

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Atividade antimicrobiana de extrato etanólico de
própolis verde**

Camila de Oliveira Vilela

Pelotas, 2010

CAMILA DE OLIVEIRA VILELA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS
VERDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Veterinária Preventiva).

Orientador: Prof. Dr. Gilberto D'Avila Vargas

Co-Orientador: Prof. Dr. Geferson Fischer

Pelotas, 2010

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

V695a Vilela, Camila de Oliveira

Atividade antimicrobiana de extrato etanólico de própolis verde / Camila de Oliveira Vilela ; orientador Gilberto D'Avila Vargas; co-orientador Geferson Fischer. Pelotas,2010.-100f. : il.- Dissertação (Mestrado em Veterinária Preventiva) –Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Faculdade de Veterinária . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1. Ovos embrionados 2.Desinfetante 3.Membrana corioalantóide 4.Própolis verde. 5.Virucida 6.Avipoxvirus 7.Formaldeido I Vargas, Gilberto D'Avila (orientador) II .Título.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Gilberto D'Avila Vargas – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Geferson Fischer – Universidade Federal de Pelotas

Prof.^a Dra. Silvia de Oliveira Hübner – Universidade Federal de Pelotas

Prof.^a Dra. Patrícia da Silva Nascente – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Marcos Antonio Anciuti – Universidade Federal de Pelotas

Prof.^a Dra. Margarida Buss Raffi – Universidade Federal de Pelotas (suplente)

À minha mãe,
pelo carinho e apoio.
Em memória do meu pai,
meu maior incentivador.

Agradecimentos

A minha mãe, pelo carinho, amor e dedicação incondicional.

Ao meu pai que foi meu maior incentivador e esteve presente em todos os bons e maus momentos; se estivesse presente hoje, certamente estaria muito feliz ao ver este trabalho concluído.

Ao meu Orientador Gilberto D'Avila Vargas por ter confiado no trabalho, por sua ajuda imprescindível e acima de tudo por seu incentivo e entusiasmo.

Ao meu co-orientador Geferson Fischer, pela presença constante, pela força para enfrentar essa fase e pela preciosa amizade.

À professora Silvia de Oliveira Hübner, por seus esclarecimentos, sua paciência e contribuição neste trabalho.

À Apis Nativa Produtos Naturais Ltda – Prodapys – Araranguá, SC – Brasil, pelo fornecimento do extrato etanólico de própolis verde.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária: José Carlos Rösler Sandrini, Eliete Sandrini, Enilda Souza de Oliveira, Telmo Vidor, Clarissa Caetano de Castro, Cristina Freitas Nunes, Luis Gustavo da Silva, Livia Munhoz, Bianca Siedler, Cacciane Fáccio, Daiana e Paula Finger pela amizade e ajuda sempre que necessária.

Aos amigos que contribuíram de alguma maneira na realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

Resumo

VILELA, Camila de Oliveira. **Atividade antimicrobiana de extrato etanólico de própolis verde**. 2010. 100f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas a partir de exsudatos de brotos e botões florais de diversas plantas. Possui coloração e consistência variada e é utilizada pelas abelhas para fechar pequenas frestas, embalsamar insetos mortos, bem como proteger a colméia contra a invasão de microrganismos. A própolis verde, com diversas propriedades bioativas cientificamente comprovadas, foi avaliada neste estudo, na forma de extrato etanólico, quanto a sua capacidade virucida contra o *avipoxvirus*, inoculado em membrana corioalantóide de embriões de galinha e quanto às ações antibacteriana e antifúngica em ovos embrionados destinados a incubação. Para avaliar a capacidade virucida da própolis verde, foram utilizados 100 ovos embrionados, com nove dias de incubação, de matrizes pesadas com 62 semanas de idade, não vacinadas contra o *avipoxvirus*. A própolis apresentou atividade virucida dependente da dose e do tempo de incubação com o vírus antes da inoculação. Ovos inoculados com vírus e 2400 µg/dose de própolis, previamente incubados por quatro horas, apresentaram redução no número de lesões pox ($P < 0,05$), em relação ao controle positivo, além da redução no número de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos e no escore de degeneração vacuolar das células epiteliais do mesoderma da membrana corioalantóide. Após oito horas de incubação com o vírus, a mesma concentração de própolis inativou completamente o *avipoxvirus* ($P < 0,0001$) e na concentração dez vezes menor (240 µg/dose) reduziu significativamente o número de lesões pox e os achados histopatológicos ($P < 0,05$). Para avaliar as atividades antibacteriana e antifúngica do extrato etanólico da própolis verde, foram utilizados 140 ovos de ninhos de matrizes de postura. Os níveis de contaminação da casca dos ovos por mesófilos totais e fungos (*Aspergillus* e outros bolores) após a desinfecção com própolis foram menores quando comparados ao controle. Na comparação ao tratamento com formaldeído (controle positivo) as concentrações de própolis com 240 µg e 24 µg não diferiram para atividade antibacteriana, mas para atividade antifúngica 2400 µg e 240 µg foram superiores. Com relação à eclodibilidade dos ovos após 21 dias de incubação, os tratamentos de própolis (2400 µg e 240 µg) apresentaram as maiores taxas, com 94,11% superando o tratamento com formaldeído. A própolis verde, portanto, apresentou atividade virucida contra o *avipoxvirus* em membrana corioalantóide, bem como atividade antibacteriana e antifúngica em ovos embrionados, representando uma nova alternativa para tratamentos contra infecções causadas por vírus, bem como um novo produto natural desinfetante em substituição ao formaldeído.

Palavras-chave: Própolis verde. Virucida. *Avipoxvirus*. Membrana corioalantóide. Ovos embrionados. Formaldeído. Desinfetantes.

Abstract

VILELA, Camila de Oliveira. **Antimicrobial activity of ethanolic extract of green propolis**. 2010. 100p. Master Dissertation. Post Graduation Program in Veterinary. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Propolis is a resinous substance by bees from exudates of flower-buds from several plants. Its coloring and consistency is variable and it is used by bees to fill gaps, to embalm dead insects, as well as to protect the hive against the invasion of microorganisms. Green propolis, which has several bioactive properties scientifically proved, was evaluated in this study in the form of ethanolic extract, concerning its virucidal capacity against the avipoxvirus, inoculated in chorioallantoic membrane of chicken embryos and concerning its antibactericidal and antifungal action in embryonated eggs destined to incubation. To evaluate the virucidal capacity of the Green propolis, 100 eggs embryonated were used, with nine days of incubation, of broiler breeders with 62 weeks of age, unvaccinated against *avipoxvirus*. Propolis presented virucidal activity depending on the dose and the time of virus incubation period before the inoculation. Eggs inoculated with virus and 2400 µg/dose of propolis previously incubated for four hours presented decrease in the number of lesion pox ($P < 0,05$) with regard to the positive control besides a decrease in the number of bodies of intracytoplasmic inclusion and in the score of vacuolar degeneration of the epithelial cells of the mesoderm of the chorioallantoic membrane. After eight hours of virus incubation the same propolis concentration inactivated completely the avipoxvirus ($P < 0,0001$) and a concentration ten times smaller (240 µg/dose) reduced significantly the number of pox lesions and the histopathological findings ($P < 0,05$). To evaluate the antibactericidal and antifungal activities of the ethanolic extract of the Green propolis, 140 eggs from nests of broiler breeders were used. The levels of contamination of eggshells through total mesophiles and fungi (*Aspergillus* sp and other molds) after the disinfection with propolis were smaller as compared to the control. As compared to the treatment with formaldehyde (positive control) the concentrations of propolis 240 µg and 24 µg did not differ concerning the antibactericidal activity, but to the antifungal activity 2400 µg and 240 µg were superior. Concerning the eggs hatchability after 21 days of incubation, the propolis treatments (2400 µg and 240 µg) presented the biggest rates, with 94,11% overcoming the treatment with formaldehyde. Thus, the green propolis, presented virucidal activity against the avipoxvirus in chorioallantoic membrane, as well as antibactericidal and antifungal activity in embryonated eggs, representing a new alternative to treatments against infections caused by virus, as well as a new natural product disinfectant in substitution to formaldehyde.

Key words: Green propolis. Virucidal. Avipoxvirus. Chorioallantoic membrane. Embryonated eggs. Formaldehyde. Disinfectant.

Sumário

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. ARTIGO1 - ATIVIDADE VIRUCIDA DA PRÓPOLIS VERDE CONTRA O <i>AVIPOXVIRUS</i> EM MEMBRANA CORIOALANTÓIDE DE OVOS EMBRIONADOS DE GALINHA.....	12
Resumo.....	14
Introdução.....	15
Material e Métodos.....	17
Resultados.....	21
Discussão.....	24
Referências.....	30
3. ARTIGO - 2 PRÓPOLIS: UM PRODUTO NATURAL COMO ALTERNATIVA NA DESINFECÇÃO DE OVOS EMBRIONADOS DESTINADOS A INCUBAÇÃO.....	45
Resumo.....	47
Introdução.....	48
Material e Métodos.....	50
Resultados.....	52
Discussão.....	53
Conclusão.....	55
Referências.....	56
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	68
5. REFERÊNCIAS.....	69
6. ANEXOS.....	76

1. INTRODUÇÃO

Ao longo da história, a humanidade aprendeu a utilizar produtos de origem natural de modo terapêutico. Dentre as várias formas de utilização destacam-se as plantas brutas, como ervas, além das tradicionais preparações galênicas (extratos). Um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pelo homem tem sido a própolis, a qual pode ser administrada sob diversas formas (PEREIRA et al., 2002). O uso da própolis remonta a tempos antigos, pelo menos 300 aC.. Há relatos a respeito da sua utilização pelos antigos povos egípcios, gregos e romanos em função das suas propriedades de cura em geral e no tratamento de algumas lesões da pele (SFORCIN, 2007). Os antigos egípcios, por exemplo, conheciam as ações anti-putrefativas da própolis e a empregavam para embalsamar cadáveres (DE CASTRO, 2001; CASTALDO; CAPASSO, 2002).

A própolis é uma substância natural formada por uma mistura complexa de materiais resinosos e balsâmicos coletados pelas abelhas de diferentes partes das plantas como brotos, botões florais, folhas e cascas (BANKOVA et al., 2000; PARK et al., 2002), modificados na colméia após a mastigação, adição de enzimas salivares e cera (CASTALDO; CAPASSO, 2002; PARK et al., 2002). Possui coloração e consistência variada e é utilizada pelas abelhas para proteger a colméia de insetos e microrganismos invasores, selar rachaduras, manter asséptico o ambiente interno da colméia e os locais de postura da abelha rainha além de embalsamar invasores (BANKOVA et al., 2000).

O amplo espectro de ação da própolis e a sua utilização na medicina popular, têm renovado o interesse na sua composição e propriedades bioativas (SFORCIN, 2007). Mais de 300 compostos já foram identificados em diferentes amostras de própolis tais como flavonóides, ácidos aromáticos, ácidos diterpênicos e compostos fenólicos, que são os principais componentes responsáveis pelas atividades biológicas da própolis (BANKOVA et al., 2000; PARK et al., 2004). A composição química bastante complexa e variada está intimamente relacionada com a flora de cada região visitada pelas abelhas, o período de coleta da resina e a variabilidade genética das abelhas rainhas (PARK et al., 1998; PARK et al., 2002; DOS SANTOS, et al., 2003). Devido à grande diversidade da flora, a própolis brasileira pode ser classificada em 12 grupos distintos, de acordo com as características físico-

químicas. A amostra mais conhecida e estudada é a própolis verde, produzida principalmente a partir de uma planta nativa da região sudeste, conhecida popularmente como vassourinha ou alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) (PARK et al., 2002). Já a própolis marrom é produzida a partir de uma grande diversidade vegetal, o que dificulta a sua correlação com a fonte produtora. Atualmente, um novo tipo de própolis, proveniente da região de mangue do Estado de Alagoas, teve sua origem botânica identificada como *Dalbergia ecastophyllum*, uma espécie de leguminosa conhecida popularmente como rabo-de-bugio. Denominada própolis vermelha, em função da sua coloração vermelha intensa, esta amostra foi classificada como o 13º tipo de própolis brasileira (DAUGSCH et al., 2008; CABRAL et al., 2009).

Diversas propriedades bioativas da própolis foram relatadas, tais como antiviral (HULEIHEL; ISANU, 2002; SCHNITZLER et al., 2009; BÚFALO et al., 2009, NOLKEMPER, et al., 2010), antibacteriana (SFORCIN et al., 2000; CABRAL et al., 2009, CARDOSO et al., 2009), antioxidante (CABRAL et al., 2009; GREGORIS; STEVANATO, 2010), antifúngica (OTA et al., 2001; KOC et al., 2005; QUINTERO et al., 2008; CARDOSO et al., 2009), antiparasitária (DANTAS et al., 2006; SALOMÃO et al., 2009), antitumoral (EL-KHAWAGA et al., 2003; SFORCIN, 2007), anti-inflamatória (BORRELLI et al., 2002; PAULINO et al., 2008,) e imunomoduladora (FISCHER et al., 2007; PAGLIARONE, 2009).

A atividade antiviral da própolis tem sido demonstrada através do seu efeito inibitório sobre o vírus da gripe aviária – H7N7 (KUJUMGIEV et al., 1999), reovirus (HEGAZI et al., 2000; HADY; HEGAZI, 2002), herpesvirus bovino e vírus da diarréia viral dos bovinos (FISCHER et al., 2005), adenovírus e vírus da estomatite vesicular (ITO et al., 2001; GEKKER et al., 2005; BÚFALO, et al., 2009), vírus da imunodeficiência humana - HIV (GEKKER et al., 2005) e herpesvirus simplex (HULEIHEL; ISHANO, 2002; SCHNITZLER et al., 2009; NOLKEMPER et al., 2010). Esta ação biológica tem sido atribuída, principalmente, à atividade de flavonóides (HULEIHEL; ISHANO, 2002; MATSUO et al., 2005).

Os poxvirus que infectam aves pertencem ao gênero, *Avipoxvirus* (APV) da família *Poxviridae*, e são formados por um amplo genoma DNA de cadeia dupla, envolto por envelope (GUBSER et al., 2004; JARMIN et al., 2006). O *Fowlpoxvirus* (FPV) causa uma doença conhecida como varíola aviária, a qual apresenta-se sob duas formas principais: cutânea e diftérica. Nas aves, a doença pode causar

significativas perdas econômicas associadas à queda na produção de ovos, crescimento reduzido, e aumento da mortalidade (MANAROLLA, 2010). O diagnóstico laboratorial convencional do APV é realizado por exames histopatológico, microscopia eletrônica, isolamento do vírus na membrana corioalantóide (MCA) de ovos embrionados de galinha, métodos sorológicos e PCR (LEE, L.; LEE, K., 1997). A inoculação do APV na MCA de embriões de galinha resulta em lesões proliferativas brancas e opacas, que podem ser focais ou difusas, denominadas de lesão pox. A lesão é, essencialmente, uma área de resposta inflamatória decorrente da invasão do vírus nas células epiteliais na membrana (MAHY; KANGRO, 1996). A MCA tem sido utilizada para estudos *in vivo* de um grande número de diferentes vírus, tornando-se um modelo biológico confiável e de fácil utilização (NÓBREGA et al., 2008).

Com relação à propriedade antibacteriana, a própolis tem sido amplamente investigada por vários pesquisadores (KUJUMGIEV et al., 1999; SFORCIN et al., 2000; VARGAS et al., 2004; SALOMÃO et al., 2008; CARDOSO et al., 2009; CABRAL et al., 2009.) Estudos *in vitro* têm comprovado que essa propriedade da própolis está relacionada, principalmente, a seus compostos flavonóides e ácidos aromáticos presentes na resina natural (BANKOVA et al., 1995; MARCUCCI et al., 2001, VARGAS et al., 2004; SCAZZOCCHIO et al., 2006). A galangina, pinocembrina e pinostrombina são tidos como os flavonóides mais efetivos contra bactérias. Além disso, os ácidos ferúlico e caféico contribuem para a ação bactericida da própolis. O mecanismo de atividade antibacteriana é complexo e, provavelmente, baseado na inibição da RNA-polimerase da bactéria (BOSIO, 2000; UZEL et al., 2005). Essa ação biológica é mais efetiva contra bactérias Gram positivas, e limitada contra Gram-negativas. Estas bactérias possuem uma parede celular quimicamente mais complexa e um teor lipídico maior, o que pode explicar essa maior resistência (MARCUCI et al., 2001; VARGAS et al., 2004; LU et al., 2005).

