

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Atividade virucida de um extrato etanólico de própolis verde contra o vírus da doença de Newcastle

Cristina Freitas Nunes

Pelotas, 2011

CRISTINA FREITAS NUNES

**ATIVIDADE VIRUCIDA DE UM EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS
VERDE CONTRA O VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE**

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-Orientadores:

Prof. Dr. Geferson Fischer

Prof^a. Dr. Maria Cristina Marcucci

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:

(Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901)

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

N972a

Nunes, Cristina Freitas

Atividade virucida de um extrato etanólico de própolis verde contra o vírus da doença de Newcastle / Cristina Freitas Nunes. – Pelotas, 2011. – 82f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Área de concentração: Sanidade animal. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2011. - Orientador Gilberto D'Ávila Vargas ; co-orientador Geferson Fischer, Maria Cristina Marcucci Ribeiro.

1.Veterinária. 2.Própolis verde. 3.Fenóis totais. 4.Virucida. 5.NDV. 6.Paramyxovirus. I.Vargas, Gilberto D'Ávila. II.Fischer, Geferson. III. Marcucci, Maria Cristina. IV.Título.

CDD: 636.2089

Banca examinadora:

Prof. Dr. Niraldo Paulino– Universidade Bandeirante de São Paulo

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

Prof. Dr. João Zani - Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Geferson Fischer – Universidade Federal de Pelotas (suplente)

Nenhum vento desviará minha barca,
nenhum raio mudará o meu caminho”
(Autor desconhecido).

Agradecimentos

Aos meus pais, pois sem eles eu não teria chegado até aqui.

Ao meu Vô Carolino, por estar sempre presente na minha vida, me incentivando e me dando forças para seguir em frente.

Ao meu namorado Juliano Dutra Schmitz, pela ajuda, parceria e pelos incentivos.

Ao meu Orientador Gilberto D'Avila Vargas por ter confiado no meu trabalho, por sempre me ajudar nos momentos em que mais precisei e por sua amizade.

Ao meu co-orientador Geferson Fischer, ajuda para com o meu trabalho e pela amizade.

Aos colegas e queridos amigos do Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária: Paula Finger, Daiana Medeiros, José Carlos Rösler Sandrini, Eliete Sandrini, Enilda Souza de Oliveira, Marcia Rodrigues, Cacciane Fáccio, Telmo Vidor, Silvia de Oliveira Hübner e Clarissa Caetano de Castro pela amizade e ajuda sempre que necessária.

Aos funcionários do Laboratório Regional de Diagnóstico, Simone e Mauro Pereira Soares pelo auxílio e dedicação em parte deste trabalho.

Aos Professores Maria Cristina Marcucci e Nivaldo Paulino, pela amizade, ensinamentos e toda a ajuda prestada para com o meu trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Farmácia da Universidade Bandeirantes de São Paulo – UNIBAN: Oseraldo Vieira, Valquiria Louzano, Roberto Gusmão, Maria Aparecida Santos, Daniel Freitas, Pedro, Ivair e Cristina Santos, por terem me acolhido e me auxiliado na primeira parte deste trabalho.

Aos meus queridos amigos Maria Fernanda Burbareli, Arlei e Neuza Burbareli e a Má, por terem me acolhido com tanto carinho em São Paulo, quando fui realizar uma parte do meu trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação, pela oportunidade de realizar mais uma etapa da minha caminhada.

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

Muito Obrigada!!!!

RESUMO

NUNES, Cristina Freitas. **Atividade virucida de um extrato etanólico de própolis verde *in vitro* e *in vivo*. 2011.** 81f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Atualmente, a indústria farmacêutica busca novos medicamentos com base em produtos naturais, visando à produção de fármacos mais eficientes, para os quais os microrganismos não apresentem resistência, tanto para humanos quanto para animais. Um dos produtos naturais que tem sido objeto de intensos estudos farmacológicos e químicos por cientistas para o controle de enfermidades é a própolis, uma substância resinosa produzida por abelhas melíferas a partir de exsudatos coletados em diferentes partes das plantas, que tem sido utilizada durante séculos na medicina popular devido as suas propriedades terapêuticas. Estudos químicos revelaram a complexa composição da própolis, identificando em alguns casos mais de 300 componentes, incluindo vários compostos bioativos fenólicos responsáveis pela ação virucida. Este trabalho inicialmente descreve a padronização de um extrato etanólico de própolis verde (EEPV), onde foram identificados os compostos químicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), caracterização fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD), teor de sólidos solúveis, teor de fenóis e flavonóides totais e atividade antioxidante por 2,2 diphenil picril hidrazil(DPPH). O EEPV foi avaliado também *in vitro* e *in vivo*, quanto a sua capacidade virucida contra uma cepa lentogênica do vírus da doença de Newcastle (NDV) em duas temperaturas distintas (22 e 37°C), 5 períodos de incubação (0, 1, 2, 4 e 8 horas) do NDV em 5 concentrações de EEPV distintos (4000µg/dose, 400µg/dose, 40µg/dose, 4µg/dose e 0µg/dose). O EEPV padronizado está dentro dos padrões requisitados pelo MAPA, com altos níveis de fenóis e flavonóides totais (12.93 e 6,05% respectivamente), comprovado por CLAE, o qual identificou altas concentrações de ácidos fenólicos (ácido p-cumárico, ácido diprenil hidroxicinâmico, derivados do ácido cinâmico), os quais são atribuídos as propriedades antibacteriana, antioxidante, antiviral e virucida. Este extrato apresentou atividade virucida dependente da dose (4000µg/dose, 400µg/dose) e do tempo de incubação com o vírus (2

horas). A atividade inibitória do EEPV contra a cepa lentogênica de NDV, encontrada no presente estudo sugere a utilização deste extrato como uma alternativa no combate a infecções por este vírus.

Palavras-chave: Própolis Verde, fenóis totais, Virucida, NDV, Paramyxovirus

ABSTRACT

NUNES, Cristina Freitas. **Virucidal activity of ethanol extract of green propolis in vitro**. 2011. 81f. Dissertation (Master) - Graduate Program in Veterinary Science. Federal University of Pelotas, Pelotas.

Currently, the drug industry looks for new drugs based on natural products, for the production of drugs more efficient, for which the microorganisms did not show resistance to both humans and animals. A natural product that has been the subject of intense pharmacological and chemical studies by scientists for the control of diseases is propolis, a resinous substance produced by honeybees from exudates collected from different parts of the plant, which has been used for centuries in popular medicine due to its therapeutic properties. Chemical studies revealed the complex chemical composition, identifying in some cases more than 300 components including various bioactive phenolic compounds responsible for the virucidal action. This work initially describes the standardization of an ethanol extract of green propolis (EEPV), where the chemicals were identified by high performance liquid chromatography (HPLC), phytochemical characterization by thin layer chromatography (TLC), soluble solids, content of phenolics and flavonoids and antioxidant activity by 2,2-diphenyl picryl hydrazyl (DPPH). The EEPV was also evaluated *in vitro* and *in vivo* for their capacity lentogenic virucidal against a strain of the virus of Newcastle disease (NDV) at two different temperatures (22 and 37 ° C), 5 incubation periods (0, 1, 2, 4 and 8 hours) of NDV in five different concentrations of EEPV (4000µg/dose, 400µg/dose, 40µg/dose, and 4µg/dose 0µg/dose). The EEPV standard is within the standards required by the MAP, with high levels of phenolics and flavonoids (12.93 and 6.05% respectively) as shown by HPLC, which identified high concentrations of phenolic acids (p-coumaric acid, hydroxycinnamic acid diprenyl, cinâmino acid derivatives), which are assigned the antibacterial, antioxidant, antiviral and virucidal. This extract showed dose-dependent virucidal activity (4000µg/dose e 400µg/dose) and time of incubation with the virus (2 hour). The inhibitory activity of EEPV against the strain of NDV lentogenic found in the present study suggests the use of this extract as an alternative to fight the infection by this virus.

Key words: Standardization, Green propolis, totals phenolics, virucidal, NDV, Paramyxovirus.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS - ARTIGO 1 - PADRONIZAÇÃO DE UM EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE.

Figura 1. Resultados do CLAE: 150mg/5 mL de Metanol, volume de injeção 20µL.....	31
Figura 2. Comportamento cinético do extrato etanólico frente ao DPPH.....	32

LISTA DE FIGURAS - ARTIGO 2 - ATIVIDADE VIRUCIDA DE UM EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE CONTRA O VÍRUS DE NEWCASTLE *IN VITRO E IN VIVO*.

