

## COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE VIRUCIDA DO EXTRATO ETANÓLICO DE ORÉGANO

DAIANE EINHARDT BLANK<sup>1</sup>; RAYRA ALMEIDA CORREA<sup>2</sup>; GABRIELA HÖRNKE ALVES<sup>2</sup>; ROGÉRIO ANTONIO FREITAG<sup>2</sup>; SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER<sup>2</sup>; MARLETE BRUM CLEFF<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – Daiane\_blank@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - emebrium@bol.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

A arterite viral eqüina é uma doença infecto-contagiosa de ocorrência mundial, causadora de abortos, enfermidades no trato respiratório superior, edema e diminuição do desempenho de equinos, além de graves perdas econômicas devidas a perdas no comércio de importação e exportação de equinos e de sêmen (TIMONEY, 2003; QUINN, 2005). Para o controle podem ser utilizadas vacinas vivas ou inativadas (QUINN, 2005). Alternativas utilizando extratos e óleos essenciais de plantas, têm sido investigadas com o interesse na descoberta do potencial antiviral das substâncias presentes NOLKEMPER et al. (2006). Extratos de plantas da família Lamiaceae vem destacando-se por suas potencialidades antivirais, entre elas *Origanum vulgare*, conhecido popularmente como orégano REICHLING et al. (2008). Embora existam alguns relatos a respeito da identificação química dos óleos essenciais de orégano e correlação com suas atividades biológicas, pouco tem sido descrito com relação ao extrato etanólico desta planta (CLEFF, 2008). Nesse sentido, evidencia-se a necessidade de um estudo a cerca da composição química do extrato etanólico de *Origanum vulgare* e a avaliação de sua atividade antiviral. O objetivo deste trabalho foi realizar a identificação dos constituintes químicos do extrato etanólico de *Origanum vulgare* e avaliar atividade antiviral frente ao EAV.

### 2. METODOLOGIA

*Origanum vulgare* (orégano) foi adquirido comercialmente da Empresa Luar Sul Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios – Santa Cruz do Sul/RS, com número de lote 001/2011 e certificado de identificação botânica.

Para obtenção dos extratos etanólicos foram utilizados 35g de folhas secas de orégano e 350 mL de álcool etílico P.A.. A amostra e o etanol foram mantidos sob agitação constante em temperatura entre 65 °C a 70 °C. Após por 24h o extrato foi filtrado e realizada evaporação do álcool etílico em um rotaevaporador até a obtenção de um extrato seco. As análises cromatográficas dos extratos aquoso e etanólico de *Origanum vulgare* L. foram realizadas empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Células RK13 foram cultivadas em microplacas a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub> e após confluência, o meio foi removido e diferentes concentrações do EEO (a partir de 100 µg/mL a 0,09 µg/mL) foram adicionadas. Após 48 horas de tratamento foi analisada a viabilidade celular via integridade da membrana plasmática usando o método do MTT (3-(4,5 dimethyl thiazole-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) conforme descrito (MOSMANN, 1983). Verificou-se efeito virucida mediante a incubação a 37 °C, 20 °C e 4 °C por 1 hora do EAV ou da mistura EAV e EEO, na

concentração não tóxica. Após os diferentes períodos de incubação o vírus foi realizada a titulação viral. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A verificação da citotoxicidade de extratos vegetais é uma etapa fundamental dos ensaios biológicos. A adição do extrato etanólico causou um decréscimo na viabilidade celular proporcional às concentrações avaliadas. Viabilidade das células RK13 superior a 90% foi detectada a partir da concentração de 12,5 µg/mL mediante o método do MTT. Tal concentração foi utilizada em todos os testes realizados. Segundo um estudo com extrato etanólico 80% de diferentes plantas da família Lamiaceae foram encontrados resultados não tóxicos a partir de 49,3 µg/mL para Rosemary, Thyme 28,7 µg/mL, Peppermint 74,1 µg/mL, e Prunella 101,1 µg/mL sendo que a partir dessas concentrações foram testados ensaios frente ao herpesvírus simplex tipo1, pré tratamento celular com extrato, pré tratamento do vírus com extrato antes de colocar na célula e teste adicionando o extrato após infecção celular com o vírus, onde foram reveladas efetividades do extrato de Peppermint e Prunella nos ensaios de pré tratamento do vírus com extrato antes de colocar na célula e no teste adicionando o extrato após infecção celular com o vírus REICHLING et al. (2008). Este último resultado foi semelhante a atividade antiviral encontrada no presente estudo.