A propriedade antifúngica da própolis foi verificada em dermatófitos dos gêneros *Microsporum* sp. e *Trychophyton* sp. (KOC et al., 2005), em leveduras do gênero *Candida* sp (QUINTERO, 2008) em *Paracoccidioides brasiliensis* (MURAD et al., 2002), *Cryptococcus neoformans* (FERNANDES et al., 2007) e em outros fungos filamentosos como determinadas espécies de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Cladosporium* sp. (AFOLAYAN; MEYER, 1997). Essa ação, a exemplo do que ocorre

sob bactérias e vírus, é atribuída por muitos autores aos flavonóides (MARCUCCI, 2001; CASTALDO E CAPASSO, 2002; CUSNHIE; LAMB, 2005; SCAZZOCCHIO et al., 2006).

Os métodos de desinfecção de ovos incubáveis comumente utilizados na indústria avícola são a fumigação (volatilização de um desinfetante), pulverização, imersão e UV. No processo de fumigação, o formaldeído é o desinfetante mais utilizado. (PATRÍCIO, 2003). Vários estudos têm demonstrado que o gás formaldeído é um carcinógeno e causa danos ao sistema mucociliar do trato respiratório de embriões de galinha, quando expostos a altas concentrações durante o período de incubação (WALKER; SANDER, 2004). Apesar da sua reconhecida ação desinfetante o formaldeído possui diversos pontos negativos, principalmente no que diz respeito à saúde das pessoas sujeitas à exposição diária. Segundo Scott e Swetnam (1993), a organização norte americana “Occupational Safety and Health Administration” (OSHA) cita, entre outros efeitos potenciais da exposição prolongada ao formol, dores de cabeça, náuseas, sonolência, problemas respiratórios, injúrias renais, efeitos neurofisiológicos que podem incluir desordens do sono, irritabilidade, censo de equilíbrio alterado, dificuldades de memorização, perda de concentração, esterilidade secundária nas mulheres, entre outros. Além de todos os efeitos citados, é praticamente um consenso sua associação ao câncer (BRAKE; SHELDON, 1990; FAVERO; BLOND, 1991; SCOTT; SWETNAM, 1993). Considerado substância cancerígena, o formaldeído tem seu uso regulamentado no Brasil pela Norma Regulamentadora nº 15/2000 do Ministério da Saúde, sendo os limites de tolerância dos seres humanos ao produto determinados por diversos órgãos ligados à saúde.

Diversos estudos têm sido realizados a fim de encontrar-se um substituto à altura do formaldeído para desinfecção de ovos incubáveis. Avaliações de eficiência entre substâncias desinfetantes utilizando produtos naturais são raros na literatura, e principalmente são limitadas as avaliações para utilização em ovos incubáveis. Associando-se esse fato à necessidade pela busca de novas substâncias antivirais e/ou virucidas, o amplo espectro de atividades biológicas da própolis tem renovado o interesse por esse produto das abelhas quanto ao seu potencial antibacteriano, antifúngico e antiviral.

2. ARTIGO 1

ATIVIDADE VIRUCIDA DA PRÓPOLIS VERDE CONTRA O *AVIPOXVIRUS* EM
MEMBRANA CORIOALANTÓIDE DE OVOS EMBRIONADOS DE GALINHA

Formatado de acordo com as normas da revista Antiviral Research (Anexo A)

Atividade virucida da própolis verde contra o *avipoxvirus* em membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha

Camila de O. Vilela^a, Geferson Fischer^{a1}, Clarissa C. de Castro^a, Cristina F. Nunes^a,
Sílvia O. Hübner^a, Margarida B. Raffi^b, Simone E. Salles^b, Marcos A. Anciuti^c,
Gilberto D. Vargas^a

^a *Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel – CP 354 – 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil;*

^b *Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel – CP 354 – 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil;*

^c *Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça, Universidade Federal de Pelotas – UFPel – CP 354 – 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil;*

¹ Corresponding author. Telf.: + 55 5332757498; fax: +55 5332757498.
E-mail address: geferson.fischer@gmail.com (G. Fischer).

RESUMO

Recentes pandemias causadas por vírus, como o *influenzavirus* (H1N1, H5N1), reafirmaram a importância dos estudos visando a obtenção de novas substâncias com atividade antiviral e/ou virucida, uma vez que o seu uso prolongado pode acarretar em resistência aos princípios ativos. A própolis verde, com diversas propriedades bioativas cientificamente comprovadas, foi avaliada neste estudo, na forma de extrato etanólico, quanto a sua capacidade virucida contra o *avipoxvirus* (APV), inoculado em membrana corioalantóide (MCA) de embriões de galinha, um modelo *in vivo* para estudo de vírus. Ovos inoculados com APV e 2400 µg/dose de própolis, previamente incubados por quatro horas, apresentaram redução no número de lesões pox ($P < 0,05$) em relação ao controle positivo sem própolis, além de redução no número de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos e no escore de degeneração vacuolar das células epiteliais do mesoderma MCA. Após oito horas de incubação com o vírus, a mesma concentração de própolis inativou completamente o APV ($P < 0,0001$) e em concentração dez vezes menor (240 µg/dose) reduziu significativamente o número de lesões pox e os achados histopatológicos ($P < 0,05$) em relação ao controle positivo. Este produto das abelhas apresentou atividade virucida dependente da dose e do tempo de incubação com o vírus antes na inoculação. A atividade inibitória da própolis verde contra o APV em MCA, pode futuramente representar uma alternativa para tratamentos contra infecções causadas por esse vírus.

Palavras-chave: própolis verde, virucida, *avipoxvirus*, membrana corioalantóide

1. Introdução

Recentemente uma nova pandemia causada por um vírus (*Influenzavirus A – H1N1*), inicialmente denominada erroneamente de Gripe Suína, e que atualmente é conhecida como Gripe A, assustou a população de diversos países. Ao longo da história, a medicina, tanto humana quanto veterinária, tem sido confrontada com uma série de pandemias e doenças virais emergentes, como a gripe aviária (H5N1) e a Síndrome Respiratória Severa Aguda (SARS) (van Boven et al., 2008), ressaltando a importância destes microrganismos como potenciais causadores de diversas doenças infecciosas.

O extraordinário sucesso da vacinação, reduzindo a incidência ou mesmo permitindo a erradicação de diversas enfermidades, representa uma das grandes conquistas das medicinas humana e veterinária (Amanna e Slifka, 2009). Embora esta prática continue a ser a estratégia mais eficaz para reduzir o risco de infecção e complicações posteriores a uma pandemia causada por vírus, uma vacina eficaz pode não estar disponível por vários meses após a declaração de uma pandemia, realçando a importância da utilização de drogas antivirais como ferramenta para a prevenção e tratamento deste tipo de infecção (Arino et al., 2009). Além disso, os antivirais podem ser utilizados para reduzir os impactos causados por uma epidemia enquanto uma nova vacina esteja em desenvolvimento (McCaw et al., 2008). No entanto, drogas antivirais não são completamente inócuas (van Boven et al., 2008) e o seu uso em larga escala tem o potencial de induzir o aparecimento de cepas virais resistentes (McCaw et al., 2008; Handel et al., 2009), reduzindo a eficácia destes medicamentos e comprometendo a sua utilização para o controle de epidemias ou pandemias. Segundo Mahu e Kangro (1996), agentes virucidas inativam vírus em

função das suas propriedades físicas e químicas. Estes agentes, geralmente, são mais efetivos em vírus que estejam fora de suas células hospedeiras.

Nos últimos anos uma quantidade reduzida de drogas antivirais foi aprovada, embora um significativo esforço tenha sido despendido no desenvolvimento de terapias eficazes (Graci e Cameron, 2008). Além disso, vírus com genoma RNA, têm taxas de mutação extremamente altas, contribuindo ainda mais para um rápido aparecimento de cepas virais resistentes, o que ressalta a necessidade de novas pesquisas na busca de alternativas de substâncias antivirais. Neste sentido, compostos naturais e fitoterápicos têm despertado o interesse de diversos pesquisadores na busca por novos fármacos (Brum, 2006).

A própolis, uma substância resinosa produzida pelas abelhas melíferas a partir de exsudatos coletados em diferentes partes das plantas (Fischer e Vidor, 2008) apresenta, atividade imunomoduladora (Fischer et al., 2007a,b), antiinflamatória (Pagliarone et al., 2009), antioxidante (Gregoris e Stevanato, 2010) e antitumoral (Vatansever et al., 2010), embora muitos dos seus mecanismos de ação sejam desconhecidos. A atividade farmacológica da própolis contra várias infecções virais tem sido avaliada em estudos com o vírus influenza (Serkedjieva et al., 1992), adenovirus (Amoros et al., 1992), HIV (Ito et al., 2001), e os herpes simplex vírus (Debiaggi et al. 1990; Schnitzler et al. 2009; Nolkemper et al., 2010). O amplo espectro de atividades biológicas da própolis, aliado à necessidade de novas substâncias antivirais e/ou virucidas, renovam o interesse por este produto das abelhas quanto ao seu potencial antimicrobiano e antiviral (Nolkemper et al., 2010).

Os Poxvirus, da família *Poxviridae*, são vírus DNA de fita dupla que infectam humanos e animais. Entre as enfermidades causadas por estes microrganismos, destacam-se a varíola humana (doença oficialmente erradicada pela Organização

Mundial da Saúde em 1979, mas que causou inúmeras mortes) (Bhattacharya, 2008), a boubá aviária e a varíola bovina, uma zoonose (Silva et al., 2008). Quando inoculado na membrana corioalantóide (MCA) de ovos embrionados de galinha, o *avipoxvirus* (APV) causa uma lesão de coloração esbranquiçada denominada lesão pox, que é, essencialmente, uma área de resposta inflamatória decorrente da invasão do vírus nas células epiteliais da membrana (Mahu e Kangro, 1996). Desta forma, a MCA de embriões de galinha é um material de grande valor para o estudo *in vivo* do desenvolvimento de um grande número de diferentes vírus, como o APV, sendo um modelo biológico confiável, de fácil utilização e aceitação pelos antivivissecionistas (Nóbrega et al., 2008).

Este estudo visou a avaliação da atividade virucida *in vivo* de um extrato etanólico de própolis verde contra o APV, quando inoculado na MCA de ovos embrionados de galinha.

2. Material e métodos

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Virologia e Imunologia, da Universidade Federal de Pelotas - UFPel, em colaboração com o Laboratório Regional de Diagnóstico, ambos da Faculdade de Veterinária da UFPel.

2.1. Extrato etanólico de própolis verde

Utilizou-se um extrato etanólico comercial, fornecido numa concentração de 24%. Durante a realização do experimento, a solução etanólica foi mantida sob refrigeração a 4° C.

2.2. Vírus

Uma amostra vacinal do *avipoxvirus* - APV (vírus de pombo, cepa forte), produzida em ovos embrionados de galinha, foi gentilmente fornecida pelo Laboratório Bio-Vet S/A. O vírus, liofilizado, foi reconstituído em 1 mL de diluente conforme instruções do fabricante no momento da sua utilização.

2.3. Ovos embrionados

Visando a determinação do seu efeito citotóxico, bem como a definição da diluição do APV a ser usada nos experimentos, foram utilizados 100 ovos embrionados, com nove dias de incubação, de matrizes pesadas com 62 semanas de idade, não vacinadas contra o APV, como modelo biológico *in vivo* para avaliação da atividade virucida do extrato etanólico de própolis verde. Os ovos embrionados, foram fornecidos pelo Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça (CAVG), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), foram mantidos em incubadora a 37° C, com umidade controlada de 60%. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEAA/UFPel).

2.4. Testes de citotoxicidade da própolis e determinação da dose infectante do APV

Previamente à avaliação da atividade virucida do extrato etanólico de própolis verde, foram realizados testes visando avaliar a sua toxicidade ao embrião e à membrana corioalantóide dos ovos embrionados de galinha. Para tanto, foram testadas diferentes concentrações de própolis: 2400 µg/dose, 240 µg/dose, 24 µg/dose e 0 µg/dose, com base em estudos sobre a atividade antiviral, anteriormente realizados pelo nosso grupo de pesquisa (Fischer et al., 2005). A inoculação na MCA foi realizada seguindo metodologia conhecida (Lierz et al.,

2007). Após a perfuração da casca do ovo e deslocamento da membrana, foram inoculadas as concentrações de própolis a serem avaliadas em um volume de 100 µl/ovo, em triplicata. Após incubação por cinco dias a 37° C, os ovos foram abertos para avaliação de possíveis lesões na membrana corioalantóide e no embrião de galinha.

Para determinar a diluição do APV a ser utilizada na avaliação da atividade virucida da própolis, a amostra vacinal após reconstituída de acordo com as recomendações do fabricante e, posteriormente, testada nas diluições 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000 e 1:2000, em triplicata. Com isso foi definida uma diluição viral em que o embrião não sofresse hemorragia ou morte, mas que permitisse a observação das lesões pox na MCA. As diluições do APV foram inoculadas em ovos embrionados, seguindo a metodologia descrita (Lierz et al., 2007).

2.5. Atividade virucida do extrato etanólico de própolis verde in vivo

Para avaliar a atividade virucida do extrato etanólico da própolis verde, a amostra de APV, na diluição 1:1000 (determinada em avaliação prévia), foi incubado com as diferentes concentrações de extrato de própolis verde a 22° C por zero, quatro ou oito horas. Além disso, foram analisadas três concentrações da própolis: T1= 2400 µg/dose, T2= 240 µg/dose, T3= 24 µg/dose e tratamento sem própolis (0 µg/dose - T4). Após a incubação, procedeu-se a inoculação sobre a MCA de seis ovos por tratamento, num volume final de 200 µl (100 µl de APV + 100 µl própolis nos tratamentos 1, 2 e 3 ou 100 µl de APV + 100 µl PBS no tratamento 4). Os ovos foram, incubados a 37° C, por cinco dias, e posteriormente abertos para avaliação das MCA. A avaliação da atividade virucida foi determinada macroscopicamente

através da observação das lesões pox na membrana e da análise histopatológica das lesões.

2.6. Histopatologia

Para a observação e descrição das lesões microscópicas causadas pelo APV na MCA, uma membrana de cada tratamento e nos diferentes períodos de incubação do vírus com a própolis, além de uma membrana de ovo inoculado somente com PBS (controle negativo), escolhidas aleatoriamente, foram fixadas em formol a 10%, para posterior inclusão em blocos de parafina. Com auxílio de um micrótomo foram obtidos cortes com 5 μ m de espessura, que foram dispostos em lâminas de vidro e corados pela técnica de hematoxilina e eosina (Allen, 1994). Na visualização em microscópio óptico, foram analisadas a hiperplasia epitelial, degeneração vacuolar, corpúsculos de inclusão, inflamação e congestão/edema, classificadas por escores de lesão como: lesões severas (+++), lesões moderadas (++) , lesões leves (+) e ausência de lesões (-).

2.7. Análise Estatística

Os valores de contagem de lesões pox foram convertidos para Log_{10} . Foi feita análise de variância através do procedimento General Linear Models, do pacote estatístico SAS 8.0 (2001), procurando verificar, estatisticamente, as diferenças entre os tratamentos. As variáveis que apresentaram diferença estatística ao teste F foram submetidas ao teste de Tukey ($P < 0,05$), procurando identificar diferenças entre as médias dos tratamentos.

3. Resultados

3.1 Citotoxicidade da própolis e determinação da dose infectante do APV

Após a abertura dos ovos, não foram observadas alterações macroscópicas na membrana corioalantóide decorrentes da inoculação dos níveis de própolis testados (2400 µg/dose, 240 µg/dose e 24 µg/dose). Além disso, macroscopicamente não houve prejuízo aos embriões. Por esta razão, decidiu-se utilizar as mesmas concentrações para avaliar a capacidade virucida do extrato etanólico de própolis verde.

A diluição 1:1000 do APV foi a que proporcionou melhor visualização das lesões pox na MCA, sendo selecionada para utilização nas avaliações subsequentes. Os ovos inoculados com as diluições 1:50, 1:100 e 1:500 do APV apresentaram uma quantidade muito elevada de lesões pox, impossibilitando a sua contagem e correta caracterização. Já na diluição 1:2000, a quantidade de lesões pox foi insuficiente ou nula, impossibilitando a sua utilização para verificação da capacidade virucida do extrato etanólico de própolis verde.

3.2 Atividade virucida do extrato etanólico de própolis verde (*in vivo*)

Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos ($P > 0,05$) quando o APV e o extrato etanólico de própolis verde foram associados e imediatamente inoculados (zero hora), conforme pode ser observado na Figura 1. No entanto, observou-se uma redução no número de lesões pox nas MCA inoculadas com o vírus associado a 2400 µg/dose do extrato de própolis (Figuras 1 e 2).

