

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO



Dissertação

**INVESTIGAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS
EXTRATOS DE *ORIGANUM VULGARE* E *ROSMARINUS OFFICINALIS*.**

Daiane Einhardt Blank

Pelotas, 2013

DAIANE EINHARDT BLANK

**INVESTIGAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIVIRAL DOS
EXTRATOS DE *ORIGANUM VULGARE* E *ROSMARINUS OFFICINALIS*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e bioprospeccção).

Orientadora: Marlete Brum Cleff
Co- Orientador: Rogério Antonio Freitag

Pelotas, 2013

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada *Investigação da citotoxicidade e atividade antiviral dos extratos de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis**, de autoria de Daiane Einhardt Blank.

Comissão examinadora:

Prof.^a Dra. Marlete Brum Cleff – Orientadora - Faculdade de Veterinária - UFPel

Prof.^a Dra. Silvia de Oliveira Hübner – Faculdade de Veterinária - UFPel

Prof.^a Dra. Patrícia da Silva Nascente – Instituto de Biologia – UFPel

Pelotas, 04 de março de 2013

A minha família, exemplo de força e dedicação, base da minha educação, que semearam e cuidaram com atenção e carinho meu crescimento pessoal e profissional.

Agradecimentos

A Deus primeiramente, por mais esta etapa vencida.

A minha família, pelo apoio, estímulo e compreensão.

A Prof.^a Marlete Brum Cleff, pela orientação, incentivo e dedicação.

Ao Prof. Rogério Antonio Freitag, pela oportunidade, orientação e confiança.

A Prof.^a Silvia de Oliveira Hübner, pelo empenho, ensinamentos e paciência.

A Prof.^a Claudia Andrea Lima Cardoso pela disponibilidade e presteza nas análises cromatográficas.

Ao Prof. Claudio Martin Pereira pela ajuda prestada durante todo experimento.

Ao Prof. Paulo Romeu Gonçalves pela amizade, pelos ensinamentos prestados durante a graduação e que perduram até hoje.

A colega Mestranda Gabriela Alves pela ajuda, amizade e convívio durante as aulas, congressos e experimentos.

A Doutoranda Clarissa Caetano de Castro e Rayra Almeida Correa o meu reconhecimento pela ajuda e comprometimento no desenvolvimento do trabalho.

As estagiárias do laboratório de química orgânica Ana, Kathelen e Victória pelo convívio e ajuda.

Ao funcionário Hélio pela amizade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Resumo

Título: **Investigação da citotoxicidade e atividade antiviral dos extratos de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis*.**

Autor: Daiane Einhardt Blank

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marlete Brum Cleff

Origanum vulgare e *Rosmarinus officinalis*, são plantas pertencentes a família Lamiaceae, apreciadas por suas propriedades aromáticas. Apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas antifúngica, antibacteriana, devido ao potencial dos componentes presentes nos extratos e óleos essenciais. O presente estudo teve como objetivo determinar a composição química, a concentração não tóxica dos óleos essenciais, extratos aquoso e etanólico de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* em diferentes linhagens celulares e avaliar a atividade antiviral frente a vírus de importância veterinária. As identificações químicas dos óleos essenciais *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* foram realizadas com o método da cromatografia gasosa com ionização por chama e os compostos dos extratos identificados com cromatográfica líquida de alta eficiência. No ensaio de citotoxicidade foram utilizadas as linhagens celulares MDBK, MDCK, CRFK e RK13, sendo confirmada a viabilidade celular pelo método MTT. A presença de atividades antivirais dos extratos foram analisadas por titulações dos vírus da diarreia viral bovina (BVDV), vírus da arterite equina (EAV), influenza vírus equino (EIV), calicivírus felino (FCV), vírus da cinomose canina (CDV), adenovírus canino (CAV) e coronavírus canino (CCoV), na presença ou ausência de cada extrato em concentração não tóxica. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C por 72 horas até a realização da leitura, tendo como base a ausência ou presença de efeito citopático. O título foi determinado como dose infectante para cultivo celular a 50% (DICC₅₀/100µL). Os compostos encontrados em ambos extratos foram o ácido carnósico, ácido rosmarinico, luteolina, apigenina, caempferol e quercetina. No óleo essencial de orégano pode-se constatar o α -terpineno, γ -terpineno, linalol, 4- terpineol e timol. No óleo de alecrim foram encontrados o α -pineno, canfeno, 1,8-cineol e cânfora. De acordo com os resultados obtidos na determinação da concentração não tóxica dos extratos e sua composição química, definiu-se a concentração segura e eficiente dos extratos nos testes antivirais. O extrato aquoso na concentração de 1600 µg/mL, não apresentou citotoxicidade para as linhagens celulares, enquanto ao extrato etanólico de *Origanum vulgare* somente na concentração de 600 µg/mL não foi tóxico para as células. A concentração máxima não tóxica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* frente a células RK13, MDBK, MDCK e CRFK foi de 0,023µg/mL. Com relação ao óleo essencial de *Origanum vulgare* frente as células RK 13 e MDCK foi de 0,013µg/mL, utilizando as células MDBK o resultado foi de 0,052µg/mL e nas

CRFK foi de 0,023µg/mL. Com relação aos extratos aquoso de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis*, apresentaram concentração não tóxica de 50 µg/mL para as células MDBK, CRFK e MDCK. Já nas células RK 13 o extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* foi de 12,5 µg/mL e o extrato aquoso de *Origanum vulgare* foi de 3,125 µg/mL. Com relação aos extratos etanólico de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis*, apresentaram concentração não tóxica de 3,125 µg/mL frente as células CRFK, mesmo resultado apresentado nas células RK 13 com extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis*, já nas células MDBK e MDCK foi de 6,25 µg/mL. O extrato etanólico de *Origanum vulgare* foi de 12,5 µg/mL para as células MDBK e RK 13 e 25 µg/mL para as células MDCK. Os óleos essenciais de ambas as plantas apresentaram resultados mais tóxicos que os extratos, e não revelaram ação antiviral. Já o extrato etanólico do *O. vulgare* quando adicionado juntamente ao EAV em células RK13, resultou em redução no título viral de $10^{5,42}$ TCID₅₀/100 µL para $10^{0,79}$ TCID₅₀/100 µL, indicando significativa ação antiviral ($p < 0.05$). O extrato aquoso de *O. vulgare* quando adicionado juntamente ao EAV em células RK13, resultou em redução no título viral de $10^{5,42}$ TCID₅₀/100 µL para $10^{2,09}$ TCID₅₀/100 µL. A adição do extrato aquoso de *O. vulgare* frente ao CDV resultou em redução nos títulos $10^{2,00}$ TCID₅₀/100 µL para $10^{0,00}$ TCID₅₀/100 µL e na presença do extrato etanólico a redução do título foi de $10^{2,00}$ TCID₅₀/100 µL para $10^{1,50}$ TCID₅₀/100 µL. 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. Com os resultados desse estudo, observou-se que os óleos essenciais foram mais tóxicos quando comparados com os extratos aquoso e etanólico de ambas as plantas, conclui-se que o extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* foi menos citotóxico e evidenciamos a potencialidade antiviral do extrato aquoso e etanólico de *Origanum vulgare* frente ao EAV e CDV, confirmando a ação virucida do extrato etanólico de *O. vulgare* ao EAV, apresentando-se um promissor agente antiviral.

Palavras-chaves: Lamiaceae, composição química, vírus

Abstract

Title: Investigation of cytotoxicity and antiviral activity of plant extracts of the family Lamiaceae.

Author: Daiane Einhardt Blank

Supervisor: Prof^a. Dr^a. Marlete Brum Cleff

Origanum vulgare and *Rosmarinus officinalis* are plants of the family Lamiaceae, appreciated by their aromatic properties. Because of the potential of the compounds present in their extracts and essential oils, they have several biological activities, such as antifungal, antibacterial and antiviral. The present study aimed at determining the chemical composition, the non-toxic concentration of the essential oils, aqueous and ethanolic extracts of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* in different cell lineages and evaluating the antiviral activity against viruses of veterinary importance. The chemical identifications of the essential oils of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* were carried out with gas chromatography with flame ionization and the compounds of the extracts were identified by high-performance liquid chromatography. In the cytotoxicity assay cell lineages MDBK, MDCK, CRFK and RK13 were used, and cellular viability was confirmed by MTT method. The presence of antiviral activities of the extracts was analyzed by titration of bovine viral diarrhea virus – BVDV, equine arteritis virus – EAV, equine influenza virus – EIV, feline calicivirus – FCV, canine distemper virus – CDV, canine adenovirus – CAV, and canine coronavirus – CCoV were carried out, in the presence or absence of each extract. The plates were kept in incubator with 5% of CO₂ at 37 °C for 72 hours until reading, based on the absence or presence of cytopathic effect. Titer was determined as infective dose for cell culture at 50% (DICC₅₀/100µL). The found compounds in both extracts were carnosic acid, rosmarinic acid, luteolin, apigenin, kaempferol and quercetin. In the essential oil of oregano can be observe the α-terpinene, γ-terpinene, linalool, 4 - terpineol and thymol. In rosemary oil were found to α-pinene, camphene, 1,8-cineole and camphor. According to the results obtained in the determination of non-toxic concentration of the extracts and their chemical composition, the safe and efficient concentration of the extracts for antiviral tests was defined. The aqueous extract from 1600 µg/mL did not show cytotoxicity for all cellular lineages evaluated (MDBK, RK13, MDCK, and CRFK), and the ethanolic extract of *Origanum vulgare* was not toxic at 600 µg/mL. The maximum non-toxic concentration of essential oil of *Rosmarinus officinalis* against cells RK13, MDBK, MDCK and CRFK was 0,023µg/mL. Regarding the essential oil of *Origanum vulgare* front cells RK 13 and MDCK was 0,013µg/mL, using the cells MDBK. The result was 0,052µg/mL and in CRFK was 0,023µg/mL. With respect to aqueous extracts of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis*, showed no concentration of toxic 50 µg/mL to cells MDBK, CRFK e MDCK. RK 13 cells already in the aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* 12,5 µg/mL and

aqueous extracts of *Origanum vulgare* was 3.125 µg/mL. Regarding ethanol extracts of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis*, showed no toxic concentration of 3.125 µg/mL front CRFK cells, same result presented in RK 13 cells with ethanol extract of *Rosmarinus officinalis*, since MDBK and MDCK cells was 6, 25 µg/mL. The ethanol extract of *Origanum vulgare* was 12,5 µg/mL for MDBK and RK 13 and 25 µg/mL for MDCK cells. The essential oils of both plants showed results more toxic than extracts, and showed no antiviral action. The results of the essential oils of both plants were more toxic than the extracts and did not show antiviral action. On its turn, the ethanolic extract of *Origanum vulgare*, when added to EAV in RK13 cells, resulted in reduction of viral titer from $10^{5.42}$ TCID₅₀/100 µL to $10^{0.79}$ TCID₅₀/100 µL. This indicates a significant antiviral action ($p < 0.05$). The aqueous extract of *O. vulgare* when added together to EAV in RK13 cells, resulted in a reduction in viral titer of $10^{5.42}$ TCID₅₀/100 µL for $10^{2.09}$ TCID₅₀/100 µL. Adding the aqueous extract of *O. vulgare* against CDV resulted in reduction of titers from $10^{2.00}$ TCID₅₀/100 µL to $10^{0.00}$ TCID₅₀/100 µL, while in the presence of the ethanolic extract the reduction was from $10^{2.00}$ TCID₅₀/100 µL to $10^{1.50}$ TCID₅₀/100 µL. No significant differences in titers regarding the other analyzed viruses were found. The protocol seeking virucidal activity was able to demonstrate strong action virucidal of the ethanol extract of *Origanum vulgare* about EAV, since after 1 hour incubation mean titers of EAV were reduced from 10^6 to 10^4 when incubated at 37 ° C and 10^3 with incubation at 24 ° C. Incubation of EEO with EAV at 4 ° C resulted in no difference in viral titer. The results of this study evidenced the antiviral potentiality of aqueous and ethanolic extracts of *Origanum vulgare* against the EAV and CDV, confirming the virucidal action of the ethanol extract of *O. vulgare* to EAV, presenting a promising antiviral agent.

Keywords: Lamiaceae, chemical composition, virus

Lista de Figuras

Figure 1: Titers (TCID ₅₀ /100μL) of EAV, EIV, BVDV, FCV, CDV, CAV and CCoV in absence or presence of aqueous extract (1600 μg/mL) or ethanolic extract (600 μg/mL) of <i>Origanum vulgare</i>	43
Figura 1a: Cromatograma da amostra do óleo essencial de orégano obtidos via (GC/FID).....	53
Figura 2. Cromatograma da amostra do óleo essencial de alecrim obtido via cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/FID).....	55

Lista de Tabelas

Tabela 1. Relação dos padrões terpênicos submetidos à cromatografia gasosa (GC/FID).....54

Tabela 2 Concentrações não tóxicas dos extratos e óleos essenciais de orégano e alecrim em µg/mL em diferentes linhagens celulares analisadas pelo ensaio MTT.....56

Tabela 1b. Composição química do extrato etanólico de *O. vulgare* identificada por CLAE e os seus respectivos tempos de retenção em comparação aos padrões.....66

Lista de abreviaturas e siglas

BVDV: vírus da diarreia viral bovina
EAV: vírus da arterite equina
EIV: influenza vírus equino
FCV: calicivírus felino
CDV: vírus da cinomose canina
CAV: adenovírus canino
CCoV: coronavírus canino
BoHV1: vírus herpes bovino tipo1
CPE: efeito citopático
CRFK: Crandell feline kidney cells
DAD: detector por arranjo de diodos
EAO: extrato aquoso de *Origanum vulgare*
EEO: extrato etanólico de *Origanum vulgare*
E-MEM: meio essencial mínimo
FBS: soro fetal bovino
FCV, feline calicivirus;
HPLC: cromatografia líquida de alta performance
MDBK: madin darby bovine kidney cells
MDCK: madin darby canine kidney cells
RK 13: rabbit kidney

Sumário

RESUMO	VI
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELA.....	XI
LISTA DE ABREVIATURA.....	XII
SUMÁRIO.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVO GERAL.....	17
2.1 Objetivos específicos.....	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Vírus de importância em veterinária.....	18
3.2 Tratamento e controle das infecções virais.....	22
3.3 Perspectivas do uso de plantas medicinais para o controle e tratamento viral.....	24
3.4 Identificação química dos extratos vegetais.....	27
3.5 Constituintes químicos do <i>Origanum vulgare</i> e <i>Rosmarinus officinalis</i>	29
3.6 Testes de citotoxicidade e linhagem celular.....	32
4. ARTIGO.....	36
4.1 Antiviral activity of extracts of <i>Origanum vulgare</i> formatado de acordo com as normas da Revista Journal of Natural Product.....	37

4.2 Composição química e citotoxicidade do óleo essencial e extratos de <i>Origanum vulgare</i> L. e <i>Rosmarinus officinalis</i> L. formatado de acordo com as normas do Journal Natural Product Reports.....	48
4.3 Atividade virucida do extrato etanólico de <i>Origanum vulgare</i> frente ao vírus da arterite equina formatado de acordo com as normas da Revista Veterinary Microbiology.....	62
5. CONCLUSÕES.....	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXO 1. Especificação Técnica do <i>Origanum vulgare</i>	82
ANEXO 2. Especificação Técnica do <i>Rosmarinus officinalis</i>	83
ANEXO 3. Comprovante da submissão do artigo.....	84

1. INTRODUÇÃO

As viroses estão entre as enfermidades desafiadoras para a saúde pública e setor agropecuário, alguns patógenos causam grandes perdas econômicas, principalmente pelos danos reprodutivos aos rebanhos infectados e não controlados pela vacinação (TRAUB-DARGATZ, 1993; DIEL et al., 2006; LIMA; OSORIO, 2007).

As medidas de controle de alguns vírus podem incluir ou não a utilização de vacinas, entretanto, as ações de controle estão relacionadas a severidade da infecção e as práticas de manejo dos animais (ACKERMANN; WEBER; WYLER, 1990; QUINN et al., 2005; FRANCO; ROEHE, 2007; KIM; NARAYANAN; CHANG, 2010; AULT et al., 2012). Em regiões com alta prevalência de infecções virais, o controle baseia-se em programas de prevenção com uso de vacinas (MOENNIG et al., 2005; MEYER et al., 2012; LUO et al., 2012), mas existem várias enfermidades em que ainda não existem vacinas disponíveis para o uso (YUAN; DWIGHT, 2003; LIMA; OSORIO, 2007).

Os fármacos disponíveis para prevenir e combater infecções virais humanas e animais são limitados, além disso, alguns destes medicamentos apresentam restrições de uso, como reduzido espectro de ação, utilidade terapêutica limitada, resistência microbiana, toxicidade e custos elevados (ARORA; DIXIT, 2009). A dificuldade de se obter drogas antivirais aplicáveis, se deve principalmente ao fato dos vírus se utilizarem fundamentalmente, do metabolismo das células hospedeiras para replicarem-se (CANAL, 2007). Sendo assim, diversas pesquisas têm sido realizadas com extratos e óleos essenciais de plantas, com o interesse na descoberta do potencial terapêutico das substâncias presentes, pois muitas demonstram ser promissoras na inativação de patógenos e assim no controle e propagação de doenças (NOLKEMPER et al., 2006; ZANDI et al., 2007; BAKKALI et al., 2008).

Entre a grande diversidade de plantas que são utilizadas pela população, a espécie *Origanum vulgare*, conhecida usualmente como orégano e a espécie *Rosmarinus officinalis*, popular alecrim, tem sido muito utilizadas na culinária brasileira, devido as suas propriedades antioxidantes e conservantes (LORENZI; MATOS, 2006; MANCINI et al., 2009). Além disso, diversos extratos e óleos essenciais do orégano e alecrim possuem

potencialidades antibacteriana, antifúngica, antiviral, entre outras, relatadas cientificamente (DORMAN et al., 2004; MOJAB et al., 2008; SADARI; ABBASI, 2011).

O extrato aquoso de *R. officinalis* demonstrou ação antiviral frente ao herpesvírus simplex tipo 1 e 2, provavelmente devido ao composto majoritário, ácido rosmarinico, presente nesse extrato (NOLKEMPER et al., 2006; REICHLING et al., 2008). Outras pesquisas têm sido realizadas utilizando vírus da cinomose canina, parainfluenza e adenovírus, comprovando a ação antiviral dos compostos químicos adquiridos comercialmente, presentes nos extratos tais como flavonóides, quercetina, rutina, apigenina e ácidos fenólicos, como ácido ferúlico, ácido gálico, ácido caféico (BRUM; WEIBLEN, 2006; OZCELIK; KARTAL; ORHAN, 2011; TAFURI, 2011). A crescente demanda por extratos de plantas medicinais pela população, como alternativa na prevenção e tratamento de patologias, colocam em discussão as propriedades antimicrobianas de diferentes tipos de especiarias como o *O. vulgare* e *R. officinalis*. O argumento de que as plantas são totalmente seguras, com base na inocuidade destas, deve ser muito bem avaliado, pois o uso popular das plantas como medicamentos não é suficiente para atestar a segurança no uso, sendo necessária a validação destas formas terapêuticas, para que a utilização destes recursos sejam de forma segura e eficiente (SIMÕES et al., 2003; LORENZI; MATOS, 2006). Portanto, bioensaios devem ser realizados em busca da comprovação do mecanismo de ação, efeito em testes *in vitro* e *in vivo*, avaliações toxicológicas, assim como, promover a identificação dos constituintes químicos responsáveis pela ação farmacológica, devido ao grande interesse da indústria farmacêutica em produzir novos medicamentos (BRUM 2006; SCHNITZLER et al., 2008; ZHANG et al., 2009; GULLUCE et al., 2012).