Figura 1. Cinética do título viral NDV quando incubado com cinco concentrações de EEPV (4000µg/dose, 400µg/dose, 40µg/dose, 4µg/dose, 0µg/dose) em cinco dos períodos (0, 1, 2, 4 e 8 horas) a 22°C <i>in vitro</i> – 1ºensaio.....	55
Figura 2. Cinética do título viral NDV quando incubado com cinco concentrações de EEPV (4000µg/dose, 400µg/dose, 40µg/dose, 4µg/dose, 0µg/dose) em cinco dos períodos (0, 1, 2, 4 e 8 horas) a 37°C <i>in vitro</i> – 1ºensaio.....	56
Figura 3. Cinética do título viral NDV quando incubado com cinco concentrações de EEPV (4000µg/dose, 400µg/dose, 40µg/dose, 4µg/dose, 0µg/dose) em cinco dos períodos (0, 1, 2, 4 e 8 horas) a 22°C <i>in vitro</i> – 2ºensaio.....	56
Figura 4. Cinética do título viral NDV quando incubado com cinco concentrações de EEPV (4000µg/dose, 400µg/dose, 40µg/dose, 4µg/dose, 0µg/dose) em cinco dos períodos (0, 1, 2, 4 e 8 horas) a 37°C <i>in vitro</i> – 2ºensaio.	57

Figura 5. Partículas virais esféricas medindo entre 125 a 250 nanômetros de diâmetro, apresentando um nucleocapsídeo envolto por um delicado envelope com cerca de 10 nanômetros. Coloração negativa.....57

Figura 6. Partículas virais após incubação com o T1. (a) Desorganização do envelope viral, projeções de hemaglutinina no formato de “corda desenrolada”. Ácido nucléico em forma de uma massa disforme, com posterior retração. (b) Processo parece estar em fase mais adiantada. Coloração negativa.....58

Figura 7 Cinética do título viral NDV quando incubado com cinco concentrações de EEPV (4000µg/dose, 400µg/dose, 40µg/dose, 4µg/dose, 0µg/dose) em cinco dos períodos (0, 1, 2, 4 e 8 horas) a 22°C *in vivo*.....59

Figura 8 Cinética do título viral NDV quando incubado com cinco concentrações de EEPV (4000µg/dose, 400µg/dose, 40µg/dose, 4µg/dose, 0µg/dose) em cinco dos períodos (0, 1, 2, 4 e 8 horas) a 37°C *in vivo*.....59

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS - ARTIGO 1 - PADRONIZAÇÃO DE UM EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE.

Tabela 1. Demonstração das amostras analisadas.....30

Tabela 2. Resultados das análises de fenóis e flavonóides totais e limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura.....30

LISTA DE TABELAS - ARTIGO 2 - ATIVIDADE VIRUCIDA DE UM EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE CONTRA O VÍRUS DE NEWCASTLE *IN VITRO E IN VIVO*.

Tabela 1. Relação dos componentes bioativos e suas concentrações, obtido por CLAE no extrato etanólico de própolis verde utilizado.....55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS - Organização Mundial de Saúde
COX-1 - Cicloxigenase-1
COX-2 - Cicloxigenase-2
H7N7 – Vírus da gripe aviária
NDV - Vírus da Doença de Newcastle
ND - Doença de Newcastle
APMV-1 - Paramyxovírus aviário sorotipo 1
OIE - Organização Internacional de Epizootias
PNSA - Plano Nacional de Sanidade Avícola
EEPV – Extrato etanólico de própolis verde
CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência
CCD – Cromatografia em camada delgada
DPPH - 2,2-diphenil-1-picrilhidrazil
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
KOH – Hidróxido de potássio
 AlCl_3 – Cloreto de alumínio
 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ – Ferricianeto de potássio
 FeCl_3 – Cloreto férrico
 CE_{50} - Concentração eficiente
CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
UFPEL – Universidade Federal de Pelotas
UNIBAN – Universidade Bandeirante de São Paulo.
CAVG – Conjunto Agrotécnico “Visconde da Graça”
IFSul - Instituto Federal Sul-rio-grandense
ME – Microscopia Eletrônica
RNA – Ácido ribonucleico
HN – Hemaglutinina e Neuraminidase.
NANA - ácido N-acetilneuramínico
PBS - Phosphate buffered saline
HA – Hemaglutinação
CEEA - Comissão de Ética em Experimentação Animal

Sumário

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. ARTIGO – 1. PADRONIZAÇÃO DE UM EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE.....	18
Resumo.....	20
Introdução.....	21
Material e Métodos.....	22
Resultados e Discussão.....	26
Conclusão.....	27
Referências.....	28
3. ARTIGO – 2. ATIVIDADE VIRUCIDA DE UM EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERDE CONTRA O VÍRUS DE NEWCASTLE IN VITRO E IN VIVO.....	33
Resumo.....	35
Introdução.....	36
Material e Métodos.....	38
Resultados.....	41
Discussão.....	43
Referências.....	47
4. CONCLUSÃO.....	60
5. REFERÊNCIAS.....	61
6. ANEXOS.....	68

1.INTRODUÇÃO

A utilização de produtos de origem natural com fins medicinais, para tratamento e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA & PINTO, 2005). A história do desenvolvimento das civilizações é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tamanha grandiosidade e eficiência que até hoje muitos extratos vegetais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos. No início da década de 90, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam destes produtos naturais medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA & PINTO, 2005). Ao longo do tempo, vários procedimentos clínicos tradicionais têm sido registrados com a utilização de tais produtos, dentre eles um dos que mais se destaca é a própolis.

Logo, a própolis está entre as novas substâncias crescentemente pesquisadas para o uso terapêutico e preventivo, em diversas enfermidades. Há relatos de que a própolis era utilizada e considerada por alguns povos como medicamento para moléstias cutâneas. Foi empregada como cicatrizante no período da Segunda Guerra Mundial em diversas clínicas da União Soviética (BARBOSA et al, 2009). Atualmente, a indústria farmacêutica necessita atender a demanda de produção de fármacos comerciais para diversas enfermidades humanas e animais, com modernos sistemas de produção, eliminando as reações colaterais e atuando especificamente no agente patológico ou no organismo de forma direta, porém de forma eficaz e sem toxicidade. Infecções resistentes a drogas já existentes ou medicamentos que possuem reações indesejáveis para o organismo impulsionam novas pesquisas para o desenvolvimento de novas substâncias terapêuticas, tanto para humanos quanto para animais.

A própolis é uma substância produzida por abelhas, as quais coletam materiais resinosos e balsâmicos de diferentes partes de plantas como, brotos,

botões florais, folhas e cascas (BANKOVA et al., 2000; PARK et al., 2002), e com o processo de mastigação destes materiais, ocorre a adição de enzimas salivares e cera (CASTALDO; CAPASSO, 2002; PARK et al., 2002). A própolis é utilizada pelas abelhas para proteger a colméia de insetos e microorganismos invasores, reparar frestas e manter o ambiente interno da colméia asséptico, principalmente os locais de postura da rainha (BANKOVA et al., 2000).

Nos últimos 30 anos, a própolis tem sido objeto de intensos estudos farmacológicos e químicos no controle de enfermidades, através do conhecimento de sua composição e propriedades bioativas (SFORCIN, 2007; LUSTOSA et al., 2008). Suas propriedades físico-químicas variam de acordo com a região, vegetação, o período em que esses materiais são coletados pelas abelhas e a variabilidade genética das abelhas rainhas (PARK et al., 1998; PARK et al., 2002; DOS SANTOS, et al., 2003).

Em função da diversidade da flora, a própolis brasileira é classificada em grupos de acordo com suas características físico-químicas. A coloração da própolis depende de sua procedência, que pode variar do marrom escuro, marrom esverdeado e marrom avermelhado. A própolis marrom escuro é produzida a partir de uma grande diversidade vegetal, o que dificulta a sua correlação com a fonte produtora. A própolis de tonalidade esverdeada é produzida principalmente a partir de uma planta nativa da região sudeste, popularmente conhecida como alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) (PARK et al., 2002). Já a própolis de coloração marrom avermelhado, proveniente da região de mangue do Estado de Alagoas, tem como origem botânica a espécie *Dalbergia ecastophyllum*, uma leguminosa conhecida popularmente como rabo-de-bugio, a qual possui um odor característico que pode variar de uma amostra para outra (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998; DAUGSCH et al., 2008; CABRAL et al., 2009).