Quando APV e própolis foram previamente incubados por quatro horas a 22° C para então serem inoculados nos ovos embrionados, a utilização de 2400 µg/dose do extrato etanólico de própolis verde apresentou redução significativa no nº de

lesões ($P < 0,05$), conforme pode ser observado nas Figuras 1 e 3. O número de lesões caiu de 0,888 (\log_{10}) no tratamento controle, em que o vírus foi inoculado sem própolis, para 0,527 (\log_{10}). Além disso, apesar de não ser constatada diferença estatística em relação ao grupo controle, a utilização de 240 $\mu\text{g}/\text{dose}$ de própolis proporcionou uma redução no número de lesões pox para 0,827 (\log_{10}). Após oito horas de incubação do APV com a própolis, o seu efeito virucida tornou-se ainda mais evidente (Figuras 1 e 4). Enquanto no tratamento controle observou-se 0,938 (\log_{10}) de lesões pox, a utilização da maior concentração de própolis (2400 $\mu\text{g}/\text{dose}$) inativou completamente o vírus, uma vez que não se observaram lesões pox na MCA dos ovos inoculados ($P < 0,0001$). Além disso, houve uma redução estatisticamente significativa ($P < 0,05$) no número de lesões entre o tratamento controle e o T2 (APV incubado com 240 $\mu\text{g}/\text{dose}$ do extrato de própolis), que apresentou 0,640 (\log_{10}) lesões pox.

3.3. Histopatologia

A MCA do controle negativo, sem a presença de vírus, não apresentou nenhuma alteração histológica característica da proliferação do avipoxvirus (Figura 5a), enquanto que no controle positivo observou-se proliferação de células epiteliais da membrana corioalantóide, com degeneração vacuolar e presença de corpúsculos de inclusão viral eosinofílicos no citoplasma das células epiteliais (Figura 5b). Conforme pode ser observado na Tabela 1, as lesões obtiveram escores maiores, quando o vírus e a própolis foram associados e imediatamente inoculados sobre a membrana corioalantóide (zero horas de incubação). Independentemente da concentração de própolis utilizada, as lesões histológicas observadas na MCA foram semelhantes. Com a utilização de 2400 $\mu\text{g}/\text{dose}$ do extrato etanólico de própolis

observou-se uma acentuada proliferação de células epiteliais no ectoderma e endoderma da MCA, com degeneração vacuolar e presença de corpúsculos de inclusão viral eosinofílicos no citoplasma das células epiteliais, com tamanhos variados (Figura 6a). No mesoderma pôde-se observar infiltrado inflamatório difuso e acentuado, constituído de heterófilos e alguns linfócitos, além de edema, congestão e heterófilos na luz dos vasos sanguíneos. Com a utilização de 240 e 24 µg/dose de própolis observou-se lesões multifocais e moderadas.

Após quatro horas de incubação do APV com o extrato de própolis verde, as lesões histológicas observadas foram similares àquelas observadas com zero horas de incubação, mas com escores menores (Tabela 1). A utilização de 2400 µg/dose de própolis propiciou uma redução no escore do processo inflamatório e presença de corpúsculos de inclusão eosinofílicos no citoplasma das células epiteliais, de lesão severa para leve (Figura 6b). Na concentração de 240 µg/dose, houve uma redução no escore de congestão, edema e inflamação para lesão leve, em comparação com o tratamento sem própolis (T4), enquanto que com a utilização de 24 µg/dose as lesões foram classificadas como leves nos parâmetros hiperplasia epitelial, degeneração vacuolar e no número de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos (Tabela 1).

Quando o extrato etanólico de própolis verde, nas três concentrações avaliadas, e o APV foram associados e incubados durante oito horas a 22° C para, então, serem inoculados sobre a MCA de ovos embrionados de galinha, houve uma grande redução no escore de lesões, quando comparado aos mesmos tratamentos, sem incubação. Em todos os tratamentos observou-se hiperplasia epitelial discreta e focal, degeneração hidrópica e discreta reação inflamatória no mesoderma. Raros corpúsculos de inclusão no citoplasma das células epiteliais foram observados com

a utilização de 240 e 24 µg/dose de própolis, enquanto que a utilização da concentração máxima avaliada de própolis (2400 µg/dose), inibiu completamente a formação de corpúsculos de inclusão característicos do APV (Figura 6c).

4. Discussão

As infecções por vírus figuram entre as principais ameaças à saúde humana e dos animais, mas podem ser minimizadas ou evitadas reduzindo-se a exposição de uma determinada população ao microrganismo. Mesmo assim, invariavelmente, uma determinada parcela desta população é infectada, sendo necessário o uso de substâncias antivirais ou virucidas. Segundo van Boven et al. (2008), é possível conter o surgimento de novas enfermidades virais em um estágio precoce através da adoção de um programa de controle antiviral em larga escala. Especificamente nos casos de gripe, o tratamento antiviral reduz a transmissibilidade e as taxas de letalidade do vírus (Merler et al., 2009). Neste sentido, a utilização de antivirais ou virucidas tem sido proposta como estratégia para evitar o risco de pandemias, como a causada recentemente pelo vírus influenza A – H1N1 (Handel et al., 2009). Contudo, o uso indiscriminado e prolongado de substâncias antivirais ou virucidas pode acarretar em problemas de toxicidade e resistência às drogas, causando diminuição da sua efetividade contra o microrganismo ou forçando à utilização de doses crescentes para supressão da replicação viral (Handel et al., 2009; van Rompay, 2010). Portanto, o sucesso na prevenção e no tratamento de uma série de enfermidades causadas por vírus está intimamente relacionado ao desenvolvimento de novas drogas antivirais ou virucidas, ou mesmo o aperfeiçoamento das já existentes (Freestone, 1985). Neste sentido, uma valiosa fonte de novos compostos

químicos é a abundância de moléculas encontradas em produtos naturais, que têm demonstrado propriedades antivirais.

Neste estudo, a atividade virucida *in vivo* da própolis verde foi avaliada quando um extrato etanólico foi associado ao APV e posteriormente inoculado sobre a MCA de embriões de galinha. Conforme esperado, não foi observada atividade virucida quando as diferentes concentrações de própolis avaliadas (2400 µg/dose, 240 µg/dose, 24 µg/dose ou 0 µg/dose) foram associadas ao vírus e imediatamente inoculadas sobre a MCA ($P > 0,05$). Segundo Mahu e Kangro (1996), os agentes virucidas inativam o vírus em decorrência de suas propriedades físicas e químicas e geralmente são mais efetivos quando o vírus está fora de suas células hospedeiras. Neste caso, como o vírus e a própolis foram inoculados imediatamente após a sua associação, provavelmente não tenha havido tempo para que a própolis atuasse sobre os vírions, permitindo a sua infecção nas células epiteliais do ectoderma da MCA e, conseqüentemente, as lesões observadas no exame histopatológico. No entanto, mesmo não havendo significância estatística, a utilização de 2400 µg/dose do extrato de própolis propiciou uma redução no número de lesões pox, expresso em \log_{10} , em relação ao tratamento controle, sem própolis.

A atividade virucida da própolis verde pôde ser claramente observada quando o APV e a própolis foram associados e, previamente à inoculação nos ovos embrionados, incubados por quatro horas a 22° C. Conforme pode ser verificado nas Figuras 1 e 3, a utilização de 2400 µg/dose do extrato etanólico reduziu o número de lesões pox de 0,888 (\log_{10}) no tratamento controle para 0,527 (\log_{10}) ($P < 0,05$). Quando o tempo de incubação entre própolis e vírus aumentou de quatro para oito horas, o efeito virucida tornou-se ainda mais evidente (Figuras 1 e 4), uma vez que a utilização de 2400 µg/dose do extrato etanólico de própolis verde inativou

completamente o APV ($P < 0,0001$). Além disso, houve uma redução estatisticamente significativa ($P < 0,05$) no número de lesões entre o tratamento controle positivo e o T2, no qual o APV foi incubado com 240 $\mu\text{g}/\text{dose}$ do extrato de própolis. Estes dados corroboram com os obtidos por Amoros et al. (1992) que detectaram atividade virucida, porém *in vitro*, de uma amostra francesa de própolis contra o herpes simplex vírus tipo 2 (HSV-2) e o vírus da estomatite vesicular. Após a sua incubação por duas horas com 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de um extrato etanólico da própolis, estes vírus foram inoculados sobre cultivos de células da linhagem Vero. Segundo estes pesquisadores, a inativação dos vírus foi dependente do tempo e concentração de própolis utilizados. Em estudo semelhante, Brum et al. (2006), avaliaram as atividades antiviral (tratamento de células da linhagem MDCK – rim de canino - pré-infecção) e virucida (incubação direta do vírus com substâncias teste) dos ácidos transcinâmico e ferrúlico, além do flavonóide Kaempferol, contra o vírus da cinomose canina. Estas substâncias, encontradas em grande quantidade na amostra de própolis verde utilizada neste estudo (Fischer et al., 2007b), segundo os pesquisadores, apresentaram atividade tanto antiviral como virucida, provavelmente interferindo na ligação e entrada do vírus na célula, resultando na redução do título viral.

Em estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa (Fischer et al., 2007b) visando caracterizar o efeito imunomodulador do mesmo extrato etanólico de própolis verde aqui avaliado quanto a sua capacidade virucida, uma análise cromatográfica (cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC) revelou elevados níveis de compostos fenólicos e de ácido cinâmico e seus derivados. Neste extrato, os flavonóides corresponderam a 22,37% do extrato seco (Fischer et al., 2007b). A atividade antiviral de determinados flavonóides, como a quercetina, por exemplo,

está relacionada à capacidade desse composto de se ligar a proteínas do envelope viral, interferindo na ligação e penetração do vírus na célula, bem como na síntese de DNA (Formica e Regelson, 1995). Em estudo avaliando, entre outros, a atividade antiviral de amostras de própolis colhidas em vários países, inclusive do Brasil, Kujumgiev et al. (1999) concluíram que a atividade antiviral das diversas amostras foi similar, apesar de diferenças em suas constituições químicas. Ainda segundo estes pesquisadores, nas amostras de regiões de clima temperado, os flavonóides e os ésteres dos ácidos fenólicos são reconhecidamente os compostos responsáveis pela ação antiviral, enquanto que nas amostras de própolis de regiões com clima tropical não apresentam estes compostos, mas, mesmo assim, demonstram atividade antiviral e virucida. É provável que as atividades antiviral e virucida da própolis não sejam causadas apenas por um composto químico, mas por uma ação sinérgica entre seus vários constituintes (Nolkemper et al., 2010). A atividade virucida observada no presente estudo, provavelmente, esteja relacionada aos altos níveis de compostos fenólicos e flavonóides encontrados na própolis verde utilizada. Resultado semelhante foi obtido por Nolkemper et al. (2010) que encontraram pronunciada atividade virucida contra o herpes simplex vírus tipo 2 (HSV-2) utilizando extratos aquoso e etanólico de uma amostra Tcheca de própolis, ricos em compostos fenólicos e flavonóides.

Grande parte dos estudos avaliando a atividade antiviral ou virucida, seja da própolis ou de outros compostos químicos, é realizada utilizando-se modelos *in vitro*. No entanto, a maior parte dos compostos que apresentam resultados promissores *in vitro* não resultam em um produto final devido à falta de recursos, farmacocinética desfavorável, toxicidade ou, especialmente, insuficiente eficácia antiviral *in vivo* (Deméter et al., 1998). A correlação entre as concentrações *in vitro* de compostos

antivirais ou virucidas e a sua relativa eficácia *in vivo* em pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), por exemplo, é muito pequena (van Rompay, 2010). Neste sentido, a membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha se constitui em um modelo biológico valioso para estudos *in vivo* com vírus de diversas famílias (Bersano et al., 2003; Beltrão et al., 2004; Lierz et al., 2007), com a vantagem do baixo custo e aceitação por parte das comissões de ética em experimentação animal e grupos de defesa dos animais. No entanto, o que destaca a utilização deste modelo biológico é o fato de que muitos aspectos da relação vírus-hospedeiro foram esclarecidos através do estudo de vírus infectando a membrana corioalantóide, em um nível ultraestrutural (Rangan e Sirsat, 1962), mimetizando a infecção viral.

A atividade virucida do extrato etanólico da própolis verde também pôde ser evidenciada na avaliação histopatológica. Conforme pode ser observado na Tabela 1, quando própolis, independentemente da concentração utilizada, e vírus foram associados e imediatamente inoculados sobre a MCA, os escores de lesões praticamente não variaram em relação ao tratamento controle positivo (inoculação somente do APV). Estes resultados são complementares àqueles obtidos em relação ao número de lesões pox encontrados na MCA, evidenciando a necessidade de um período de incubação entre a própolis e o vírus para que se perceba a sua ação virucida (Mahu e Kangro, 1996). Após quatro horas de incubação com o vírus, o efeito virucida da própolis tornou-se mais evidente. A utilização de 2400 µg/dose do extrato etanólico propiciou uma redução nos escores de inflamação e corpúsculo de inclusão de lesões severas para lesões leves, enquanto que o tratamento controle se manteve com lesões severas para todos os parâmetros analisados. A utilização da concentração mais baixa de própolis (24 µg/dose) permitiu uma

redução nos escores de hiperplasia epitelial, degeneração vacuolar e corpúsculo de inclusão. O processo inflamatório, a formação de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos, bem como a proliferação de células epiteliais do ectoderma e endoderma são lesões histopatológicas características do APV. A redução no escore destas lesões caracteriza claramente a atividade virucida da própolis verde utilizada.

A ação virucida total do extrato etanólico de própolis verde pôde ser observada após oito horas da sua incubação com o APV. Além de evitar o surgimento das lesões pox características do vírus, a utilização de 2400 µg/dose de própolis propiciou ausência de corpúsculos de inclusão (Figura 6c), patognomônicos do vírus. Além disso, os escores de todos os parâmetros analisados (Tabela 1) foram reduzidos, passando de lesões severas no tratamento controle, sem própolis, para lesões leves, independentemente das concentrações de própolis utilizadas, novamente evidenciando a atuação da própolis. Este efeito virucida pode ter ocorrido em função da ação da própolis sobre o envelope viral do APV, uma vez que Amoros et al. (1992) identificaram efeito virucida da própolis em vírus envelopados como os herpesvirus simplex tipos 1 e 2 e o , o que não se repetiu em vírus não envelopados como o adenovirus e poliovirus tipo 2 e o vírus da estomatite vesicular.

Neste estudo, um extrato etanólico de própolis verde demonstrou efeito virucida contra o APV, quando inoculado sobre a MCA de embriões de galinha. Este efeito foi dependente da concentração de própolis utilizada, bem como do tempo de incubação entre o vírus e o extrato etanólico. A inibição completa do vírus foi obtida com oito horas de incubação do APV com 2400 µg/dose de própolis, manifestada pela ausência de lesões pox e de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos.

Frente à necessidade de novas substâncias com atividade antiviral e/ou virucida, a própolis verde pode ser uma alternativa no combate a infecções por poxvirus.

Agradecimentos

Nós somos gratos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) – pelo suporte financeiro; Apis Nativa Produtos Naturais Ltda – Prodapys – Araranguá, SC – Brasil, pelo fornecimento do extrato etanólico de própolis verde; ao Laboratório Bio-Vet S/A – Vargem Grande Paulista, SP – Brasil, pelo fornecimento da vacina comercial contra o APV.

Referências

Allen, T.C., 1994. Hematoxilin and eosin, in: Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. *Laboratory Methods in Histotechnology* – Armed Forces Institute of Pathology, pp.53-57.

Amanna, I.J., Slifka, M.K., 2009. Wanted, dead or alive: New viral vaccines. *Antiviral Res.* 84, 119–130.

Amoros, M., Sauvager, F., Girre, L., Cormier, M., 1992. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie*, 23, 231–240.

Arino, J., Bowman, C.S., Moghadas, S., 2009. Antiviral resistance during pandemic influenza: implications for stockpiling and drug use. *BMC Infect Dis*, 9:8

Bhattacharya, S., 2008. The World Health Organization and global smallpox eradication. *J Epidemiol Community Health*, 62, 909–912.

Beltrão, N., Furian, T.Q., Leão, J.A., Pereira, R.A., Moraes, L.B., Canal, C.W., 2004. Detecção do vírus da laringotraqueíte das galinhas no Brasil. *Pesq Vet Bras*, 24, 85-88.

Bersano, J.G., Catroxo, M.H.B., Villalobos, E.M.C, Leme, M.C.M., Martins, A.M.C.R.P.F., Peixoto, Z.M.P., Portugal, M.A.S.C., Monteiro, R.M., Ogata, R.A., Curi, N.A., 2003. Varíola suína: estudo sobre a ocorrência de surtos nos Estados de São Paulo e Tocantins, Brasil. *Arq Inst Biol*, 70, 269-278.

Brum, L.P., 2006. Atividade antiviral dos compostos fenólicos (ácido ferrúlico e transcinâmico) e dos flavonóides (quercetina e kaempherol) sobre os herpesvírus bovino 1, herpesvírus bovino 5 e vírus da cinomose canina. 86f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, MG.