Existem muitos estudos quanto a composição química e as atividades biológicas dos óleos essenciais de orégano e alecrim, no entanto, pouco tem sido apresentado na literatura com relação aos extratos aquoso e etanólico destas plantas (ANGIONI et al., 2004; CLEFF, 2008). Diante disso, evidencia-se a necessidade de um estudo mais detalhado a cerca destes extratos, além de uma abordagem com relação a toxicidade e potencialidade biológica dessas plantas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi investigar a citotoxicidade e atividade antiviral dos extratos de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis*.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar dos constituintes químicos dos extratos aquoso, etanólico e óleo essencial de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis*.
- Avaliar a citotoxicidade dos referidos extratos em células MDCK, MDBK, CRFK e RK13.
- Estudar a atividade antiviral frente aos vírus da diarreia viral bovina, vírus da arterite equina, influenza vírus equino, calicivírus felino, vírus da cinomose canina, adenovírus canino e coronavírus canino.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Vírus de importância em veterinária

Vírus são pequenos agentes infecciosos, com tamanho variado entre 20 a 1.000 nm de diâmetro, com genoma constituído de uma ou várias moléculas de ácido nucléico desoxirribonucléico (DNA) ou ácido ribonucléico (RNA), as quais possuem a forma de fita simples ou dupla. Os ácidos nucléicos virais geralmente apresentam-se revestidos por um envoltório formado proteínas, algumas vezes, por um envelope composto de lipídeos e carboidratos. Os vírus necessitam das funções e do metabolismo celular para se multiplicar, sendo parasitas intracelulares obrigatórios (YUAN; DWIGHT, 2003; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; FLORES, 2007).

A unidade fundamental dos vírus é denominada partícula viral ou simplesmente vírion, portanto o produto final, do ciclo de desenvolvimento do vírus, constituído por DNA ou RNA cercado por proteínas, é uma partícula viral completa, e se constitui na forma infectante. As dimensões, morfologia e complexidade das partículas víricas diferem amplamente entre as famílias (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; FLORES, 2007; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O resultado das relações vírus-hospedeiro depende de diversos fatores, incluindo interação vírus-célula, espécie de hospedeiro, vias de exposição ao agente, modo de disseminação viral e resistência do hospedeiro. O estabelecimento bem sucedido de infecção viral depende também da presença de células receptoras suscetíveis e da natureza físico-química do agente viral. Existem várias portas de entrada do vírus no hospedeiro, tais como via respiratória, alimentar e urogenital, sendo que a transmissão pode ocorrer de forma direta, ou indireta como por picadas de insetos ou por contato com outros animais (YUAN; DWIGHT, 2003; HOLYOAK et al., 2008; URYVAEV et al., 2012). A transmissão do vírus da arterite equina, por exemplo, pode ocorrer de forma direta ou indireta, por várias vias, como por urina, fezes, e através da inalação de partículas virais pelos equinos que encontram-se na fase aguda da infecção, o que pode ser facilitado durante o transporte desses animais para o comércio, exposição ou corrida. Também pode ocorrer a transmissão através

do sêmen, durante inseminação artificial ou acasalamento natural. Além disso, pode ocorrer a transmissão indireta pelo uso de utensílios contaminados com secreções nasais ou tecidos infectados (HOLYOAK et al., 2008; SÁENZ, 2010).

Alguns vírus apresentam maior importância em animais de produção, como bovinos, suínos, aves e equinos, destacando-se aqueles em que não há vacinas disponíveis ou são pouco eficazes, como a exemplo da diarreia viral bovina, arterite eqüina e influenza eqüina. Em animais de companhia, como cães e gatos, alguns vírus apresentam uma importância, devido a alta morbidade e mortalidade, destacando-se o calicivírus felino, cinomose canina, adenovírus canino e coronavírus canino (FLORES, 2007).

Dentro da espécie equina o vírus da influenza tem se destacado. A enfermidade é causada por um vírus RNA de polaridade negativa, envelopado, pertencente a família Orthomyxoviridae e gênero Influenzavirus, com replicação no núcleo da célula hospedeira. Eqüinos de todas as idades são susceptíveis, mas a enfermidade tem maior prevalência em animais com idade inferior a dois anos (WEIBLEN, 2001; OLIVEIRA et al., 2005; QUINN et al., 2005; DIEHL et al., 2006). A transmissão do vírus ocorre pelo contato direto ou indireto entre animais. Eqüinos em fase de convalescença continuam excretando o vírus nas secreções nasais por um período de até dez dias (FLORES, 2007a).

A influenza eqüina, é uma enfermidade aguda, economicamente importante, caracterizada por rápida disseminação e alta morbidade mundial em eqüinos, que afeta as vias aéreas superiores, levando a prejuízos econômicos, principalmente em animais de competição (WEIBLEN, 2001; QUINN et al., 2005; FLORES, 2007a). A severidade do surto depende das características antigênicas do vírus circulante e do estado imunológico da população no momento da exposição. Os surtos de influenza podem ocorrer em qualquer época do ano. O estresse pode aumentar a susceptibilidade à infecção, bem como, freqüentemente, ambientes escuros e pouco ventilados tem sido citados por favorecerem a transmissão do vírus (QUINN et al., 2005; FLORES, 2007a). Em agosto de 2007 na Austrália, ocorreu um surto da gripe equina, sendo que a vacinação foi utilizada para diminuir os índices de morbidade e a severidade da doença (KIRKLAND et al., 2011; READ et al., 2012).

Outra enfermidade viral que vem se destacando em veterinária é a arterite viral equina. É uma doença infecto-contagiosa, de ocorrência mundial, causada pelo vírus da arterite eqüina (equine viral arteritis virus, EVAV), pertencente à família Arteriviridae (SUMMERS-LAWYER et al., 2011). Os arterivírus apresentam diâmetro de 50 a 70 nm com capsídeo icosaédrico e envelopados. O genoma consiste de uma molécula de RNA linear de sentido positivo, e a replicação desses vírus ocorre no citoplasma das células infectadas. A liberação dos vírus se dá por exocitose após brotamento dentro de vesículas no citoplasma. Durante a fase aguda da infecção, o vírus é eliminado nas fezes, na urina e nas secreções vaginais (TIMONEY, 2003; QUINN et al., 2005; DIEL et al., 2006; LIMA; OSORIO, 2007).

A arterite viral eqüina tem sido associada a diversas manifestações clínicas em eqüinos adultos, causando graves perdas econômicas devidas à abortos, enfermidade no trato respiratório superior, edema ventral e diminuição do desempenho. Surto de infecção têm sido relatados mundialmente, e assim gerando perdas no comércio de importação e exportação de equinos e de sêmen (CAVANAGH, 1997; TIMONEY, 2003; QUINN et al., 2005; DIEL et al., 2006; SÁENZ, 2010).

Outro agente que se destaca nos animais de produção é o vírus da diarréia viral bovina (BVDV), que pertence a família Flaviviridae. Apresenta distribuição mundial, baixa morbidade e baixa mortalidade. O vírus pode infectar bovinos, ovinos, outros ruminantes e suínos. A infecção pelo BVDV pode causar doença aguda, subaguda crônica, doença das mucosas e infecção persistente (QUINN et al., 2005; BØTNER; BELSHAM, 2012). O vírus é transmitido entre animais principalmente por contato direto, através de focinho-focinho, coito, mucosa-mucosa, além de contato indireto através do focinho com secreções/excreções, focinho com feto abortado/placenta (RIDPATH; FLORES, 2007).

O vírus da cinomose canina (CDV) é o agente etiológico de uma infecção multissistêmica que afeta diferentes espécies de carnívoros e é responsável por uma das principais viroses dos cães (NIKOLIN et al., 2012; PANZERA et al., 2012). O CDV é pertencente aos Paramixovirídeos, gênero Morbilivírus, são esféricas com tamanho entre 150 a 350 nm, pleomórficos, envelopados e com genoma RNA linear de sentido negativo. A replicação viral

ocorre no citoplasma, e a liberação é feita por brotamento da membrana plasmática (YUAN; DWIGHT, 2003; ARNS; SPILKI; ALMEIDA, 2007; YI et al., 2012).

A transmissão viral ocorre através do contato com a urina e outras secreções de cães infectados. O vírus da cinomose se dissemina através do sangue ou do sistema linfático, produzindo infecção generalizada com envolvimento de uma variedade de órgãos-alvos. Para alguns vírus, incluindo o vírus da cinomose, os leucócitos periféricos e macrófagos podem servir como células hospedeiras (YUAN; DWIGHT, 2003; QUINN et al., 2005).

A replicação primária do CDV é seguida de viremia que permite a disseminação sistêmica do vírus e infecção de linfonodos e tecidos linfóides, levando a um quadro de imunossupressão. Em cães que não conseguem montar uma resposta imune eficiente, o vírus produz viremia secundária, dissemina-se e replica-se nos tecidos, incluindo células epiteliais, digestivo, respiratório, urinário, neurológico e no sistema retículo - endotelial. Os animais podem apresentar uma variedade de manifestações clínicas, relacionadas com os órgãos e tecidos afetados (ARNS; SPILKI; ALMEIDA, 2007; NIKOLIN et al., 2012).

A família Adenoviridae produz enfermidade no trato respiratório, gastrointestinal e genitourinário, causando perdas importantes. Com relação ao adenovírus canino, este possui simetria icosaédrica, replica-se no núcleo, formando corpúsculos de inclusão intranucleares, são DNA de fita dupla e não-envelopados. Os adenovírus são moderadamente estáveis no meio ambiente. A infecção pelo adenovírus canino tipo 1 (AVC-1) causa hepatite infecciosa canina, uma doença generalizada severa, enquanto a infecção pelo adenovírus canino tipo 2 (AVC-2) leva a doença respiratória localizada (QUINN, 2005 et al.; MORAES; COSTA, 2007).

A infecção pelo coronavírus canino (CCoV) ocorre em caninos domésticos e silvestres. O vírus está associado com surtos de enterite em cães (QUINN et al., 2005; LOVATO; DEZENGRINI, 2007). Cães de todas as idades e raças são susceptíveis à infecção pelo CCoV. No entanto, os filhotes são mais sensíveis e frequentemente desenvolvem sinais clínicos de enterite, além de apresentarem índices maiores de mortalidade. O coronavírus canino é membro da família Coronaviridae, com molécula linear de RNA de fita simples,

possuem vírions envelopados e pleomórficos cujo diâmetro pode variar de 80 a 120 nm, com replicação no citoplasma das células. O vírus é altamente contagioso e dissemina-se rapidamente na população canina. A principal fonte do vírus são as fezes de cães infectados, além de fômites contaminados, e a infecção ocorre principalmente pela via oral. O vírus pode ser excretado nas fezes por até duas semanas após a infecção, porém alguns estudos demonstraram a eliminação por longos períodos (entre 37 e 180 dias) (QUINN et al., 2005; LOVATO; DEZENGRINI, 2007).

O calicivírus felino tem sido o agente infeccioso mais importante da família Caliciviridae, responsável por doenças respiratórias, dermatites, e gastroenterite em gatos em todo o mundo, com elevada taxa de mortalidade. A replicação do vírus ocorre no citoplasma das células infectadas. Apresentam-se estáveis e persistentes no meio ambiente e assim, podendo ocorrer a transmissão indireta. Os vírus são icosaédricos, não-envelopados e com genoma RNA de fita simples (QUINN et al., 2005; FLORES, 2007; GERRIETS et al., 2012). A vacinação ajuda a reduzir os sinais clínicos e estão disponíveis vacinas inativadas e vacinas vivas modificadas. Alguns estudos relataram desenvolvimento de doença e alguns casos fatais em animais vacinados (POULET et al., 2008; GERRIETS et al., 2012; RISI et al., 2012).

3.2 Tratamento e controle das infecções virais

Existe uma grande quantidade de fármacos antibacterianos e antifúngicos, capazes de combater infecções em humanos e animais, entretanto para as infecções virais poucos medicamentos encontram-se disponíveis, além disso, os antivirais tem limitação terapêutica, custo elevado e toxicidade a célula hospedeira (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Para o uso veterinário existem poucos fármacos antivirais disponíveis, mas é provável que alguns antivirais efetivos para uso em humanos possam ser também eficazes contra vírus animais (FLORES, 2007). Estudo avaliou a atividade de três fármacos que são utilizados na terapia antiviral humana, como Aciclovir (ACV), Ganciclovir (GCV) e Foscarnet (PFA), frente aos herpesvírus bovino tipos 1 (BoHV-1), 2 (BoHV-2) e 5 (BoHV-5), demonstrando atividade moderada do

ACV frente aos três tipos de vírus e do GCV frente ao BoHV-2 e BoHV-5, sendo ineficaz frente ao BoHV-1. O PFA foi o mais efetivo *in vitro* frente ao BoHV-1, ao BoHV-2 e ao BoHV-5 (DEZENGRINI; WEIBLEN, 2007; FLORES, 2007).

Para o controle das doenças virais, têm sido desenvolvidas vacinas efetivas, mas não tem sido possível a produção para um número considerável de agentes. Mesmo assim, as vacinas desempenham um papel fundamental no controle e erradicação de várias doenças virais humanas e animais (FLORES, 2007).

Existem muitas vacinas de uso veterinário, licenciadas para produção e comercialização no Brasil, sendo elas, atenuadas que consistem de microorganismos modificados e as inativadas consistindo de vírus morto por métodos físicos ou químicos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; FLORES, 2007; SUMMERS-LAWYER et al., 2011, SATO et al., 2011).

A fim de reduzir as perdas causada por BoHV, vacinas constituídas por vírus atenuado são utilizadas com resultados positivos. No entanto, o controle de infecções ainda é difícil, devido à latência estabelecida pelo vírus após a infecção primária ou após vacinação (FLORES, 2007). A utilização da vacina intranasal mostrou-se mais segura que por via intramuscular, na qual foram associadas causas de aborto em animais (YUAN; DWIGHT, 2003; QUINN et al., 2005). Para o controle da infecção pelo BVDV, o uso de vacinas inativadas e vacinas atenuadas tem se mostrado um método seguro e eficaz, reduzindo a infecção fetal (MOENNIG et al., 2005; MEYER et al., 2012; LUO et al., 2012).

Na Influenza eqüina a terapia de suporte e repouso são indicados aos eqüinos afetados. Além de disso, são necessários isolamento dos animais doentes, limpeza e desinfecção das instalações infectadas (QUINN et al., 2005). As drogas antivirais amantidina e rimantidina têm se mostrado eficazes para inibir a replicação do vírus em testes *in vitro*, e estão sendo avaliadas para uso terapêutico em equinos. Varias vacinas estão disponíveis, sendo o controle feito com vacina inativada (FLORES, 2007; KIM; NARAYANAN; CHANG, 2010; AULT et al., 2012). Embora as vacinas auxiliem na redução da doença, novos surtos têm sido relatados, a mutação viral é frequente e com isso as vacinas necessitam ser modificadas periodicamente, a fim de se assegurar a incorporação de tipos virais circulantes no campo (AULT et al., 2012).

Em relação a arterite equina, não há tratamento disponível (YUAN; DWIGHT, 2003). Em casos graves de enfermidade é indicado a terapia de suporte, e para controle da virose, pode ser utilizada vacina viva modificada adaptada a cultura de tecidos, e a vacina inativada com vírus integral (QUINN et al., 2005).

A utilização de vacinas contra os vírus da cinomose canina e adenovírus canino tem diminuído a incidência dessas doenças, mas a persistência dos vírus, o desenvolvimento de infecções mesmo em animais vacinados, contribuem para a manutenção dessas viroses nas populações (BÖHM et al., 2004). Para o controle da cinomose canina, um dos melhores métodos tem sido o uso de vacinas vivas modificadas, que estão comercialmente disponíveis, proporcionando imunização aos filhotes (YUAN; DWIGHT, 2003; QUINN et al., 2005; SATO et al., 2011). A terapia para todos os vírus envolve tratamento de suporte e sintomático (YUAN; DWIGHT, 2003). Para prevenir cães das doenças por coronavírus canino, existem vacinas inativadas disponíveis comercialmente (DECARO et al., 2011).

3.3 Perspectivas do uso de plantas medicinais para o controle e tratamento viral

A utilização de espécies vegetais em tratamentos de enfermidades acompanha a civilização a mais de 3.000 a. C.. Os povos primitivos iniciaram suas práticas de saúde observando os efeitos das plantas no organismo, acumulavam conhecimentos e revelavam, embora empiricamente, seu potencial curativo, que foram passados de geração a geração (SIMÕES et al., 2003; FERRO; DEGMA, 2008). Atualmente 25% dos medicamentos têm componentes químicos oriundos de plantas, sendo que as plantas medicinais representam um complemento ou uma alternativa, entre as diversas fontes de insumos para o desenvolvimento e obtenção de medicamentos, para o tratamento das enfermidades humanas e de animais (SIMÕES et al., 2003; FERRO; DEGMA, 2008).

O Brasil tem aproximadamente 350 mil espécies vegetais, sendo que em torno de 55 mil espécies são catalogadas e 120 mil espécies, com potencial de aplicação terapêutica (SIMÕES et al., 2003; FERRO; DEGMAR, 2008).

Dentre as inúmeras espécies vegetais, as plantas aromáticas tem se destacado pelas propriedades antimicrobianas, principalmente os óleos essenciais, que têm sido muito estudados (BUSSATA et al., 2007; CLEFF et al., 2010). Neste sentido, plantas utilizadas como condimentares hoje são fontes de pesquisa em busca de novas moléculas ativas, destacando-se o gênero *Origanum* e *Rosmarinnus* que são muito difundidos no Brasil.

O gênero *Origanum* pertence à família Lamiaceae, sendo essa composta por três grupos, dez secções, trinta e oito espécies e dezessete híbridos, e apresenta grande diversidade morfológica e química. A maior parte das espécies de *Origanum* é nativa da região do Mediterrâneo (Grécia, Irã e Turquia), sendo cultivado também no centro da Ásia, no leste da Europa e Taiwan (LORENZI; MATOS, 2006).

As diversas espécies são muito empregadas, destacando-se orégano turco (*Origanum onites* L.), orégano grego (*Origanum vulgare hirtum* L.), orégano espanhol (*Coridothymus capitatus* L.) e orégano mexicano (*Lippia graeolens* HBK) (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Origanum vulgare (orégano) tem sido utilizado na culinária, na elaboração de licores, cosméticos e fármacos, além disso, na indústria de alimentos seu uso tem se justificado pela presença de compostos bioativos, com ação conservante (SIMÕES et al., 2003; DORMAN et al., 2004; LORENZI; MATOS, 2006; MOJAB et al., 2008).

O. vulgare é uma planta perene, cuja altura varia entre 25cm e 40cm, que se adapta bem a solos calcários e secos. As folhas são verde-escuras ou acinzentadas, pecioladas, inteiras, com pêlos curtos e finos na face interior de cada folha, que medem aproximadamente 1 a 5 cm (LORENZI; MATOS, 2006 RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

A espécie *Rosmarinus officinalis* L., conhecida popularmente como alecrim, é originária do Sul da Europa, Norte da África e Sudoeste da Ásia. Desenvolve-se em clima temperado quente, com grande exposição ao sol. Segundo a classificação taxonômica, o alecrim pertence a família Lamiaceae, gênero *Rosmarinus*, espécie *officinalis*. Dependendo da região tem como

nomes populares alecrim-de-jardim; rosmarino; labinotis; alecrinzeiro; alecrim comum; alecrim-de-cheiro; alecrim-de-horta; erva-coada; flor-do-olimp; rosamarinha e rosmarinho (LORENZI; MATOS, 2006). A planta possui porte subarborescente lenhoso, ereto e pouco ramificado de até 1,5m de altura. As folhas são opostas, sésseis, simples, lineares, coriáceas e muito aromáticas, medindo 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura. Apresentam as margens enroladas para a face inferior. As flores são hermafroditas, diclamíneas, pentâmeras, apresentam coloração azulada e pequenas. Em condições tropicais floresce o ano todo e no Sul do Brasil de fins de agosto até o fim do verão (LORENZI; MATOS, 2006; BIASI; DESCHAMPS, 2009).

