Em nossos resultados, pela microscopia eletrônica de transmissão, todos os embriões murinos que passaram pelos tratamentos com extratos não romperam a ZP.

Foi detectado partículas virais na região da carioteca em embriões tratados com EA de Própolis (Figura 74). Somente nos embriões tratados com EA de Própolis foram detectadas as partículas virais. Porém, isto não significa que não haja partículas virais nos embriões tratados com EE de *Punica granatum* e EE de *Pterodon emarginatus* visto que foi possível verificar CPE em células MDBK que foram submetidas a co-cultura com embriões murinos e título, após 72 h de co-cultura, diferente de zero (Tabela 15).

Ao analisar as MP por microscopia eletrônica, detectamos perturbações/abaulamento quando comparamos embriões tratados com os extratos em relação ao grupo controle, G1, e, também, ao grupo exposto aos vírus, G2 (Figuras 66, 69, 70 e 73). Essa deformação presente na MP dos embriões murinos pode estar relacionada à liberação das partículas virais por exocitose (WILD et al., 2002) ou por interferir em mecanismos relacionados ao equilíbrio da MP e da célula, como a proteína quinase dependente de cálcio (CaMK) que é um importante sinalizador celular (MIYAKE; MCNEIL, 1995; SILVA et al., 2009).

Em relação às organelas e estruturas celulares observou-se bom estado tanto no citosol (Figuras 66, 70, 71 e 76) quanto no núcleo (Figura 67). Porém, apesar de encontrarmos alterações morfológicas por microscopia óptica em embriões submetidos

aos vírus, grupos G2, não foram detectadas modificações por microscopia eletrônica nas organelas e estruturas celulares, exceto pelas pretuberâncias na MP. Este fato se justifica provavelmente porque os vírus utilizam da maquinaria celular até o momento do ciclo lítico. No entanto este parâmetro é importante para verificar possíveis danos decorrentes do metabolismo celular nos embriões que foram submetidos aos tratamentos com os extratos.

Portanto, dentre os 18 tratamentos, obtivemos 3 tratamentos (com EE de *Punica granatum*, EE de *Pterodon emarginatus-C* e EA de *Própolis*) com promissores resultados por diminuir, significativamente, a replicação viral e, ao mesmo tempo, permitirem o pleno desenvolvimento dos embriões murinos segundo a análise morfológica (microscópio óptico e pela microscopia eletrônica) e taxa de clivagem.

Consideramos que o esclarecimento dos constituintes ativos nestas plantas possam fornecer vantagem importante para o desenvolvimento de novos e eficazes agentes anti-virais para serem usados a favor da sanidade animal através de protocolos utilizados em centrais de fertilização.

Além disto, há a necessidade de cuidado ao extrapolar os resultados deste trabalho *in vitro* para o sistema *in vivo* e de zigotos/embriões murinos para bovinos.

Entre os inúmeros fatores, o sistema imunológico, a disposição tecidual e mecanismos de defesa através da excreção de substâncias são variáveis importantes e que exigem cautela para transpor as observações feitas *in vitro* (D'ANGELO, 1998).

7 CONCLUSÕES

- a) O estabelecimento das concentrações dos extratos não tóxicas para os embriões murinos possibilitou trabalhar com embriões viáveis na presença dos PN, pois não interferiram na morfologia e taxa de clivagem, mostrando-se, portanto, seguras para estudos *in vitro*;
- b) Entre os 18 tratamentos testados, o EE de *Punica granatum*, EE de *Pterodon emarginatus-C* e o EA de própolis apresentaram eficiência, *in vitro*, pois não alteraram a morfologia e taxa de clivagem dos embriões expostos ao BoHV-1 Colorado após 24h de cultivo (segundo microscopia óptica) e, apesar da detecção viral pela n-PCR, foi possível verificar discreto CPE nas células MDBK corroborado pela drástica diminuição das partículas virais segundo titulação viral;
- c) Em relação à análise morfológica pela microscopia eletrônica os tratamentos de EE de *Punica granatum*, EE de *Pterodon emarginatus-C* e o EA de Própolis foram eficientes, pois não apresentaram alterações significativas no núcleo, carioteca, citosol, organelas e membrana plasmática;
- d) Considerando o conjunto dos testes, os tratamentos com EE de *Punica granatum*, EE de *Pterodon emarginatus-C* e o EA de Própolis apresentaram eficiência na diminuição da replicação viral *in vitro*;