Debiaggi, M., Tateo, F., Pagani, L., Luini, M., Romero, E., 1990. Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. *Microbiologica*, 13, 207–213.

Demeter, L.M., Meehan, P.M., Morse, G., Fischl, M.A., Para, M., Powderly, W., Leedom, J., Holden-Wiltse, J., Greisberger, C., Wood, K., Timpone Jr., J., Wathen, L.K., Nevin, T., Resnick, L., Batts, D.H., Reichman, R.C., 1998. Phase I study of atevirdine mesylate (U-87201E) monotherapy in HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 19, 135–144.

Fischer, G., Dummer, L.A., Vidor, T., Paulino, N., Paulino, A.S. Avaliação da ação antiviral de uma solução de própolis sobre o herpesvírus bovino e o vírus da diarreia viral dos bovinos. In: EnPos - Encontro de Pós-Graduação, 7, 2005, Pelotas. Anais, 2005.

Fischer, G., Conceição, F.R., Leite, F.P.L., Vargas, G.D., Hübner, S.O., Dellagostin, O.A., Paulino, N., Paulino, A.S., Vidor, T., 2007a. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine*, 25, 1250-1256.

Fischer, G., Cleff, M.B., Dummer, L.A., Campos, F.S., Storch, T., Vargas, G.D., Hübner, S.O., Vidor, T., 2007b. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. *Vet Immunol Immunopathol*, 116, 79-84.

Fischer, G., Vidor, T., 2008. Propolis as an immune system modulator substance, in: Orsolic, N., Basic, I. (Eds.), *Scientific Evidence of the Use of Propolis in Ethnomedicine*. Transworld Research Network, Kerala. pp. 133-147.

Formica, J.V., Regelson, W., 1995. Review of biology of quercetin and related bioflavanoids. *Food Chem Toxicol*, 33, 1061-1080.

Freestone, D.S., 1985. The need for new antiviral agents. *Antiviral Res.* 5, 307-324.

Graci, J.D., Cameron, C.E., 2008. Therapeutically targeting RNA viruses via lethal mutagenesis. *Future virol*, 3, 553-566.

Gregoris, E., Stevanato, R., 2010. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. *Food Chem Toxicol*, 48, 76–82.

Handel, A., Longini, I.M., Antia, R., 2009. Antiviral resistance and the control of pandemic influenza: The roles of stochasticity, evolution and model details. *J Theor Biol*, 256, 117-125.

Ito, J., Chang, F.R., Wang, H.K., Park, Y.K., Ikegaki, M., Kilgore, N., Lee, K.H., 2001. Anti-AIDS agents 48: anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. *J Nat Prod*, 64, 1278–1281.

Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popov, S., 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*, 64, 235–40.

Lierz, M., Bergmann, V., Isa, G., Czerny, C.P., Lueschow, D., Mwanzia, J., Prusas, C., Hafez, H.H., 2007. Avipoxvirus Infection in a Collection of Captive Stone Curlews (*Burhinus oedicnemus*). *J Avian Med Surg*, 21, 50–55.

Mahy, B.W.J., Kangro, H.O., 1996. *Virology Methods Manual*. London, Academic Press. pp.374.

McCaw, J.M., Wood, J.G., McCaw, C.T., McVernon, J., 2008. Impact of Emerging Antiviral Drug Resistance on Influenza Containment and Spread: Influence of Subclinical Infection and Strategic Use of a Stockpile Containing One or Two Drugs. *PLoS ONE* 3, e2362. doi:10.1371/journal.pone.0002362

Merler, S., Ajelli, M., Rizzo, C., 2009. Age-prioritized use of antivirals during an influenza pandemic. *BMC Infect Dis*, 9,117 doi:10.1186/1471-2334-9-117

Nóbrega, A.M., Alves, E.N., Presgrave, R.F., Delgado, I.F., 2008. Avaliação da irritabilidade ocular induzida por ingredientes de cosméticos através do teste de Draize e dos Métodos HET-CAM e RBC. *Universitas: Ciências da Saúde*, 6, 103-120.

Nolkemper, S., Reichling, J., Sensch, K.H., Schnitzler, P., 2010. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine*, 17, 132-138.

Pagliarone, A.C., Orsatti, C.L., Búfalo, M.C., Missima, F., Bachiega, T.F., Araújo Júnior, J.P., Sforcin, J.M., 2009. Propolis effects on pro-inflammatory cytokine production and Toll-like receptor 2 and 4 expression in stressed mice. *Int Immunopharmacol*, 9, 1352–1356.

Rangan, S.R.S., Sirsat, S.M., 1962. The fine structure of the normal chorio-allantoic membrane of the chick-embryo. *Quarterly J Microsc Sci*, 103, 17-23.

SAS Institute. SAS User's guide: Statistics. Version 8.0 Edition. Cary, NC, 2001.

Schnitzler, P., Neuner, A., Nolkemper, S., Zundel, C., Nowack, H., Sensch, K.H., Reichling, J., 2009. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytother. Res.* in press.

Serkedjieva, J., Manolova, N., Bankova, V., 1992. Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). *J Nat Prod*, 55, 294–297.

Silva, A.C., Reis, B.B., Ricci Junior, J.E.R., Fernandes, F.S., Corrêa, J.F., Schatzmayr, H.G., 2008. Infecção em humanos por varíola bovina na microrregião de Itajubá, Estado de Minas Gerais: relato de caso. *Rev Soc Bras Med Trop*, 41, 507-511.

van Boven, M., Klinkenberg, D., Pen, I., Weissing, F.J., Heesterbeek, H., 2008. Self-Interest versus Group-Interest in Antiviral Control. *PLoS ONE* 3, 1-9.

van Rompay, K.K.A., 2010. Evaluation of antiretrovirals in animal models of HIV infection. *Antiviral Res*, 85, 159–175.

Vatanserver, H.S., Sorkun, S.K., Gurhan, I.D., Kurt, F.O., Turkoz, E., Gencay, O., Salih, B., 2010. Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. *Acta Histochem*, doi:10.1016/j.acthis.2009.06.001

Legenda das Figuras

Fig. 1: Média \pm desvio padrão médio de lesões pox na membrana córioalantóide (MCA) de ovos embrionados de galinha (Log_{10}) após inoculação com *avipoxvírus* (APV) associado a 2400 $\mu\text{g}/\text{dose}$, 240 $\mu\text{g}/\text{dose}$, 24 $\mu\text{g}/\text{dose}$ ou 0 $\mu\text{g}/\text{dose}$ e extrato etanólico de própolis verde, após zero, quatro ou oito horas de incubação do vírus e própolis a 22° C. Letras diferentes em um mesmo período de incubação representam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Fig. 2: MCA de embrião de galinha fixada em formoldeído 10%, inoculada com APV e diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis verde, imediatamente após a associação: (a) 0 $\mu\text{g}/\text{dose}$ de própolis; (b) 2400 $\mu\text{g}/\text{dose}$ de própolis; (c) 240 $\mu\text{g}/\text{dose}$ de própolis; (d) 24 $\mu\text{g}/\text{dose}$ de própolis.

Fig. 3: MCA de embrião de galinha fixada em formoldeído 10%, inoculada com APV e diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis verde, 4 horas após a sua associação: (a) 0 $\mu\text{g}/\text{dose}$ de própolis; (b) 2400 $\mu\text{g}/\text{dose}$ de própolis; (c) 240 $\mu\text{g}/\text{dose}$ de própolis; (d) 24 $\mu\text{g}/\text{dose}$ de própolis.

Fig. 4: MCA de embrião de galinha fixada em formoldeído 10%, inoculada com APV e diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis verde, 8 horas após a sua associação: (a) 0 $\mu\text{g}/\text{dose}$ de própolis; (b) 2400 $\mu\text{g}/\text{dose}$ de própolis; (c) 240 $\mu\text{g}/\text{dose}$ de própolis; (d) 24 $\mu\text{g}/\text{dose}$ de própolis.

Fig. 5: MCA de embrião de galinha corada com hematoxilina eosina, observada em microscópio ótico 40x: (a) controle negativo; (b) controle positivo. \uparrow = corpúsculos de

inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos de células epiteliais do mesoderma; ◀ = degeneração vacuolar das células epiteliais do mesoderma.

Fig. 6: MCA de embrião de galinha corada com hematoxilina eosina, observada em microscópio ótico: (a) APV + 2400 µg/dose de própolis, 0 horas de incubação, 40x; (b) APV + 2400 µg/dose de própolis, 4 horas de incubação, 40x; (c) APV + 2400 µg/dose de própolis, 8 horas de incubação, 20x. ↑ = corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos de células epiteliais do mesoderma; ◀ = degeneração vacuolar das células epiteliais do mesoderma.

Tabela 1: Caracterização das lesões histológicas na membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha após inoculação do *avipoxvírus* associado a diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis verde, após três períodos de incubação

	Tratamento	Hiperplasia epitelial	Degeneração vacuolar	Corpúsculos de inclusão	Inflamação	Congestão / edema
0 hora	2400 µg/dose	+++ ^a	+++	+++	+++	+++
	240 µg/dose	+++	++ ^b	+++	+++	+++ hemorragia
	24 µg/dose	++	++	++	+++	+++
	0 µg/dose	+++	+++	+++	+++	+++
4 horas	2400 µg/dose	++	++	+ ^c	+	++
	240 µg/dose	++	++	++	+	+ hemorragia
	24 µg/dose	+	+	+	++	++
	0 µg/dose	+++	+++	+++	+++	+++
8 horas	2400 µg/dose	+	+	- ^d	+	+
	240 µg/dose	+	+	+	+	+
	24 µg/dose	+	+	+	+	+
	0 µg/dose	+++	+++	+++	+++	+++

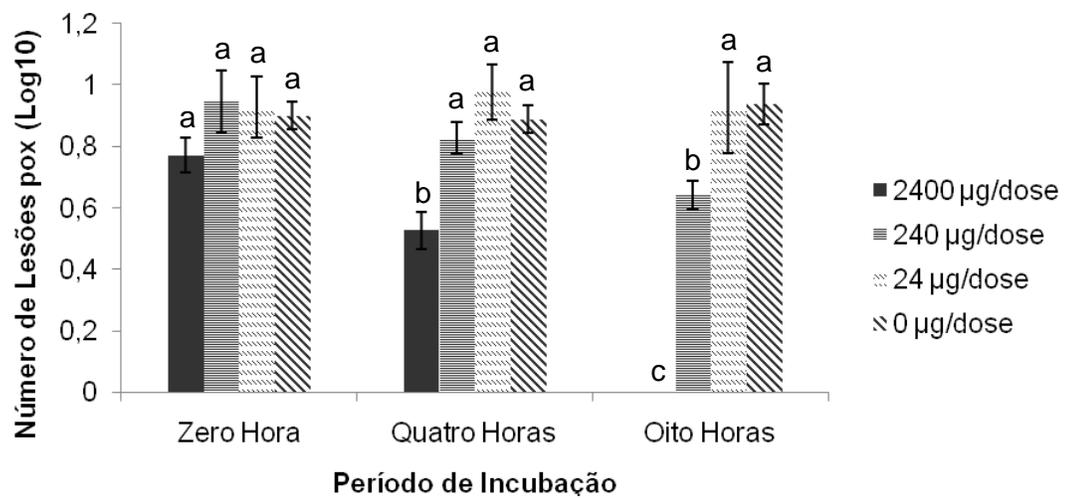
^a lesões severas;

^b lesões moderadas;

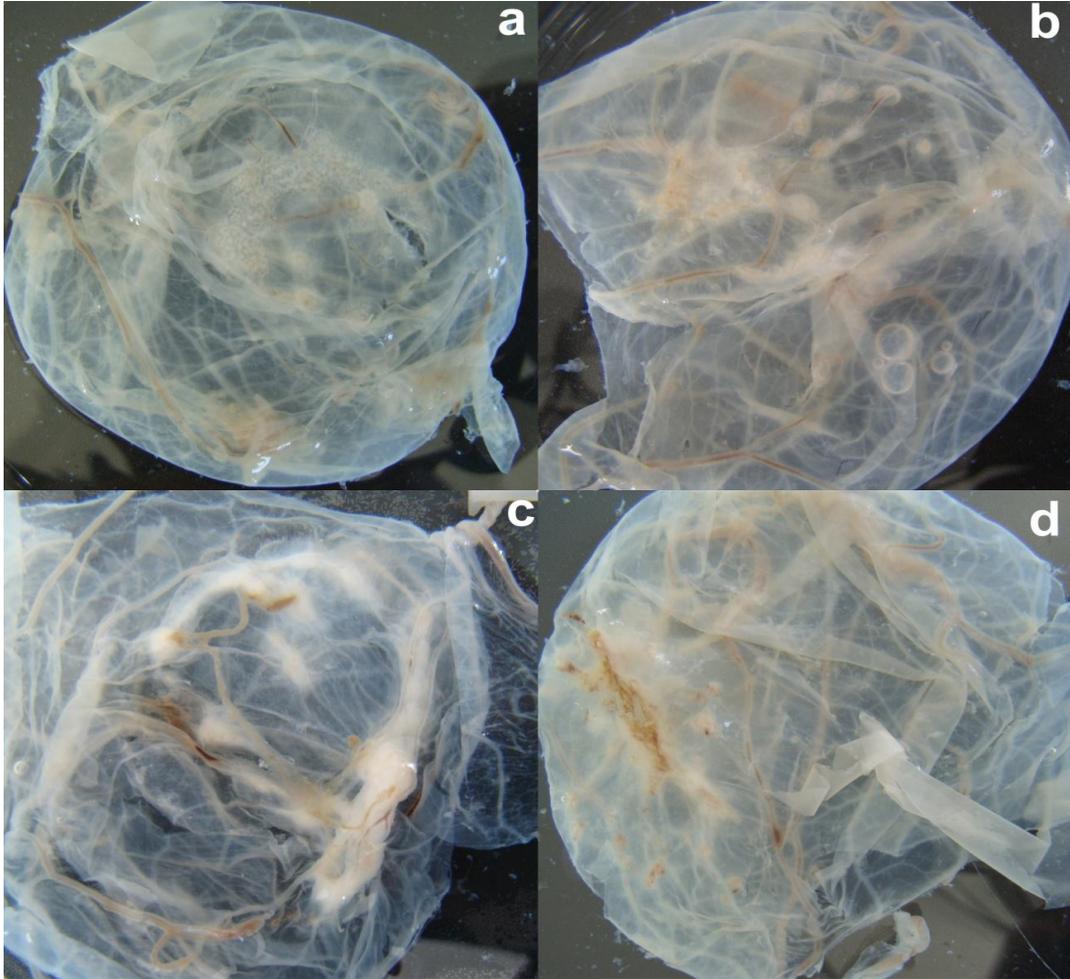
^c lesões leves;

^d ausência de lesões.