Estudos químicos revelaram a complexa composição da própolis, identificando mais de 300 componentes, incluindo vários compostos bioativos fenólicos, como flavonóides e derivados de ácidos hidroxicinâmicos (BANKOVA et al. 2000; PARK et al., 2004). Muitas propriedades bioativas da própolis já foram relatadas, tais como, atividade antibacteriana, onde verificaram que de 39 linhagens de bactérias testadas, 25 delas tiveram o seu crescimento inibido na presença de baixas concentrações de própolis (LINDENFELSER, 1967; MARCUCCI, 1996; SFORCIN et al., 2000; CABRAL et al., 2009, CARDOSO et

al., 2009). Atividade antifúngica, a qual foi relatado que o extrato de própolis associado com alguns antimicóticos aumentaram a atividade sobre alguns fungos como *Candida albicans*, *Trychopyton*, *Microsporum* entre outros (SCHELLER et al 1977; ; MARCUCCI, 1996; OTA et al., 2001; KOC et al., 2005; QUINTERO-MORA et. al., 2008; CARDOSO et al., 2009). Antioxidante, a qual há relatos de que extrato de própolis oriundo de diversos países como Argentina, Chile, China, Bulgária, entre outros, apresentaram mais de 60% de atividade antioxidante (KUMAZAWA et al., 2004). Existe uma correlação entre o alto conteúdo de flavonóides totais e a atividade anti-radicaís livres em extratos de própolis (AHN et al., 2007; CABRAL et al., 2009; GREGORIS & STEVANATO, 2010). Ação antiprotozoária, a qual foi descrita sobre diversos protozoários, como *Trypanossoma cruzi*, *Trichomonas vaginalis*, *Giargia lamblia*, *Eimeria* sp.(HOLLANDS et al.,1984; MARCUCCI, 1996; BIAVATTI et al., 2003; DANTAS et al., 2006; ALMEIDA et al., 2008; SALOMÃO et. al., 2009). A ação antitumoral foi demonstrada em ratos adultos portadores de carcinoma de Ehrlich (SCHELLER et al.,1989; EL-KHAWAGA et al., 2003; SFORCIN, 2007). A atividade anti-inflamatória, foi relatada demonstrando que a própolis promove a inibição da liberação de ácido aracdônico da membrana celular, suprimindo as atividades das enzimas COX-1 e COX-2, inibe a síntese de prostaglandina, ativa o timo, auxiliando o sistema imune pela promoção da atividade fagocítica e estimulando a imunidade celular (BORRELLI et al., 2002; KOSALEC et al, 2005; PAULINO et al., 2008). A ação imunomoduladora, a qual uma das formas de imunomodulação ocorre através da ativação de macrófagos (ORSOLIC & BASIC, 2003; FISCHER et al., 2007; PAGLIARONE, 2009). ORSATTI et al.(2010) relataram um aumento na expressão de TLR-2 e TLR-4 em macrófagos de ratos tratados com própolis.

O potencial efeito antiviral de diferentes extratos de própolis e alguns componentes foi demonstrado pela redução da replicação *in vitro*, em muitas cepas virais, tais como adenovírus, rotavírus, coronavírus (MARCUCI, 1996), vírus da gripe aviária – H7N7 (KUJUMGIEV et al., 1999), reovírus (HEGAZI et al., 2000; HADY; HEGAZI, 2002), herpesvírus bovino, vírus da diarreia 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 herpesvírus simplex (HULEIHEL; ISANU, 2002; SCHNITZLER et al., 2010; NOLKEMPER et al.,

2010). Esta ação biológica tem sido atribuída, principalmente, à atividade de flavonóides, tais como crisina e canfenol (HULEIHEL; ISANU, 2002; MATSUO et al., 2005), esteres de ácido cinâmico, como o ferulato de isopentila (MARCUCCI, 1996).

A ocorrência de diversas doenças virais incentiva a busca de novos medicamentos ou associações com medicamentos comerciais visando à produção de fármacos mais eficientes aos quais os microrganismos não apresentem resistência, principalmente em pacientes imunodeprimidos. (GONG et al., 2004; BRUM, 2006).

Os vírus da família Paramyxoviridae são importantes agentes que acometem o trato respiratório de animais e humanos. Os *Paramyxovirus* são responsáveis por algumas doenças de grande relevância em Medicina Veterinária, tanto por sua prevalência como pelo impacto econômico na produção animal. Dentre os Paramixovirus de importância sanitária destaca-se o vírus da doença de Newcastle (NDV).

A doença de Newcastle (ND) é uma importante enfermidade de aves causada pelo paramixovírus aviário sorotipo 1 (APMV-1), também conhecido como Vírus da Doença de Newcastle (NDV). Pela sua importância sanitária, a ocorrência de um surto pode resultar na interrupção da exportação regional ou nacional de carne de frango, causando grandes perdas econômicas para a região ou país afetado. A ND é um dos principais problemas sanitários da avicultura industrial. É uma enfermidade viral aguda, altamente contagiosa, que acomete aves comerciais e outras espécies aviárias, produzindo sinais respiratórios freqüentemente acompanhados de manifestações nervosas, diarreia e edema da cabeça (ARNS et al., 2007). Essa doença faz parte da lista A da Organização Internacional de Epizootias (OIE) e apresenta destaque no Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), caracterizando-se como uma doença transmissível que acarreta sérias consequências sócio-econômicas e/ou à saúde pública (a ND é considerado zoonose, por causar conjuntivite em humanos), com destaque relevante para o comércio internacional de aves e seus subprodutos (SPRADBROW, 1994). Essa enfermidade foi considerada como endêmica durante 25 anos. Em 2001, os plantéis brasileiros de aves comerciais foram declarados livres, através de um levantamento oficial realizado com o reconhecimento da OIE. Entretanto, cinco anos mais tarde o

Brasil perdeu o status de livre com o registro de um surto no RS em 2006 (OIE, 2006). Desde então não há registro da enfermidade.

As manifestações clínicas e mortalidade variam de acordo com a virulência da amostra viral envolvida. Estas são classificadas de acordo com a sua virulência em velogênicas, mesogênicas e lentogênicas (ALLAN et al., 1973). Os métodos disponíveis para essa classificação distinguem amostras com acentuada diferença no seu potencial patogênico, porém podem produzir resultados discrepantes com amostras de virulência similar. As amostras de NDV usadas como vacina viva estão entre as lentogênicas, que apresentam variações individuais de virulência para o trato respiratório da galinha (ALEXANDER, 1991).

Os objetivos deste trabalho foram padronizar um extrato etanólico de própolis verde e determinar a sua atividade *in vitro* e *in vivo* como agente virucida contra o vírus da doença de Newcastle

2. ARTIGO 1

Padronização de uma amostra de extrato etanólico de própolis verde.

Formatado de acordo com as normas da revista Química Nova (Impresso)

**PADRONIZAÇÃO DE UMA AMOSTRA DE EXTRATO ETANÓLICO DE
PRÓPOLIS VERDE.**

Cristina Freitas Nunes^a, Paula Fonseca Finger^a, Geferson Fischer^a, Clarissa
Caetano de Castro^a, Silvia de Oliveira Hübner^a, Niraldo Paulino^b, Maria Cristina
Marcucci^c, Oseraldo Vieira^c, Roberto Gusmão^c, Gilberto D'Ávila Vargas^a

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

^b *Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Biomedicamentos do Programa de
Mestrado Profissional em Farmácia da Universidade Bandeirante de São Paulo
– UNIBAN – CEP. 02071-013 - São Paulo - SP – Brasil*

^c *Laboratório de Produtos Naturais do Programa de Mestrado Profissional em
Farmácia da Universidade Bandeirante de São Paulo – UNIBAN – CEP. 02071-
013 - São Paulo - SP – Brasil.*

Corresponding author: Phone: +55 53 32757498; fax: +55 53 3275-7498.