REFERÊNCIAS*

- ACKERMANN, M.; WEBER, H. P.; WYLER, R. Aspects of infectious bovine rhinotracheitis eradication programmes in a fattening cattle farm. ***Preventive Veterinary Medicine***, v. 9, n. 2, p. 121-130, 1990.
- ALVES, P. L. DE C. A.; PAVANI, M. C. M. D. **Instruções básicas para a coleta e preparo de material botânico a ser herborizado**. Jaboticabal: UNESP/FUNEP, 1991. 22 p.
- ATHAYDE, C. S. **Interação do parvovírus suíno com oócitos suínos durante o período de maturação *in vitro***. 2007. 52 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- BAXTER, A. L.; FARLEY, J. Mendel and meiosis. ***Journal of the History of Biology***, v.12: p. 137-71, 1979.
- BLOCK, E.; AHMAD, S. (E-Z) - Ajoene: a potent antithrombotic agent from garlic. ***Journal American Chemical Society***, v. 106, p. 8295-8296, 1984.
- BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; DONAWICK W. J.; EVANS, J. F.; DRESSEL, M. A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. ***Biology of Reproduction***. v. 27, n. 1, p. 147-158, 1982.
- BRUGGEMANN, R. et al. Antiviral activity of *Agaricus blazei* Murrill ss. *Heinem* extract against human and bovine herpesviruses in cell culture. ***Brazilian Journal Microbiology***, São Paulo, v. 37, n. 4, Dec. 2006 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822006000400029&lng=en&nrm=iso>. access on 05 Feb. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822006000400029>.
- CIRASINO, L.; PISATI, A.; FASANI, F. Contact dermatitis from propolis. ***Contact Dermatitis***, v.16, n.2, p.110-111, 1987.
- COUTO, M. E. O. Coleção de plantas medicinais aromáticas e condimentares. -- Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. p. .91 n. 157.
- D'ANGELO, M. **Interação do herpesvirus bovino tipo-1 (BoHV-1) com oócitos bovinos maturados *in vitro***. 1998. 52 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio da Janeiro, 2002.

D'ANGELO, M.; GALUPPO, A. G.; PIATTI, R. M.; MELO, G. M.; ZERIO, N. M. C.; SOUZA, R.J. Avaliação da sensibilidade de zigotos murinos ao herpesvírus bovino-1: um modelo experimental para estudos de interações embrião-vírus. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n.2, p. 141-145, 2005, São Paulo.

D'ANGELO, M.; VISINTIN, J. A.; RICHTZENHAIN, L. I.; GONÇALVES, R. F. Evaluation of trypsin treatment on the inactivation of bovine herpesvirus type 1 on in vitro produced pre-implantation embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 3, p. 536-539, 2009.

DIAS, Juliana A. et al . Fatores de risco associados à infecção pelo herpesvírus bovino 1 em rebanhos bovinos da região oeste do estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 3, Mar. 2008 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100736X2008000300006&lng=en&nrm=iso>. access on 03 Feb. 2014.

DUARTE, A.. Avaliação da qualidade de amostras de *Illicium verum* Hook.f. comercializadas na região do Distrito Federal. **Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente**, v. 12, n. 14, 12, may. 2010. Available from <<http://www.sare.anhanguera.com/index.php/anuic/article/view/1625/785>>. Date accessed: 14 Feb. 2014.

ENGELS, M.; ACKERMANN, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. **Veterinary Microbiology**, v. 53, n. 1-2, p. 3-15, 1996.

ENGELS M, STECK F, WYLER R Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. **Archives Virology** v.67, p: 169–174, 1981.

FERREIRA, C. Y. M. R. **Infectividade de estirpes do herpesvírus bovino tipo 1 em oócitos e culturas de células epiteliais de ovidutos bovinos**. 2003. 68f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2003.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. **Virology**. Philadelphia: Raven Press, 1992. 2 v.

FIELDS, B.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M., et al. **Virology**. 4th. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 2 v.

FLORES, E. F.; FRANCO, A. C.; ROEHE, P. M. *Herpesviridae*. In: FLORES, E. F. (Org.). **Virologia veterinária**. Santa Maria, Rio Grande do Sul: Ed UFSM, 2007. p 435-440.