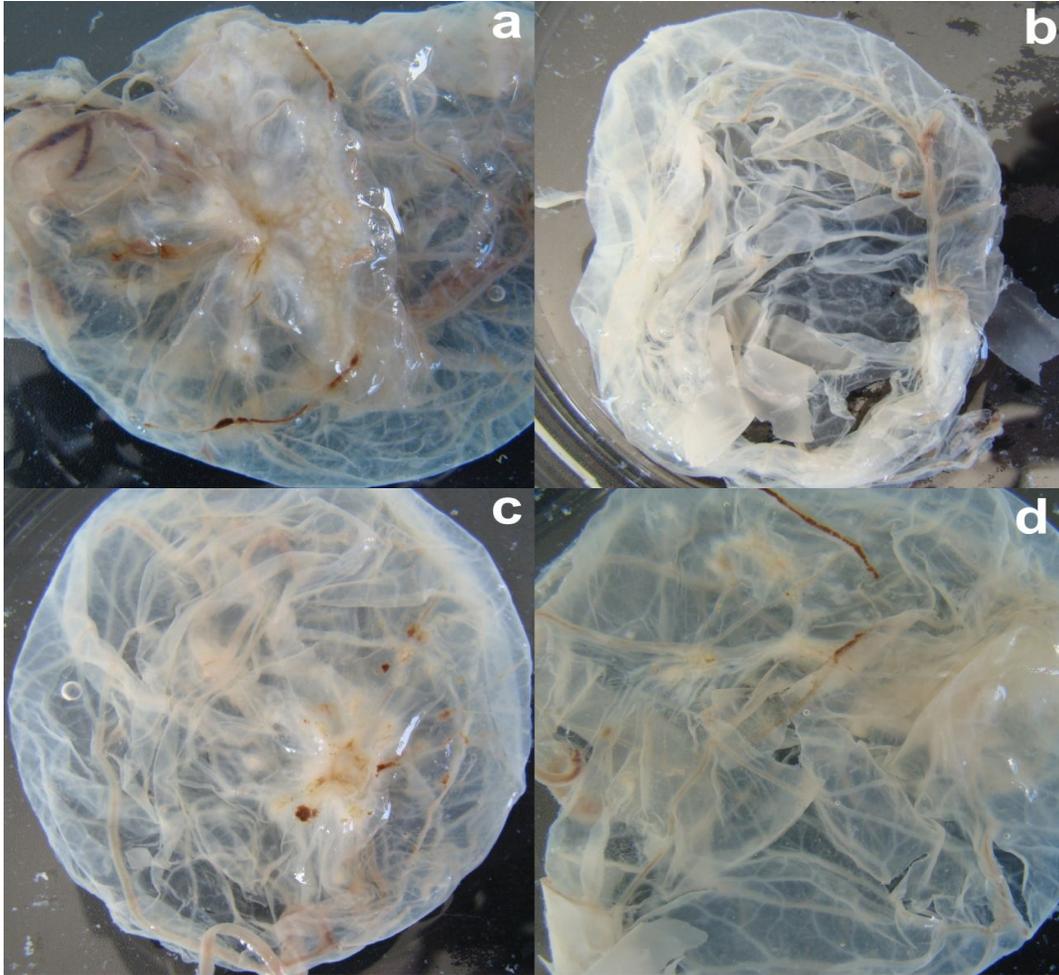
Vilela et al., Figura 1



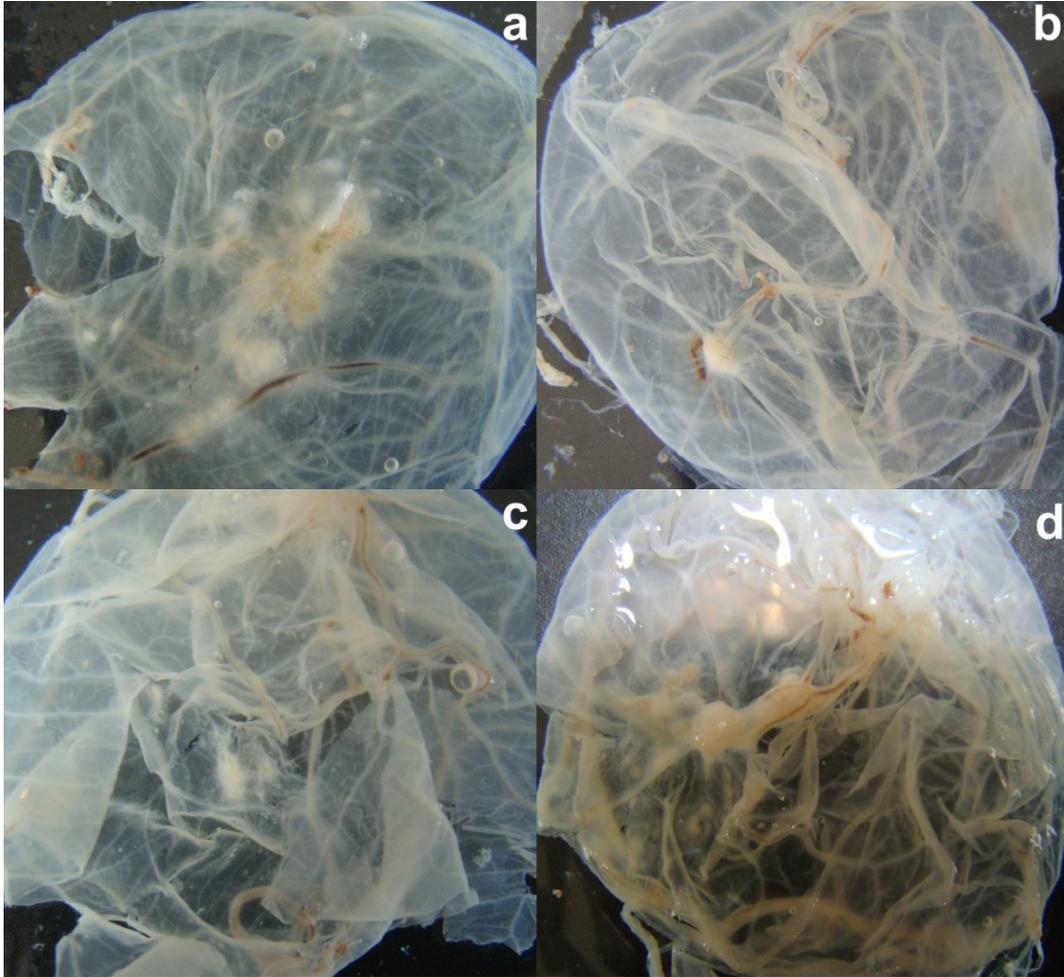
Vilela et al., Figura 2



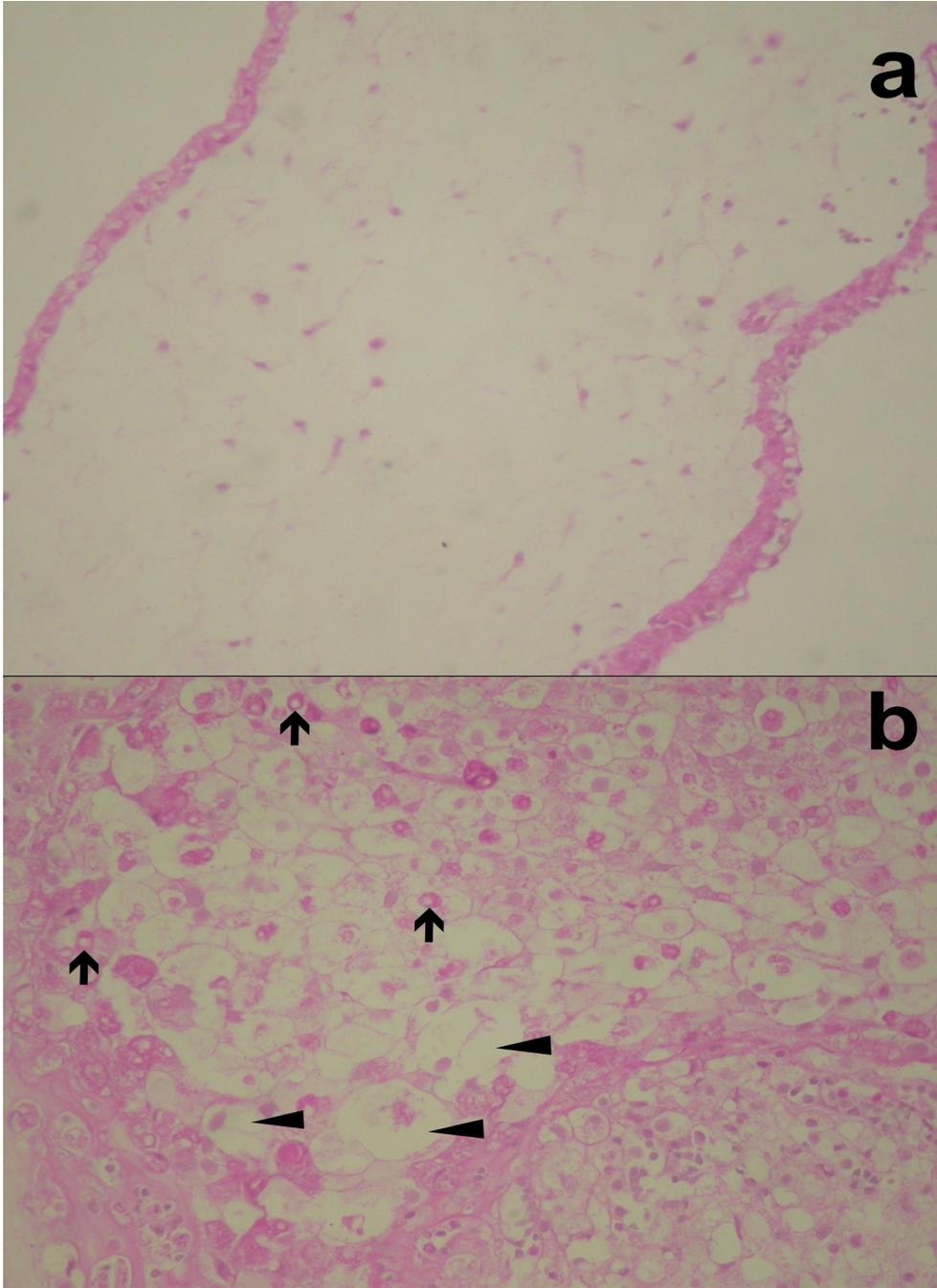
Vilela et al., Figura 3



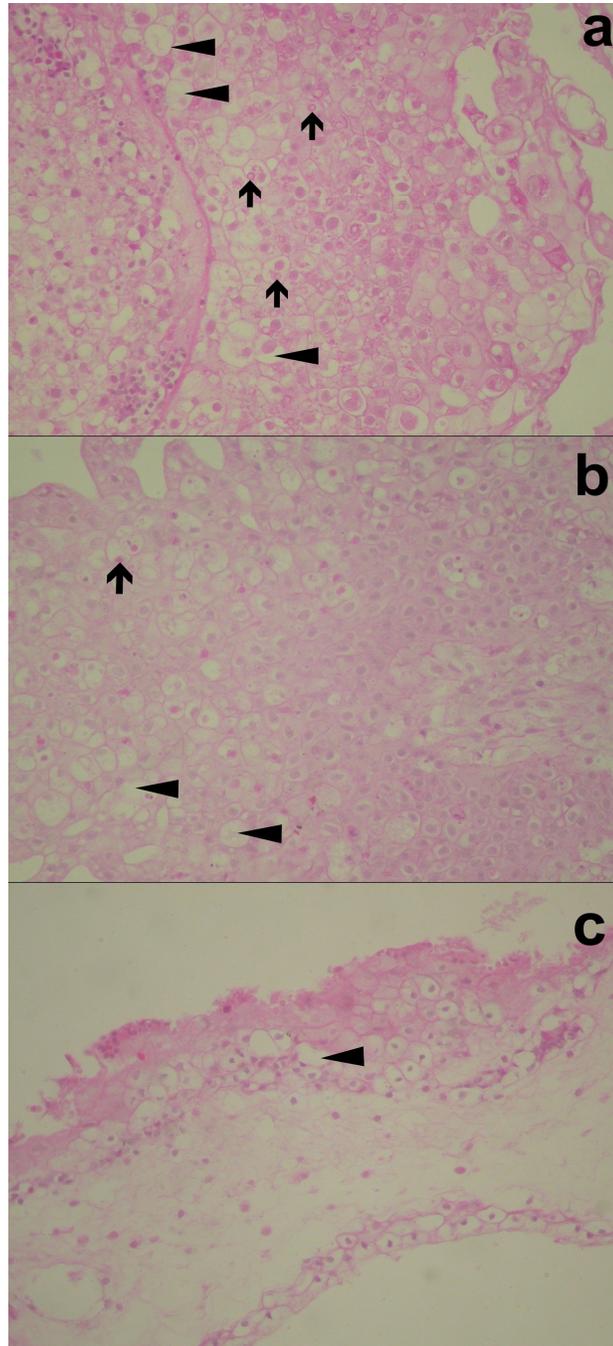
Vilela et al., Figura 4



Vilela et al., Figura 5



Vilela et al., Figura 6



3. ARTIGO 2

**PRÓPOLIS: UM PRODUTO NATURAL COMO ALTERNATIVA NA DESINFECÇÃO
DE OVOS EMBRIONADOS DESTINADOS A INCUBAÇÃO**

Formatado de acordo com as normas da revista Veterinary Microbiology (Anexo B)

**Própolis: um produto natural como alternativa na desinfecção de ovos
embrionados destinados a incubação**

Camila de O. Vilela¹; Cristina F. Nunes¹; Letícia De Toni¹;
Renata O. de Faria³; Sílvia Ladeira³; Sílvia de O. Hübner¹, Simone E. Sallis²,
Margarida B. Raffi²; Marcos A. Anciuti⁴; Geferson Fischer¹; Gilberto D. Vargas¹

¹ *Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel – CP 354 – 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil;*

² *Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel – CP 354 – 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil;*

³ *Laboratório de Bacteriologia e Micologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel – CP 354 – 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil;*

⁴ *Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça, Universidade Federal de Pelotas – UFPel – CP 354 – 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil;*

Resumo [Própolis: um produto natural como alternativa na desinfecção de ovos embrionados destinados a incubação]:

Durante o processo de resfriamento dos ovos embrionados há um fluxo natural de ar da superfície para o interior dos ovos carreando contaminantes como bactérias e fungos por meio dos poros da casca, infectando o embrião e resultando na inabilidade para eclodir e pintinhos de má qualidade. O formaldeído, que é um produto tóxico, ainda é o desinfetante mais utilizado para a desinfecção de ovos embrionados pela indústria avícola. Para avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da própolis verde como alternativa ao formaldeído 140 ovos de ninhos de matrizes de postura foram coletados e submetidos à desinfecção com cinco tratamentos: T1 - ovos fumigados com formaldeído; T2 - sem desinfecção; T3, T4 e T5 desinfetados por imersão com solução de própolis nas concentrações de 2400 µg, 240 µg e 24 µg respectivamente. Os níveis de contaminação da casca dos ovos por mesófilos totais e fungos (*Aspergillus* sp. e outros bolores) após a desinfecção com própolis foram menores quando comparados ao controle sem desinfecção. Na comparação ao tratamento com formaldeído as concentrações de própolis com 240 µg e 24 µg não diferiram para atividade antibacteriana, mas para atividade antifúngica as concentrações de 2400 µg e 240 µg foram superiores. Os tratamentos de própolis (2400 µg e 240 µg) apresentaram as maiores taxas de eclodibilidade, com 94,11% superando o tratamento com formaldeído que foi de 84,61%. O extrato etanólico de própolis verde apresentou atividade antibacteriana e antifúngica em ovos embrionados podendo ser um novo produto natural desinfetante em substituição ao formaldeído.

Palavras chave: própolis, ovos embrionados, formaldeído, desinfetantes

1. Introdução:

A biologia dos ovos férteis possibilita que todos os recursos nutricionais necessários para o desenvolvimento embrionário estejam presentes no ovo durante a incubação. O ambiente ideal para o desenvolvimento embrionário é o mesmo necessário para a multiplicação de microrganismos. Portanto, os ovos contaminados disseminarão microrganismos nas incubadoras e nascedouros reduzindo a eclodibilidade e produzindo pintos de má qualidade (Bramwell, 2000). As práticas destinadas à manutenção da qualidade sanitária dos ovos requerem coletas freqüentes e principalmente limpeza e desinfecção adequadas. Durante o processo de resfriamento dos ovos, há um fluxo natural de ar da superfície para o interior dos ovos que carrega contaminantes como bactérias e fungos por meio dos poros da casca, infectando o embrião, resultando na incapacidade para eclodir, pintinhos de má qualidade, ou aves enfermas durante a fase de crescimento (Scott & Swetnam, 1993; Cony et al., 2008). Dessa forma, os ovos devem sofrer desinfecção o mais rápido possível após a postura por meio de métodos e compostos adequados (Sesti, 2005).

O formaldeído, através do processo de fumigação, é o desinfetante mais utilizado pela indústria avícola para esta finalidade. A formalina (formaldeído a 40%) é misturada com um agente oxidante, o permanganato de potássio, para gerar um gás. Os ovos são em seguida expostos a esse gás em um gabinete fechado ou numa sala adequada (Magras, 1996). Mesmo mantendo a incubação com baixos níveis de contaminação e com elevadas taxas de eclodibilidade, é importante ressaltar que o formaldeído é tóxico, não somente para as aves como também para os seres humanos. A fumigação com formaldeído na pré-incubação acarreta na redução em tamanho e número das células do epitélio traqueal de embriões e de

pintinhos recém eclodidos (Zulkifli et al., 1999; Hayretida & Kolankaya, 2008). Para os seres humanos o formaldeído é mais prejudicial, considerado cancerígeno. Contudo, ele ainda é usado principalmente como conservante e desinfetante. A Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2006) o classificou como carcinógeno principalmente devido à sua associação com o câncer nasofaríngeo em humanos e o câncer nasal em roedores. O aumento nos casos de mortalidade por neoplasias linfohematopoiéticas, em especial a leucemia mielóide assim como câncer cerebral, tem sido observado em anatomistas, patologistas e trabalhadores da indústria funerária, todos por estarem expostos ao formaldeído (Hauptmann et al., 2009). Ainda não existem dados de literatura relacionando o risco de câncer nos trabalhadores da indústria avícola, mesmo sabendo que estes profissionais estão constantemente expostos ao formaldeído em níveis considerados acima do permitido (Scott & Swetnam, 1993). Sendo assim, há necessidade de buscar alternativas para substituir este produto desinfetante, especialmente na avicultura.