Existem mais de dez variedades de alecrim em cultivo no Brasil, todas com o mesmo uso, porém aromas e características sutis diferentes (LORENZI; MATOS, 2006). A colheita das folhas de alecrim pode ser realizada em qualquer época do ano e, após a secagem, estas são separadas do caule para utilização e/ou armazenagem (BIASI; DESCHAMPS, 2009). As folhas de alecrim tem sido utilizadas no preparo de xaropes, infusão, tinturas, pó e obtenção de óleo essencial. Na indústria alimentícia tem sido utilizado devido as propriedades antioxidantes dos diterpenos presentes. Popularmente a planta é utilizada como estimulante digestivo, para inapetência; contra azia; em problemas respiratórios e debilidade cardíaca. Por suas virtudes tônicas e estimulantes, atua sobre o sistema nervoso, sendo indicado para cansaço mental e físico. Tem ainda, ação como anti-séptico, anti-espasmódico, cicatrizante, protetor hepático, anti-tumoral, anti-depressivo natural. Tópicamente, utilizado em casos de obstrução nasal, catarros e em enxágües bucais. Além do uso tópico como cicatrizante e antimicrobiano (LORENZI; MATOS, 2006).

Pesquisas têm sido realizadas com extratos de plantas frente ao herpesvírus e os resultados relatam promissora a atividade antiviral dos flavonoides e ácidos fenólicos (NOLKEMPER et al., 2006). Também AKULA e colaboradores (2002), relataram que o herpesvírus bovino sofreu inibição devido a ação de flavonoides. Flavonoides como a quercetina tem inibido a enzima transcriptase reversa de vírus RNA. Em outro estudo a quercetina foi relacionada como composto ativo contra herpesvírus (WANG et al., 1994; SY et al., 2005).

Os compostos químicos dos extratos vegetais podem interferir em etapas do ciclo viral, como na adsorção, penetração, replicação, montagem ou liberação viral. Existem hipóteses como a inibição da bomba de prótons pelos flavonoides, inibindo a liberação de material genético viral e assim impedindo o ciclo da replicação viral (BERTORELLO et al., 1991; NOLKEMPER et al., 2006).

Pesquisa com extratos aquoso e etanólico de *Salvia officinalis* (Lamiaceae) tem sido realizados em testes *in vitro*, com células de RC-37 frente a vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2) e ambos os extratos testados revelaram sua potencialidade antiviral (SCHNITZLER et al., 2008).

De acordo com um estudo com extratos aquosos e óleo essencial de plantas *Thymus vulgaris*, *Thymus daenensis*, e *Zataria multiflora*, pertencentes a família Lamiaceae, comprovou-se o efeito antiviral do extrato aquoso e do óleo essencial de ambas as plantas frente ao adenovírus humano (SADERI; ABBASI, 2011).

3.4 Identificação química dos extratos vegetais

A composição química das plantas é influenciada por fatores climáticos, altitude, condições e características de solo, da parte da planta analisada, do tipo de extrato, além das condições de cultivo e estocagem entre outros fatores, que serão determinantes na formação de compostos nas diferentes porções das plantas (SIMÕES et al., 2003). Entretanto alguns componentes se mantêm na forma qualitativa variando apenas em quantidade, sendo estes princípios ativos que identificam a planta (DANILA; GATEA; RADU, 2011).

Para a avaliação química ou da qualidade e rendimento dos extratos vegetais, diversos métodos podem ser aplicados. A identificação dos extratos pode ser realizada com ou sem reação química através de aplicação de reagentes específicos para o grupo da substância pesquisada (CARVALHO, 2006). Os principais métodos utilizados são a cromatografia gasosa e líquida, além dos métodos espectroscópicos, como ultravioleta visível (UV-VIS),

infravermelho (IR), ressonância magnética nuclear (NMR) e espectrometria de massas (MS) (MELECCHI, 2005).

A cromatografia é um método físico-químico de separação, no qual os constituintes da amostra a serem identificados são divididos entre duas fases, que estão em contato íntimo, onde uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (HARRIS, 2008; VOGEL, 2008).

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica com poder de resolução excelente, empregada para compostos voláteis, possibilitando a análise de várias substâncias em uma mesma amostra. Dependendo do tipo de substância a ser analisada e do detector empregado, consegue-se detectar cerca de 10^{-12} g. Essa sensibilidade permite que pequenas quantidades de amostra possam ser analisadas (PERES, 2002).

Uma outra técnica muito utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), onde a amostra é solúvel na fase móvel, esta técnica é utilizada para identificar amostras líquidas e sólidas, utiliza altas pressões de até 2500 psi. A capacidade analítica é excelente, com alta reprodutibilidade, alta sensibilidade, com sistema automatizado e controle de vazão do eluente, com a vantagem de fazer a separação de amostras com até 50 componentes (TSIMOGIANNIS et al., 2007; HARRIS, 2008; VOGEL, 2008).

O cromatografo líquido é composto por uma coluna sensível a impurezas e partículas sólidas, geralmente de aço, comprimento de 5 a 30 cm, diâmetro interno de 1 a 5 mm e partículas normalmente a faixa de 3 a 5 μ m. Quanto menor o tamanho da partícula e maior o tamanho da coluna, mais eficiente será a separação, pois mais tempo a amostra levará para passar pela coluna. O diâmetro interno da coluna menor diminui o gasto de eluente e o custo operacional (HARRIS, 2008, VOGEL, 2008; DANILA; GATEA; RADU, 2011). A pré coluna é composta da mesma fase estacionária da coluna, os suportes mais comuns são constituídos por partículas microporosas de sílica, são de grande pureza e formato esférico, apresentam grande área superficial e são

sensíveis a pH acima de 8 (PROESTOS; KAPSOKEFALOU; KOMAITIS, 2007; HARRIS, 2008, VOGEL, 2008).

A fase estacionária, fase reversa apolar pode ser C8, C2, C18, que corresponde ao tamanho da cadeia carbônica, quanto maior a cadeia maior o poder de retenção e mais tempo demora para passar pela coluna. Nessa fase acontece interações de van der waals (HARRIS, 2008, VOGEL, 2008).

A fase móvel, deve ter eluentes com alto grau de pureza (grau HPLC), usar água ultra pura, nessa fase o poder de eluição é determinado por sua polaridade, pela polaridade da fase estacionaria e pela natureza dos componetes da amostra. Na fase reversa apolar, quanto maior a polaridade do solvente, maior a eluição da amostra (TSIMOGIANNIS et al., 2007; HARRIS, 2008, VOGEL, 2008).

A fase móvel pode ser usada de duas formas, a isocrática onde a mistura de solventes é fixa durante todo processo de separação e a forma de gradiente, na qual a proporção entre os solventes sofre alteração durante o processo para otimizar a separação (KOSAR; DORMAN; HILTUNEN, 2003; HARRIS, 2008, VOGEL, 2008).

A escolha do detector é fundamental para se obter êxito na análise com HPLC. Esses podem ser divididos em dois grandes grupos. Os detectores de propriedades macroscópicas: índice de refração e condutividade e os detectores de propriedades do soluto: espectrofotométricos, eletroquímicos ou de fluorescência. O detector ultravioleta tem sido o mais utilizado, são bons para eluição em gradiente, tem alta sensibilidade, seletivo e detectar compostos que absorvem energia na faixa do UV/Vis (TSIMOGIANNIS et al., 2007; HARRIS, 2008, VOGEL, 2008).

3.5 Constituintes químicos do *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis*

Algumas pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de descrever o perfil químico de diferentes extratos de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis*, comprovando a presença de muitos compostos com potencialidade biológica, como ácido rosmarinico, ácido caféico, carnosol e ácido carnósico que somam aproximadamente 55% dos compostos fenólicos presentes nas

amostras dessas plantas, além desses, muitos flavonoides têm sido identificados (PIZZALE et al., 2002; SKERGET, et al., 2005).

Os compostos fenólicos são uma classe de compostos com diversidade de estruturas, que possuem pelo menos um anel aromático, no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por uma hidroxila(OH) . São solúveis em água e em solventes orgânicos polares, são altamente reativos, de caráter ácido, e podem formar ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. As rotas sintéticas para a obtenção dos compostos fenólicos são a via ácido chiquímico a partir de carboidratos, ou para obtenção de compostos com grupos hidroxila em *orto* a via é a partir do ácido cinâmico. Para obtenção de compostos com grupos – OH em *meta* a via é acetato-polimalato que inicia com acetil-CoA e malonil-CoA (SIMÕES et al., 2003; TAIZ; ZEIGER, 2004; SKERGET et al., 2005).

Os ácidos fenólicos são hidroxilados, derivados de ácido benzóico e além disso são comuns no estado livre, bem como combinados como ésteres ou glicosídeos como o ácido gálico por exemplo. Os ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico (C6-C3), como cumárico, cafeico e ferúlico estão largamente distribuídos e ocorrem raramente no estado livre e são muitas vezes esterificado (SKERGET et al., 2005).

Em contrapartida, os flavonóides são amplamente distribuídos no reino vegetal, encontrados em frutas, legumes, grãos, cascas, raízes, caules, flores, chá e vinho, são substâncias que possuem estruturas fenólicas variáveis com um ou mais núcleos aromáticos contendo substituintes hidroxilados ou seus derivados como ésteres, éteres, glicosídeos e outros (SIMÕES et al., 2003; TAIZ; ZEIGER, 2004; LUCAS, 2011).

No estudo realizado por ZIAKOVÁ; BRANDSTETEROVA (2003) para determinação de compostos fenólicos em extrato aquoso de *Origanum vulgare* e de *Rosmarinus officinalis*, o ácido rosmarinico e ácido caféico foram identificados, enquanto PIZZALE et al., (2002) demonstraram a presença de carnosol e ácido carnosico em *Origanum*. Uma outra pesquisa visando a caracterização química de extrato aquoso de *Origanum vulgare* identificou os seguintes compostos fenólicos: ácido clorogênico, ácido caféico, ácido ferúlico, cumárico, ácido rosmarínico e além disso os flavonóides, rutina, luteolina, quercetol, apigenina, quercetina e caempferol, sendo que o majoritário foi o

ácido rosmarínico (DANILA; GATEA; RADU, 2011). Enquanto KOSAR et al. (2003) identificaram os ácidos fenólicos, ácido rosmarinico, ácido caféico e flavonóide apigenina no extrato aquoso de *Origanum vulgare*. A identificação química e isolamento do ácido rosmarínico foi realizada inicialmente por Scarpati em 1958, sendo que este é amplamente encontrado em diversas espécies vegetais, sendo um dos compostos químicos biosintetizados para a defesa das plantas, apresentando-se como um éster do ácido caféico (PETERSEN et al., 2009).

Segundo a literatura, os extratos metanólicos de espécies pertencentes a família Lamiaceae, tais como *Ocimum basilicum* L., *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L. e *Thymus vulgaris* L., apresentam na sua composição química o ácido caféico e ácido rosmarinico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido ferúlico, quercetina, rutina, apigenina, luteolina, carnosol e ácido carnosínico (PETERSON; SIMMONDS, 2003; KOSAR; DORMAN; HILTUNEN, 2005; PAPAGEORGIOU; MALLOUCHOS; KOMAITIS, 2008; HOSSAIN et al., 2010).

No estudo realizado por PIZZALE et al., (2002), na obtenção da composição química do extrato metanólico de orégano, foram constatados a presença de ácido caféico, ácido rosmarinico e carvacrol e esses representaram 55 % do total de compostos fenólicos da amostra. Além disso, os flavonoides apigenina, luteolina, miricetina, quercetina e kaempferol foram identificados no extrato metanólico de orégano (SKERGET et al., 2005). A luteolina e apigenina, livres (agliconas) ou conjugadas (heterosídeos), são os flavonóides mais abundantes encontrados nas plantas (SIMÕES et al., 2003). Alguns compostos fenólicos como ácido caféico, ácido vanílico, ácido ferúlico além de flavonóides, como rutina foram extraídos de *Origanum vulgare* com metanol e água e identificados por método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (PROESTOS; KAPSOKEFALOU; KOMAITIS, 2008).

Estudo visando a identificação química do extrato hidroalcoólico de *Origanum vulgare*, detectou compostos fenólicos como, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido ferúlico, cumárico, ácido rosmarínico e os flavonóides, rutina, luteolina, quercetol, apigenina, quercetina e kaempherol, sendo que os majoritários foram os ácidos rosmarínico, cumárico e a rutina (DANILA; GATEA; RADU, 2011).

Outro estudo analisou a composição química do alecrim, identificando os compostos fenólicos representados por flavonóides (apigenina, luteolina esteróides do luteol, diosmetol) e flavonas metoxiladas em C-6 e/ou C-7 e por ácidos fenólicos, sobretudo derivados caféicos como ácido caféico, ácido clorogênico e rosmarínico, além disso, observou-se a presença de diterpenos tricíclicos como ácido carnosólico, carnosol rosmanol; epirosmanol; isorosmanol; rosmarinidifenol; rosmariniquinona e rosmadiol, assim como triterpenos como ácido ursólico e oleanólico e amirinas. (BRUNETON, 2001; NOLKEMPER et al., 2006). Em outro estudo com extrato de *Rosmarinus officinalis* utilizando 20% de etanol e 80% de água, o composto majoritário demonstrado foi o ácido rosmarínico (REICHLING et al., 2008).

Em síntese, ao longo dos anos tem-se estudado a composição química dos óleos essenciais sendo esta muito variável (SIMÕES et al., 2003; GOBBONETO; LOPES, 2005), entretanto alguns autores tem citado como constituintes majoritários no óleo essencial de *Origanum vulgare* o γ -terpineno, 4-terpineol e timol (RODRIGUES et al., 2004; BARANAUSKIENE et al., 2006; CLEFF et al., 2010). Enquanto que para o óleo essencial do *Rosmarinus officinalis* tem sido descrito a presença de terpenos, destacando-se borneol, pineno, cineol, canfeno, eucaliptol, acetato de isobornila, alerianato de isonila e cânfora (ORHAN et al., 2012).

3.6 Testes de citotoxicidade e linhagens celulares

As plantas possuem uma capacidade de produzir muitas substâncias diferentes, mas apenas uma ou algumas são responsáveis pela atividade terapêutica ou tóxica. No entanto, as substâncias ou extratos vegetais a serem avaliados em sua atividade biológica, como antivirais por exemplo, devem apresentar ação em baixas concentrações, a fim de evitar danos as células ou ao organismo infectado, pois em doses mais elevadas pode induzir efeitos tóxicos. Dessa maneira, os testes de citotoxicidade são os primeiros ensaios para se obter a concentração que produza o melhor resultado sem demonstrar lesões celulares (CASTRO et al., 2004; ITHARAT et al., 2004; CHUN et al., 2005; SCHNITZLER et al., 2008).

A verificação da citotoxicidade de substâncias pode ser obtida por uma gama de bioensaios, que são considerados mais ou menos sensíveis, expressando assim, resultados satisfatórios para utilização como triagem em relação a toxicidade de extratos vegetais (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003; SOTELO-FÉLIX et al., 2002; SCHNITZLER et al., 2008). Sendo que o método com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio) associado ao método com vermelho neutro tem sido um dos ensaios mais utilizados para confirmação da viabilidade celular (ALI et al., 2001; NOLKEMPER et al., 2006; GESCHER et al., 2011).

A citotoxicidade pode ser avaliada microscopicamente por alteração da morfologia celular e confirmada através do método colorimétrico MTT, este método foi descrito inicialmente por MOSMANN (1983). O MTT é o sal tetrazolium que, após clivagem por desidrogenases mitocondriais de células, torna-se insolúvel em água pela formação de cristais de formazan, que são solúveis em solventes orgânicos. Em meio de cultura com células, após adição de Dimetil Sulfoxido (DMSO), o MTT convertido em formazan é solubilizado e pode ser lido por espectrofotometria em função desta conversão. Esta reação pode ser expressa em percentual de células vivas de acordo com a absorvância obtendo-se, o percentual da viabilidade celular (VIJAYAN et al., 2004; ZHANG et al., 2009; GESCHER et al., 2011).

As linhagens celulares são derivadas de células tumorais ou de tecidos normais que sofreram transformação *in vitro*. Esses tipos celulares são cultivados de maneira semelhante aos cultivos primários e possuem capacidade de multiplicação. Por estarem bem adaptadas às condições do cultivo, são de fácil manipulação e propagação (ITHARAT et al., 2004; FLORES, 2007). As culturas de células tem sido um dos métodos mais comuns para o cultivo de vírus. A obtenção de uma cultura celular primária inicia-se pelo tratamento enzimático de fragmentos de tecido animal para separar as células. As células separadas são suspensas em meio nutritivo para promover o crescimento e incubados em estufa a temperatura de 37°C, por um período de 24 horas, as células tendem a aderir as placas e se reproduzem formando uma monocamada (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; FLORES, 2007; SONG; SHIM; CHOI, 2011). A infecção viral da monocamada celular pode induzir a morte celular, com destruição na célula do hospedeiro a medida que o vírus se

multiplica, essa alteração na morfologia da célula é visível ao microscópio, conhecida como efeito citopático (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; SONG; SHIM; CHOI, 2011).

Existem diversas linhagens celulares comumente utilizadas em Virologia Veterinária, como MDBK (célula de rim bovino), MDCK (célula de rim canino), CRFK (célula de rim felino), CRIB (célula de rim bovino resistente a infecção pelo vírus da diarreia viral bovina), RK13 (célula de rim de coelho), PK15 (célula de rim suíno), SK6 (célula de rim suíno), BHK-21 (célula de rim de hamster), IBRS2 (Instituto Biológico rim de suíno) e Vero (células de rim de macaco-verde africano). Geralmente são utilizadas células originárias da espécie animal capaz de ser infectada pelo vírus, mas existem vários vírus que replicam em células de cultivos de outras espécies. Por exemplo, o herpesvírus eqüino (EHV) é cultivado em células RK-13 ou em células Vero e o isolamento do vírus da arterite eqüina (EAV) tem sido realizado em células RK-13 (NOLKEMPER et al., 2006; FLORES, 2007; MANCINI et al., 2009; OZCELIK; KARTAL; ORHAN, 2011; SUMMERS-LAWYER et al., 2011).

Os vírus necessitam de cultivos celulares diferenciados. O vírus da influenza eqüina, por exemplo pode fazer replicação *in vitro*, em células MDCK, apresentando como efeito citopático o arredondamento e desprendimento celular (FLORES, 2007; KIM; NARAYANAN; CHANG, 2010). Para o vírus da cinomose canina, utiliza-se tipo celular VERO e MDCK, observando-se como efeito citopático, formação de sincícios e desprendimento das células do tapete celular (FLORES, 2007; YI et al., 2012).

Para a replicação viral e avaliação do efeito do herpesvírus bovino, é necessário o tipo celular MDBK. Sendo observado desorganização nuclear, arredondamento e desprendimento celular, assim como formação de focos infecciosos com aspecto de “cachos de uva”, e lise, além da presença de corpúsculos intranucleares (FLORES, 2007; GRAVINA et al., 2010).

Para a avaliação do vírus da arterite viral equina, diarreia viral bovina, calicivírus felino, coronavírus canino e adenovírus canino, os tipos celulares MDCK, RK-13, CRFK, MDBK e VERO tem sido os mais utilizados e os efeitos citopáticos visualizados são, vacuolização citoplasmática, degeneração celular, enrugamento do tapete, desprendimento e lise celular (FLORES, 2007; SUMMERS-LAWYER et al., 2011; URYVAEV et al., 2012).