FREIRE, J. M.; CARDOSO, M.G.; BATISTA, L. R.; ANDRADE, M. A. Essential oil of *Origanum majorana* L., *Illicium verum* Hook. f. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume: chemical and antimicrobial characterization. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.13, n.2, p.209-214, 2011.

GALUPPO, A. G.; D'ANGELO, M.; PIATTI, R. M.; BARRA, S. H. C.; GONÇALVES, R. F. Detection of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) in experiments with in vitro-infected murined zygotes by the Nested-PCR technique. ***Theriogenology***, v. 57, p. 571, 2002.

GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISINTIN, J. A.; COSTA, L. F. S. Produção *In Vitro* de Embriões In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Ed Roca, 2008, p. 261-271.

GUIENNE, B. M.; JOLY, C. G.; PONSART, C.; GUÉRIN, B. *General sanitation procedures associated with the production of embryos in vitro*. In: STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. **Manual of the International Embryo Transfer Society**. 4th ed, Champaign: IETS, 2009. cap.5, p.70-78.

HANADA A.; ENYA Y.; SUZUKI T. Birth of calves by non-surgical transfer of *in vitro* fertilized embryos obtained from oocytes matured *in vitro*. ***Japan Journal Animal Reproduction***, v.32, p.208, 1986.

HANSEN, D.; HARAGUCHI, M.; ALONSO, A.. Pharmaceutical properties of 'sucupira' (Pterodon spp.). **Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 46, n. 4, Dec.2010. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502010000400002&lng=en&nrm=iso>. access on 20 July 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502010000400002>.

HOGAN, B.; CONSTANTINI, F.; LACY, E. Developmental genetics and embryology of the mouse: past, present, and future. In: HOGAN, B.; CONSTANTINI, F.; LACY, E. (Ed.). **Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1986. p. 12-14.

JADHAV, P.; KAPOOR, N.; THOMAS, B.; LAL, H.; KSHIRSAGAR, N. Antiviral potential of selected Indian medicinal (ayurvedic) plants against Herpes Simplex Virus 1 and 2. ***North American Journal of Medical Science***. v. 4, p. 641-647, 2012.

JAKOVLEV, V.; ISAAC, O.; THIEMER, K., Pharmakologische untersuchungen von kamillen-Inhaltsstoffen. ***Journal of Medicinal Plant Research***. v.35, p. 125-140, 1979.

KNUTTON, S. Electron microscopical methods in adhesion. ***Methods Enzymology***, v.253, p. 145 – 158, 1995.

KOCH C., REICHLING J., SCHNEELE J., SCHNITZLER P.. Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. ***Phytomedicine***, v.15, p. 71-78, 2008.

LEMAIRE, M.; PASTORET, P. P.; THIRY, E. Le contrôle de l'infection pas le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine. ***Annales de Médecine Vétérinaire***, v. 138, n. 3, p. 167-180, 1994.

LEVY JR., N.C. Atividade antimicrobiana da própolis. **Revista da Universidade de Franca**, ano 7, n. 7, p. 18, 1999.

LIMA, M.S.; NOGUEIRA, A.H.C.; ALMEIDA, M.C.S.; MARTINS, M.S.N.; OKUDA, L.H.; STEFANO, E.; PITUCO, E.M. Ocorrência de herpesvírus bovino tipo 1 em bovinos no Brasil **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 53, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A., *Chamomilla recutita*. In: _____
Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 1 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudo da Flora Ltda, 2002. p. 148-149.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A., *Allium Sativum* L. In: _____
Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudo da Flora Ltda, 2002. p. 312-313.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A., *Punica granatum* L. In: _____
Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudo da Flora Ltda, 2002. p. 394-395.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A., *Melissa officinalis* L. In: _____
Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudo da Flora Ltda, 2002. p. 245.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A., *Syzygium aromaticum* In: _____
Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudo da Flora Ltda, 2002. p. 355.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A., *Zingiber officinal* In: _____
Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudo da Flora Ltda, 2002. p. 512.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A., Plantas Medicinais In: _____
Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudo da Flora Ltda, 2002. p. 13-29.

LUSTOSA, SARAH R. et al . Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 3, Sept. 2008 . Available from
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000300020&lng=en&nrm=iso>. access on 15 Mar. 2013.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300020>.

MALLEK, Z.; GUERIN, B.; NIBART, M.; PAREZ, M.; THIBIER, M. Conséquences de la contamination in vitro des embryons de souris et de vaches par *B. abortus*. **Bulletin de l'Académie Veterinari de France**, v. 57, p. 479-490, 1984.