Os ácidos fenólicos e flavonoides foram identificados nos espectros registrados entre 225 e 350 nm, sendo detectados no extrato etanólico de *Origanum vulgare* a apigenina, ácido rosmarínico, ácido caféico, carnosol, ácido p-cumárico, caempferol, quercetina, ácido carnósico e luteolina. Estudo recentemente realizado com extrato etanólico de *Origanum vulgare* visando a caracterização química dos extratos identificou como compostos majoritários o ácido rosmarínico e p-cumárico e apigenina, em diferentes concentrações concordando com os resultados obtidos nesse estudo DANILA et al. (2011).

Segundo estudo realizado com extrato metanólico de *Origanum vulgare*, foram identificados alguns compostos fenólicos, como ácido caféico, ácido vanílico, ácido ferúlico e rutina PROESTOS et al. (2008).

O protocolo buscando atividade virucida foi capaz de demonstrar forte ação virucida do extrato etanólico de *Origanum vulgare* sobre o EAV, uma vez que após 1 hora de incubação os títulos médios do EAV ficaram reduzidos de  $10^6$  para  $10^4$  quando incubados a 37 °C e para  $10^3$  com a incubação a 20 °C. A incubação do EEO com o EAV a 4 °C não resultou em diferença no título viral. É possível que ação virucida do extrato esteja relacionada a interação dos compostos químicos presentes com moléculas existentes no envelope viral, resultando no impedimento ou dificultando a ligação celular e penetração na célula RK13.

Entre os compostos fenólicos identificados no extrato de *Origanum vulgare*, o ácido rosmarínico tem apresentado atividade antiviral NOLKEMPER et al. (2006). Outros compostos químicos identificados foram a apigenina, carnosol e quercetina, que também podem ter sido responsáveis pela atividade antiviral do extrato etanólico de *Origanum vulgare* talvez devido a sinergismo entre essas substâncias.

Pesquisadores relatam que os compostos fenólicos, entre eles os flavonoides, possam ser potenciais drogas antivirais, promissores como terapia antiviral GRAVINA et al. (2010). A maioria dos estudos relatam ensaios *in vitro*

comprovando a ação dos flavonoides na inibição da replicação intracelular dos vírus, pouco tem sido evidenciado sobre o efeito antiviral dos flavonóides em testes *in vivo*. No entanto, a utilização terapêutica dos flavonoides se encontra ainda em expansão necessitando de maiores pesquisas e ensaios biológicos.

#### 4. CONCLUSÃO

Com os resultados evidenciados nesse estudo conclui-se que o EEO pode representar um novo agente antiviral promissor para o arterivirus.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

TIMONEY PJ. Equine viral Arteritis. In: Equine Respiratory Diseases, P. Lekeux (Ed.) Publisher: **International Veterinary Information Service** (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA. 2003.

QUINN, P. J. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: **ARTMED**, 512 p. 2005.

NOLKEMPER S, REICHLING J, STINTZING FC, CARLE R, SCHNITZLER P. Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against Herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. **Planta Med.**, 72(15): p.1378-1382, 2006.

REICHLING, J.; NOLKEMPERA, S.; STINTZING, F.C.; SCHNITZLER, P. Impact of Ethanollic Lamiaceae Extracts on Herpesvirus Infectivity in Cell Culture. **Forsch Komplementmed**, p.15:313–320, 2008.

CLEFF, M. B. **Avaliação da Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de Origanum vulgare L. Frente a Fungos de Importância em Veterinária com Ênfase em Candida SPP.. 2008.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **J. Immunol. Methods**, 1983, 65, 55-63.

MAHY, B.W.J.; KANGRO, H.O. **Virology methods manual**. San Diego, CA: Academic, 1996. 374p.

LUGANINI A., et al. 2010. Peptide-derivatized dendrimers inhibit human cytomegalovirus infection by blocking virus binding to cell surface heparan sulfate. **Antiviral Res.** 85:532–540.

DANILA, O.A., GATEA, F., RADU, G.L. Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs, **Chemistry of Natural Compounds**, Vol. 47, No. 1, 2011.

PROESTOS, C.; KAPSOKEFALOU, M.; KOMAITIS, M. Analysis Of Naturally Occurring Phenolic Compounds In Aromatic Plants By Rp-HPLC And GC-MS After Silylation. **Journal of Food Quality**, 31, p.402–414, 2008.

GRAVINA, H.D.; TAFURI, N.F.; SILVA JUNIOR, A.; FIETTO, J.L.R.; OLIVEIRA, T.T.; DIAZ, M.A.N.; ALMEIDA, R. In vitro assessment of the antiviral potencial of trans-cinnamic acid, quercetina and morin against equid herpesvirus 1. **Research in veterinary science**, 2010.