E-mail address: tinavet_@hotmail.com (C.F. Nunes). Universidade Federal de

Pelotas, CP 354, CEP, 96010-900, Pelotas, RS, Brazil

RESUMO

A própolis, uma substância resinosa produzida pelas abelhas melíferas a partir de exsudatos coletados em diferentes partes das plantas, tem sido utilizada há séculos na medicina popular devido as suas propriedades terapêuticas. Este trabalho descreve a padronização de um extrato etanólico de própolis verde, onde foram identificados os compostos químicos por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência), caracterização fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD), teor de sólidos solúveis, teor de fenóis e flavonóides totais e atividade antioxidante por diphenil picril hidrazil (DPPH). Este extrato etanólico de própolis verde (EEPV) analisado posteriormente será estudado como agente virucida. Os resultados encontrados evidenciam que este EEPV está dentro dos padrões requisitados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, apresentando 9,35% de teor de sólidos solúveis, atividade antioxidante com $CE_{50\%}$ de 9,80 $\mu\text{g/mL}$, duas classes fitoquímicas, polifenóis e flavonóides, identificadas pela CCD, altos níveis de fenóis e flavonóides totais (12,93 e 6,05% respectivamente), comprovados por CLAE, o qual identificou altas concentrações de ácidos fenólicos (ácido p-cumárico, ácido diprenil hidroxicinâmico, derivados do ácido cinâmico), os quais são atribuídos as propriedades antibacteriana, antioxidante, antiviral e virucida.

Palavras-chave: CLAE, caracterização fitoquímica, sólidos solúveis, fenóis totais, flavonóides totais.

1- Introdução

A própolis, uma substância resinosa produzida pelas abelhas melíferas a partir de exsudatos coletados em diferentes partes das plantas, tem sido utilizada há séculos na medicina popular devido as suas propriedades terapêuticas¹. Nos últimos 30 anos, a própolis tem sido objeto de intensos estudos farmacológicos e químicos no controle de enfermidades, através do conhecimento de sua composição e propriedades bioativas^{2,3}, tais como atividade antibacteriana, antiinflamatória, antifúngica, antitumoral, imunomoduladora, antioxidantes, antiviral, virucida, entre outros, embora muitos dos seus mecanismos de ação ainda sejam desconhecidos. A atividade e os componentes da própolis variam de acordo com sua origem geográfica^{4,5}.

Quimicamente, a própolis apresenta diversos compostos, sendo que na denominada de “verde” estão presentes vários compostos fenólicos. Recentemente, foi demonstrada a tipificação das amostras de própolis no Brasil, associando-as a atividades biológicas específicas⁶.

Além de todas as características mencionadas, a própolis é utilizada freqüentemente tanto na área da medicina humana quanto na área veterinária, com obtenção de bons resultados terapêuticos. Com isso não se pode relegar a própolis a uma categoria de modismo terapêutico, tendo em vista que suas virtudes são reconhecidas há séculos, sendo relatadas em muitos trabalhos que demonstram diferentes tipos de atividade biológica e aplicações em diversas terapias^{7,8,9}. Trata-se de uma medicina alternativa, chamada de Apiterapia, devido às suas várias propriedades terapêuticas e biológicas, segundo trabalhos científicos do mundo inteiro¹⁰. No entanto, a fim de ser aceito oficialmente pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), deve-se estabelecer a identidade e os requisitos mínimos de qualidade do extrato de própolis para que se garanta a segurança e eficácia^{11,12}. Neste sentido o objetivo deste trabalho foi determinar a padronização de um extrato etanólico de própolis verde, que posteriormente será estudado como agente virucida.

2. Material e Métodos

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Produtos Naturais do Programa de Mestrado Profissional em Farmácia da Universidade Bandeirante de São Paulo - UNIBAN.

2.1. Obtenção do extrato etanólico da própolis verde (EEPV)

O EEPV foi obtido através da mistura de aproximadamente 75 gramas de própolis bruta triturada fornecida pela Prodapys, com 250 mL de álcool etílico (p.a.) (ou na mesma proporção) em erlenmeyers de 500 mL, estes permaneceram em um *shaker* orbital a uma agitação de 160 rpm a uma temperatura de 40°C por 18h. Após esse procedimento, a amostra foi armazenada em freezer por 1 a 2 horas, para a redução do teor de gordura no extrato e posteriormente filtrada para a separação da porção insolúvel. A porção insolúvel (retida no filtro) foi seca em uma capela com ventilação, *overnight*. Junto às porções insolúveis foi adicionado álcool etílico (p.a.) e devolvido ao *shaker* para uma nova extração. Repetindo o procedimento. O solvente foi evaporado em rotaevaporador a temperatura de 70°C até a obtenção do extrato mole da própolis.

2.2. Identificação dos compostos da amostra.

2.2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência do EEPV.

Uma quantidade de 150 mg do extrato mole foi solubilizada em 5 mL de metanol, 2 mL desta amostra foi filtrada em filtro Millipore (0,20µm) e armazenada em um “vial”, para a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando-se o cromatógrafo LaChrom, modelo D-70005. Para determinar a composição química da amostra da própolis por CLAE, empregou-se uma coluna com 18 cadeias de carbono em fase reversa (Lichrochart Lichrospher 100 RP 18, 12,5 x 0,4 cm, diâmetro de partícula de 5µm Merck) e um gradiente linear (fluxo de 1 mL/min.) composto de metanol e água acidificada com 5% de ácido fórmico. O volume injetado foi de 20 µL. Foi utilizado um detector de rede de diodos na detecção dos picos. O tempo máximo de análise foi de 60 minutos e a detecção foi efetuada em comprimentos de onda de 280 e 340 nm. O programa utilizado para a análise de dados foi o Merck-Hitachi modelo D-7000 (Chromatography Data Station - DAD Manager).

2.3. Caracterização fitoquímica do EEPV

2.3.1. *Cromatografia em camada delgada.*

As análises foram realizadas em relação às seguintes substâncias naturais: flavonóides (reação com AlCl_3), cumarinas (reação com KCl), alcalóides (reagente de Dragendorff), saponinas (anisaldeído), triterpenos (reação de Liebermann-Buchard)¹³ heterosídeos cardioativos, polifenóis e taninos. Obteve-se os perfis cromatográficos, em cromatografia de camada delgada em placas de sílica gel 60G, com base de alumínio e indicador fluorescente.

Para a preparação das amostras, 1 mg do EEPV foi solubilizado em 1 mL de metanol. Os sistemas de eluentes empregados foram selecionados de acordo com o grupo fitoquímico que foi pesquisado. As amostras analisadas (Tabela 1) foram aplicadas a aproximadamente 1 cm da base inferior da placa, com auxílio de um capilar. Após a aplicação das amostras sobre as placas, as mesmas foram introduzidas nas cubas previamente saturadas, contendo fase móvel adequada, para cada classe fitoquímica. Foram utilizadas cubas de vidro com fundo chato com as paredes laterais internas recobertas com papel filtro (deixando uma abertura para a observação da fase móvel), para facilitar sua saturação com os vapores do solvente. O solvente sobe por capilaridade até que esteja a 2 cm da extremidade superior. Ao ascender, o solvente arrasta os compostos menos adsorvidos na fase estacionária, separando-os dos mais adsorvidos. A linha de chegada da fase móvel foi marcada e a placa foi colocada em local arejado para ocorrer a secagem e posterior revelação. Os eluentes e reveladores utilizados estão descritos na tabela 1.

2.4. *Teor de sólidos solúveis da própolis verde*

Pesou-se um *becker* de 50 mL e anotou-se o peso. Com auxílio de uma proveta mediu-se 20 mL do extrato e depositou-se no *becker* e este levado à estufa a 60°C até a secura. O *becker* foi retirado e resfriou-se o mesmo. Pesou-se e repetiu-se a operação até peso constante. O procedimento foi realizado em triplicata.

Para fins de cálculo foi utilizada a fórmula abaixo.

$$\% \text{ sólidos solúveis (m/v)} = \frac{(m_1 - b) \times 100}{V_a}$$

Onde: b = massa do *becker*.

m_1 = massa final do *becker* com o extrato seco, após secagem.

V_a = Volume da alíquota do extrato, a ser seco.

2.5. Análises espectrofotométricas

2.5.1. Determinação de fenóis totais.

Para a quantificação de fenóis totais utilizou-se o método de Folin, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, e a leitura por espectrofotometria. Este método funciona através da quantificação da substância a ser testada, necessária para inibir a oxidação do reagente. Preparou-se uma solução estoque, da seguinte forma, 0,05 g do extrato seco, dissolvido em etanol, transferindo-o para um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com água. A partir deste ponto o procedimento foi realizado em triplicata. Transferiu-se uma alíquota de 0,2 mL da solução estoque, para um balão volumétrico de 10 mL, contendo aproximadamente 5 mL de água destilada e adicionou-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Agitou-se por alguns segundos e no intervalo de 1 a 8 minutos acrescentou-se 1,2 mL da solução tampão carbonato-tartarato de sódio a 20% (carbonato de sódio). Completou-se o volume do balão volumétrico com água até próximo ao menisco. A solução foi mantida em um banho Maria a 20°C. Após 2 horas, fez-se o ajuste do volume final a 20°C, agitando-se por alguns segundos e fez-se a leitura no espectrofotômetro a 760 nm.