A própolis é uma substância resinosa coletada pelas abelhas a partir de exsudatos de brotos e botões florais de diversas plantas. Possui coloração e consistência variada e é utilizada pelas abelhas para reparar os favos de mel, para fechar pequenas frestas, embalsamar insetos mortos, bem como proteger a colméia contra a invasão de micro-organismos (Marcucci, 1995). A composição química da própolis é dependente da biodiversidade da região visitada pelas abelhas (Park et al. 2002). Portanto, as substâncias presentes encontram-se diretamente relacionadas com a composição química da resina da planta de origem (Cabral et al., 2009). Os compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides, têm sido considerados como um dos principais constituintes biologicamente ativos da própolis (Li et al. 2009),

juntamente com os derivados do ácido cinâmico e seus ésteres e os diterpenos (Lustosa, 2008).

Devido à composição química complexa e variável da própolis várias são as propriedades biológicas, tais como: antiviral (Huleihel & Isanu, 2002; Schnitzler et al. 2009; Nolkemper et al. 2010), antibacteriana (Sforcin et al., 2000; Cabral et al., 2009, Cardoso et al., 2009), antifúngica (Koc et al., 2005, Quintero et. al., 2008; Cardoso et. al., 2009), imunomoduladora (Fischer et al., 2007), anti-inflamatória (Paulino et al., 2008), antiparasitária (Salomão et al., 2009) e antioxidante (Cabral et al., 2009; Gregoris & Stevanato, 2010).

Avaliações de eficiência entre substâncias desinfetantes utilizando produtos naturais são raros na literatura, e principalmente são limitadas as avaliações para utilização em ovos incubáveis. Com o intuito de avaliar a atividade antimicrobiana da própolis verde, o objetivo deste trabalho foi testar a utilização da própolis como desinfetante para ovos embrionados em substituição ao formaldeído.

2. Material e métodos:

2.1 Extrato etanólico de própolis verde

Foi utilizado um extrato etanólico de própolis verde a 24% produzido pela Apis Nativa Produtos Naturais Ltda. (PRODAPYS) e armazenado a temperatura de 4°C.

2.1 Desinfecção dos ovos

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis verde, foram utilizados 140 ovos coletados de ninhos de matrizes de postura da linhagem 051-Embrapa com 68 semanas de idade, provenientes do Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça (CAVG). Os ovos foram selecionados desprezando-

se os impróprios à incubação (sujos, trincados, com defeito na casca e pequenos ou grandes em excesso). Para as análises os ovos foram subdivididos em cinco tratamentos com 28 ovos cada: T1 - ovos fumigados com formaldeído 91%, T2 - ovos não submetidos a qualquer processo de desinfecção prévia, T3, T4 e T5 ovos que foram submetidos à desinfecção utilizando-se uma solução de própolis nas concentrações de 2400 µg, 240 µg e 24 µg respectivamente, pelo processo de imersão por um período de 5 minutos (Mauldin, 2002). Do total de 140 ovos, 40 ovos (8 ovos de cada grupo) foram levados para análise microbiológica no laboratório de bacteriologia da Faculdade de Veterinária da UFPel e o restante foi incubado por 21 dias no incubatório do CAVG para as análises de incubação. Aos sete dias foi realizada a ovoscopia e após o nascimento dos pintinhos foram determinadas as taxas (%) de mortalidade embrionária inicial, fertilidade e eclodibilidade.

2.3 Avaliação microbiológica

A avaliação microbiológica para determinação do grau de contaminação e da eficiência da desinfecção na casca de ovos baseou-se na técnica de contagem de mesófilos totais segundo a metodologia padrão proposta por Silva et al. (1997). Inicialmente foi coletado material da casca dos ovos com um suabe estéril previamente umedecido em 1 mL de solução salina estéril. O suabe foi colocado em tubo tipo falcon com a solução salina estéril e homogeneizado por 30 segundos. Posteriormente, foram realizadas diluições decimais das amostras em solução salina e alíquotas de 0,1 mL das diferentes diluições foram plaqueadas na superfície de placas contendo Agar Padrão de Contagem. As amostras em salina dos ovos que sofreram processo de desinfecção foram diluídas em 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , enquanto as amostras dos ovos que não foram desinfetados diluídas em 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Por fim,

as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas quando realizou-se a leitura por contagem de unidades formadoras de colônia bacteriana (UFC/mL).

Para avaliação da atividade antifúngica também foram realizadas sementeiras em superfície como descrito anteriormente, porém, a diluição utilizada foi de 10^{-1} e o meio de cultura o Ágar Sabouraud Dextrose. As placas foram incubadas a temperatura de 25° C por cinco dias para pesquisa de fungos filamentosos, onde foram feitas as contagens de UFC fúngicas para *Aspergillus* sp., outros bolores e bolores totais.

Os valores de contagem de unidade formadora de colônia (UFC) foram convertidos para logaritmo de base dez. Foi feita análise de variância através do procedimento “General Linear Models” do pacote estatístico SAS 8.0 (2001) procurando verificar estatisticamente as diferenças entre os tratamentos. As variáveis que apresentaram diferença estatística ao teste F foram submetidas ao teste de Tukey ($P < 0,05$) procurando identificar diferenças entre as médias de tratamento.

3. Resultados:

Na Figura 1 pode-se observar os níveis de contaminação por mesófilos totais da casca dos ovos expressos em médias de UFC/ml em \log_{10} após a desinfecção. O tratamento controle diferiu estatisticamente dos demais ($P < 0,0001$) demonstrando uma maior contaminação dos ovos que não sofreram desinfecção. Porém o tratamento com própolis na concentração de 240 μg não diferiu estatisticamente do tratamento com formaldeído ($P > 0,05$).

Na avaliação da contaminação fúngica, a Figura 2, mostra a contaminação por *Aspergillus* sp., onde não houve diferença significativa entre os tratamentos

testados ($P>0,05$). Mesmo assim os tratamentos com própolis proporcionaram uma menor contaminação que o tratamento controle, e as concentrações de 2400 μg e 240 μg de própolis foram melhores que o tratamento com formaldeído. Na Figura 3 pode-se observar a contaminação por outros fungos, como bolores, na qual verifica-se que os tratamentos contendo concentrações de 2400 μg e 240 μg de própolis não diferiram estatisticamente do tratamento com formaldeído ($P>0,05$). Por fim a Figura 4 que traz a soma de toda contaminação fúngica (*Aspergillus* sp e outros bolores), todos os tratamentos não foram diferentes estatisticamente ($P>0,05$).

Com relação ao embriodiagnóstico (Tabela 1) o tratamento controle apresentou a maior taxa de mortalidade nos primeiros sete dias de incubação. Os tratamentos com concentrações de 2400 μg e 240 μg de própolis e o tratamento com formaldeído não apresentaram mortalidade neste período inicial de incubação. Quando foi avaliada a eclodibilidade dos ovos após 21 dias de incubação, os tratamentos com própolis (2400 μg e 240 μg) apresentaram os maiores taxas com 94,11%, inclusive superiores ao tratamento dos ovos com formaldeído. A pior taxa foi proporcionada pelo tratamento controle (77%).

4. Discussão:

São práticas comuns em incubatórios industriais as análises microbiológicas buscando-se a detecção de mesófilos totais e fungos como *Aspergillus* sp. e outros bolores. Devido ao fato do grupo controle não ter recebido nenhum tipo de desinfecção, era esperado que este grupo apresentasse maior contaminação microbiológica, fato ocorrido quando foi avaliada a prevalência de mesófilos totais, com maior quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) diferindo estatisticamente de todos os outros tratamentos ($P<0,0001$) (Figura 1). Resultado

semelhante foi observado por Cony et al., 2008, quando estes pesquisadores avaliaram técnicas de pulverização e imersão com distintos desinfetantes sobre ovos incubáveis. Os três tratamentos com própolis apresentaram uma menor contaminação quando comparados ao grupo controle ($P < 0,0001$), e o tratamento contendo a concentração de 240 µg não diferiu estatisticamente do tratamento com formaldeído ($P > 0,05$). Esta diminuição na contaminação dos ovos evidencia a atividade antibacteriana da própolis. De acordo com Bankova et al. (1999) e Marcucci et al. (2001), a atividade antibacteriana da própolis é maior contra as bactérias Gram positivas, provavelmente devido aos flavonóides, ácidos e ésteres aromáticos presentes na resina, os quais atuam sobre a estrutura da parede celular desses microrganismos através de um mecanismo de ação ainda não elucidado. Outros pesquisadores já demonstraram a atividade antimicrobiana da própolis sobre uma grande variedade de bactérias, em especial bactérias gram positivas (Kujumgiev et al., 1999; Miorin et al., 2003; Uzel et al., 2005). Recentemente Cardoso et al., (2009) encontraram resultados semelhantes utilizando extrato etanólico de própolis verde contra isolados de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius*.

Com relação à atividade antifúngica (Figuras 2, 3 e 4) os tratamentos com própolis proporcionaram uma menor contaminação dos ovos que o tratamento controle, e as concentrações de 2400 µg e 240 µg de própolis foram melhores que o tratamento com formaldeído. A ação antifúngica da própolis (fungistática e fungicida) é atribuída aos ácidos fenólicos (ácido cinâmico, felúrico e caféico), terpenos e flavonóides como crisina, ermanina, galangina, canferol, pinobanskina e principalmente pinocembrina (Siqueira et al., 2009). Essas substâncias são encontradas na própolis verde (Marcucci et al., 2001; Cushnie & Lamb, 2005). Cabe

ressaltar que em estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa (Fischer et al., 2007) visando caracterizar o efeito imunomodulador do mesmo extrato etanólico de própolis verde aqui avaliado quanto a sua capacidade antimicrobiana, uma análise cromatográfica (cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC) revelou altos níveis de compostos fenólicos e de ácido cinâmico e seus derivados. Neste extrato, os flavonóides corresponderam a 22,37% do extrato seco (Fischer et al., 2007).

Através do embriodiagnóstico foi possível observar que os ovos que não sofreram desinfecção resultaram numa mortalidade embrionária de 25% nos primeiros sete dias de incubação. Esta taxa é considerada extremamente elevada, pois neste período inicial de incubação é considerado dentro da normalidade taxas de mortalidade em torno de 3% (Rosa & Ávila, 2000). Já os tratamentos contendo própolis nas concentrações de 2400 µg e 240 µg e o tratamento com formaldeído não apresentaram mortalidade neste período inicial, indicando que proporcionaram uma efetiva desinfecção. Quando a eclodibilidade foi avaliada, estes mesmos tratamentos contendo própolis foram superiores aos demais, o que torna evidente que nestas concentrações a própolis além de não ter nenhum efeito deletério, pode ainda incrementar a eclodibilidade dos ovos.

5. Conclusões:

O extrato etanólico de própolis verde, quando utilizado como desinfetante através do processo de imersão de ovos embrionados, apresentou efeito antibacteriano e antifúngico além de não ser prejudicial para o desenvolvimento embrionário, promovendo altas taxas de eclodibilidade.

O extrato etanólico de própolis verde é uma alternativa como produto natural ao uso do formaldeído para a desinfecção de ovos embrionados destinados a incubação.

Agradecimentos

Agradecemos a Apis Nativa Produtos Naturais Ltda. (PRODAPYS) pelo fornecimento do extrato etanólico de própolis verde para a condução deste experimento e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

6. Referências

Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Marcucci, M.C., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., 1999. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia*, Milão, 70, 190–193.

Bramwell, R. K., 2000. Importancia de las prácticas de manejo de lãs casetas de reprodutoras. *Indústria Avícola*, Mout Morris, 47, 8-18.

Cabral, I. S. R., Oldoni, T. L. C., Prado, A., Bezerra, R. M. N., Alencar, S. M. de, Ikegaki, M., Rosalen, P. L., 2009. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*, 32, 1523-1527.

Cardoso, R.L., Maboni, F., Machado, G., Alves, S.H., Vargas, A.C., 2009. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus coagulase positive*

and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. *Veterinary Microbiology*, doi:10.1016/j.vetmic.2009.09.07

Cony, H.C.; Vieira, S.L.; Berres, J.; Gomes, H.A.; Coneglian, J L.B.; Freitas, D.M., 2008. Técnicas de pulverização e imersão com distintos desinfetantes sobre ovos incubáveis. *Revista Ciência Rural*, 38, 1407-1412.

Cushnie, T.P.T. and Lamb, A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343–356.

Fischer G, Conceição F.R, Leite F.P, Dummer L.A, Vargas G.D, Hübner S. de O, Dellagostin. O.A, Paulino N, Paulino A.S, Vidor T., 2007. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine*, 26;25, 1250-6.

Gregoris, E., Stevanato, R., 2010. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian própolis. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 76–82.

Hauptmann M., Stewart, P., Lubin, J., Freeman, L., Hornung, R., Herrick, R., Hoover, R., Fraumeni, J., Blair, A., Hayes, R., 2009. Mortality From Lymphohematopoietic Malignancies and Brain Cancer Among Embalmers Exposed to Formaldehyde. *Journal of the National Cancer Institute*, 101, 1696–1708.

Hayretda, S.; Kolankaya, D., 2008. Investigation of the Effects of Pre-Incubation Formaldehyde Fumigation on the Tracheal Epithelium of Chicken Embryos and Chicks Turk. Journal of Veterinary Research and Animal Science, 32, 263-267.

Huleihel, M., Isanu, V., 2002. Anti-Herpes Simplex Virus effect of an Aqueous Extract of propolis. The Israel Medical Association Journal, 4, 923-927.

International Agency for Research on Cancer (IARC) 2006. Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and Propylene Glycol Mono-t-Butyl Ether . Vol 88 . Research Lyon, France: IARC Press.

Koc, A. N., Silici, S., Ayangil, D., Ferahbas, A., Çankaya, S., 2005. Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by using a microdilution assay. *Mycoses* 48, 205-210.

Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popov, S., 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology* 64, 235–240.

Li, F., Awale, S., Zhang, H., Tezuka, Y., Esumi, H., Kadota, S., 2009. Chemical Constituents of Propolis from Myanmar and Their Preferential Cytotoxicity against a Human Pancreatic Cancer Cell Line. *Journal of Natural Products*, 2009, 72, 1283–1287.

Lustosa, Sarah R., Galindo, A.B., Nunes, L. C.C., Randau, K. P., Rolim neto, P.J., 2008. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. Revista brasileira de farmacognosia [online]. 18, 447-454.

Magras, I.N., 1996. Formaldehyde vapour effects in chicken embryo. Anatomia, Histologia, Embryologia, Journal of Veterinary Medicine, 25, 197-200.

Marcucci, M.C., 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutical activity, Apidologie, 26, 83–99.

Marcucci, M. C; Ferreres, F.; García-Viguera, C.; Bankova, V.S.; De Castro, S.L.; Dantas, A.P.; Valente, P.H.M.; Paulino, N., 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. Journal of Ethnopharmacology, 74, 105 - 112.

Mauldin, J.M. Maintaining hatching egg quality. 2002 In: Bell, D.D., Weaver, W. D. Commercial Chicken Meat and Egg Production. 5th ed. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 707-705.

Miorin, P.L., Levy Junior, N.C., Custodio, A.R., Bretz, W.A., Marcucci, M.C., 2003. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. Journal Applied Microbiology 95, 913–920.

Nolkemper, S.; urgenReichling, J.; Sensch, K.; Schnitzler, P., 2010. Mechanism of herpessimplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine*, 17, 132–138.

Paulino , N., Abreu, S. R. L., Uto, Y., Koyama, D., Nagasawa, H., Hori, H., Dirsch, V. M., Vollmar, A. M., Scremin, A., Bretz, W. A., 2008. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian própolis. *European Journal of Pharmacology*, 587, 296–301;

Park, Y.K., Alencar, S.M., Scamparini, A.R.P., Aguiar, C.L., 2002. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural*, 32, 997-1003.

Quintero, M.; Orozco, A.; Hernández, F., Gayosso, P.; Martínez,R.; Zárate, C, Miranda,L.; Carrillo, G., Tovar, C.; Sánchez, T., 2008. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25, 22-26.

Rosa, P.; Ávila, V., 2000. Variáveis relacionadas ao rendimento da incubação de ovos em matrizes de frangos de corte. CT / 246 / Embrapa Suínos e Aves, 1–3.

Salomão,K.; Souza, E.; Pons,H.; Barbosa, H.;Castro, S. 2009. Brazilian Green Propolis: Effects In Vitro and In Vivo on *Trypanosoma cruzi*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, doi:10.1093/ecam/nep014.

SAS Institute. SAS User's guide: Statistics. Version 8.0 Edition. Cary, NC, 2001.

Schnitzler, P; Neuner, A.; Nolkemper, S.; Zundel, C.; Nowack. 2009. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. *Phytotherapy Research*, doi: 10.1002/ptr.2868.

Scott, T.A.; Swetnam, C.,1993. Screening sanitizing agents and methods of application for hatching eggs. II. Effectiveness against microorganisms on the egg shell. *Journal Applied Poultry Research* 2, 7-11.