Estudo verificou as concentrações não citotóxicas dos extratos metanólico e diclorometano de *Ocimum sanctum* L., *Ocimum basilicum* L. e *Ocimum americanum* L., plantas pertencentes a família Lamiaceae, sendo observado que a citotoxicidade dos extratos de *Ocimum sanctum* L. e *Ocimum americanum* L., com ambos solventes foi de 110µg/mL, já a concentração dos extratos de *Ocimum basilicum* L. com metanol e diclorometano foi de 56 µg / mL (YUCHAROEN; ANUCHAPREEDA; TRAGOOLPUA, 2011). De acordo com um estudo com extrato aquoso e óleo essencial de *Thymus daenensis*, *Thymus vulgaris*, *Zataria multiflora* também pertencentes a família Lamiaceae, os menores efeitos citotoxicos observados foram em 200 µg/mL para os extratos aquosos *Thymus vulgaris*, *Thymus daenensis*, e *Zataria multiflora* e, em 1000µg/mL para o óleo essencial de ambos os extratos, a partir desses resultados de citotoxicidade foi comprovado o potencial antiviral dessas plantas frente ao adenovirus humano (SADERI; ABBASI, 2011).

Outro estudo realizou ensaio de citotoxicidade com extrato aquoso de *Melissa officinalis* e *Prunella vulgaris* membros da família Lamiaceae em células RC-37 e os resultados demonstraram a concentração não citotóxica de 55 µg/mL para a *Melissa officinalis* e 125 µg/mL para *Prunella vulgaris* (NOLKEMPER et al., 2006).

4. ARTIGO

4.1 Antiviral activity of extracts of *Origanum vulgare*

Daiane Einhardt Blank^{*,¹}, *Gabriela Hörnke Alves*^¹, *Silvia de Oliveira Hübner*^[§],

Claudia Andrea Lima Cardoso^{^{II}}, *Rogério Antonio Freitag*^{^T}, and *Marlete Brum
Cleff*^[§]

Formatado de acordo com as normas da Revista Journal of Natural Products

Antiviral activity of extracts of *Origanum* *vulgare*

Daiane Einhardt Blank^{*,†}, Gabriela Hörnke Alves[†], Silvia de Oliveira Hübner[§],
Claudia Andrea Lima Cardoso[‡], Rogério Antonio Freitag[†], and Marlete Brum Cleff[§]

[§]Faculdade Veterinária - UFPel – Pelotas/RS, Brazil, [†]Postgraduate Program in
Biochemistry and Bioprospection (PPGBBIO) - UFPel – Pelotas/RS, Brazil, [†]Center of
Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences (CCQFA) - UFPel- Pelotas/RS, Brazil
[‡]Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS) Dourados/MS, Brazil

Keywords: extracts, antimicrobial, virus

This study aimed determine the activity of aqueous and ethanolic extracts of *Origanum vulgare* against some viruses of veterinary importance (bovine viral diarrhea virus – BVDV, equine arteritis virus – EAV, equine influenza virus – EIV, feline calicivirus – FCV, canine distemper virus – CDV, canine adenovirus – CAV, and canine coronavirus – CCoV) by evaluating the possibility of inhibition of viral particles production. The aqueous extract from 1600 µg/mL did not show cytotoxicity for all cellular lineages evaluated (MDBK, RK13, MDCK, and CRFK), and the ethanolic extract of *Origanum vulgare* was not toxic at 600 µg/mL. The addition of aqueous extract of *Origanum vulgare* in media resulted in a significant reduction of the EAV titer from $10^{5.42}$ TCID₅₀ to $10^{2.09}$ TCID₅₀/100 µL while in the presence of the ethanolic extract of *Origanum vulgare* in media resulted in a significant reduction of the EAV titer from $10^{5.42}$ TCID₅₀ to $10^{0.79}$ TCID₅₀/100 µL. To CDV the addition of aqueous extract resulted in reduction from $10^{2.00}$ TCID₅₀ to $10^{0.00}$ TCID₅₀/100 µL while in the presence of the ethanolic extract titers were reduced from $10^{2.00}$ TCID₅₀ to $10^{1.50}$ TCID₅₀/100 µL. No significant differences in titers regarding the others analyzed viruses were detected. With respect to chemical analysis of the extracts of *Origanum vulgare*, were identified in the ethanol extract phenolics rosmarinic acid, caffeic acid,

carnosol, p-coumaric acid, carnosic acid, luteolin, apigenin, kaempferol and quercetin. In aqueous extracts of *Origanum vulgare* were detected rosmarinic acid, p-coumaric acid, carnosic acid, luteolin, apigenin, kaempferol and quercetin. The data obtained stimulate other biological assays in order to determine which compounds are responsible for the antiviral activity as well as which are the mechanisms involved. The results presented and the considerations we were able to draw from them allowed us to conclude that the ethanolic extract of *Origanum vulgare* has significant antiviral activity against EAV and the both aqueous and ethanolic extracts have antiviral action against CDV.

Introduction.

Viral diseases are a challenge for human public health and the farming sector due to their clinical severity, the zoonotic character of some, as well as financial losses. While some diseases are controlled by vaccination programs¹⁻², others do not have available vaccines in the domestic market³⁻⁴. The use of antiviral drugs for control and treatment is characterized by several restrictions such as reduced action spectrum, limited therapeutic utility, microbial resistance, high costs, and limited availability⁴⁻⁵.

It is difficult to develop new antiviral drugs mainly because of the nature of the viruses, which are totally dependent on cellular metabolic processes to multiply and survive. As a result, the compounds that inhibit viruses or cause their death are also toxic to host cells, at different intensities⁵⁻⁶. Several researches for the development of new antiviral drugs have been carried out based on synthetic substances. However, great efforts have been made to evaluate the antiviral potential of natural products, in order to isolate and characterize new compounds. That can inhibit viral replication or be used as models of new molecules. Some extracts and essential oils of plants have been evaluated regarding their therapeutic potentiality, and many of them have shown promising biological activities⁷⁻¹⁰.

Among the various species of plants which are popularly used as an alternative to prevent and treat pathologies, *Origanum vulgare* stands out due to its reported antibacterial and antifungal properties¹¹⁻¹². However, it is necessary to evaluate the antiviral potential of this plant, defining its specificity, toxicity and mechanism of action through *in vitro* and *in vivo* bioassays, besides identification of the chemical

constituents responsible for the biological effects. This work aimed evaluate antiviral activity of ethanolic and aqueous extracts of *Origanum vulgare* against bovine viral diarrhea virus (BVDV), equine arteritis virus (EAV), equine influenza virus (EIV), feline calicivirus (FCV), canine distemper virus (CDV), canine adenovirus (CAV), and canine coronavirus (CCoV), and identificate of the chemical compounds.

Materials and methods.

Acquisition of extracts.

For preparing the aqueous extract 25 g of dry leaves of *Origanum vulgare* were immersed in 250 mL of distilled water for one hour at 60 °C, under agitation. The extract was then filtered and the process was repeated twice. For obtaining the ethanolic extract, 35 g of dry leaves were added into 350 mL of ethanol for 24 hours at 60 °C, under agitation. After filtering the aqueous and ethanolic extracts, their respective densities were calculated, according to the formula $d=m/v$. The extracts were then stored in hermetically sealed containers until use.

Identification of compounds in the sample.

Chemical constitution was defined through high-performance liquid chromatography (HPLC) by using Varian Diode Array Detector (DAD), reversed-phase C18 column (Phenomenex Gemini), with flow rate of 1 mL min⁻¹ and injection volume of 10 µL.

Viruses and cells.

EAV, EIV, FCV, CDV, CAV, and CCoV were propagated in cell culture as described by Snijder and Meulenberg¹³. The strain Singer of BVDV was propagated in Madin Darby bovine kidney cells (MDBK); EAV (strain Bucyrus) in Rabbit kidney cells (RK 13- ATCC® Number: CCL-37TM); EIV and CDV in Madin Darby canine kidney cells (MDCK), while FCV and CCoV were propagated in Crandell feline kidney cells (CRFK). Viruses culture were frozen when full cytopathic effect (CPE) was observed, after thawing were clarified by centrifugation and the suspensions stored at -70 °C until use. The cells were cultured in Eagle's medium (E-MEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS), and penicillin–streptomycin (Invitrogen, Gaithersburg, MD), at 37 °C and 5% of CO₂.

Cytotoxicity

The aqueous and ethanolic extracts were analyzed regarding toxicity in lineages MDBK, RK13, MDCK, and CRFK by determining the highest non-toxic dilution to be evaluated concerning antiviral action. The cells were cultured in microplates at 37 °C with 5% of CO₂ for 24 hours in E-MEM containing 10% of fetal bovine serum, in order to form the monolayers. E-MEM was removed and cells were treated with serial dilutions (in E-MEM) of the aqueous and ethanolic extracts of *Origanum vulgare* (from 1/10 to 1/5120). Cells treated only with E-MEM were used as control. Cellular viability was measured through MTT assay, after 72 hours, as described¹⁴. The percentage of viability was calculated as $AT/AC \times 100$; where AT and AC are the rates of absorbance of treated and control cells, respectively.

Screening for antiviral activity.

In order to evaluate the presence of antiviral activity, after removing the growth medium of the cellular monolayers, was carried virus titration, in absence or presence of each extract, at a concentration previously determined as non-toxic. Titrations were performed by Behrens & Kärber method¹⁵, based on absence or presence of cytopathic effect. Reading was done after 72 hours and titer was determined as infecting dose for cellular culture at 50% (TCID₅₀/100μL).

Statistical analyses.

All assays described here were performed a minimum of three times and mean values $\pm$ SD (Standard Deviation) were calculated using Microsoft Excel®. Statistical analyses were performed using a Fisher's test and values were considered significant when $p < 0.05$.

Results and discussion.

Extraction resulted in density rates of 1.0002 g/cm³ for the aqueous extract and 0.7846g/cm³ for the ethanolic extract of *Origanum vulgare*. From this concentration, serial dilutions were evaluated regarding toxicity in different cell lineages. The determination of cytotoxicity is considered important in order to differentiate cytopathic effect and toxic effect and to select potential vegetal extracts concerning toxicity. The MTT assay showed a decrease in the cellular viability that was proportional to the

concentration evaluated in each extract. Absence of cytotoxicity was detected in the aqueous extract at the concentration of 1600 $\mu\text{g/mL}$, in all lineages used. To the ethanolic extract cellular integrity and viability near to 100% was only observed in the concentration at 600 $\mu\text{g/mL}$. These concentrations were used in the antiviral assays.

The CLAE-DAD method identified similar phenolic and flavonoid compounds in aqueous and ethanolic extracts of *Origanum vulgare*. The phenolic acids and diterpenes detected in the ethanolic were carnosic acid, carnosol, p-coumaric acid, rosmarinic acid and caffeic acid. Carnosol and caffeic acid were not detected in the aqueous extract. The flavonoids quercetin, apigenin, luteolin and caempferol were present in both extracts. Chemical constituents here identified were also described in other study carried out with aqueous and ethanolic extracts of *Origanum vulgare*¹⁶. It is known that the solvent used for obtaining the extracts can also interfere in the kinds of chemical constituents, and this may result in different biological activities. Antiviral activity of the plant extracts obtained with different kinds of solvents such as hexane, ethanol and dichloromethane can be different¹⁷. Our analytic study was qualitative and the concentrations of the chemical constituents were not determined. Usually the active constituents in bigger concentrations are the responsible by antimicrobial effects.

The results of the viruses' titrations, in absence or presence of each extract, are shown in Figure 1. The action of the aqueous and ethanolic extract of *Origanum vulgare* was particularly interesting to EAV, as the virus was almost completely inactivated in the presence of the extract. In the absence of the ethanolic extract EAV showed an average titer of $10^{5.42}\text{TCID}_{50}/100\ \mu\text{L}$ and the titer was reduced to $10^{0.79}\text{TCID}_{50}/100\ \mu\text{L}$ with the presence of these extract, indicating a strong antiviral action. The addition of aqueous extract of *Origanum vulgare* in media resulted in a significant reduction of the EAV titer from $10^{5.42}\text{TCID}_{50}$ to $10^{2.09}\text{TCID}_{50}/100\ \mu\text{L}$. When data were statistically analyzed, it was confirmed that EAV titers were significantly different ($p<0.05$). Statistically significant results were also obtained to CDV titrated in the presence of the aqueous and ethanolic extracts of *Origanum vulgare* (Figure 1). The production of particles of BVDV, EIV, FCF, CAV, and CCoV was not significantly affected in the presence of the extracts.

The mechanism of action of the aqueous and ethanolic extracts against EAV and CDV was not determined. It is know that antiviral action can differ to different viruses and even in different stages of infection; the action may be extracellular, in the adsorption to the cells, intracellular, during the replication or also in the stage of

liberation of the viral particles¹⁸. Moreover, some components described in extracts of *Origanum sp.* such as flavonoids and phenolic acids can present synergic or antagonistic effect increasing or inhibiting biological potentiality¹⁸⁻¹⁹. The synergic effect of the combination of quercetin and baicalein has been demonstrated against human cytomegalovirus (HCMV)²⁰. Among the flavonoids present in the aqueous and ethanolic extracts of *Origanum vulgare*, quercetin has been described with antiviral activity²¹⁻²². It has been suggested that the antiviral potential of quercetin is related to their ability of binding to glycoproteins on the viral envelope and thus interfering in the adsorption and penetration of the virus in the cell and also interfering with DNA synthesis²³. It is possible that the compounds quercetin and/or baicalein are related to the antiviral action against EAV and CDV observed in this study. However, in the present work, the antiviral activity against EAV was identified only with the ethanolic extract of *Origanum vulgare*. This suggests action by compounds absent in the aqueous extract (carnosol and caffeic acid). Regarding CDV, ethanolic and aqueous extract resulted in reduction of production of viral particles. More studies will be carried out aiming identify the compound or compounds responsible for the anti-EAV and anti-CDV activity and also to determine the mechanism of antiviral action. The results presented in this study give a rich, not yet reported data concerning the antiviral activities of *Origanum vulgare*, and are therefore a preliminary source of important scientific information that stimulates future investigations.

Conclusion.

The results presented and the considerations we were able to draw from them allowed us to conclude that the ethanolic extract of *Origanum vulgare* has significant antiviral activity against EAV and aqueous extracts have antiviral action against EAV and the both aqueous and ethanolic extracts have antiviral action against CDV.

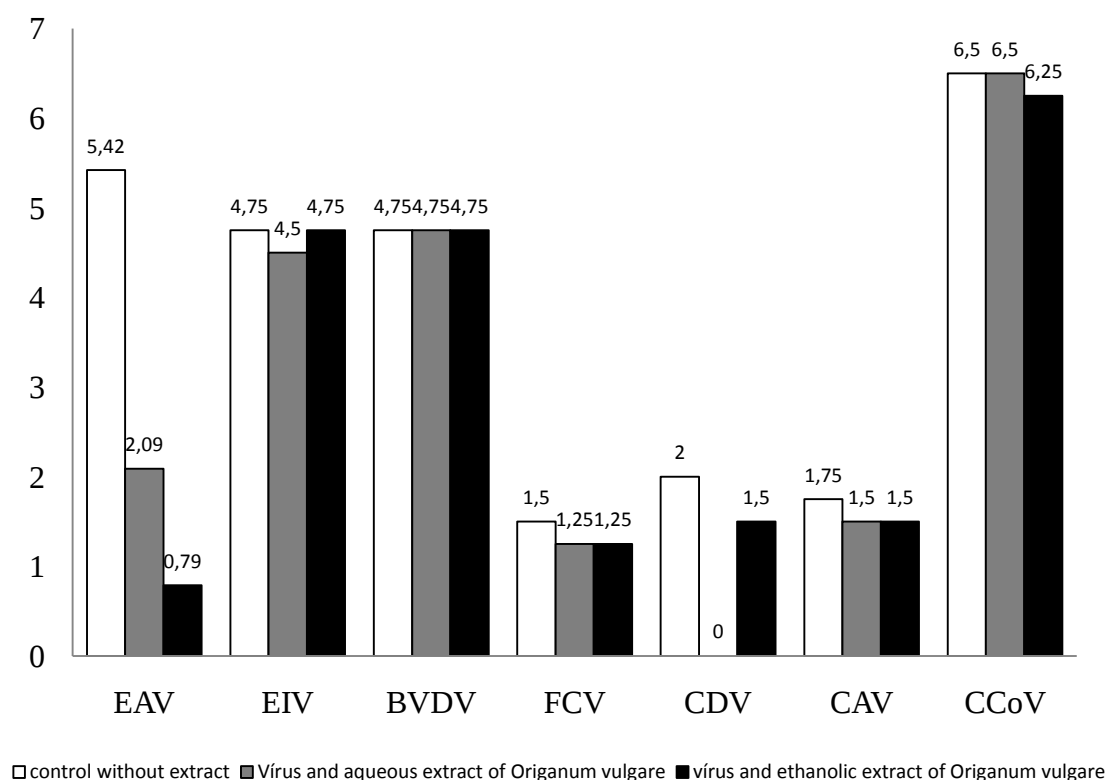


Figure 1. Titers ($TCID_{50}/100\mu L$) of EAV, EIV, BVDV, FCV, CDV, CAV and CCoV in absence or presence of aqueous extract (1600 $\mu g/mL$) or ethanolic extract (600 $\mu g/mL$) of *Origanum vulgare*

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* To whom correspondence should be addressed. Tel: 55 53 84016218. E-mail: emebrum@bol.com.br

ABBREVIATIONS

BoHV1, bovine herpesvirus type 1; BVDV, bovine viral diarrhea virus; BVDV, bovine viral diarrhea virus; CAV, canine adenovirus; CCoV, canine coronavirus; CDV, canine distemper virus; CPE, full cytopathic effect; CRFK, Crandell feline kidney cells; DAD, Diode Array Detector; EAO,

aqueous extract of oregano; EAV, equine arteritis virus; EEO, ethanolic extract of oregano; EIV, equine influenza virus; E-MEM, Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; FCV, feline calicivirus; HCMV, human cytomegalovirus; HPLC, high-performance liquid chromatography; MDBK, Madin Darby bovine kidney cells; MDCK, Madin Darby canine kidney cells; RK 13, Rabbit kidney.

REFERENCES

- (1) MEYER, G.; DEPLANCHE, M.; ROUX, D.; MOULIGNIE, M.; PICARD-HAGEN, N.; LYAZRHI, F.; RABOISSON, D. ; MATHEVET, P.; SCHELCHER, F. Fetal protection against bovine viral diarrhoea type 1 virus infection after one administration of a live-attenuated vaccine. *The Veterinary Journal*, **2012**, 192, 242–245.
- (2) LUO, Y.; YUAN, Y.; ANKENBAUER, R.G.; NELSON, L.D.; WITTE, S.B.; JACKSON, J.A.; WELCH, S.W. Construction of chimeric bovine viral diarrhea viruses containing glycoprotein Erns of heterologous pestiviruses and evaluation of the chimeras as potential marker vaccines against BVDV. *Vaccine*, **2012**, 30, 3843 – 3848.
- (3) LIMA, M.; OSORIO, F. A. Arteriviridae. In: FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. Editora UFSM, Santa Maria/RS, **2007**, 641-653.
- (4) YUAN C. Z.; DWIGHT C. H. *Microbiologia Veterinária* Editora: Guanabara, **2003**.
- (5) MULLER, V.; CHAVEZ, J.H.; REGINATTO, F.H.; ZUCOLOTTI, S.M.; NIERO, R. ; NAVARRO, D.; YUNES, R.A.; SCHENKEL, E.P.; BARARDI, C.R.M.; ZANETTI, C.R.; SIMOES, C.M.O. Evaluation of antiviral activity of south American plant extracts against herpes simplex virus type I and rabies virus. *Phytotherapy research.*, **2007**, 21, ed. 10, 970-974.