2.5.2. Determinação de flavonóides totais.

A quantificação do teor de flavonóides totais foi realizada por espectrofotometria utilizando-se cloreto de alumínio, como reagente de deslocamento. O método espectrofotométrico para quantificar flavonóides totais baseia-se na propriedade do cátion alumínio de formar complexos estáveis com os flavonóides, evitando a interferência de outras substâncias fenólicas.

A partir da solução estoque do procedimento anterior, retirou-se uma alíquota de 0,2 mL desta solução e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL, contendo aproximadamente 5 mL de metanol. Adicionou-se 0,2 mL de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) e completou-se o volume até próximo ao menisco com metanol. Agitou-se a solução e esta foi mantida em banho Maria por 30 minutos a 20°C. Após esse período fez-se o ajuste do volume. A leitura foi feita a 425 nm. As análises foram feitas em triplicatas.

2.5.3. Atividade antioxidante - DPPH

A atividade antioxidante foi avaliada empregando-se o radical DPPH (2,2-diphenil-1-picrilhidrazil) em amostras de própolis, realizada através de medidas espectrofotométricas do consumo do radical, na presença de substâncias antioxidantes. A partir do extrato seco da amostra, preparou-se uma solução estoque a 1%, desta solução estoque tomou-se 100µl e colocou-se em um balão volumétrico de 10 mL e completou-se com etanol. Preparou-se diferentes diluições do extrato de própolis a 0,0002% da seguinte forma, organizou-se 9 tubos enumerados de 0 a 8, adicionando álcool, solução de própolis e DPPH em cada tubo. O tubo de número zero foi o controle, ou seja, apenas DPPH e etanol. Ao adicionar o DPPH no tubo zero, contou-se 1 minuto e adicionou-se o DPPH no segundo tubo e assim sucessivamente até o tubo 8. Agitando os tubos de tempo em tempo. Após 30 minutos da adição de DPPH no primeiro tubo, realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 517 nm, em triplicata, sempre obedecendo 1 minuto de intervalo entre cada amostra.

3. Resultados e Discussão

3.1. *Cromatografia líquida de alta eficiência do EEPV.*

Os compostos fenólicos foram quantificados com o uso de padronização interna por meio de cromatografia de fase líquida de alta eficiência. O perfil cromatográfico da amostra está apresentado na figura 1. Nota-se, altas concentrações de Ácido p-cumárico, Artepillin C e derivados do ácido cinâmico (Figura 1). Segundo Akao, et al¹⁴, atividades biológicas extremamente importantes, como por exemplo, atividade virucida de extratos etanólicos desse tipo de própolis podem ser atribuídas principalmente à presença destes ácidos fenólicos.

3.2. *Caracterização fitoquímica do EEPV*

3.2.1. *Cromatografia em camada delgada (CCD).*

Ao realizar a leitura das placas, observou-se apenas a presença de duas classes de metabólitos secundários no EEPV avaliado, sendo a classe dos polifenóis e flavonóides. As análises por CCD, baseadas na comparação das manchas reveladas, sendo estas iguais e de mesmo tamanho que das amostras padrão.

3.3. *Teor de sólidos solúveis da própolis verde / Resíduo seco.*

Quanto ao teor de sólidos solúveis, considerando a metodologia utilizada, são aceitáveis valores acima de 7 %^{11,14}. Avaliando-se o resultado obtido para a análise do teor de sólidos solúveis percebe-se que a amostra apresenta 9,35% de teor de sólidos solúveis, atendendo as normas em vigor.

3.4. *Análises espectrofotométricas*

3.4.1. *Determinação de fenóis e flavonóides totais*

A tabela 2 traz os resultados dos ensaios espectrofotométricos realizados com a própolis para determinação de seus teores de flavonóides e fenóis totais. A média do teor de fenóis totais encontrado na amostra investigada foi de 12,93% (m/m), atendendo ao requisito mínimo do Ministério da Agricultura, que é de 5%. Da mesma forma ocorreu com o teor de flavonóides totais, que na amostra investigada apresentou o valor de 6,048% (m/m), sendo que o requisito mínimo do Ministério da Agricultura é de 0,5%¹¹.

3.4.2. Atividade antioxidante- DPPH

A quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração efetiva (CE_{50}). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE_{50} e maior a sua atividade antioxidante. Neste experimento a CE_{50} da amostra do extrato etanólico foi de 9,80 $\mu\text{g/mL}$, o que indica uma ótima atividade antioxidante (Figura 2). A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias¹⁶.

4. Conclusão

Pode-se concluir que o EEPV avaliado está dentro dos padrões requisitados pelo MAPA, com altos níveis de fenóis e flavonóides totais, o que indica altas concentrações de ácidos fenólicos, os quais são atribuídos as propriedades antibacteriana, antioxidante e antiviral¹⁷, por tanto, está apto a ser utilizado para a determinação da atividade virucida a ser pesquisada posteriormente.

Agradecimentos

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 da própolis bruta; Laboratório de Produtos Naturais do Programa de Mestrado Profissional em Farmácia da Universidade Bandeirante de São Paulo – UNIBAN - pelo treinamento prestado; Laboratório Bio-Vet S/A – Vargem Grande Paulista, SP – Brasil, pelo fornecimento da vacina comercial contra o NDV, e à BASF - The Chemical Company - São Paulo, SP, Brasil - pelo fornecimento do emulsificante utilizado.

Referências

1. Fischer, G.; Hübner S.O.; Vargas, G.D.; Vidor, T. Imunomodulação pela própolis - Arquivos Do Instituto Biologico. São Paulo, **2008**, 75(.2),.247-253.
2. Lustosa, S.R.; Galindo, A.B.; Nunes, L.C.C., Randau, K.P; Rolim Neto P.J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia, Revista Brasileira de Farmacognosia, **2008**, 18(3), 447-454.
3. Sforcin, J. M. Propolis and the immune system: a review. Journal of Ethnopharmacology, **2007**, 13, 1-14.
4. Kujumgiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R., Popov S., J. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. Ethnopharmacol., **1999**, 64, 235 - 240.
5. Markham K. E., Mitchel, K. A., Wilkins, A. L., Daldy, J. A., Lu, Y., HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. Phytochemistry, **1996**, 42, 205 - 211.
6. Ribeiro, F.L.,Jesus, P.T., Marcucci, M.C., Composição química e atividade biológica da própolis tipificada – I jornada de iniciação científica UNIBAN - http://www.uniban.br/pesquisa/iniciacao_cientifica/pdf/ciencias_vida/farmacologia/composicao_tipificada.pdf, **2008**. Acesso em 27 de junho de 2010.
7. Pereira, A.S.; Seixas, F.R.M.S. E Aquino Neto, F.R. PRÓPOLIS: 100 ANOS DE PESQUISA E SUAS PERSPECTIVAS FUTURAS, Quim. Nova, **2002**, 25(2), 321-326.
8. Helfenberg, K. D. The analysis of beeswax und propolis. In: Chemikerzeitung, German, **1908**, 31, 987.
9. Mizuno, M., Iinuma, M., Kato, I.I. Useful ingredients and biological activity of propolis. Fragrance Journal,**1987**, 15, 20.
10. Malheiros, E.B.; Silva L.P.G.; Zanato, J. A. F.; Neto, A. C.; Santos, E.; Lui, J.F; Coloni, R.D. Extrato etanólico de própolis sobre o ganho de peso, parâmetros de carcaça e pH cecal de coelhos em crescimento. Biotemas, **2007**, 20(2), 59-64.
11. Brasil. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 jan. **2001**.
12. Bankova, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. Journal of Ethnopharmacology, **2005**, 100, 114 – 117.

13. Costa, A. Farmacognosia. Lisboa, Fundação Calouste Grilbenkian. 2ª Ed., **1982**, vol.3.
14. Akao Y.; Maruyama, H.; Matsumoto, K.; Ohguchi, K.; Nishizawa, K.; Sakamoto, T.; Araki, Y.; Mishima, S.; Nozawa, Y. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. *Biol Pharm Bull*, **2003**, 26: 1057-1059.
15. Sousa, J.P.B.; Furtado, N.A.J.C.; Jorge, R.; Soares, A.E.E.; Bastos, J.K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17, 85-93, **2007**.
16. Sousa, C.M.M.; Silva, H.R.; Vieira-Jr., G.M.; Ayres, M.C.C.; Costa, C.L.S., Araújo, D.S.; Cavalcante, L.C.D.; Barros, E.D.; Araújo, P.B.M.; Brandão, M.S. E Chaves, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, *Quim. Nova*, 30,2, 351-355, **2007**.
17. Volpi N, Bergonzini G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 42, 354-361, **2006**.