Sesti, L.A.C. Biosseguridade em granjas de reprodutoras, 2005. In: Macari, M.; Mendes, A.A. Manejo de matrizes de corte. Santos: Facta, 244-317.

Sforcin, J.M., Fernandes Jr., A., Lopes, C.A.M., Bankova, V., Funari, S.R.C., 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 243–249.

Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A.1997. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, 295.

Siqueira, A.B.S., Gomes, B.S., Cambuim, I., Maia, R., Abreu, S., Souza-Motta, C.M., Queiroz, L.A., Porto, A.L.F., 2009. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 90–96.

Uzel, A., Sorkun, K., Önçag, Ö., Çogulo, D., Gençay, Ö., Salih, B., 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiology Research* 160, 189–195.

Zulkifli, I., Fauziah, O., Omar, A.R., Shaipullizan S., Siti Selina, A.H., 1999. Respiratory epithelium, production performance and behaviour of formaldehyde-exposed broiler chicks. *Veterinary Research Communications*, 23, 91-99.

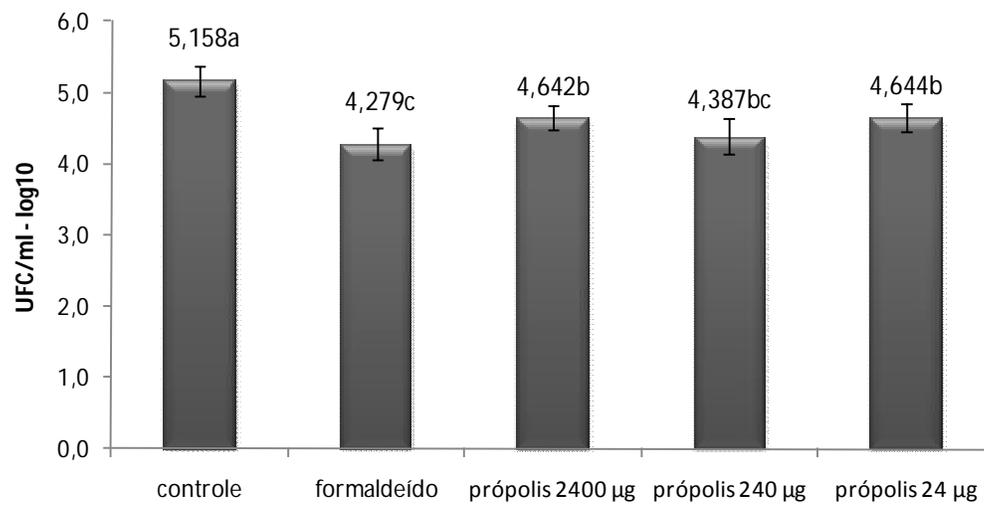


Figura 1 - Médias de UFC/ml em \log_{10} para mesófilos totais de ovos embrionados submetidos a desinfecção. Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

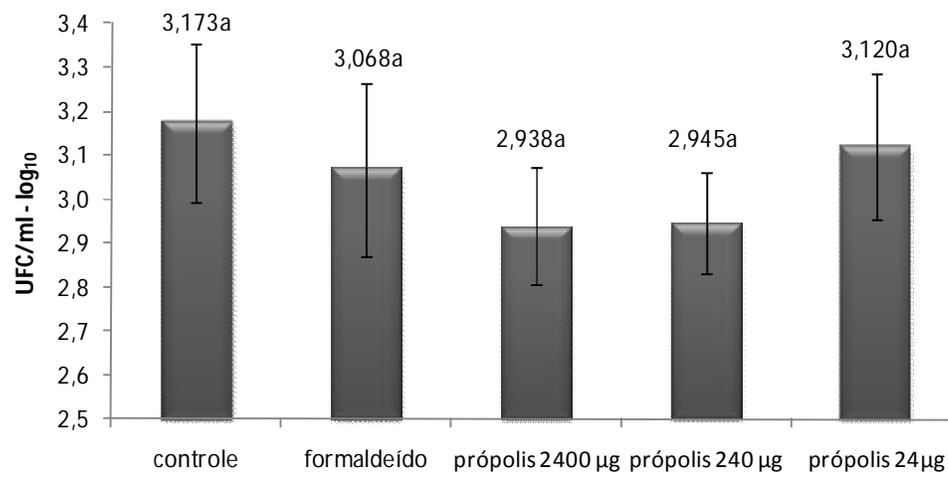


Figura 2 – Médias de UFC/ml em \log_{10} para *Aspergillus* em ovos embrionados submetidos a desinfecção. Letras diferentes representam diferença estatística ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey.

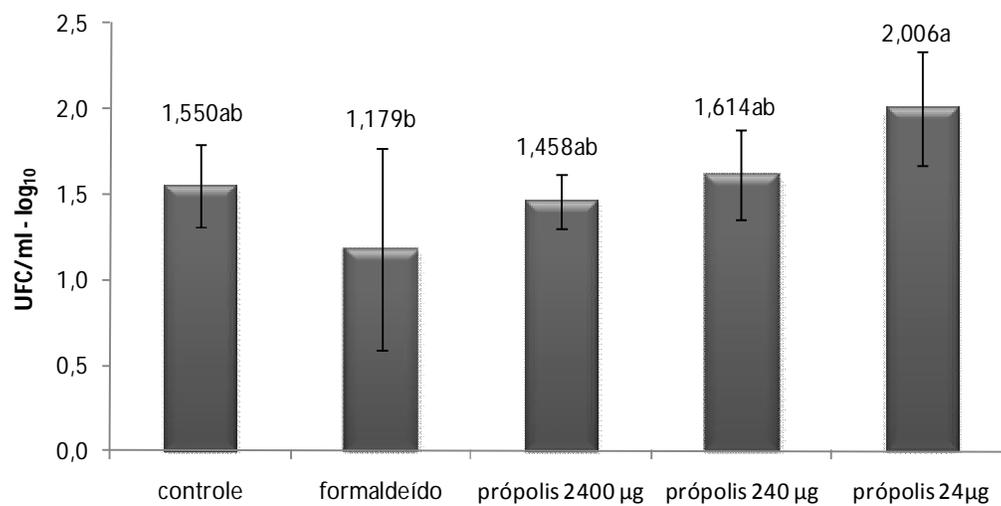


Figura 3 – Médias de UFC/ml em \log_{10} para outros bolores de ovos embrionados submetidos a desinfecção. Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

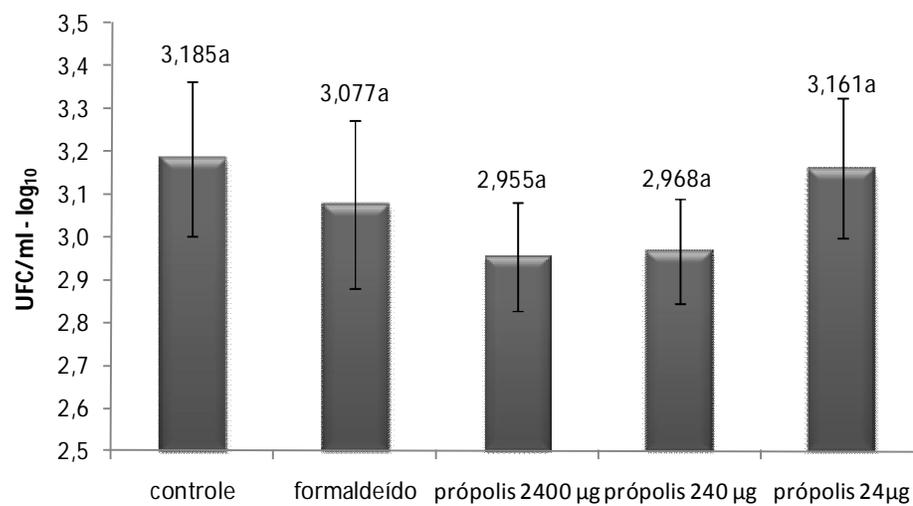


Figura 4 – Médias de UFC/ml em \log_{10} para bolores totais de ovos embrionados submetidos a desinfecção. Letras diferentes representam diferença estatística ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Tabela1 - Mortalidade embrionária, fertilidade e eclodibilidade dos ovos submetidos à desinfecção (%)

Tratamentos	Mortalidade 7 dias (%)	Fertilidade (%)	Eclodibilidade (%)
Controle	25	95	73,68
Formaldeído	0	65	84,61
Própolis 2,4 mg	0	85	94,11
Própolis 240 µg	0	85	94,11
Própolis 24 µg	10	90	77,77

4. CONCLUSÕES GERAIS

- O extrato etanólico de própolis verde demonstrou efeito virucida contra o *avipoxvirus*, quando inoculado sobre a membrana corioalantóide de embriões de galinha;
- O efeito virucida foi dependente da concentração de própolis utilizada, bem como do tempo de incubação entre o vírus e o extrato etanólico;
- A utilização do extrato etanólico de própolis verde como desinfetante, através do processo de imersão de ovos embrionados, propiciou efeito antibacteriano e antifúngico;
- O extrato etanólico de própolis verde além de não ser prejudicial para o desenvolvimento embrionário, resultou em altas taxas de eclodibilidade;
- O extrato etanólico de própolis verde é uma alternativa como produto natural ao uso do formaldeído para a desinfecção de ovos embrionados destinados a incubação.

5. REFERÊNCIAS

AFOLAYAN, A. J.; MEYER, J. J. The antimicrobial activity of 3, 5, 7 – trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.57, n.3, p.177 – 181, 1997.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 50, p.167 - 172, 1995.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C.. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, n.1, p.3 - 15, jan./fev. 2000.

BORRELLI, F.; MAFFIA, P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; IALENTI, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, v.73, n.1 p. 53 - 63, 2002.

BOSIO, K.; AVANZINI, C.; D'AVOLIO, A.; OZINO, O.; SAVOIA, D. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Applied Microbiology**, v.31, n.3, p.174 - 177, 2000.

BRAKE, J.; SHELDON, B.W. Effect of a quaternary ammonium sanitizer for hatching eggs on their contamination, permeability, water loss, and hatchability. **Poultry Science**, v.69, p. 517 - 525, 1990.

BÚFALO, M. C.; FIGUEIREDO, A. S.; DE SOUSA, J. P. B.; CANDEIAS, J. M. G.; BASTOS J. K.; SFORCIN, J. M. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p. 1669 - 1680, 2009.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, 1523 - 1527, 2009.

CARDOSO, R. L.; MABONI, F.; MACHADO, G.; ALVES, S. H.; VARGAS, A. C. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus coagulase positive* and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. **Veterinary Microbiology**. In press, 2009.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Própolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 1, p.1 - 6, 2002.

CUSHNIE, T.P.T. AND LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 26, p.343 – 356, 2005.

DANTAS, A. P; OLIVIERI, B, P; GOMES, F. H. M; DE CASTRO, S. L. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, p.187 - 193, 2006.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian Red Propolis - Chemical Composition and Botanical. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.4, p. 435 - 441, 2008.

DE CASTRO, S. L. Própolis: Biological and Pharmacological Activities. **Therapeutic uses of this bee-product Annual Review on Biological Sciences**, v.3, p.49 - 83, 2001.

DOS SANTOS, C.R.; ARCENIO, F., CARVALHO, E.S.; LÚCIO, E.M.R.A., ARAÚJO, G.L.; TEIXEIRA, L.A.; SHARAPIN, N.; ROCHA, L. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p. 71 - 74, 2003.

EL-KHAWAGA O-A. Y.; SALEM, T. A.; ELSHAL, M. F. Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. **Clinica Chimica Acta**, v.338, p.11 - 16, 2003.

FAVERO, M. S; BLOND, W. W. Chemical disinfection of medical and surgical materials. In: BLOCK, S.S. **Disinfection, Sterilization and Preservation**. 4th ed. Philadelphia: Lea e Febiger, p. 617 - 641. 1991.

FERNANDES, F. F.; DIAS, A. L. T.; RAMOS, C. L.; SIQUEIRA, A. M.; FRANCO, M. C. The *in vitro* antifungal activity evaluation of própolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n.2, p. 93 - 95, 2007.

FISCHER, G.; DUMMER, L. A; VIDOR, T.; PAULINO, N.; PAULINO, A. S. Avaliação da ação antiviral de uma solução de própolis sobre o Herpesvírus Bovino e o Vírus da Diarréia Viral dos Bovinos. In: ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 7, 2005, Pelotas, RS. **Anais**. Pelotas, 2005.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P. L.; DUMMER, L. A.; VARGAS, G. D.; HÜBNER, S. O.; DELLAGOSTIN, O. A.; PAULINO, N.; PAULINO, A. S.; VIDOR, T. Immunomodulation produced by green própolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v.25, p.1250-1256, 2007.

GEKKER, G.; HU, S.; SPIVAK, M.; LOKENSGARD, J. R.; PETERSON, P. K. Anti-HIV- 1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p. 158 - 163, 2005.

GREGORIS, E.; STEVANATO, R. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian própolis. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.76 - 82, 2010.

GUBSER, C.; HUÉ, S.; KELLAM, P.; SMITH, G. L. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. **Journal of General Virology**, v. 85, p.105 - 117, 2004.

HADY, F. K. A. E.; HEGAZI, A. G. Egyptian Propolis: 2. Chemical Composition, Antiviral and Antimicrobial Activities of East Nile Delta Propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.57, p. 386 – 394, 2002.

HEGAZI, A. G.; HADY, F. K. A. E.; ALLAHA, F. A. M. A. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of European Propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 55, p. 70 - 75, 2000.

HULEIHEL, M.; ISANU, V. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. **The Israel Medical Association Journal**, v. 4, n.11, p. 923 - 927, 2002.

ITO, J.; CHANG, F. R.; WANG, H. K.; PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; KILGORE, N.; LEE, K. H. Anti-AIDS agents 48: anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. **Journal Natural Products**, v. 64, p. 1278 - 1281, 2001.

JARMIN, S.; MANVELL, R.; GOUGH, R. E.; LAIDLAW, S.M.; SKINNER, M. A. Avipoxvirus phylogenetics: identification of a PCR length polymorphism that discriminates between the two major clades. **Journal of General Virology**, v. 87, p.2191 - 2201, 2006.

KOC, A. N.; SILICI, S.; AYANGIL, D.; FERAHBAŞ, A.; ÇANKAYA, S. Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by using a microdilution assay. **Mycoses** v.48, p. 205 - 210, 2005.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal Ethnopharmacol**, v.64, p. 235 - 240, 1999.

LEE, L. H; LEE, K. H. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. **Journal of Virological Methods**, v. 63, p.113 - 119, 1997.

LU, L. C.; CHEN, Y. W, CHOU, C. C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.15, p.213 - 20, 2005.

MAHY, B. W. J., KANGRO, H. O. **Virology Methods Manual**. London, Academic Press. pp.374, 1996.

MANAROLLA, G.; PISONI, G.; SIRONI, G.; RAMPIN, T. Molecular biological characterization of avian poxvirus strains isolated from different avian species. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.1 - 8, 2010.

MARCUCCI, M. C; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P. H. M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, n.2, p.105 - 112, 2001.

MATSUO, M.; SASAKI, N.; SAGA, K.; KANEKO, T. Citotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.28, p. 253 - 259, 2005.

MURAD, M.; CALVI, S. A.; SOARES, A. M. V. C.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M.; Effects of própolis fom Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, n.3, p. 331 – 334, 2002.

NÓBREGA, A. M.; ALVES, E. N.; PRESGRAVE, R. F.; DELGADO, I. F. Avaliação da irritabilidade ocular induzida por ingredientes de cosméticos através do teste de Draize e dos Métodos HET-CAM e RBC. **Universitas: Ciências da Saúde**, v.6, p.103 - 120, 2008.

NOLKEMPER, S.; URGENREICHLING, J.; SENSCH, K.; SCHNITZLER, P. Mechanism of herpessimplex virus type 2 suppression by propolis extracts. **Phytomedicine**, v. 17, p. 132 - 138, 2010.

OTA, C.; UNTERKIRCHER, C.; FANTINATO, V.; SHIMIZU, M. T. Antifungal activity of própolis on different species of *candida*. **Mycoses**, v. 44, p. 375 - 378, 2001.

PAGLIARONE, A. C.; MISSIMA, F.; ORSATTI, C. L.; BACHIEGA, T. F.; SFORCIN, J. M. Propolis effect on Th1/Th2 cytokines production by acutely stressed mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.125, p. 230 – 233, 2009.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n.3, p. 313 - 318, 1998.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R.P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v.32, n.6, p.997-1003, 2002.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1100 – 1103, 2004.

PATRÍCIO, I. C. Manejo do ovo incubável da granja ao incubatório. In: MACARI, M.; GONZALES, E. Manejo da incubação. Campinas: FACTA, 2003. Cap. 3, p.163 -177.