MEYER, A. D. **Detecção do herpesvírus bovino 1 (BHV-1) em amostras de sêmen através da reação em cadeia pela polimerase (PCR)**. 2001. 36 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MIYAKE, K.; MCNEIL. Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption. **Journal of Cell Biology**, v. 131, p. 1737–1745. 1995.

MING, L. C. *Ageratum conyzoides*: A tropical source of medicinal and agricultural products. In: JANICK, J. **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 1999. p. 469–473.

NAGY A.; GERTSENSTEIN M.; VINTERSTEN, K; BEHRINGER, R. Assisted reproduction: ovary transplantation, *in vitro* fertilization, Artificial Insemination, and Intracytoplasmic Sperm Injection. In: _____ **Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual**. 3rd New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003 p. 251–273.

OIE – World Organization for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008. Chapter 2.4.13. - Infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis. Version adopted in May 2010. disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> Último acesso em: fev. 2014.

OLIVEIRA, J. M.; JORDÃO, B.Q.; RIBEIRO, L.R.; EIRA, A.F.; MONTOVANI, M.S. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murril lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. **Food and Chemical Toxicology** ., v. 40, p. 1775-1780, 2002.

PADRÓN, T. S. Técnicas de imunocitoquímica. In: _____ **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: W.Sousa, 1998. p. 435-440.

PALAZZI, E. G.; GOES, A. C; PICCOLOMINI, M. M.; PAVÃO, D.L; BATISTA, M. L, ALVES, M.F., DANGELO, M. Avaliação da taxa de clivagem em zigotos murinos infectados, experimentalmente, com o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (BoHV-1) amostra Colorado. **SBM in Foco**, n. 9, p.132, 2009.

PALAZZI, E. G. **Efetividade da tripsina sobre embriões murinos infectados experimentalmente com BoHV-1**. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PALAZZI, E. G; GONÇALVES, F. R; HANSEN , D.; FELICIO, J. D.; ALMEIDA, M. L.; ALVES, M.F.; NOGUEIRA, A. H. C.; STURARO, L. G. R.; PITUCO, E. M.; PAVÃO, D. L.; D'ANGELO, M. Evaluation of Pomegranate (*Punica granatum*) as replication inhibitor of BoHV-1 Colorado strain of experimentally infected murine zygotes. In: **XXIII Brazilian Congress of Virology & VII Mercosur Meeting of Virology** (Foz do Iguaçu/), v.17, n.2, p. 394, 2012.

PASSOS, L. A. C.; GUARALDO, A. M. A.; ALVES, D. P.; PIRES, L. A.; SANTANA, T. M.; DINI, T. H. C. Criopreservação de embriões murinos em biotérios. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório criação e experimentação**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2002.p. 225-245.

PAVÃO, D. L. **Avaliação da citotoxicidade e interferência da *Ateleia glazioviana* na interação do herpesvirus bovino tipo1 (BoHV-1) com oócitos bovinos maturados *in vitro***. 2009. 60 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, 2009.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO, N. F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PIRAINO, F.; BRANDT, C.R. Isolation and partial characterization of an antiviral, RC-183, from the edible mushroom *Rozites caperata*. **Antiviral Research**, v. 43, p. 67-78, 1999.

PITUCO, E. M.; CARNEIRO, B.; MENZ, I.; STEFANO, E.; OKUDA, L. H. Detecção de anticorpos contra o herpesvírus bovino tipo 1 (HVB-1) em rebanhos de corte e leite com problemas reprodutivos no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 66, p. 126, 1999.

QUINCOZES, C. G. **Prevalência e fatores de risco associados às infecções pelos herpesvírus bovino Tipo 1 e 5 (BHV-1 E 5) e pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) nos rebanhos dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí**. 2005. 117 f. Dissertação (Mestrado em Virologia) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas – RS, 2005.

REED, L J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493, 1938.

REIS, C. M. F. et al. Atividade anti-inflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Maringá, v. 9-10, n. 1, 2000. Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2000000100005&lng=en&nrm=.access on 07 Fev. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2000000100005>.

REIS, T. M. et al. Óleos essenciais extraídos dos talos e frutos do craveiro-da-Índia. **Seminário de iniciação científica da UESC da UESC/Ciências Exatas da Terra e Engenharias** (Ilhéus), v. 12., p.284-5, 2006.