Legenda de tabelas e figuras

NUNES, et al., Tabela 1

Tabela 1. Demonstração das classes fitoquímicas, eluentes, amostras analisadas e agentes reveladores utilizados.

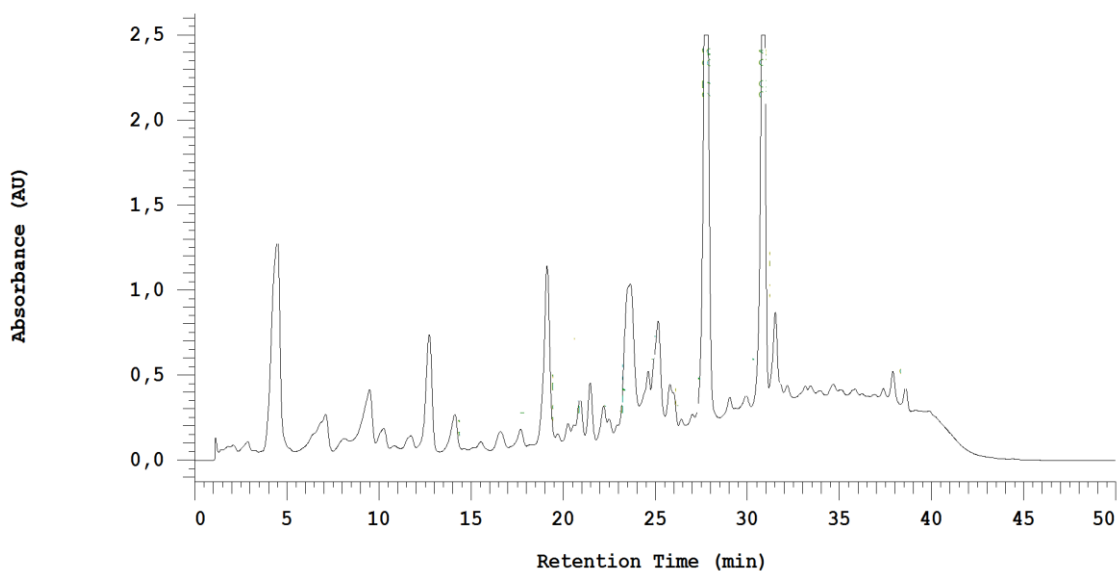
Classe fitoquímica	Eluente	Amostras Analisadas		Agente revelador
		Amostra padrão	Amostra avaliada	
Cumarinas	Tolueno e éter saturado com 10% de ácido acético	Extrato de Guaco	EEPV	KOH 10% + luz UV
Flavonóides	Acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial e água	Extrato de Calêndula	EEPV	AlCl ₃ 1% + luz UV
Alcalóides	Acetato de etila, metanol e água	Extrato de Jaborandi	EEPV	Reativo de Draggendorf
Triterpenos	Hexano e acetato de etila	Óleo Essencial de Citronela	EEPV	Reativo de Liebermann-Buchar
Heterosídeos cardioativos	Acetato de etila, metanol e água	Extrato de Espirradeira	EEPV	Reagente de Kedde
Saponinas	Clorofórmio, metanol e água	Extrato de Carqueja	EEPV	Anilsadeido + 5 min a 105°C
Polifenóis	Hexano e acetato de etila	Extrato desidratado de Própolis Verde	EEPV	K ₃ Fe(CN) ₆ 1% + FeCl ₃ 2% + luz UV
Taninos	Tolueno, n-butanol, ácido acético e água.	Extrato de Espinheira Santa	EEPV	K ₃ Fe(CN) ₆ 1% + FeCl ₃ 2% + luz UV

NUNES,et al., Tabela 2

Tabela 2. Resultado das análises de fenóis e flavonóides totais e limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Análise	Teor médio±Desvio Padrão	Requisito do Ministério
Fenóis totais	12,93 ± 1,06	Mínimo de 5%
Flavonóides totais	6,05 ± 0,61	Mínimo de 0,5%

NUNES, et al., Figura 1



Nome	Tempo de Retenção	Concentração no EEPV(mg/g)
Ácido cafeico	2,88	0,87
Ácido p-cumárico	4,49	20,98
Ácido cafeico (derivado 1)	7,11	6,46
Ácido cafeico (derivado 2)	9,5	7,32
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 1)	12,73	7,61
Ácido cafeico (derivado 3)	14,12	3,27
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 2)	17,69	1,05
Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico	19,13	9,92
2,2-Dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano	20,91	0,91
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 3)	22,2	1,54
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 4)	25,14	5,88
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 5)	25,97	0,82
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C)	27,86	27,46
Ácido cinâmico (derivado 1)	30,94	11,91
Ácido 6-propenóico-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano	31,52	2,47

Figura 1 Resultados do CLAE: 150mg/5mL de metanol, volume de injeção 20µL. Apresentando os nomes dos compostos químicos, tempo de retenção e concentração dos compostos químicos no EEPV.

NUNES, et al., Figura 2

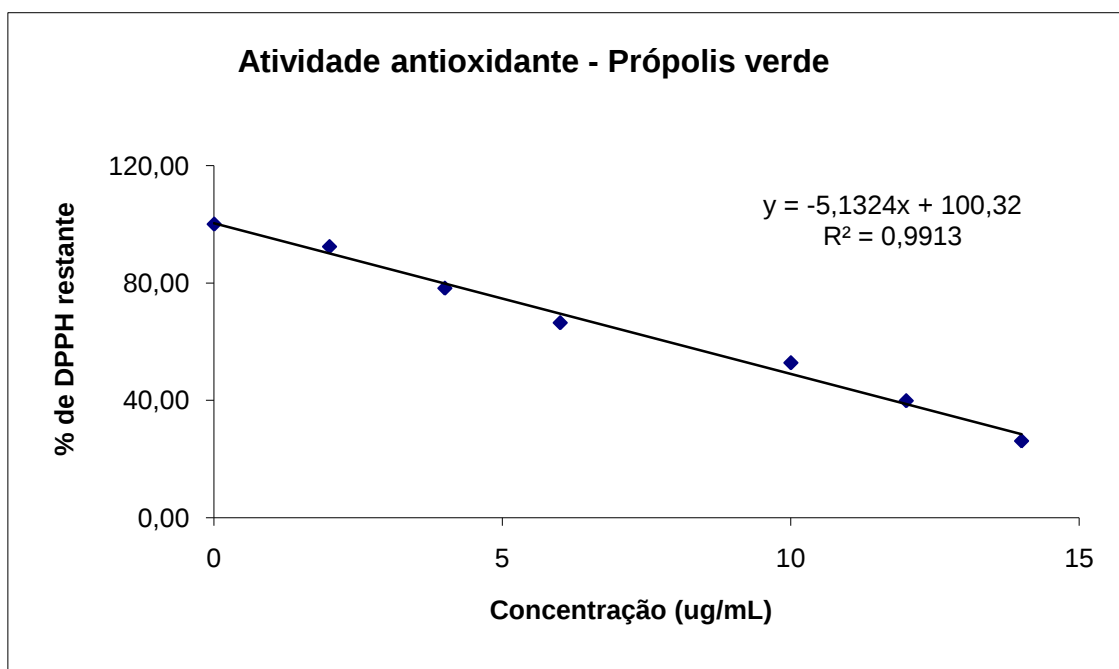


Figura 2. Comportamento do extrato etanólico frente ao DPPH

3. ARTIGO 2

**Atividade virucida de um extrato etanólico de própolis verde contra o
vírus da doença de Newcastle “in vitro” e “in vivo”**

(Formatado de acordo com as normas da revista International Journal of
Antimicrobial Agent.)

**ATIVIDADE VIRUCIDA DE UM EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS
VERDE CONTRA O VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE IN VITRO E IN
VIVO.**

Cristina Freitas Nunes^a, Paula Fonseca Finger^a, Daiana Medeiros^a, Cacciane Faccio^a, Geferson Fischer^a, Clarissa Caetano de Castro^a, Silvia de Oliveira Hübner^a, Niraldo Paulino^b, Maria Cristina Marcucci^c, Fabiane Gentilini^d, Mauro, Pereira Soares^e, Gilberto D'Avila Vargas^a

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

^b Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Biomedicamentos do Programa de Mestrado Profissional em Farmácia da Universidade Bandeirante de São Paulo – UNIBAN – CEP. 02071-013 - São Paulo - SP – Brasil

^c Laboratório de Produtos Naturais do Programa de Mestrado Profissional em Farmácia da Universidade Bandeirante de São Paulo – UNIBAN – CEP. 02071-013 - São Paulo - SP – Brasil.