PAULINO, N.; ABREU, S. R. L.; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H., DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A.; BRETZ, W. A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian própolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, p. 296 - 301, 2008.

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

QUINTERO, M.; OROZCO, A.; HERNÁNDEZ, F., GAYOSSO, P.; MARTÍNEZ, R.; ZÁRATE, C, MIRANDA, L.; CARRILLO, G., TOVAR, C.; SÁNCHEZ, T. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, p. 22-26, 2008.

SALOMÃO, K., PEREIRA, P. R. S., CAMPOS L. C.,BORBA, C. M., CABELLO, P. H., MARCUCCI, M. C., DE CASTRO, S. L. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.3, p.317 - 324, 2008.

SALOMÃO, K.; SOUZA, E. M.; PONS, A. H.; BARBOSA, H. S.; CASTRO, S. L. Brazilian Green Propolis: Effects *In Vitro* and *In Vivo* on *Trypanosoma cruzi*. **Evidence-based Complementar and Alternative Medicine**. In press, 2009.

SCAZZOCCHIO, F.; D'AURIA, F. D.; ALESSANDRINI, D.; PANTANELLA, F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, v.4 p. 327 -333, 2006.

SCHNITZLER, P; NEUNER, A.; NOLKEMPER, S.; ZUNDEL, C.; NOWACK, H.; SENSCH, K. H.; REICHLING, J. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. **Phytotherapy Research**, In press, 2009.

SCOTT, T. A.; SWETNAM, C.; Screening sanitizing agents and methods of application for hatching eggs. I. Environmental and user friendliness. **Journal Applied Poultry Research**, v.2, p. 1-6, 1993.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES, J. R.; A., LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p. 243 - 249, 2000.

SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p.1-14, 2007.

UZEL, A.; SORKUN, K.; ÖNÇAG, Ö.; ÇOGULO, D.; GENÇAY, Ö.; SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiology Research**, v.160, p.189 -195, 2005.

VARGAS, A. C; LOGUERCIO, A. P; WITT, N. M; COSTA, M. M; SILVA, S. M; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.159 - 163, jan./fev. 2004.

WALKER, S. E.; SANDER, J. E. Effect of biosentry 904 and ethylenediaminetetraacetic acid-tris disinfecting during incubation of chicken eggs on microbial levels and productivity of poultry. **Avian Diseases**, v.48, p.238 - 243, 2004.

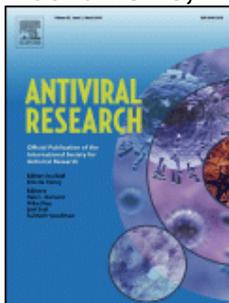
Anexos

ANEXO A - Formatado de acordo com as normas da revista Antiviral Research.

<http://www.elsevier.com>
[Browse Journals](#) > [Antiviral Research](#) > Guide For Authors

Antiviral Research

A Multidisciplinary Journal of Antiviral Agents, Natural Host Defence Mechanisms, Interferons and Antiviral Vaccines



ISSN: 0166-3542

Imprint: ELSEVIER

Actions

-  [Submit Article](#)
-  [Order Journal](#)
-  [Free Sample Issue](#)
-  [Recommend to Friend](#)
-  [Bookmark this Page](#)

Statistics

Impact Factor: 3.613

5-Year Impact Factor: 3.469

Issues per year: 12

Additional Information

- [Related Publications](#)
- [Editorial Board](#)
-  [Login to Editorial System](#)
- [Advertisers Media Information](#)
-  [Virus International Online](#)

Readers

- [Order Journal](#)
-  [Access Full-Text](#)

- [Free Sample Issue](#)
- [Volume/Issue Alert](#)
- [Free Tables of contents and abstracts](#)

Authors

- [Authors Home](#)
- [Submit an Article](#)
- [Track Your Accepted Articles](#)
- [Guide for Authors](#)
- [Artwork instructions](#)
- [Authors Rights](#)
- [Funding Bodies Compliance](#)

Librarians

- [Librarians Home](#)
- [Ordering Information and Dispatch Dates](#)
- [Abstracting/Indexing](#)

Editors

- [Editors Home](#)
- [Article Tracking for Editors](#)
- [Ethics Questions \(PERK\)](#)

Reviewers

- [Reviewers Home](#)

Advertisers/Sponsors

- [Advertisers Home](#)
- [Reprints Information](#)



[Printer-friendly](#)

Guide for Authors

A Multidisciplinary Journal of Antiviral Agents, Natural Host Defence Mechanisms,
Interferons and Antiviral Vaccines
An Official Publication of the International Society for Antiviral Research

Research Articles should generally not exceed 25 typewritten pages and should be divided into Summary, Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion.

Short Communications typically should not exceed 1500 words or equivalent space including figures and tables and should not be divided into sections, i.e., Introduction, Materials and Methods, etc. but should have a brief Summary, keywords and a full reference list. These must be brief definitive reports, not preliminary findings.

Review Articles will be published following invitation from the Reviews Editor, Mike Bray.

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers
- All necessary files have been uploaded
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Research Articles can be submitted to either Earl Kern or Richard Whitley at the US office or Erik De Clercq at the European office. Review articles should be submitted to Mike Bray. Please indicate any preferences on the 'Request Editor' page.
- Manuscript has been "spellchecked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in colour on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only colour on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please contact the Author Support Department at

authorsupport@elsevier.com

Submission of articles

It is essential to give a fax number and e-mail address when submitting a manuscript. Articles must be written in good English.

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Publisher.

Upon acceptance of an article, Authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding Author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided.

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+44) 1865 843830, fax (+44) 1865 853333, e-mail permissions@elsevier.com. Requests may also be completed on-line via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting (" Public Access") policy

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy", see (<http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Authors' rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites

- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on <http://www.elsevier.com>)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Online submission to the journal prior to acceptance

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article at <http://www.elsevier.com> you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the Author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail. The above represents a very brief outline of this form of submission. It can be advantageous to print this "Guide for Authors" section from the site for reference in the subsequent stages of article preparation.

Electronic format requirements for accepted articles

General points

We accept most wordprocessing formats, but Word or WordPerfect is preferred. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Save your files using the default extension of the program used.

Wordprocessor documents

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use

tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Author Gateway's Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Preparation of electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spellchecker" function of your wordprocessor.

Characters not available on your wordprocessor (Greek letters, mathematical symbols, etc. should not be open but indicated by a unique code e.g., alpha, for the Greek α , #, etc.) consistently throughout the entire text. Please make a list of such codes and provide a key. Do not allow your wordprocessor to introduce word splits and do not use a 'justified' layout.

Preparation of text

Presentation of manuscript

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Language Editing:

International Science Editing and Asia Science Editing can provide English language and copyediting services to authors who want to publish in scientific, technical and medical journals and need assistance before they submit their article or, before it is accepted for publication. Authors can contact these services directly: International Science Editing (<http://www.internationalscienceediting.com>) and Asia Science Editing (<http://www.asiascienceediting.com>) or, for more information about language editing services, please contact authorsupport@elsevier.com who will be happy to deal with any questions.

Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions (http://authors.elsevier.com/terms_and_conditions.html).

Provide the following data on the title page (in the order given).

Title

Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations

Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the Authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the Author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each Author.

Corresponding Author

Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Present/permanent address

If an Author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that Author's name. The address at which the Author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract.

A concise and factual abstract is required (maximum length 200 words). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone.

References should therefore be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list.

Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords.

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations.

Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Arrangement of the article*Subdivision of the article.*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ?), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction.

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Experimental/Materials and methods.

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results.

Results should be clear and concise.

Discussion.

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them.

Conclusions.

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Acknowledgements.

Place acknowledgements, including information on grants received, before the references, in a separate section, and not as a footnote on the title page.

References.

See separate section, below.

Figure captions, tables, figures, schemes.

Present these, in this order, at the end of the article. They are described in more detail below. High-resolution graphics files must always be provided separate from the main text file (see Preparation of illustrations).

Footnotes.

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves on a separate sheet at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes.

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Tables.

Number tables consecutively with Arabic numerals in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

All tables must have descriptive headings and possibly legends below. Both the heading and legends should be understandable without reference to the feet.

Nomenclature and units.

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI.

Virus Nomenclature

Formal terms used for virus families, genera, and species should be those approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV): Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L.A. (2005) *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*. Eighth ICTV Report, Academic Press, an imprint of Elsevier. This volume also includes standard abbreviations for species. Once formal taxonomic names have been given in a paper, vernacular terms may be used.

GenBank/DNA sequence linking

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine.

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** Note that in the final version of the *electronic copy*, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

For each and every accession number cited in an article, Authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognise the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example: "GenBank accession nos. **AI631510** , **AI631511** , **AI632198** , and **BF223228**) , a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**) , and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**) ".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** In the final version of the *printed article*, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the *electronic copy*, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Preparation of supplementary data.

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the Author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive

caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at the Author Gateway at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

References

Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the Authors.

Citations in the text:

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

Citing and listing of Web references

As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (Author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Text:

All citations in the text should refer to:

1. *Single Author:* the Author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two Authors:* both Authors' names and the year of publication;
3. *Three or more Authors:* first Author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same Author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-

Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Journal names should be abbreviated according to:

List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/istwa.html>

Use of the Digital Object Identifier (DOI)

The digital object identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Preparation of electronic illustrations

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide all illustrations as separate files and as hardcopy printouts on separate sheets.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (Note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below.):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: Colour or greyscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Line drawings

The lettering and symbols, as well as other details, should have proportionate dimensions, so as not to become illegible or unclear after possible reduction; in general, the figures should be designed for a reduction factor of two to three. The degree of reduction will be determined by the Publisher. Illustrations will not be enlarged. Consider the page format of the journal when designing the illustrations. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Photographs (halftones)

Remove non-essential areas of a photograph. Do not mount photographs unless they form part of a composite figure. Where necessary, insert a scale bar in the illustration (not below it), as opposed to giving a magnification factor in the caption. Note that photocopies of photographs are not acceptable.

Colour illustrations

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for colour in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to "grey scale" (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white versions of all the colour illustrations.

Proofs

When your manuscript is received by the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as drafts.

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding Author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility.

A form with queries from the copyeditor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required.

The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated. Return corrections within 2 days of receipt of the proofs. Should there be no corrections, please confirm this.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted.

Offprints

Twenty-five (25) offprints will be provided free of charge. Additional reprints may be purchased at the proof stage

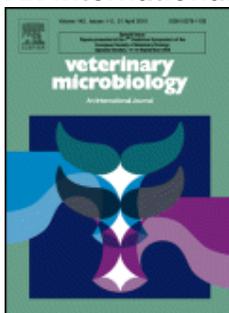
[↑ Top of Page](#)

ANEXO B - Formatado de acordo com as normas da revista Veterinary Microbiology

<http://www.elsevier.com>
[Browse Journals](#) > [Veterinary Microbiology](#) > Guide For Authors

Veterinary Microbiology

An International Journal



ISSN: 0378-1135

Imprint: ELSEVIER

Actions

-  [Submit Article](#)
-  [Order Journal](#)
-  [Free Sample Issue](#)
-  [Recommend to Friend](#)
-  [Bookmark this Page](#)

Statistics

Impact Factor: 2.370

Issues per year: 28

Additional Information

- [Related Publications](#)
- [Editorial Board](#)
-  [Login to Editorial System](#)
- [Elsevier's Animal and Veterinary subject page](#)

Readers

- [Order Journal](#)
-  [Access Full-Text](#)

-  [Free Sample Issue](#)

- [☞ Volume/Issue Alert](#)
- [☞ Free Tables of contents and abstracts](#)

Authors

- [Authors Home](#)
- [☞ Submit an Article](#)
- [☞ Track Your Accepted Articles](#)
- [Guide for Authors](#)
- [Artwork instructions](#)
- [Authors Rights](#)
- [Funding Bodies Compliance](#)

Librarians

- [Librarians Home](#)
- [Ordering Information and Dispatch Dates](#)
- [Abstracting/Indexing](#)

Editors

- [Editors Home](#)
- [☞ Article Tracking for Editors](#)
- [Ethics Questions \(PERK\)](#)

Reviewers

- [Reviewers Home](#)

Advertisers/Sponsors

- [Advertisers Home](#)
- [Reprints Information](#)

 [Printer-friendly](#)

Guide for Authors

An International Journal

Types of contribution

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Short Communications
4. Letters to the Editor
5. Book Reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal. Of particular interest are topical, short (Mini) Reviews in areas of current interest. Reviews of topics in veterinary bacteriology, mycology and virology should provide short, readable, well-referenced, up-to-date overviews of current, emerging, or neglected subjects in the discipline. Syntheses of information from diverse sources, providing clarification of areas of confusion or uncertainty, are especially desirable. It is anticipated that these reviews will provide overviews of important topics to the benefit of curious-but-busy readers of *Veterinary Microbiology*.

Reviews should carry titles which are creative and provocative, but nonetheless descriptive, and emphasize current status and future directions of research. Historical vignettes are useful in setting the stage for addressing important contemporary questions, but should not ordinarily be the basis for an article. Manuscripts may include controversial views, if presented in balanced fashion and supported by evidence; informed speculation is welcome. For reasons of credibility, it is preferred that reviews be written by authors from more than one research center.

Authors may find it useful to contact the Reviews Editor J. Glenn Songer (gsonger@u.arizona.edu), perhaps with an outline of a proposed review, before submitting. Articles should be about fifteen pages of double-spaced type, supported by illustrative material. Figures are welcomed and articles should not have more than 50 references. Manuscripts should be submitted through the EES electronic submission system, taking care to clearly indicate that it is a review article.

Manuscripts will, where possible, be fast-tracked for publication, but will go through the normal review procedure. Final decisions on bacteriology and mycology topics will be handled by Glenn Songer and for virology by Uwe Truyen.

A Short Communication is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 6 printed pages (about 12 manuscript pages, including figures, tables and references).

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editor-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old.

Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Microbiology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/vetmic>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to: AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or

other funding.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Ethics

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Microbiology*.

Any new nucleotide or amino acid sequence data will be deposited in publicly accessible databases, such as GenBank, and the accession numbers will be included in the manuscript (Methods section) before it is finally accepted for publication. In addition, it is expected that any plasmids, transposons, viruses, microbial strains, or cell lines described for the first time in the paper will be made available to scientists for non-commercial purposes at reasonable cost following publication.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Language Editing: Elsevier's Authors Home provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

2. Manuscripts should have **(numbered lines)** with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)
 Name(s) of author(s)
 Complete postal address(es) of affiliations
 Full telephone, Fax No. and E-mail of the corresponding author
 Present address(es) of author(s) if applicable
 Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent
 Abstract
 Keywords (indexing terms), normally 3 – 6 items. Please refer to the cumulative index.
 Introduction
 Material studied, area descriptions, methods, techniques
 Results
 Discussion
 Conclusion
 Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc.
 References
 Tables
 Figure captions
 Tables (separate file(s))
 Figures (separate file(s))
 4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.
 5. SI units should be used.
 6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Abstracts

Manuscripts of original research papers should include a structured Abstract of 250 or fewer words, organised under the sections: Problem addressed; Objective; Methods and approach; Results; Conclusions. Do not actually include section headings, but use this structure for the Abstract.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible, any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.
10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. For original research papers, the list should not exceed 35 references (it may be longer for review articles).

2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed– if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp.12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates –publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.
5. Use the following system for arranging your references:
 - a. *For periodicals*
Chin, J.C., Dai, Y., Watts, J.E., 1995. Antibody response against *Pseudomonas aeruginosa* membrane proteins in experimentally infected sheep. *Vet. Microbiol.* 43, 21–32.
 - b. *For edited symposia, special issues, etc. published in a periodical*
Caffrey, J.P., 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. In: Wood, P.R., Monaghan, M.L., Rothel, J.S. (Eds.), *Bovine Tuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 40, 1–4.
 - c. *For books*
Armitage, P., Berry, G., 1987. *Statistical Methods in Medical Research*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 94–100, 411–416.
 - d. *For multi-author books*
Butler, J.E., 1981. A concept of humoral immunity among ruminants and an approach to its investigation. In: Butler, J.E., Nielson, K., Duncan, J.R. (Eds.), *The Ruminant Immune System*, Plenum Press, New York, pp. 3–55.
6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references; according to the International *List of Periodical Title Word Abbreviations*. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Microbiol.*
7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.
8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".
9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.
10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.
11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are

first used.

2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by \exp .
5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .
6. Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ^{18}O .
7. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*. Virologists should consult the latest Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses for proper nomenclature and spelling.
2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the

Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Author Services

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600, Fax: (+353) 61 709111/113.

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage [↔](#)

<http://www.elsevier.com/locate/vetmic> For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

***Veterinary Microbiology* has no page charges**

[↑ Top of Page](#)