- (6) FLORES E.F. Estrutura e composição dos vírus. In: FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. Editora UFSM, Santa Maria/RS, **2007**, 21-33.
- (7) 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 Medica.*, **2006**, 72, 15, 1378-1382.
- (8) BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils-a review. *Food and Chemical Toxicology*, **2008**, 46, 446–475.
- (9) KOCH, C.; REICHLING, J.; KEHM, R.; SHARAF, M.M.; ZENTGRAF, H.; SCHNEELE, J.; SCHNITZLER, P. Efficacy of anise oil, dwarf-pine oil and chamomile oil against thymidine-kinase-positive and thymidine-kinase-negative herpesviruses. *Journal of pharmacy and pharmacology*. **2008**, 60, ed. 11, 1545-1550.
- (10) SADERI, H.; ABBASI, M. Evaluation of anti-adenovirus activity of some plants from Lamiaceae family grown in Iran in cell culture. *African Journal of Biotechnology*, **2011**, v.10, n.76, p.17546-17550.
- (11) NEVES, J. M.; MATOS, C.; MOUTINHO, C.; QUEIROZ, G.; GOMES, L.R.; Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, **2009**, 124, 270–283.
- (12) CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.; FARIA, R.O.; XAVIER,M.O.; SANTIN, R.; PASCENTE, P.S.; RODRIGUES, M.R.; MEIRELES, M.C.A. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **2010**, 62, 5, 1291-1294.
- (13) SNIJDER, E.J.; MEULENBERG J.J. The molecular biology of arteriviruses.

Journal of General Virology, **1998**, v.79, p. 961- 979.

(14) MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Journal of Immunological Methods ,**1983**, 65, 55-63.

(15) MAYR, A.; BACHMANN, P.A.; BIBRACK, B.M.; WITTMANN, G. Virologische Arbeitsmethoden - Band IV - Sicherheit bei virologischen arbeiten – Biometrische Methoden. Stuttgart : Gustav Fischer Verlag, **1982**.

(16) DANILA, O.A., GATEA, F., RADU, G.L. Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs, Chemistry of Natural Compounds, **2011**, v.47, 22-26.

(17) TAFURI, N. F. Atividade antiviral de extratos vegetais e flavonóides contra o Bovine herpesvirus 1 (BoHV1). **2011**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica agrícola)- Universidade de Viçosa, Minas Gerais.

(18) SCHNITZLER, P.; NOLKEMPER, S.; STINTZING, F.C.; REICHLING, J. Comparative in vitro study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations, Phytomedicine, **2008**, v.15, 62–70.

(19) KHAN, M.T.H.; ATHER, A.; THOMPSON, K.D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. Antiviral Research. **2005**, 67, 107-119.

(20) COTIN, S.; CALLISTE, C.; MAZERON, M.; HANTZ, S. DUROUX, J.; RAWLINSON, W. PLOY, M.; ALAIN,S. Eight flavonoids and their potential as inhibitors of human cytomegalovirus replication Antiviral Research, **2012**, 6.

- (21) WANG, J.N.; HOU, C.Y.; LIU, Y.L.; LIN, L.Z.; GIL, R.R.; CORDELL, G.A. Swertifranchaside, an HIV-reverse transcriptase inhibitor and the first flavone-xanthone dimmer, from *swertia franchetiana*. *Journal of Natural products*, **1994**, v.57, 211-217.
- (22) SY, L.; JY, R.; WB, P. Antiherpetic Activities of Flavonoids against herpes simplex virus type 1(HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro. *Archives of Pharmacology Research*, **2005**, v.28, 1293-1301.
- (23) FORMICA, J.V.; REGELSON W. Review of biology of quercetin and related bioflavanoids. *Food Chemical Toxicology*, **1995**, 33, 1061-1080.

4.2 Composição química e citotoxicidade do óleo essencial e extratos de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L.

Daiane Einhardt Blank^{*a}; Gabriela Hörnke Alves^a; Clarissa Caetano de Castro^c;
Rogério Antonio Freitag^a; Silvia de Oliveira Hübner^b; Marlete Brum Cleff^b

Formatado de acordo com as normas do Journal Natural Product Reports

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS DE *ORIGANUM VULGARE* L. E *ROSMARINUS OFFICINALIS* L.

Daiane Einhardt Blank^{*a}; Gabriela Hörnke Alves^a; Clarissa Caetano de Castro^c; Rogério Antonio Freitag^a; Silvia de Oliveira Hübner^b; Marlete Brum Cleff^b

Resumo

A determinação da citotoxicidade dos extratos obtidos de plantas medicinais é uma etapa essencial para que estes possam ser utilizados de forma segura. O presente estudo teve como objetivo identificar a composição química e determinar a toxicidade dos óleos essenciais, extratos aquoso e etanólico de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* em diferentes linhagens celulares. A identificação química dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia gasosa com ionização por chama (GC/FID) e os compostos dos extratos através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A citotoxicidade foi analisada em células Madin Darby bovine kidney (MDBK), Rabbit kidney (RK 13), Madin Darby canine kidney (MDCK) e Crandell feline kidney (CRFK), pelo método MTT. Os compostos encontrados em ambos extratos foram o ácido carnósico, ácido rosmarinico, luteolina, apigenina, caempferol e quercetina. No óleo essencial de orégano pode-se constatar o α -terpineno, γ -terpineno, linalol, 4-terpineol e timol. No óleo de alecrim foram encontrados o α -pineno, canfeno, 1,8-cineol e cânfora. A concentração máxima não tóxica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* frente a células RK13, MDBK, MDCK e CRFK foi de 0,023 μ g/mL. Com relação ao óleo essencial de *Origanum vulgare* frente as células RK 13 e MDCK foi de 0,013 μ g/mL, utilizando as células MDBK o resultado foi de 0,052 μ g/mL e nas CRFK foi de 0,023 μ g/mL. Com relação aos extratos aquosos de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis*, estes apresentaram concentração não tóxica de 50 μ g/mL para as células MDBK, CRFK e MDCK. Já nas células RK 13 o extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* foi de 12,5 μ g/mL e o extrato aquoso de *Origanum vulgare* foi de 3,125 μ g/mL. Os extratos etanólico de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis*, apresentaram concentração não tóxica de 3,125 μ g/mL frente as células CRFK, mesmo resultado apresentado nas células RK 13 com extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis*, já nas células MDBK e MDCK foi de 6,25 μ g/mL. O extrato etanólico de *Origanum vulgare* foi de 12,5 μ g/mL para as células MDBK e RK 13 e 25 μ g/mL para as células MDCK. As análises demonstraram que a citotoxicidade foi dependente do tipo de extrato, da linhagem celular, sendo os óleos essenciais mais tóxicos que os extratos aquosos e etanólicos. A citotoxicidade do extrato etanólico é maior quando comparada ao extrato aquoso, sendo que o extrato aquoso de alecrim foi o menos tóxico nas células testadas.

Palavras –chaves: Alecrim, orégano, citotoxicidade, extratos

- 1 Introduction
- 2 Material e métodos
 - 2.1 Material vegetal
 - 2.2 Extrações dos óleos essenciais
 - 2.3 Preparação dos extratos aquoso e etanólico
 - 2.4 Condições das análises
 - 2.4.1 Cromatografia Gasosa (GC/FID)
 - 2.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)
 - 2.5 Citotoxicidade
- 3. Resultados e discussões
 - 3.1 Análise cromatográfica dos óleos essenciais por GC/FID
 - 3.2 Análise cromatográfica dos extratos aquoso e etanólico por HPLC
 - 3.3 Citotoxicidade
 - 3.4 Conclusão
 - 3.5 Referências bibliográficas

^a*Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos – Universidade Federal de Pelotas*

^b*Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas*

^c*Pós-Graduação em Veterinária, UFPel*

1 Introdução

A família Lamiaceae compreende diversas plantas aromáticas, dentre elas o *Origanum vulgare* L. (orégano) e *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), que são reconhecidas pela potencialidade biológica dos seus extratos como antimicrobiano¹. O uso popular dessas plantas como medicamentos não atesta a segurança no uso, sendo necessária avaliação criteriosa para que a utilização destes recursos seja de forma segura e eficaz².

Origanum vulgare L. e *Rosmarinus officinalis* L. apresentam inúmeras substâncias bioativas, sendo algumas responsáveis por atividades terapêuticas e ou tóxicas^{3,4}. Dentre os constituintes, os óleos essenciais de alecrim e orégano podem apresentar compostos terpênicos, cânfora, timol, carvacrol, 1,8-cineol, dentre outros⁵. No caso dos extratos etanólicos e aquosos, os principais constituintes são compostos fenólicos não voláteis como ácido rosmarínico, carnosol e ácido carnósico, e alguns

flavonóides, dentre eles quercetina, rutina e campferol^{6,7}. No entanto, a proporção de cada constituinte químico pode variar de acordo com a espécie vegetal e esses são frequentemente afetados, por condições ambientais devido a interface química entre plantas e o ambiente circundante, podendo assim apresentar atividades biológicas diferentes⁸. Desta forma os testes de citotoxicidade nas etapas de triagem para utilização de extratos vegetais em estudos biológicos são essenciais. Entretanto, estudos sobre citotoxicidade de extratos de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L., não foram encontrados. Assim, o trabalho tem por objetivo a identificação dos compostos químicos presentes nos óleos essenciais e extratos aquoso e etanólico de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L., além de avaliação da toxicidade frente a diferentes linhagens celulares obtidas de animais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As folhas de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* utilizadas no trabalho foram adquiridas da Empresa Luar Sul Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios – Santa Cruz do Sul/RS, com número de lote 001/2011 e especificação das plantas (Anexo 1 e 2).

2.2 Extrações dos óleos essenciais

Para a obtenção dos óleos essenciais 100g das folhas secas foram submetidas à extração com arraste de vapor em aparelho Clevenger⁹, durante 4 horas, em triplicata. O óleo obtido foi seco com sulfato de sódio anidro concentrado sob N₂ (ultra puro) e armazenado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração até a realização da caracterização química.

2.3 Preparação dos extratos aquoso e etanólico

Para obtenção dos extratos etanólicos foram utilizados 35g de folhas secas de *Origanum vulgare* ou *Rosmarinus officinalis* em 350 mL de álcool etílico P.A.. A amostra e o etanol foram colocadas em balão e mantidos sob agitação constante em uma chapa de aquecimento com banho de óleo, até uma temperatura entre 65°C e 70°C por 24h, após o que o extrato foi filtrado. A evaporação foi realizada em um rotaevaporador até a obtenção de um extrato seco.

Para obtenção do extrato aquoso bruto, utilizou-se 25g de folhas secas de *Origanum vulgare* ou *Rosmarinus officinalis* e 250 mL de água destilada. As amostras foram mantidas sob agitação constante em chapa de aquecimento da mesma forma que para obtenção dos extratos etanólicos, mas por uma hora. Após decantação por 15 min, e filtração, adicionou-se 250 mL de água destilada no balão com as folhas e o sistema foi novamente aquecido e mantido sob agitação por mais uma hora. Essa técnica foi repetida até a obtenção de três extrações, as quais foram homogeneizadas.

O extrato aquoso foi acondicionado em bandejas, congelado a -70°C e liofilizado. O pó obtido foi acondicionado em pequenos frascos, hermeticamente fechados, para posterior utilização.

2.4 Condições das análises

2.4.1 Cromatografia Gasosa (GC/FID)

A cromatografia gasosa foi utilizada para análise dos óleos essenciais obtidos. Foi realizada em equipamento CG/FID (Schimadzu, modelo 2010) equipado com coluna de sílica DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), nas seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial de 40°C , aumentando na taxa de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até atingir 80°C , depois a taxa foi de $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até atingir 90°C e finalmente $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 280°C , permanecendo nesta temperatura por 10 min; $T_d = 300^{\circ}\text{C}$; $T_{inj} = 300^{\circ}\text{C}$; $T_{col} = 40^{\circ}\text{C}$; Split = 1:50. Foi preparada uma solução do óleo a 5000 mg L^{-1} em hexano e uma solução de 40 mg L^{-1} de um mix de padrões cromatográficos, dos quais foram injetadas $1 \mu\text{L}$. Os constituintes foram identificados por comparação entre o tempo de retenção dos padrões e das amostras.

2.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As análises cromatográficas dos extratos aquoso e etanólico de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. foram realizadas empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando o equipamento da Varian com detector por Arranjo de Diodos (DAD), coluna de fase reversa C-18 (Phenomenex Gemini, 25 cm x 4,6 mm x 5 μm). Fluxo de 1 mL min^{-1} , volume de injeção de $10 \mu\text{L}$. As soluções de extratos aquosos foram solubilizadas em água ultra purificadas, e as soluções de extratos etanólicos em metanol, utilizando balão volumétrico, individualmente. As diluições dos padrões de ácido rosmarínico, ácido caféico, ácido ferúlico, carnosol, ácido p-cumárico, ácido vanílico, ácido siríngico, vanilina, ácido sinápico, rutina, ácido carnósico, luteolina, apigenina, caempferol e quercetina foram preparadas em metanol.

2.5 Citotoxicidade

Para analisar a toxicidade as linhagens celulares Madin Darby bovine kidney (MDBK), Rabbit kidney (RK 13), Madin Darby canine kidney (MDCK) e Crandell feline kidney (CRFK) foram cultivadas em microplacas a 37°C com 5% de CO_2 durante 24 horas, em meio essencial mínimo de Eagle (E-MEM) contendo 10 % de soro fetal bovino. As monocamadas celulares foram tratadas com diferentes concentrações dos óleos essenciais, extratos aquosos e etanólicos de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis*. Após 72 horas a viabilidade celular foi mensurada através do ensaio MTT

(brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio)¹⁰, sendo os resultados lidos em espectrofotômetro (540 nm). Células tratadas somente com E-MEM foram usadas como controles. Foram consideradas não tóxicas aquelas concentrações cuja viabilidade celular foi próxima a 100%, quando comparadas aos controles celulares não tratados, tanto mediante observação por microscopia quanto no ensaio com MTT.

3. Resultados e discussões

3.1 Análise cromatográfica dos óleos essenciais por GC/FID

A concentração dos terpenos encontrados nas amostras de óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* foi calculada em relação à área normalizada dos picos, cujos tempos de retenção eram iguais aos tempos dos padrões. De acordo com o cromatograma obtido da amostra do óleo essencial de orégano analisada, pode-se constatar como compostos majoritários, α -terpineno, γ -terpineno, linalol, 4-terpineol e timol. A Figura 1 demonstra os picos identificados em comparação com os padrões para a análise da composição química do óleo essencial de *Origanum vulgare*, sendo numerados de acordo com a Tabela 1, que apresenta os padrões terpênicos e os seus respectivos tempos de retenção utilizados para a identificação dos compostos.

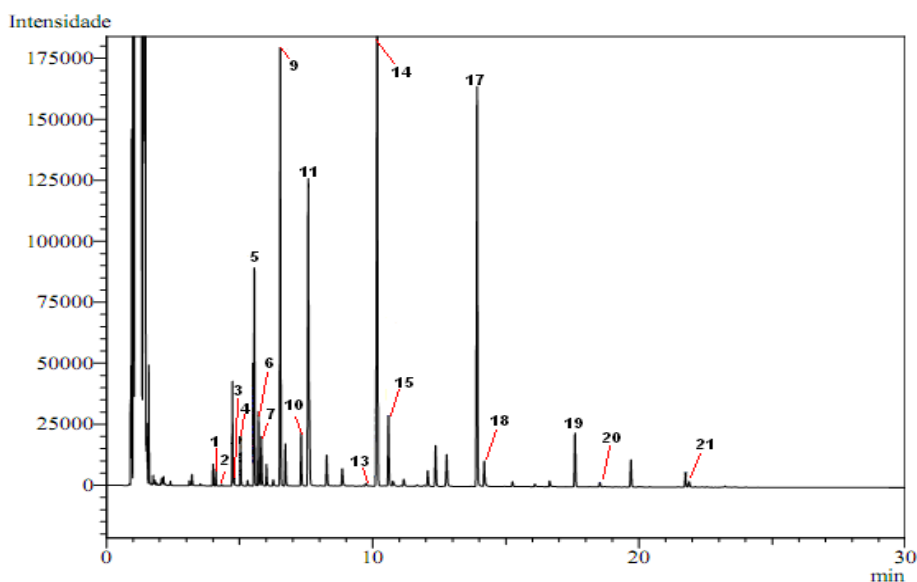


Figura 1. Cromatograma da amostra do óleo essencial de orégano obtidos via (GC/FID).

Tabela 1. Relação dos padrões terpênicos submetidos à cromatografia gasosa (GC/FID)

	Composto	Tempo de Retenção
1	α -pineno	4.119
2	Canfeno	4.330
3	β -pineno	4.813
4	Mirceno	5.035
5	α -terpineno	5.573
6	p-cimeno	5.709
7	Limoneno	5.816
8	1,8-cineol	5.886
9	γ -terpineno	6.544
10	Terpinoleno	7.308
11	Linalol	7.623
12	Cânfora	9.022
13	Borneol	9.774
14	4-terpineol	10.140
15	α -terpineol	10.615
16	Acetato de bornyl	13.706
17	Timol	13.901
18	Carvacrol	14.177
19	Trans-cariofileno	17.627
20	α -humoleno	18.559
21	Óxido de cariofileno	21.909

O conteúdo dos metabólitos secundários das plantas pode variar devido a fatores relacionados às condições ambientais, climáticas e experimentais como método de extração, dificultando uma análise comparativa com resultados de outros estudos^{2,8}. Entretanto, resultados semelhantes foram encontrados visando à obtenção do perfil cromatográfico do óleo essencial de *Origanum vulgare* com atividade frente a fungos de

interesse veterinário⁵, sendo observados como constituintes majoritários o 4-terpinenol, α -terpineol, timol e carvacrol, assim como p-cimeno, 1,8 cineol, limoneno, carvacrol, timol¹¹. Em outro estudo foram identificados os compostos 4-terpinenol, linalol, limoneno, α -terpineol em amostras de *Origanum majorana* L, e no *Origanum vulgare* L., timol, carvacrol, o-cimeno e α -terpineol através da cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa¹², concordando com os resultados obtidos no presente estudo. Relatos na literatura demonstraram que o carvacrol, encontrado no óleo essencial de *Origanum vulgare*, tem sido o constituinte responsável pela citotoxicidade^{13,14}.

De acordo com os resultados da identificação química do óleo essencial de alecrim pôde-se constatar os compostos majoritários, α -pineno, canfeno, 1,8-cineol e cânfora. A concentração dos terpenos encontrados nas amostras de óleos essenciais das folhas secas de alecrim foi calculada em relação à área normalizada dos picos, conforme a Figura 2.

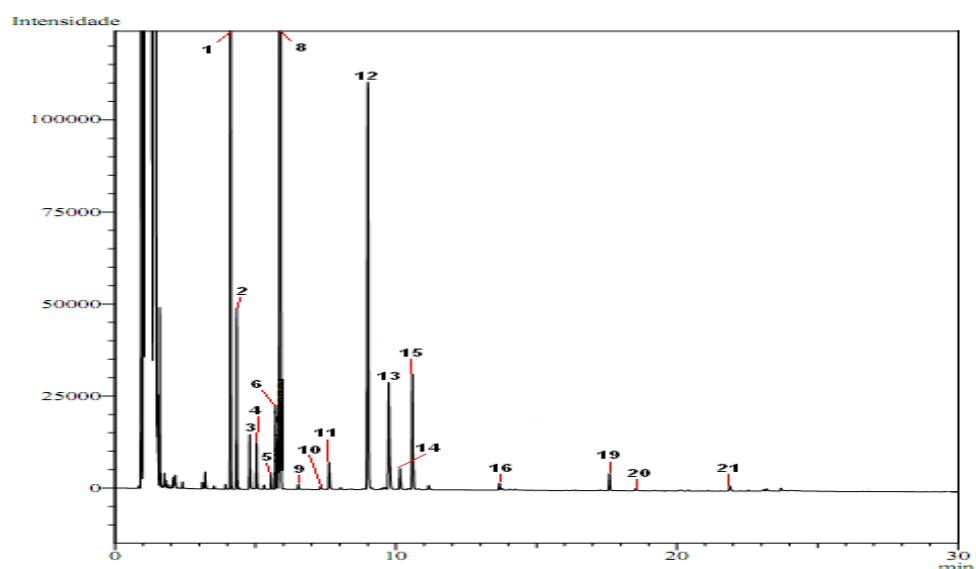


Figura 2. Cromatograma da amostra do óleo essencial de alecrim obtido via cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/FID).