^d Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça, Instituto Federal Sul-rio-grandense – IFSul campus Pelotas – CP 354 – 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil

^e Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel – CP 354 – 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil

Corresponding author: Phone: +55 53 32757498; fax: +55 53 3275-7498.

E-mail address: tinavet_@hotmail.com (C.F. Nunes). Universidade Federal de

Pelotas, CP 354, CEP, 96010-900, Pelotas, RS, Brazil

Resumo

Atualmente, a indústria farmacêutica busca novos medicamentos com base em produtos naturais visando à produção de fármacos mais eficientes, para os quais, os microrganismos não apresentem resistência, tanto para humanos quanto para animais. Um dos produtos naturais que tem sido objeto de intensos estudos farmacológicos e químicos por cientistas para o controle de enfermidades, é a própolis. O termo própolis refere-se a uma substância produzida por abelhas para proteger a colméia de insetos e microorganismos invasores, reparar frestas e manter o ambiente interno da colméia asséptico. Estudos químicos revelaram a complexa composição da própolis, incluindo vários compostos bioativos fenólicos responsáveis pela ação virucida. Neste estudo, um EEPV foi avaliado *in vitro* e *in vivo*, quanto a sua capacidade virucida contra uma cepa lentogênica do vírus da doença de Newcastle (NDV). Utilizou-se duas temperaturas distintas (22 e 37°C), 5 períodos de incubação (0, 1, 2, 4 e 8 horas) do NDV em 5 concentrações de EEPV distintos (4000µg/dose, 400µg/dose, 40µg/dose, 4µg/dose e 0µg/dose). Este extrato apresentou atividade virucida dependente de concentração e do tempo de incubação, ocorrendo inibição total do vírus nas concentrações de 4000µg/dose, 400µg/dose, a partir de 2 horas de incubação. Atividade inibitória do EEPV contra a cepa lentogênica de NDV, sugere a utilização deste extrato como uma alternativa de agente virucida natural no combate a infecções pelo NDV.

Palavras-chave: Extrato etanólico, própolis verde, virucida, Paramyxovirus, *in vitro*, *in vivo*.

1. Introdução

Atualmente, a indústria farmacêutica busca novos medicamentos com base em produtos naturais visando à produção de fármacos mais eficientes, para os quais, os microrganismos não apresentem resistência, impulsionando novas pesquisas para o desenvolvimento de novas substâncias terapêuticas, tanto para humanos quanto para animais [1, 2]. Um dos produtos naturais que tem sido objeto de intensos estudos farmacológicos e químicos por cientistas para o controle de enfermidades, é a própolis uma substância resinosa produzida por abelhas, a partir da coleta de materiais resinosos e balsâmicos de diferentes partes de plantas como, brotos, botões florais, folhas e cascas [3, 4], e com o processo de mastigação destes materiais, ocorre à adição de enzimas salivares e cera [4, 5]. A própolis é utilizada pelas abelhas para proteger a colméia de insetos e microorganismos invasores, reparar frestas e manter o ambiente interno da colméia asséptico, principalmente os locais de postura da rainha [3]. Estudos químicos revelaram a complexa composição da própolis, identificando mais de 300 componentes, incluindo vários compostos bioativos fenólicos, como flavonóides (tais como crisina, quercetina, luteolina e canfenol) e ésteres de ácido cinâmico, como o ferulato de isopentila, descritos como responsáveis pela ação antiviral e/ou virucida [3, 6, 7, 8, 9, 10, 11].

Os vírus da família Paramyxoviridae incluem importantes patógenos do trato respiratório de animais e humanos. Os Paramyxovírus são responsáveis por algumas doenças de grande relevância em Medicina Veterinária, tanto por sua prevalência como pelo impacto econômico na produção animal. Dentre os Paramyxovírus de importância destaca-se o Vírus da Doença de Newcastle (NDV), também chamado de Paramyxovirus aviário tipo I (APMV-I) [12, 13].

O APMV-I pertence ao gênero Avulavirus da família Paramyxoviridae [13]. O genoma deste vírus é constituído por uma molécula de RNA linear de fita simples, polaridade negativa, com 15 a 19 Kb [12, 13, 14]. Possui uma arquitetura complexa, que consiste basicamente de um envelope lipoprotéico, um nucleocapsídeo e uma proteína matriz. As partículas víricas são pleomórficas e muitas vezes esféricas, com diâmetro de aproximadamente 180nm. Este é inativado após três horas a 56°C ou 30 minutos a 60°C, e por ação de pH ácido [13]. Os vírions são sensíveis ao éter e inativados por desinfetantes contendo formol e/ou fenol, porém podem sobreviver por longos

períodos a temperatura ambiente. Nos vírions intactos, a única estrutura visível por microscopia eletrônica (ME) é o envelope, com 7 a 15nm de espessura, recoberto por projeções de 8 a 20nm de extensão, constituídas pelas glicoproteínas de superfície hemaglutinina e neuraminidase (HN). A hemaglutinina apresenta atividade de hemaglutinação, ou seja, se adere à receptores da membrana dos eritrócitos, fazendo com que as hemácias se aglutinem. Estes receptores são mucoproteínas com resíduos de ácido N-acetilneuramínico (NANA) [15]. A hemaglutinina destes vírus são glicoproteínas rica em fucose, galactose, manose e glicosamina, que favorecem a ligação com os receptores celulares. Já a neuraminidase, tem a capacidade de clivar o receptor celular (ácido siálico), prevenindo que as partículas virais se liguem em células já infectadas ou fiquem retidas na membrana celular durante o egresso de vírions recém formados. Possui também a glicoproteína F, responsável pela fusão do envelope viral com a membrana plasmática celular durante o processo de penetração, em condições de pH neutro [12, 14, 15, 16].

A doença de Newcastle (ND) é altamente contagiosa, acomete uma ampla variedade de hospedeiros. Mais de 250 espécies de aves têm sido relatadas como sensíveis à infecção como galinhas, patos, avestruzes, perus, aves silvestres e aquáticas bem como humanos [13, 17]. Possui distribuição mundial e a patogenia da infecção pelo NDV é classificada de acordo com a virulência de suas cepas, em velogênicas (mais severa e está associada à alta mortalidade), mesogênicas (apresenta sinais respiratórios e ocasionalmente neurológicos) e lentogênicas (se caracteriza por infecções subclínica ou sinais respiratórios moderados) [13, 18]. Os métodos disponíveis para essa classificação distinguem amostras com acentuada diferença no seu potencial patogênico, porém podem produzir resultados discrepantes com amostras de virulência similar. As amostras de NDV usadas como vacina viva são as lentogênicas, que apresentam variações individuais de virulência para o trato respiratório da galinha [19].

A ND faz parte da “lista A” das enfermidades infecciosas do “Office Internacional des Epizooties - OIE” [20] e apresenta destaque no Plano Nacional de Sanidade Avícola - PNSA, sendo esta enfermidade considerada um dos problemas sanitários mais importantes do plantel avícola brasileiro. Com isso o surgimento de um surto da ND, além de acarretar elevadas perdas econômicas ao país, se torna um grande obstáculo à exportação de produtos

avícolas para outros mercados consumidores, uma vez que programas profiláticos referentes a esta enfermidade estão enquadrados nos sistemas de biossegurança, sendo estabelecidas barreiras sanitárias para exportação e importação entre os países [21, 22, 23].

O controle da ND é freqüentemente realizado, em aves reprodutoras, frangos de corte e poedeiras comerciais, mediante vacinação e princípios de manejo que evitem a disseminação do vírus e eliminem a infecção de uma região após um surto. Porém, estas medidas nem sempre são suficientes, devido à falta de política de controle sanitário em criações domésticas [21]. Um estudo realizado no ano de 2010 mostrou a prevalência de 39,1% de amostras soropositivas no Brasil durante os anos de 2002 a 2003. Demonstrando a predominância na região Sudeste (66,4%), seguido pelo Centro-Oeste (23,3%) e Sul (22,3%) das regiões [24]. Nesse contexto, reforça-se a grande importância dessa pesquisa, cujo objetivo é verificar a atividade virucida “in vitro” e “in vivo” de um extrato etanólico de própolis verde sobre uma cepa lentogênica do vírus da doença de Newcastle.