ROIZMANN, B.; DESROSIERS R. C.; FLECKENSTEIN B.; LOPEZ C.; MINSON A. C.; STUDDERT M.J. The family Herpesviridae: an update. The herpesvirus study group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, v.28, n.1, p.1-7, 1992.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. 4ª ed. In: SIMÕES C. M. O. et al., (Org.) **Farmacognosia- da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2010. p. 403-434.

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. **American Society for Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1859–1862, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al., (Org.) **Farmacognosia- da planta ao medicamento**. 6 ed Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2010. p. 467-495.

SIMONI, I. C. Tratamentos antivirais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 65, n. 1/2, p. 41-44, 2003.

SILVA, B. V.; HORTA, A.C.; ALECASTRO, R. B.; PINTO, A. C. . Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, 2009 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000200032&lng=en&nrm=iso>.access on 15 Feb. 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000200032>.

SILVA, M. C. O. P. **Soroprevalência do herpesvirus bovino tipo 1 e 5** . 2011. 92 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal)- Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, 2011.

SOUSA, M. P.; MATOS, M. E. O.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: UFC, 1991. 416 p.

STEPTOE, P. C.; EDWARDS, R. G. Birth after the reimplantation of a human embryo. **Lancet**, v. 312, p. 366. Issue 8085.

STRAUB, O. C. BoHV-1 infectious: relevance and spread in Europe. **Comp. Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 175-186, 1991.

STRINGFELLOW, D. A. Recommendations for the sanitary handling of embryos obtained in vivo. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual of the International Embryo Transfer Society**. 3rd. ed. Savoy IL: IETS, 1998. p.83-88.

STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. Epidemiologic concerns relative to in vivo and in vitro production of livestock embryos. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p. 629-42, 2000.

STRINGFELLOW D. A., GIVENS M. D., WALDROP J. G. Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 93–102, 2004.

VANROOSE, G.; NAUWYNCK, H.; SOOM, A.V.; YSEBAERT, M.T.; CHARLIER, G.; OOSTVELDT, P.V.; KRUIF, A. Structural aspects of the zona pellucida of in vitro-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser Scanning microscopy study. **Biology and Reproduction**, v. 62, p. 463-469, 2000.

WHITBECK, J. C.; BELLO, L. J.; LAWRENCE, W. C. Comparison of the bovine herpesvirus 1 gl gene and the herpes simplex virus type 1gB gene. **Journal of Virology**, v. 62, p. 3319-3327, 1988.

WILD, P.; SCHRANER, E. M.; CANTIENI, D.; LOEPFE, E.; WALTHER, P.; MÜLLER, M.; ENGELS, M.. The significance of the Golgi complex in envelopment of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) as revealed by cryobased electron microscopy, **Micron**, v. 33, Issue 4, January 2002, Pages 327-337, ISSN 0968-4328, 10.1016/S0968-4328(01)00037-3.

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968432801000373>)

WINK, M. Physiology of secundar product formation in plants. In: CHARLWOOD, B. V.; RHODES, M. J. C. (eds.) **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendon, 1990. p. 23-42.

WOLFFENBÜTTEL, A. N. **Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia: abordagem técnica e científica**. São Paulo: Roca, 2010. 293 p.

WRATHALL, A. E.; SUTMÖLLER, Potential of embryo transfer to control transmission of disease. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual of the International Embryo Transfer Society**. 3rd.ed., Savoy IL: IETS, 1998. p.17-46.

WRIGHT, C. W. Antiprotozoal natural products. In: EVANS, W. C., SAUNDERS, W. B. **Trease and Evan`s Pharmacognosy**. 16th. Edinburgh: Saunders, 2002. p. 277–280.

ZHAI, Y.; SUN, S. ; WANG, Z. ; CHENG, J. ; SUN, Y. ; WANG, L. ; ZHANG, Y. ; ZHANG, H; YU, A. Microwave extraction of essential oils from dried fruits of *Illicium verum* Hook. f. and *Cuminum cyminum* L. using ionic liquid as the microwave absorption medium. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 3544–3549, 2009.

ZHANG, J; ZHAN, B; YAO, X; GAO, Y; SHONG, J. Antiviral activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum* L. against genital Herpes virus *in vitro*. **Journal of Chinese**, v. 20, p. 556-558, 1995.