Estudos recentes demonstraram resultados semelhantes aos nossos, sendo observado como compostos majoritários 1,8-cineol¹⁵, enquanto outros identificaram o canfeno, α -pineno, cânfora, eucaliptol e β -mirceno^{16,17}.

3.2 Análise cromatográfica dos extratos aquoso e etanólico por HPLC

Nos extratos aquosos e etanólicos de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis*, foram identificados os compostos fenólicos, ácido carnósico, ácido rosmarinico, luteolina, apigenina, caempferol e quercetina. O carnosol não foi identificado no extrato aquoso de *O. vulgare*, estando presente nos cromatogramas dos demais extratos desse estudo, e o ácido caféico não foi identificado nos extratos aquosos

de *O. vulgare* e *R. officinalis*. O extrato etanólico de *Origanum* apresentou o ácido p-cumárico, diferentemente do extrato etanólico de alecrim onde não foi encontrada esta substância. O extrato etanólico de *Origanum* apresentou maior quantidade de constituintes químicos identificados quando comparando com os outros extratos analisados. Os constituintes foram identificados em comparação com padrões, e desta forma outros compostos podem não ter sido detectados, outro aspecto relevante é em relação os solventes utilizados no estudo, relatos na literatura demonstram que os tipos de solventes utilizados interferem na quantidade de constituintes químicos extraídos^{18,19}.

Estudos identificaram nos extratos aquosos de *Origanum vulgare* a presença de ácido rosmarinico, apigenina e luteolina^{6,20}, assim como tem sido citada a presença de ácido cafeico no extrato metanólico de *Origanum vulgare*²¹. Dentre os flavonóides presentes no extrato aquoso e etanólico de *Origanum vulgare*, quercetina tem sido observado como composto majoritário²². Com relação a presença de ácidos fenólicos no *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis*, o ácido rosmarinico tem se destacado como composto majoritário^{23,24,25}.

3.3 Citotoxicidade

A adição dos diferentes extratos causou um decréscimo na viabilidade celular, proporcional às concentrações avaliadas. As concentrações não tóxicas detectadas nos ensaios para os óleos essenciais e extratos aquoso e etanólico de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* estão relatadas na (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações não tóxicas dos extratos e óleos essenciais de orégano e alecrim em µg/mL em diferentes linhagens celulares analisadas pelo ensaio MTT.

CÉLULAS	AA	EA	OA	AO	EO	OO
MDBK	50	6,25	0,023	50	12,5	0,052
RK13	12,5	3,125	0,023	3,125	12,5	0,013
CRFK	50	3,125	0,023	50	3,125	0,023
MDCK	50	6,25	0,023	50	25	0,013

AA: Aquoso de alecrim, **EA:** Etanólico de alecrim, **OA:** óleo essencial de alecrim, **AO:** Aquoso de orégano, **EO:** Etanólico de orégano, **OO:** óleo essencial de orégano

Os resultados demonstraram, que em concentrações a partir de 50µg/mL os extratos aquosos de orégano e alecrim não comprometeram as células MDCK, CRFK e

MDBK. Entretanto, somente a partir de 3,125 µg/mL do extrato aquoso de orégano e 12,5 µg/mL do extrato aquoso de alecrim as células RK13 não foram comprometidas na viabilidade. Com relação ao extrato etanólico de orégano para as células MDCK concentrações iguais ou inferiores a 25 µg/mL não foram tóxicas, enquanto que com o extrato etanólico de alecrim somente a partir da concentração de 6,25 µg/mL. Nas células CRFK a maior concentração não tóxica foi de 3,125 µg/mL tanto para o extrato etanólico de orégano quanto para o de alecrim. As células RK13 e MDBK apresentaram viabilidade celular de 100% a partir da concentração de 12,5 µg/mL do extrato etanólico de orégano adicionado. Os resultados de citotoxicidade dos extratos podem estar relacionados a presença ou não de determinada substância química, ou um sinergismo entre as substâncias presentes no extrato, já que existiu uma variabilidade de compostos químicos nos extratos. Estudo com ensaio de citotoxicidade de compostos isolados tais como ácido ferúlico, ácido transcinâmico e alguns flavonoides como quercetina e o caempherol, demonstraram concentrações tóxicas a partir de 120 µg/mL para os ácidos fenólicos; 35 µg/mL para os flavonóides caempferol e 10 µg/mL para a quercetina²⁶⁻²⁷, sendo que os compostos quercetina, ácido rosmarínico, ácido carnósico, luteolina e apigenina estavam presentes nos extratos aquoso e etanólico de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis*. Outra pesquisa relatou os efeitos citotóxicos de flavonóides visualizados pelo ensaio do MTT na presença ou ausência de compostos, usando as linhas celulares AML-2 sub-linha AML-2 /D100, demonstrado que os flavonoides com grupos 5-OH e/ou 7-OH apresentaram a maior citotoxicidade²⁸. Entre os flavonoides identificados nos extratos aquoso e etanólico de *O. vulgare* e *R. officinalis*, a quercetina apresenta 5-OH, podendo ser um dos compostos responsáveis pela citotoxicidade dos extratos.

Foi observado que os óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* apresentam-se mais tóxicos as células quando comparados aos extratos aquosos e etanólicos de ambas as plantas, uma vez que somente em concentrações próximas a 0,023 µg/mL não foi observado toxicidade do óleo essencial de alecrim nas células analisadas e com relação ao óleo essencial de orégano as concentrações não tóxicas foram de 0,013 µg/mL a 0,052 µg/mL. Resultados semelhantes foram descritos em um estudo, onde 36,13% de viabilidade celular foi detectada com uso do óleo essencial de alecrim na concentração de 0.0625% (v/v), em células SK-OV-3. Na concentração de 1% (v/v), a adição do óleo essencial resultou em viabilidade celular inferior a 11%²⁹.

Outro estudo também realizou ensaio citotóxico com terpenos e com óleo essencial de *Eucalyptus benthamii*, de acordo com os resultados o α -pineno não apresentou citotoxicidade a partir 192.42 µg/mL, γ -terpineno na concentração de 136.6 µg/mL, 4-terpineol foi de 50.20 µg/mL e com o óleo essencial foi de 54.96 µg/mL, demonstrando o aumento do efeito biológico pelo sinergismo entre os componentes individuais da planta ministrados na mesma dose³⁰. Outra pesquisa utilizou compostos voláteis isolados para avaliação da citotoxicidade *in vitro* em diferentes linhagens celulares hepáticas, epiteliais, linfócitos e fibroblastos, demonstrou que o 4 terpineol, α -terpineol, terpinoleno, α -pineno e 1,8 cineol foram os responsáveis pela citotoxicidade. Em um estudo realizado com as espécies de *Origanum manjerona* e *Origanum vulgare*

em diferentes células humanas pôde-se verificar maior citotoxicidade do óleo essencial de *Origanum manjerona* composto por 4 terpienol, linalol, limoneno e α -terpineol, na concentração de 70 μ g/mL na célula MCF-7, 85 μ g/mL na célula LNCaP, 300 μ g/mL na célula NIH-3T3 quando comparado ao de *Origanum vulgare*, composto por timol, carvacrol e α -terpineol, na concentração de 100 μ g/mL na célula MCF-7, 90 μ g/mL na célula LNCaP, 320 μ g/mL na célula NIH-3T3¹². Em outros estudos de citotoxicidade, utilizando mesma metodologia do presente estudo, mas com óleos essenciais de *Thymus zygis* subsp. *Sylvestris*, também foi detectado relativamente alta toxicidade na concentração 0.08 a 0.16 μ L/mL³¹. Enquanto que um estudo com extrato aquoso e óleo essencial de *Thymus daenensis*, *Thymus vulgaris*, *Zataria multiflora* pertencentes a mesma família do *Origanum vulgare*, foram observadas toxicidade (200 μ g/mL) para os extratos aquosos *Thymus vulgaris*, *Thymus daenensis*, e *Zataria multiflora* e para o óleo essencial (1000 μ g/mL)³². No presente estudo, os resultados das concentrações não tóxicas foram maiores nos extratos, quando comparadas com as concentrações dos óleos essenciais. Sabe-se que os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, que pode justificar a maior citotoxicidade dos óleos², devido a grande quantidade de terpenos presentes nos OA e OE que não se apresentaram nos extratos. O presente trabalho foi o primeiro a relatar um estudo com relação à citotoxicidade dos óleos essenciais e extrato aquoso e etanólico de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* nas células MDBK, MDCK, RK13 e CRFK. Tais células são amplamente utilizadas para isolamento e crescimento de diversos vírus. A partir da determinação da concentração não tóxica dos extratos de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* será possível a realização de estudos sobre ações antivirais. A toxicidade dos extratos bem como de seus compostos depende da dose, sendo muitas vezes produzidas reações tóxicas somente em doses elevadas.

3.4 Conclusão

Os principais compostos nos óleos de *O. Vulgare*, foram α -terpineno, γ -terpineno, linalol, 4-terpineol e timol, enquanto no óleo de alecrim foram encontrados o α -pineno, canfeno, 1,8-cineol e cânfora, enquanto que para os extratos foram ácido rosmarinico, ácido carnosico, luteolina, caempferol, apigenina e quercetina. Os óleos essenciais nas linhagens celulares avaliadas mostraram-se mais tóxicos quando comparado com os extratos aquoso e etanólico de ambas as plantas, enquanto, os extratos aquosos demonstraram maior viabilidade celular que os extratos etanólicos. Logo, a análise da citotoxicidade dos óleos essenciais e extratos de alecrim e orégano é uma etapa importante, para utilização segura nas avaliações da potencialidade biológica.

3.5 Referências bibliográficas

- 1 LORENZI, H.; MATOS, F. J. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas. 1º ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2006. 324-512
- 2 SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 417

- 3 CHUN, S.S.; VATTEM, D.A.; LIN, Y.T.; SHETT, K. Phenolic antioxidants from clonal orégano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*, 2005, **40**, 809–816.
- 4 CELIKTAS, O.Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 2007, **100**, 553-9.
- 5 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.*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2008.
- 6 TSIMOGIANNIS, D.; SAMIOTAKI, M.; PANAYOTOU, G.; OREOPOULOU, V. Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*, 2007, **12**, 593-606.
- 7 PAPAGEORGIOU, V.; MALLOUCHOS, A.; KOMAITIS, M. Investigation of the Antioxidant Behavior of Air- and Freeze-Dried Aromatic Plant Materials in Relation to Their Phenolic Content and Vegetative Cycle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, **56**, 5743–5752.
- 8 GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 2006, **30**, 2, 374-381.
- 9 Farmacopéia Brasileira IV – Parte I; 4ª ed., Atheneu: São Paulo; 1988.
- 10 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *Journal of Immunological Methods*. 1983, **65**, 55-63.
- 11 BARANAUSKIENE, R.; VENSKUTONIS, P.R.; DEWETTINCK, K.; VERHE, R. Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein-based matrices. *Food Research International*, 2006, **39**, 413–425.
- 12 HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; RASHEED, S.; NIGAM, P. S.; JANNEH, O.; SARKER, S. D. Composition, antioxidant and chemotherapeutic properties of the essential oils from two *Origanum* species growing in Pakistan. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2011, **21**(6): 943-952.
- 13 JAAFARI, A. et al. Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of *Moroccan thyme*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2007, **17**, 4, 477-491.
- 14 ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S. Plant Extracts: Search for New Alternatives to Treat Microbial Diseases. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2009, **10**, 106-121.
- 15 KABOUCHE, Z. et al. Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *International Journal Aromatherapy*, 2005, **15**, 3, 129-33.
- 16 ANGIONI, A. et al. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, **52**, 11, 3530-5.

- 17 HUSSAIN, A.I. et al. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Brazilian Journal of Microbiology, 2010, 41, 4, 1070-8.
- 18 DANILA, O.A., GATEA, F., RADU, G.L. Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs, Chemistry of Natural Compounds, 2011, **47**, No. 1.
- 19 TAFURI, N. F. Atividade antiviral de extratos vegetais e flavonóides contra o Bovine herpesvirus 1 (BoHV1). 2011. Dissertação (Mestrado em Bioquímica agrícola)-Universidade de Viçosa, Minas Gerais.
- 20 KOSAR, M.; DORMAN, H.J.D.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. Food Chemistry, 2005, **91**, 525–533.
- 21 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, 2008, **31**, 402–414.
- 22 SY, L.; JY, R.; WB, P. Antiherpetic Activities of Flavonoids against herpes simplex virus type 1(HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro. Archives of Pharmacology Research, 2005, 28, 1293-1301.
- 23 ZIAKOVA, A.; BRANDSTETEROVA, E. Validation of HPLC Determination of Phenolic Acids Present in Some Lamiaceae Family Plants. Journal of liquid chromatography & related technologies1, 2003, **26**, 3, 443–453.
- 24 NOLKEMPER, S.; REICHLING, J.; STINTZING, F.C.; 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 Medica. 2006, **72**(15), 1378-1382.
- 25 REICHLING, J.; NOLKEMPER, S.; STINTZING, F.C.; SCHNITZLER, P. Impact of Ethanolic Lamiaceae Extracts on Herpesvirus Infectivity in Cell Culture. Forsch Komplementmed, 2008, **15**, 313–320.
- 26 BRUM, L.P. Atividade antiviral dos compostos fenólicos (ácidos ferúlico e transcinâmico) e dos flavonoides (quercetina e kaempferol) sobre os herpesvirus bovino1, herpesvirus bovino5 e vírus da cinomose canina. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2006.
- 27 MUSCHIETTI, L.V. Atividades biológicas dos flavonoides naturais. Química de produtos naturais novos fármacos e a moderna farmacognosia. 3º ed., editor Univali, Itajai, 2012.
- 28 JEONG, J.M.; CHOL, C.H.; KANG, S.K.; LEE, I.H.; LEE, J.Y.; JUNG, H. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007, 10, **4**, 537.
- 29 WANG, W.; LI, N.; LUO, M.; ZU, Y.; EFFERTH, T.; Antibacterial Activity and Anticancer Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Compared to That of Its Main Components. Molecules, 2012, **17**, 2704-2713.

- 30 BOSCARDIN, D.P.M.; SARTORATTO, A.; MAIA, B. H. L. DE N. S.; PAULA, J.P.; NAKASHIMA, T.; FARAGO, P.V.; KANUNFRE, C.C. In Vitro Cytotoxic Potential of Essential Oils of *Eucalyptus benthamii* and Its Related Terpenes on Tumor Cell Lines. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012, 8.
- 31 GONÇALVES, M.J., CRUZ, M.T., CAVALEIRO, C.; LOPES, M.C., SALGUEIRO, L. Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *Sylvestris*. Industrial Crops and Products, 2010, **32**, 70–75.
- 32 SADERI, H.; ABBASI, M. Evaluation of anti-adenovirus activity of some plants from Lamiaceae family grown in Iran in cell culture. African Journal of Biotechnology, 2011, 10, **76**, 17546-17550.

4.3 Atividade virucida do extrato etanólico de *Origanum vulgare* frente ao vírus da arterite equina

Daiane Einhardt Blank^{*,†}, Rayra Almeida Correa[§], Gabriela Hörnke Alves[†],
Rogério Antonio Freitag[†], and Marlete Brum Cleff[§], Silvia de Oliveira Hübner[§],

Formatado de acordo com as normas da Revista Veterinary Microbiology

Atividade virucida do extrato etanólico de *Origanum vulgare* frente ao vírus da arterite equina

Daiane Einhardt Blank^{*†}, Rayra Almeida Correa[§], Gabriela Hörnke Alves[†], Rogério Antonio Freitag[‡], and Marlete Brum Cleff[§], Silvia de Oliveira Hübner[§],

[§]Faculdade Veterinária - UFPel – Pelotas/RS, Brazil, [†]Postgraduate Program in Biochemistry and Bioprospection (PPGBBIO) - UFPel – Pelotas/RS, Brazil, [‡]Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences (CCQFA) - UFPel- Pelotas/RS, Brazil

ABSTRACT

An ethanolic extract (EEO) of *Origanum vulgare* was tested for their antiviral activity against equine arteritis virus (EAV) in RK13 cultured cells. The antiviral activity was monitored by virus yield reduction assay and under virucidal protocol. The addition of EEO after cellular infection reduced significantly the titer of EAV ($p < 0.05$, Student's test) with percentage inhibition (PI) of 90 %. The inhibition could be via a direct interaction with the virus envelope, thereby decreasing the infectivity of virus. This report provides evidence that the EEO can represent a new antiviral agent to arterivirus.

Palavras –chaves: Orégano, citotoxicidade, extratos

Introdução

O vírus da arterite eqüina (EAV) pertence à família Arteriviridae, seu genoma consiste de uma molécula de RNA linear de sentido positivo, com replicação no citoplasma das células infectadas. Os arterivírus apresentam diâmetro de 50 a 70 nm, capsídeo icosaédrico e envelope (Quinn, 2005; Flores, 2007; Summers-lawyer et al., 2011).

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 (Quinn, 2005; Sáenz et al., 2010). Para o controle da enfermidade, podem ser utilizadas vacinas vivas ou inativadas

(Quinn, 2005; Summers-lawyer et al., 2011), no entanto, não existe qualquer composto específico para arterivirus. Extratos e óleos essenciais de plantas, têm sido investigadas com o interesse na descoberta do potencial antiviral das substâncias presentes (Flores, 2007; Rajbhandari et al., 2009; Sadari et al., 2011). Dentre as plantas, a família Lamiaceae vêm destacando-se por suas atividades antivirais (Mancini et al., 2009; Vimalanathan; Hudson, 2012). Estudos preliminares evidenciaram o potencial antiviral de extratos aquoso e etanólico de *Origanum sp* (Blank, D. E. et al., 2012). O objetivo deste trabalho foi realizar a identificação dos constituintes químicos do extrato etanólico de *Origanum vulgare* e avaliar atividade antiviral frente ao EAV e determinar seu mecanismo de ação.

Materiais e métodos

Planta e extrato

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 especificação botânica (Anexo 1 e 2).

Para obtenção dos extratos etanólicos foram utilizados 35g de folhas secas e foram imersas em 350 mL de álcool etílico P.A. (Synth) e mantidos sob agitação constante em temperatura entre 65 °C a 70 °C. Após 24h o extrato foi filtrado e realizada evaporação do álcool etílico em um rotaevaporador até a obtenção de um extrato seco.

Caracterização química

As análises cromatográficas dos extratos aquoso e etanólico de *Origanum vulgare* L. foram realizadas empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando o equipamento da Varian com detector Detector por Arranjo de Diodos (DAD), coluna de fase reversa C-18 (Phenomenex Gemini, 25 cm x 4,6 mm x 5 µm). Fluxo de 1 mL min⁻¹, volume de injeção de 10 µL. As soluções de extratos etanólicos foram solubilizadas em metanol e foram preparadas em balão volumétrico individualmente. Os padrões utilizados estavam com pureza ≥ 94%.

Células e vírus

Células RK13 (ATCC® Number: CCL-37TM, Rockville, USA) foram mantidas em meio E-MEM (meio essencial mínimo de Eagle) contendo 10% de soro fetal bovino, penicilina (Sigma Aldrich, USA), estreptomicin (Vetec, Brazil), enrofloxacin (Bayer, Brazil) e anfotericina B (Cristália, Brazil) em estufa a 37 °C.

A cepa Bucyrus do EAV, gentilmente fornecida pelo Laboratório de Virologia da UFSM, foi propagada em RK13 e utilizada em todos os estudos.

Citotoxicidade

Células RK13 foram cultivadas em microplacas a 37 °C e 5 % de CO₂ e após confluência, o meio foi removido e diferentes concentrações do extrato etanólico de *O. Vulgare* (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-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide), conforme descrito Mosmann (1983).

Atividade antiviral do extrato etanólico de *Origanum vulgare*

Atividade antiviral do extrato etanólico de *O. vulgare* frente ao EAV foi avaliada por três diferentes mecanismos. Inicialmente verificou-se o efeito de pré-tratamento das células com o EEO. Após retirada do MEM foi adicionado 100 µL por cavidade da concentração não tóxica do EEO (12,5 µg/mL) em monocamadas confluentes de células RK13. Após duas horas o extrato foi removido e, sob as células tratadas, foram realizadas titulações do EAV, conforme descrito por Behrends and Karber (Mahy and Kangro, 1996). Os títulos foram expressos como TCID₅₀/100µL.

Atividade antiviral após infecção celular foi avaliada através de um ensaio realizado como descrito por Luganini et al. (2010) com modificações. Células RK 13 foram infectadas com 100 TCID₅₀ do EAV durante 1 hora a 37 °C. O inóculo foi aspirado e adicionado MEM ou MEM associado a EEO (12,5 µg/mL) e as placas foram mantidas por 72 horas.

No terceiro ensaio, 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 e analisados pelo método estatístico utilizando o teste de Fisher. Valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

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 µL/mL mediante o método do MTT. Tal concentração foi utilizada em todos os testes realizados.

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector DAD, foi utilizada e as substâncias químicas identificadas no extrato etanólico de *Origanum vulgare* e os seus respectivos tempos de retenção estão demonstrados na Tabela 1. A substância que apresentou menor tempo de retenção foi o ácido caféico e a apigenina demonstrou um maior tempo de retenção.

Tabela 1. Composição química do extrato etanólico de *O. vulgare* identificada por CLAE e os seus respectivos tempos de retenção em comparação aos padrões.

Substância	Concentração (µg/mL)	TR (min)
Ácido caféico	980	14,864
Ácido p-cumárico	980	25,480
Ácido rosmarínico	1176	53,922
Quercetina	1078	60,328
Luteolina	980	60,683
Carnosol	1078	67,013
Ácido carnósico	970	67,307
Caempferol	810	68,080
Apigenina	1425	69,121

Resultados semelhantes foram relatados por Danila; Gatea; Radu, (2011) na análise de extrato hidroalcólico de *Origanum vulgare* onde os compostos majoritários foram o ácido rosmarínico e p-cumárico e apigenina.

Rutina, ácido vanílico e ácido ferúlico foram utilizados como padrões no presente estudo, mas não foram encontrados no extrato etanólico de *Origanum vulgare*,

sendo que tais compostos foram detectados em extrato metanólico da planta (Proestos; Kapsokefalou; Komaitis, 2008).

No primeiro ensaio de investigação da atividade antiviral no EAV, em que as células foram tratadas com o EEO antes da titulação do vírus, não foram detectadas alterações significativas nos títulos do EAV, sugerindo incapacidade do extrato em inibir a infecção viral. Possivelmente o EEO não induz um estado antiviral nas células RK13, e os compostos presentes não ocupam sítios de ligação e adsorção do EAV nas células utilizadas. Contudo, quando o EEO foi adicionado após infecção celular, houve redução na produção de partículas virais, como evidenciado pela redução significativa no título viral ($P < 0.05$).

Pesquisadores relatam que os compostos fenólicos, entre eles os flavonoides, possam ser potenciais drogas antivirais, promissores como terapia antiviral (Chiang et al., 2003; Gravina et al., 2010; Cotin et al., 2012). Compostos fenólicos presentes em outras plantas, tem demonstrado efeito antiviral frente ao herpesvírus simplex, vírus parainfluenza e adenovírus (Kaul et al., 1985). Entre os compostos fenólicos identificados nos nossos extratos vegetais, o ácido rosmarinico tem sido relatado com potencialidade antiviral (Schnitzler et al., 2008). Estudo comprovou a eficiência dos ácidos caféico e rosmarinico na inibição do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) (Bailly et al., 2005). O ácido caféico demonstrou ação antiviral frente aos vírus herpesvírus simplex tipo 1, vírus parainfluenza tipo 3 e vírus da Hepatite B (VHB) (Wang et al., 2009; Nakama et al., 2012) e poliovirus type 1 (PV1) (Bufalo et al., 2009).

Outros compostos químicos identificados no extrato utilizado no presente estudo foram a apigenina, carnosol e quercetina, que também podem ter sido responsáveis pela atividade antiviral do extrato etanólico de *Origanum vulgare* (Aruoma et al., 1996; Choi et al., 2009; Gravina et al., 2010). Estudos verificando o potencial de inibição da replicação do citomegalovirus humano relataram possível efeito do sinergismo, da combinação de quercetina e balcaleína (Cotin et al., 2012). Assim como, foi relatada a inativação das partículas virais pela quercetina contra o herpesvírus bovino tipo 1 na fase de adsorção (Tafari, 2011). Ação da quercetina, pode estar relacionada a sua ligação com as estruturas virais, as glicoproteínas do envelope viral, que impede a ligação do vírus a célula, fazendo uma proteção da célula frente a infecção (Chiang et al., 2003; Gravina et al., 2010). Outras pesquisas relatam a ação antiviral da quercetina, inibido a enzima transcriptase reversa de vírus RNA (Wang et al., 1994; Sy et al.,

2005). Além desse efeito, a quercetina, pode ser responsável pela inibição do efeito sobre a infecção do vírus influenza (Kumar et al., 2005).

No estudo da atividade antiviral de flavonoides frente ao vírus da diarreia viral suína epidêmica (PEDV), foi relatado que a atividade antiviral da apigenina, da quercetina e da luteolina estando relacionada a posição da hidroxila em um dos anéis aromáticos na molécula. Destaca-se que a apigenina possui grupo hidroxila na posição 4, a luteolina e quercetina nas posições 3 e 4 (Choi et al., 2009).

O caempferol também tem sido relatado na literatura como um potencial antiviral frente ao herpesvírus (Amoros et al., 1992), podendo ser uma das substâncias presentes no extrato etanólico de *O. vulgare*, com possível ação frente ao EAV. Também foi relatado a efetividade do carnosol frente ao (HIV) (Aruoma et al., 1996).

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.

Conclusão

Com os resultados evidenciados nesse estudo conclui-se que o EEO é virucida e pode representar um bom protótipo para o desenvolvimento de um novo agente antiviral, apresentando-se promissor para o arterivírus.

Referências bibliográficas

Amoros, M.; Simões, C.M.; Girre, L.; Sauvager, F.; Cormier, M., 1992. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex vírus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products*, 55, 1732-1740.

Aruoma, O.I.; Spencer, I.J.P.E.; Rossi, R.; Aeschbach, R.; Khan, A.; Mahmood, N.; Munoz, A.; Murcia, A.; Butler, J.; Halliwell, B., 1996. An Evaluation of the Antioxidant and Antiviral Action of Extracts of Rosemary and Provençal Herbs. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 449—456.

- Bailly, F.; Queffelec, C.; Mbemba, G.; Mouscadet, J.; Cotel, P., 2005. Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activities of caffeic acid dimers derived from *Salvia officinalis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15, 5053–5056.
- Blank, D.E.; Alves, G.H.; Hübner, S.O.; Freitag, R.A.; Cleff, M.B. Atividade antiviral dos extratos aquoso e etanólico de *Origanum sp.* In: Congresso Ibero Americano de Fitoterapia, Foz do Iguaçu, 2012.
- Bufalo, M.C.; Figueiredo, A.S.; Sousa, J.P.B.; Candeias, J.M.G.; Bastos, J.K.; Sforcin, J.M., 2009. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and Mpropolis by cell viability determination and real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1669–1680.
- Chiang, L.C.; Chiang, W.; Liu, M.C.; Lin, C.C., 2003. In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52:194-198.
- Choi, H.; Kim, J.; Lee, C.; Ahn, Y.; Song, J.; Baek, S.; Kwon, D., 2009. Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus. *Antiviral Research*, 81, 77–81.
- Cotin, S.; Calliste, C.; Mazon, M.; Hantz, S.; Duroux, J.; Rawlinson, W.; Ploy, M.; Alain, S., 2012. Eight flavonoids and their potential as inhibitors of human cytomegalovirus replication. *Antiviral Research*, 6.
- Danila, O.A., Gatea, F., Radu, G.L., 2011. Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs, *Chemistry of Natural Compounds*, 47, 1.
- Flores, E.F., 2007. Estrutura e composição dos vírus. In: FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. Editora UFSM, Santa Maria/RS, p. 21-33.
- Gravina, H.D.; Tafuri, N.F.; Silva junior, A.; Fietto, J.L.R.; Oliveira, T.T.; Diaz, M.A.N.; Almeida, R., 2010. In vitro assessment of the antiviral potential of trans-cinnamic acid, quercetin and morin against equine herpesvirus 1. *Research in veterinary science*.
- Kaul, T.N.; Middleton, E.J.R.; Ogra, P.L., 1985. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal of Medical Virology*, 15:71–9.
- Kumar, P., Khanna, M., Srivastava, V., Tyagi, Y.K., Raj, H.G., Ravi, K., 2005. Effect of quercetin supplementation on lung antioxidants after experimental influenza virus infection. *Experimental Lung Research*, 31:449–59.
- Luganini, A., 2010. Peptide-derivatized dendrimers inhibit human cytomegalovirus infection by blocking virus binding to cell surface heparan sulfate. *Antiviral Research*, 85:532–540.
- Mahy, B.W.J.; Kangro, H.O., 1996. *Virology methods manual*. San Diego, CA: Academic, 374p.
- Mancini, D.A.P.; Torres, R.P.; Pinto, J.R.; Mancini-filho, J., 2009. Inhibition of DNA Virus: Herpes-1 (HSV-1) in cellular culture replication, through an antioxidant

treatment extracted from rosemary spice Brazilian. Journal of Pharmaceutical Sciences v.45, n.1.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Journal of Immunological Methods, 65, 55-63.

Nakama, S.; Tamaki, K.; Ishikawa, C.; Tadano, M.; Naokimori, 2012. Efficacy of *Bidens pilosa* Extract against Herpes Simplex Virus Infection *In Vitro* and *In Vivo*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

Proestos, C.; Kapsokefalou, M.; Komaitis, M., 2008. 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.

Quinn, P. J., 2005. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: ARTMED, 512.

Rajbhandari, M.; Mentel, R.; Jha, P. K.; Chaudhary, R. P.; Bhattarai, S.; Gewali, M.B.; Karmacharya, N.; Hipper, M.; Lindequist, U., 2009. Antiviral activity of some plants used in nepalese traditional medicine. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine , 6(4): p.517-522.

Saderi, H.; Abbasi, M., 2011. Evaluation of anti-adenovirus activity of some plants from Lamiaceae family grown in Iran in cell culture. African Journal of Biotechnology, v.10(76), p.17546-17550.

Sáenz, J.R., 2010. Arterite Viral Equina: Perspectivas Epidemiológicas e de Intervenção. Revista Colombiana de Ciencias Pecuaria, 23, p.501-512.

Schnitzler, P.; Nolkemper, S.; Stintzing, F.C.; Reichling, J., 2008. Comparative in vitro study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations, Phytomedicine, 15, p.62–70.

Summers-lawyer, K.A.; Go, Y.Y.; Lu, Z.; Timoney, P.J.; Mccue, P.M.; Zhang, J.; Shuck, K.M.; Bruemmer, J., 2011. Response of Stallions to Primary Immunization with a Modified Live Equine Viral Arteritis Vaccine. Journal of Equine Veterinary Science, 31, p. 129-138.

Sy, L.; Jy, R.; Wb, P., 2005. Antiherpetic Activities of Flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro. Archives of Pharmacology Research, 28: p 1293-1301.

Tafari, N. F., 2011. Atividade antiviral de extratos vegetais e flavonóides contra o Bovine herpesvirus 1 (BoHV1). Dissertação (Mestrado em Bioquímica agrícola)-Universidade de Viçosa, Minas Gerais.

Vimalanathan, S.; Hudson, J., 2012. Anti-Influenza Virus Activities of Commercial Oregano oils and their Carriers. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 02, 214-218.

Wang, J.N.; Hou, C.Y.; Liu, Y.L.; Lin, L.Z.; Gil, R.R.; Cordell, G.A., 1994. Swertifrancheside, an HIV-reverse transcriptase inhibitor and the first flavone-xanthone dimmer, from *swertia franchetiana*. *Journal of natural products*, 57, 211-217.

Wang, G.; Shi, L.; Ren, Y.; Liu, Q.; Liu, H.; Zhang, R.; Li, Z.; Zhu, F.; He, P.; Tang, W.; Tae, P.; Li, C.; Zhao, W.; Zuo, J., 2009. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid in vivo and in vitro. *Antiviral Research*, 83, 186–190.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados e discutidos nos artigos, foram elaboradas as seguintes conclusões sobre o trabalho desenvolvido:

a) As ferramentas de identificação GC/FID e HPLC mostraram-se eficientes na identificação dos constituintes químicos dos extratos aquoso, etanólico e óleo essencial de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis*, pode-se observar no óleo essencial de orégano os compostos α -terpineno, γ -terpineno, linalol, 4-terpineol e timol e no óleo de alecrim o α -pineno, canfeno, 1,8-cineol e cânfora, enquanto que para todos extratos foram ácido rosmarínico, ácido carnósico, luteolina, caempferol, apigenina e quercetina.

b) Sobre a avaliação da citotoxicidade dos referidos óleos essenciais e extratos em linhagens celulares observou-se que os óleos essenciais foram mais tóxicos quando comparados com os extratos aquoso e etanólico de ambas as plantas.

c) O extrato etanólico de *Origanum vulgare* possui atividade antiviral significativa frente ao EAV e os extratos aquoso e etanólico exercem ação antiviral frente ao CDV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN M., WEBER H. & WYLER R. Aspects of Infectious Bovine Rhinotracheitis eradication programmes in a fattening cattle farm. **Preventive Veterinary Medicine** 9, p.121-130, 1990.
- AKULA, S.M.; HURLEY, D.J.; WIXON, R.L.; WANG, C.; CHASE, C.C.; Effect of genistein on replication of bovine herpesvirus type 1. **American Journal of Veterinary Research** 63, p.1124-1128, 2002.
- ALI, N.A.A.; JULICH, W.D.; KUSNICK, C.; LINDEQUIST, U. Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. **Journal of Ethnopharmacology** 74, p.173–179, 2001.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E. BARILE, D.; COISSON, J. D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO,V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal Agricultural Food and Chemistry** v.52, p.3530-3535, 2004.
- ARNS, C.W.; SPILKI, F.R.; ALMEIDA, R.S. **Paramyxoviridae**. . In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Editora UFSM, Santa Maria/RS, p. 659-677, 2007.
- ARORA, P.; DIXIT, N.M. Timing the emergence of resistance to anti-HIV drugs with large genetic barriers. **Plos Computational Biology** v.3, p.305, 2009.
- AULT, A.; ZAJACA, A.M.; KONGA, W.; GORRESA, J.P.; ROYALSC, M.; WEI, C.; BAOA, S.; YANGA, Z.; REEDYB, S. E.; STURGILL, T. L.; PAGEB, A. E.; DONOFRIO-NEWMANB, J.; ADAMSB, A.A.; BALASURIYAB, U. B.R. HOROHOVB, D.W.; CHAMBERSB, T. M.; NABEL, G.J.; RAOA, S.S. Immunogenicity and clinical protection against equine influenza by DNA vaccination of ponies. **Vaccine** 30, p.3965–3974, 2012.
- BAILLY, F., QUEFFELEC, C., MBEMBA, G., MOUSCADET, J.E., COTELLE, P., Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activities of caffeic acid dimers from *Salvia officinalis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 15, p.5053–5056, 2005.
- BAKKALI F., AVERBECK S., AVERBECK D., IDAOMAR M. Biological effects of essential oils-a review. **Food and Chemical Toxicology** 46, p.446–475, 2008.
- BARANAUSKIENE R.; VENSKUTONIS P.R.; DEWETTINCK K.; VERHE R. Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein-based matrices. **Food Research International** 39: p. 413–425, 2006.
- BIASI, L.A.; DESCHAMPS, C., **Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. 1º edição, Curitiba, editora Layer Studio Gráfico e editora Ltda, 2009.

BOHM, M.; THOMPSON, H.; WEIR, A. Serum antibodies titres to canine parvovirus, adenovirus and distemper virus in dogs in the UK which had not been vaccinated for at least three years. **Veterinary Record** v.154, p.457-463, 2004.

BERTORELLO, A.M.; APERIA, A.; WALAAS, S.I.; NAIRN, A.C.; GREENGARD, P. Phosphorylation of the catalytic subunit of Na^+/K^+ -ATPASE inhibits the activity of the enzyme. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America** 88: p.11359-11362, 1991.

BØTNER, A.; BELSHAM, G.J. Virus survival in slurry: Analysis of the stability of foot-and-mouth disease, classical swine fever, bovine viral diarrhoea and swine influenza viruses. **Veterinary Microbiology** 157 p.41–49, 2012.

BRUM, LARISSA **Atividade antiviral dos compostos fenólicos (ácidos ferúlico e transcinâmico) e dos flavonóides (quercetina e kaempferol) sobre os herpesvírus bovino 1, herpesvírus bovino 5 e vírus da cinomose canina**. 2006. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

BRUM, M.C.S.; WEIBLEN, R. Detecção, identificação e quantificação de vírus. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Editora UFSM, Santa Maria/RS, p.61-75, 2007.

BRUNETON, J. Farmagognosia, Fitoquímica. **Plantas Medicinales**. Ed.I ACRIBIA S.A/Zaragoza, Espanha, 2. ed, p.1099, 2001.

BUSSATA, C.; MOSSI, A.J.; RODRIGUES, M.R.A.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, J.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de óleo essencial de *Origanum vulgare* em lingüiça. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38 n.4, 2007.

CANAL, C.W.; VAZ, C.S.L.V. Drogas antivirais. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Editora UFSM, Santa Maria/RS, p. 354-355, 2007.

CARVALHO, C. M. G. et al. Avaliação da qualidade de extratos vegetais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.53-62, 2006.

CAVANAGH D. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. **Archives of Virology**, 142, p.629-633, 1997.

CHUN, S.S.; VATTEM, D.A.; LIN, Y.T.; SHETT, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, 40,p.809–816, 2005.

CLEFF, MARLETE **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.

DANILA, O.A., GATEA, F., RADU, G.L. Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs, **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, 2011.

DECARO, N.; MARI, V.; SCJARRETTA, R.; COLAO, V.; LOSURDO, M. CATELLA, C.; ELIA, G.; MARTELLA, V. GIUDICE, G.D.; BUONAVOGLIA, C. Immunogenicity and protective efficacy in dogs of an MF59TM-adjuvanted vaccine against recombinant canine/porcine coronavirus. **Vaccine** 29 p. 2018–2023, 2011.

DEZENGRINI, R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Soroprevalência das infecções por parvovírus, adenovírus, coronavírus canino e pelo vírus da cinomose em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural** vol.37 n.1 Santa Maria, 2007.

DIEL, D.G.; ALMEIDA, S. R. DE; WEIBLEN, R.; FRANDOLOSO, R.; ANZILIERO, D.; KREUTZ, L.C.; GROFF, F.H.S.; FLORES, E.F. Prevalência de anticorpos contra os vírus da influenza, da arterite viral e herpesvírus em eqüinos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.5, Santa Maria, 2006.

DORMAN, H.J.D., BACHMAYER, O., KOSAR, M., HILTUNEN, R., Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52, p.762–770, 2004.

FERRO, DEGMAR; **Fitoterapia - conceitos clínicos**, Editora Atheneu: São Paulo, 2008.

FLORES E.F. **Estrutura e composição dos vírus**. In: FLORES, E. F. Virologia Veterinária. Editora UFSM, Santa Maria/RS, p. 21-33, 2007.

FLORES, E.F.; LOVATO, L.T.; SILVA, M.S.; DEZENGRINI, R.; DIEL, D.G. **Orthomyxoviridae**. In: FLORES, E. F. Virologia Veterinária. Editora UFSM, Santa Maria/RS, p. 723-738, 2007

FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. **Herpesviridae**. In: FLORES, E. F. Virologia Veterinária. Editora UFSM, Santa Maria/RS, p. 435-485, 2007

GERRIETS, W.; JOY, N.; HUEBNER-GUTHARDT, J.; EULE, J.C. Feline calicivirus: a neglected cause of feline ocular surface infections? **Veterinary Ophthalmology**, 15, 3, p.172–179, 2012.

GESCHER, K.; KÜHN, J.; HAFEZI, W.; LOUIS, A.; DERKSEN, A.; DETERS, A.; LORENTZEN, E.; HENSEL, A. Inhibition of viral adsorption and penetration by an aqueous extract from *Rhododendron ferrugineum* L. as antiviral principle against herpes simplex virus type-1. **Fitoterapia** 82, p.408–413, 2011.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2006.

GULLUCE, M.; SOKMEN, M.; DAFERERA, D.; AGAR, G.; OZKAN, H.; KARTAL, N.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A.; SAHIN, F. Isolation of some active compounds from *Origanum vulgare* L. ssp. *Vulgare* and determination of their genotoxic potentials, **Food Chemistry**.130, p.248–253 2012.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa** 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

HOLYOAK, G.R.; BALASURIYA, U.B.R.; BROADDUS, C.C.; TIMONEY, I.P.J. Equine viral arteritis: **Current status and prevention**, 2008.

HOSSAIN, M.B.; RAI, D.K.; BRUNTON, N.P.; MARTIN-DIANA, A.B.; BARRY-RYAN, C. Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58, p.10576-10581, 2010.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P.J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P.J.; SAMPSON, J.H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology** 90, p.33–38, 2004.

JASSIM, S.A.A.; NAJI, M.A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **Journal of Applied Microbiology**, 95, 412–427, 2003.

KIM, Y.; NARAYANAN, S.; CHANG, K. Inhibition of influenza virus replication by plant-derived isoquercetin. **Antiviral Research** 88, p. 227–235, 2010.

KIRKLAND, P.D., FINLAISON, D.S., CRISPE, E., HURT, A.C., Influenza virus infection in dogs – Transmission during the Australian equine influenza outbreak. **Emerging Infectious Diseases** 16, p.699–702, 2010.

KOCH, C.; REICHLING, J.; KEHM, R.; SHARAF, M.M.; ZENTGRAF, H.; SCHNEELE, J.; SCHNITZLER, P. Efficacy of anise oil, dwarf-pine oil and chamomile oil against thymidine-kinase-positive and thymidine-kinase-negative herpesviruses. **Journal of pharmacy and pharmacology**. v.60, ed. 11, p.1545-1550, 2008

KOSAR, M.; DORMAN, H.J.D.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. **Food Chemistry** 91 p.525–533, 2005.

LIMA, M.; OSORIO, F. A. **Arteriviridae**. In: FLORES, E. F. Virologia Veterinária. Editora UFSM, Santa Maria/RS, p. 641-653, 2007.

LITSTER, A.; NICHOLS, J.; VOLPE, A. Prevalence of positive antibody test results for canine parvovirus (CPV) and canine distemper virus (CDV) and response to modified live vaccination against CPV and CDV in dogs entering animal shelters. **Veterinary Microbiology** 157, 86–90, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**. 1.ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2006. 512p.

LOVATO, L.T.; DEZENGRINI, R. **Coronaviridae**. In: FLORES, E. F. Virologia Veterinária. Editora UFSM, Santa Maria/RS, p. 615-639, 2007.

LUO, Y.; YUAN, Y.; ANKENBAUER, R.G.; NELSON, L.D.; WITTE, S.B.; JACKSON, J.A.; WELCH, S.W. Construction of chimeric bovine viral diarrhea

viruses containing glycoprotein Erns of heterologous pestiviruses and evaluation of the chimeras as potential marker vaccines against BVDV. **Vaccine**. 30,p.3843 – 3848, 2012.

MANCINI, D.A.P.; TORRES, R.P.; PINTO, J.R.; MANCINI-FILHO, J. Inhibition of DNA Vírus: Herpes-1 (HSV-1) in cellular culture replication, through na antioxidant treatment extracted from rosemary spice **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v.45, n.1, 2009.

MELECCHI, M. I. S. **Caracterização química de extratos de Hibiscus Tiliaceus L: Estudo comparativo de métodos de extração**. 2005. 197f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MEYER, G.; DEPLANCHE, M.; ROUX, D.; MOULIGNIE, M.; PICARD-HAGEN, N.; LYAZRHI, F.; RABOISSON, D. ; MATHEVET, P.; SCHELCHER, F. Fetal protection against bovine viral diarrhoea type 1 virus infection after one administration of a live-attenuated vaccine. **The Veterinary Journal** 192, p. 242–245, 2012.

MOENNIG, V.; EICKEN, K.; FLEBBE, U.; FREY, H.R.; GRUMMER, B.; HAAS, L.; Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD). **Preventive Veterinary Medicine** 72, p.109–14, 2005.

MOJAB, F.; POURSAEED, M.; MEHRGAN, H.; PAKDAMAN, S. Antibacterial activity of Thymus daenensis methanolic extract. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences** 21(3): p.210-213, 2008.

MORAES, M.P.; COSTA, P.R. Adenoviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Editora UFSM, Santa Maria/RS, p.415-426, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods** v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MULLER, V.; CHAVEZ, J.H.; REGINATTO, F.H.; ZUCOLOTTTO, S.M.; NIERO, R. ; NAVARRO, D.; YUNES, R.A.; SCHENKEL, E.P.; BARARDI, C.R.M.; ZANETTI, C.R.; SIMOES, C.M.O. Evaluation of antiviral activity of south American plant extracts against herpes simplex virus type I and rabies virus. **Phytotherapy research** v. 21, ed. 10 p. 970-974, 2007.

NEVES, J. M.; MATOS, C.; MOUTINHO, C.; QUEIROZ, G.; GOMES, L.R.; Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). **Journal of Ethnopharmacology** v.124, p. 270–283, 2009.

NIKOLIN, V.M.; WIBBELT, G.; MICHLER, F.F.; WOLF, P.; EAST, M.L. Susceptibility of carnivore hosts to strains of canine distemper virus from distinct genetic lineages. **Veterinary Microbiology** 156 p.45–53, 2012.

NTAFIS, V.; XYLOURI, E.; MARI, V.; PAPANASTASSOPOULOU, M.; PAPAIOANNOU, N.; THOMAS, A.; BUONAVOGLIA, C. DECARO, N. Molecular

characterization of a canine coronavirus NA/09 strain detected in a dog's organs. **Archives of Virology** p.157:171–175, 2012.

NOLKEMPER, S.; REICHLING, J.; STINTZING, F.C.; 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 Medica**, 72(15): p.1378-1382, 2006.

ORHAN, I.E.; OZCELİK, B.; KARTAL, M.KAN, Y. Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components. **Turkish journal of biology** 36, p.239-246, 2012.

OZCELIK, B.; KARTAL M.; ORHAN, I. **Pharmaceutical Biology**, 49(4): p. 396-402, 2011.

PANZERA, Y.; CALDERÓN, M.G.; SARUTE, N.; GUASCO, S.; CARDEILLAC, A.; BONILLA, B.; HERNÁNDEZ, M.; FRANCIA, L.; BEDÓ, G.; TORRE, J.L.; PÉREZ, R. Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. **Virus Research** 163, p.401–404, 2012.

PAPAGEORGIOU, V.; MALLOUCHOS, A.; KOMAITIS, M. Investigation of the Antioxidant Behavior of Air and Freeze-Dried Aromatic Plant Materials in Relation to Their Phenolic Content and Vegetative Cycle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 56, p.5743–5752, 2008.

PERES, T.B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, v.64, n.2, p.227-229, 2002.

PETERSEN, M.; ABDULLAH, Y.; BENNER, J.; EBERLE, D.; GEHLEN, K.; HÜCHERIG, S. JANIÁK, V.; KIM, K. H.; SANDER, M.; WEITZEL, C.; WOLTERS, S. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis, **Phytochemistry**, 70, p.1663–1679, 2009.

PIZZALE, L.; BORTOLOMEAZZI, R.; VICHI, S.; UBEREGGER, E.; CONTE, L. S. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. onites*) extracts related to their phenolic compound content. **Journal of Science and Food Agriculture**, 82, p.1645–1651, 2002.

POULET, H.; JAS, D.; LEMETER, C.; COUPIER, C.; BRUNET, S. Efficacy of a bivalent inactivated non-adjuvanted feline calicivirus vaccine: Relation between in vitro cross-neutralization and heterologous protection in vivo. **Vaccine** 26 p.3647–3654, 2008.

PRESTES, L. S. **Avaliação in vitro da atividade de diferentes extratos de *Origanum vulgare* L. e *Thymus vulgaris* frente a microrganismos de importância veterinária**. 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Brasil.

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.

QUINN, P. J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: ARTME, 512 p. 2005.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E.; **Biologia Vegetal**, 7^a.ed.; **Guanabara Koogan**: Rio de Janeiro, p.830, 2007.

READ, A.J; ARZEY, K.E.; FINLAISON, D.S.; GU, X.; DAVIS,R.J.; RITCHIE, L.; KIRKLAND, P.D. A prospective longitudinal study of naturally infected horses to evaluate the performance characteristics of rapid diagnostic tests for equine influenza virus. **Veterinary Microbiology** 156, 246–255, 2012.

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

RIDPATH, J. F.; FLORES, E.F. FLAVIVIRIDAE. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Editora UFSM, Santa Maria/RS, p. 565-582, 2007.

RISI, E.; AGOULON, A.; ALLAIRE, F.; DREAN-QUENECHDU, L.; MARTIN, V.; MAHL, P. Antibody response to vaccines for rhinotracheitis, caliciviral disease, panleukopenia, feline leukemia, and rabies in tigers (*panthera tigris*) and lions (*panthera leo*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** 43(2): p.248–255, 2012.

RODRIGUES, M.R.A.; KRAUSE, L.C.; CARAMÃO, E.B. et al. Chemical composition and extraction yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained from sub- and supercritical CO₂. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.3042-3047, 2004.

SADERI, H.; ABBASI, M. Evaluation of anti-adenovirus activity of some plants from Lamiaceae family grown in Iran in cell culture. **African Journal of Biotechnology**, v.10(76), p.17546-17550, 2011.

SÁENZ J.R. Arterite Viral Equina: Perspectivas Epidemiológicas e de Intervenção. **Revista Colombiana de Ciências Pecuária** 23, p.501-512, 2010.

SATO, H.; YONEDA, M.; HONDA, T.; KAI, C. Recombinant vaccines against the mononegaviruses—What we have learned from animal disease controls. **Virus Research** 162, p. 63 – 71, 2011.

SCHNITZLER, P.; NOLKEMPER, S.; STINTZING, F.C.; REICHLING, J. Comparative in vitro study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations, **Phytomedicine**,15, p.62–70, 2008.

SHIRVANI, E.; LOTFI,M.; KAMALZADEH,M.; NOAMAN,V.; BAHRIARI,M.; MOROVATI, H. HATAMI, A. Seroepidemiological study of bovine respiratory viruses (BRSV, BoHV-1, PI-3V, BVDV, and BAV-3) in dairy cattle in central region of Iran (Esfahan province). **Tropical Animal Health and Production** 44, p.191–195, 2012.

SIMÕES, C. M. O. ; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETOVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p. 417

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; **Genética Toxicologia**. Porto Alegre, Alcance, p. 422, 2003.

SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A. R.; SIMONIC, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**. 89, p.191-198, 2005.

SONG, J.H.; SHIM, J.K.; CHOI, H.J. Quercetin 7-rhamnoside reduces porcine epidemic diarrhea virus replication via independent pathway of viral induced reactive oxygen species. **Virology Journal** 8:460, 2011.

SOTELO-FÉLIX J.I., MARTINEZ-FONG D., MURIEL P., SANTILLÁN R.L., CASTILLO D., YAHUACA P. J. **Ethnopharmacol**. 81(2) p.145-54, 2002.

SUMMERS-LAWYER, K.A.; GO, Y.Y.; LU, Z.; TIMONEY, P.J.; MCCUE, P.M.; ZHANG, J.; SHUCK, K.M.; BRUEMMER, J. Response of Stallions to Primary Immunization with a Modified Live Equine Viral Arteritis Vaccine. **Journal of Equine Veterinary Science** 31, p. 129-138, 2011.

SY, L.; JY, R.; WB, P. Antiherpetic Activities of Flavonoids against herpes simplex virus type 1(HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro. **Archives of Pharmacology Research** 28: p 1293-1301, 2005.

TAFURI, Natalia. **Atividade antiviral de extratos vegetais e flavonóides contra o Bovine herpesvirus 1 (BoHV1)**. 2011. Dissertação (Mestrado em Bioquímica agrícola)- Universidade de Viçosa, Minas Gerais.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; **Fisiologia Vegetal**, 3ª. ed.; Artmed: Porto Alegre,p.720, 2004.

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.

TORTORA, G. J. FUNKE, B. R. CASE, C.L. **Microbiologia**. Artmed, 8. Ed. São Paulo, 2005

TRABULSI, L. R.; ALTHERTUM, F. **Microbiologia**, 5ª Ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2008.

TRAUB-DARGATZ, J.L. **The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. London: Saunders, 1993. V.9, 448p.

TSIMOGIANNIS, D.; SAMIOTAKI, M.; PANAYOTOU, G.; OREOPOULOU, V. Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules** , 12, p. 593-606, 2007.

URYVAEV, L.V.; DEDOVA, A.V.; DEDOVA, L.V.; IONOVA, K.S.; PARASJUK,N.A.; SELIVANOVA, T.K.; BUNKOVA,N.I.; GUSHINA, E.A. GREBENNIKOVA, T.V.; PODCHERNJAEVA, R.J. Contamination of Cell

Cultures with Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV). **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, Vol. 153, No. 1, May, 2012

VIJAYAN, P.; RAGHU,C.; ASHOK,G.; DHANARAJ, S.A.; SURESH, B. Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. **Indian Journal of Medical Research** 120, July, p 24-29, 2004.

VOGEL, A. I. **Análise Química Quantitativa**. 6 Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

YI, L.; CHENG, S.; XU, H.; WANG, J.; CHENG, Y.; YANG, S.; LUO, B. Development of a combined canine distemper virus specific RT-PCR protocol the differentiation of infected and vaccinated animals (DIVA) and genetic characterization of the hemagglutinin gene of seven Chinese strains demonstrated in dogs. **Journal of Virological Methods** 179 p.281– 287, 2012.

YUAN C.Z.; DWIGHT C.H. **Microbiologia Veterinária** Editora: Guanabara, 2003.

YUCHAROEN, R., ANUCHAPREEDA, S., TRAGOOLPUA, Y. **African Journal of Biotechnology** Vol. 10(5), p. 860-866, 31, 2011.

WANG, J.N.; HOU, C.Y.; LIU, Y.L.; LIN, L.Z.; GIL, R.R.; CORDELL, G.A.; Swertifrancheside, an HIV-reverse transcriptase inhibitor and the first flavone-xanthone dimmer, from swertia franchetiana. **Journal of Natural Products**. 57: 211-217, 1994.

WEIBLEN, R. Influenza eqüina. In: RIET-CORREA, F.et al. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. São Paulo: Varela, V.1, p.121-125, 2001.

WEIBLEN R. Viroses emergentes em suínos: como surgem e possível importância? **Acta Scientiae Veterinariae**. 37(Supl 1): s91-s96, 2009.

ZANDI K.; FOULADVAND M.; PAKDEL P.; SARTAVI K. Evaluation of in vitro antiviral activity of a brown alga (*Cystoseira myrica*) from the Persian Gulf against herpes simplex virus type 1. **African Journal of Biotechnology**, 6 (22): 2511-2514, 2007.

ZHANG, C.; LI, W.; LI, H.; WANG, Y.; YUN, T.; SONG, Z.; SONG, Y.; ZHAO, X. In vivo and in vitro antiviral activity of fve Tibetan medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 2 infection. **Pharmaceutical Biology**, 47(7): p. 598–607, 2009.

ZIAKOVA, A.; BRANDSTETEROVA, E. Validation of HPLC Determination of Phenolic Acids Present in Some Lamiaceae Family Plants. **Journal of liquid chromatography & related technologies**1 v. 26, No. 3, p. 443–453, 2003.

ANEXO 1

	Especificação Técnica Orégano Folhas	ET - 006	
		Revisão: 04	Pág. 1/1
		Data 1ª Edição: 29/03/06	
		Data Revisão: 16/11/2010	

Produto/ Nome Científico
 ORÉGANO FOLHAS/ORIGANUM VULGARE L.
 Descrição: Folhas secas de orégano

Propriedades:Físico-Químicas:

Umidade: máx. 12% (g/100g)

Microbiológica:

De acordo com a legislação brasileira, Resolução RDC 12, de 2 de janeiro de 2001, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Macroscópicas:

Ausência de insetos, larvas, parasitos e de todo e qualquer sujidade que indique contaminação do produto.

Organolépticas:

Aspecto do Produto:	Folhas integras.
Sabor:	Característico.
Cor do Produto:	Verde.
Odor do Produto:	Característico.

Prazo de Validade

De 24 a 36 meses, dependendo do fornecedor.

Embalagem

Embalagem : sacos de papel Kraft.

Identificação

Em cada embalagem deverá conter as seguintes informações: Nome do produto, Data de fabricação, Data de validade, lote, registro do produtor (CNPJ), peso líquido e ingredientes (quando se tratar de formulação).

Transporte

O produto deve ser transportado em veículos limpos/secos, livres de insetos, larvas e mercadorias que possam vir a gerar contaminação ao produto.

Armazenamento

Armazenar em local fresco, arejado e seco, distante produtos químicos e livres de insetos, pássaros, pombo ou outros.

ANEXO 2

	Especificação Técnica Alecrim Folhas	ET - 67
		Revisão: 03
		Data 1ª Edição: 05/01/09
		Revisado em: 13/09/2010

Produto Nome Científico

ALECRIM FOLHAS/ ROSMANIMUS OFFICINALIS

Descrição: Alecrim seco procedente de espécimes vegetais genuínos, sãos e limpos.

Propriedades:

Físico-Químicas:

Umidade: máx. 12% (g/100g)

Microbiológica:

Padrões ANVISA, segundo Resolução RDC 12 de 02/01/2001.

Coliformes a 45°C: máximo 5×10^2 NMP/g

Salmonella sp.: ausência em 25 g

Macroscópicas:

Ausência de insetos, larvas, parasitos e de todo e qualquer sujidade que indique contaminação do produto.

Organolépticas:

Aspecto do Produto:	Folhas íntegras e isentas de matérias estranhas
Sabor:	Característico, aromático
Cor do Produto:	Marron esverdeado
Odor do Produto:	Aromático característico, sem presença de mofo, bolor ou odores estranhos

Prazo de Validade

48 meses da data de fabricação.

Embalagem

Embalagem: sacos de nylon.

Identificação

Em cada embalagem deverá conter as seguintes informações: nome do produto, data de fabricação, data de validade, lote e peso líquido.

Transporte

O produto deve ser transportado em veículos limpos/secos, livres de insetos, larvas e mercadorias que possam vir a gerar contaminação ao produto.

Armazenamento

Armazenar em local limpo, seco e arejado, distante de produtos químicos e livres de insetos, pássaros ou outros animais.

Informação Nutricional porção de 50g

Quantidade por porção		Valor*
Valor calórico	kcal	0
Carboidratos	g	0
Proteínas	g	0
Gorduras totais	g	0
Gorduras saturadas	g	0
Cholesterol	mg	0
Ferro	0,1mg	0
Sódio	0mg	0

(*): Valores Diários de Referência com base em uma dieta de 2.000 calorias.

ANEXO 3

Journal of Natural Products ACS Paragon Plus Environment	SCHOLARONE™ Manuscripts
Home → Submission Confirmation	
You are logged in as Marlete Cleff	

Submission
Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Natural Products*.

Manuscript ID: np-2013-00147p
Title: Antiviral activity of extracts of <i>Origanum vulgare</i>
Blank, Daiane Alves, Gabriela
Authors: Hübner, Silvia Freitag, Rogério Cleff, Marlete
Date Submitted: 19-Feb-2013