2. Material e Métodos

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Virologia e Imunologia, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas - UFPel, em colaboração com o Laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da Universidade Bandeirante de São Paulo – UNIBAN.

2.1. Extrato etanólico de própolis verde

O extrato etanólico de própolis verde (EPPV) foi obtido através da mistura de própolis bruta triturada com álcool etílico (p.a.) e mantidos sob agitação de 160 rpm a uma temperatura de 40°C por 18h. Após esse procedimento, a amostra foi armazenada em freezer por 1 a 2 horas, para a redução do teor de gordura no extrato e posteriormente filtrada para a separação da porção insolúvel. Após a secagem da porção insolúvel e repetiu-se o procedimento. O solvente foi evaporado em rotaevaporador a temperatura de 70°C até a obtenção do extrato mole da própolis. Durante a realização do experimento, a solução etanólica foi mantida sob refrigeração a 4° C.

2.2. Citotoxicidade do EEPV.

Previamente à avaliação da atividade virucida do extrato etanólico de própolis verde, foram realizados testes visando avaliar a sua toxicidade ao embrião de galinha. Para tanto, foram testadas diferentes concentrações de própolis: 40000 µg/dose, 4000 µg/dose, 400 µg/dose e 4 µg/dose, com base em estudos sobre a atividade antiviral, anteriormente realizado pelo nosso grupo de pesquisa [25]. A inoculação foi realizada seguindo metodologia conhecida [20]. Após a perfuração da casca do ovo, 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, dois ovos referentes a cada concentração de própolis, foram abertos para avaliação de possíveis lesões no embrião e alterações no líquido alantóide. O restante dos ovos continuou incubado até eclosão dos pintinhos.

2.3. Vírus

Uma amostra vacinal do vírus da doença de Newcastle (cepa La Sota), produzida em ovos embrionados de galinha, foi gentilmente fornecida pelo Laboratório Bio-Vet S/A. A amostra liofilizada, foi reconstituída em 5 mL de PBS estéril (pH 7.4) e inoculada (100µL) em 12 ovos embrionados, com 11 dias de incubação. Foram incubados por 5 dias, a 37°C com umidade relativa do ar controlada de 60% e posteriormente, coletou-se o líquido alantóide e foram realizadas mais 5 passagens utilizando o mesmo protocolo. A cada passagem foi realizado o teste de hemaglutinação, para a verificação da titulação viral. Ao final coletou-se o líquido alantóide, liofilizou-se e armazenou-se a -10°C.

2.4. Atividade virucida do EEPV “in vitro”.

Visando a avaliação da atividade virucida do extrato etanólico de própolis verde in vitro, o NDV foi exposto a 5 tratamentos com diferentes concentrações do EEPV. Este extrato foi diluído em PBS, nas seguintes concentrações 4000µg/dose (T1), 400µg/ dose (T2), 40µg/ dose (T3), 4µg/ dose (T4), 0µg/ dose (controle). Foi acrescentadas às diluições, 500µL de vírus aos tratamentos e incubados a 37°C e a 22°C por 8 horas. A titulação foi realizada em triplicata em 5 períodos de incubação (0, 1, 2, 4 e 8 horas), através da técnica de Hemaglutinação. Esta técnica é baseada em diluições seriadas de base logarítmica 2 (log2) com um diluente tipo salina tamponada

(PBS). As diluições foram feitas em microplacas com 96 cavidades, sendo que cada tratamento ficou em uma cavidade. As diluições iniciam-se em 1:2, seguindo-se na mesma proporção. Depois de realizado as diluições, adicionou-se as placas, uma suspensão de hemácias de galinha lavadas a 1%. Onde houve antígeno suficiente, houve a formação de um tapete de hemácias. Onde a diluição foi alta e não houve mais antígeno suficiente, as hemácias sedimentaram formando um pequeno botão. Essa avaliação foi realizada em dois ensaios (1º e 2º ensaio) com dois diferentes títulos virais, 512 e 1024 respectivamente.

2.5. Microscopia Eletrônica

Para avaliação do efeito virucida da própolis sobre o NDV foi retirada uma amostra do tratamento 1 (solução de própolis e vírus na concentração de 4000µg/dose) e do controle com 8 horas de incubação, previamente utilizada para o teste HA. A amostra foi centrifugada a 26000 rpm durante 5 horas. O pellet formado foi ressuspendido em 1mL de PBS com pH 7.4. O mesmo procedimento foi realizado com o tratamento controle. As amostras então foram coradas negativamente com ácido fosfotúngstico e observadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109) a 80 kilovolts.

2.6. Atividade virucida do EEPV “in vivo”.

Foram utilizados 250 ovos embrionados de galinha, com nove dias de incubação, de matrizes pesadas com 32 semanas de idade, como modelo biológico “in vivo” para avaliação da atividade virucida do EEPV. Os ovos embrionados de galinha foram fornecidos pelo Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça (CAVG), do Instituto Federal Sul-rio-grandense - IFSul, foram mantidos em incubadora a 37º C, com umidade controlada de 60%. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEa/UFPel). Os tratamentos utilizados neste estudo foram os mesmos do ensaio “in vitro” totalizando 25 ovos por tratamento em cada temperatura de associação própolis e vírus. Os ovos foram inoculados via cavidade corioalantóide com 100µL do vírus combinado às diferentes concentrações de própolis e imediatamente incubados por cinco dias a 37°C com umidade controlada de 60%. Foi feita a ovoscopia diária, para verificar mortalidade embrionária, e no final de cinco dias estes ovos foram abertos em

fluxo laminar e coletado o líquido alantóide de forma asséptica e posteriormente centrifugadas a 2500 rpm e armazenadas em ultrafreezer a -70°C até o dia da realização da titulação viral por HA. Este procedimento foi realizado da mesma forma do ensaio in vitro.

2.7. Análise Estatística

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 do EEPV.

Após a abertura dos ovos, verificou-se que na concentração máxima (40000 $\mu\text{g}/\text{dose}$) ocorreu morte do embrião, o que fez com que esta concentração não fosse utilizada. Nas demais concentrações (4000 $\mu\text{g}/\text{dose}$, 400 $\mu\text{g}/\text{dose}$, 40 $\mu\text{g}/\text{dose}$ e 4 $\mu\text{g}/\text{dose}$) não foram observadas alterações macroscópicas no embrião e nenhuma alteração no líquido alantóide decorrentes da inoculação dos níveis de própolis testados. Os demais ovos, ao final do período de incubação, eclodiram pintinhos viáveis. Por esta razão, decidiu-se utilizar essas concentrações para avaliar a capacidade virucida do EEPV.

3.2. Atividade virucida do EEPV “in vitro” no 1º ensaio.

Quando avaliado os tratamentos a 22°C no período de incubação zero hora, não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P > 0.05$) (Figura 1). No período de 1 hora, os tratamentos T1, T2, T3 e T4 não diferiram estatisticamente entre si, mas todos foram superiores ao controle ($P < 0.0001$) (Figura 1). Com 2 horas de incubação do NDV com os tratamentos, o tratamento que mostrou melhor desempenho foi o T2 diferindo dos demais, sendo que os tratamentos T1, T3 e T4 não diferiram entre si, mas foram superiores ao controle (Figura 1). Ao observar o período 4 horas de incubação,

verificou-se que o T1 foi superior estatisticamente aos demais tratamentos ($P < 0.0001$), sendo seguido por T2, T3 e T4, sendo eles superiores estatisticamente ao controle (Figura 1). Já no período de 8 horas, houve uma melhor resposta do T1 e T2 ($P < 0.0001$) sobre os demais tratamentos, sendo que os tratamentos T3 e T4 foram superiores ao controle, não diferindo entre si (Figura 1).

Quando avaliado os tratamentos a 37°C no período zero hora, não se observou diferença entre os tratamentos ($P > 0.05$) (Figura 2). No período de 1 hora de incubação, houve diferença estatística entre os tratamentos ($P < 0.0001$), onde o melhor resultado foi obtido no T1 seguido pelo T2. Ainda neste período de incubação o T4 não diferiu do controle (Figura 2). O mesmo ocorreu no período de duas horas, sendo que o T1 obteve a melhor resposta ($P < 0.0001$) (Figura 2). Já nos períodos 4 e 8 houve diferença estatística do T1 e T2 em relação aos demais tratamentos ($P < 0.0001$), porém não houve diferença estatística significativa entre os mesmos (Figura 2).

3.3. Atividade virucida do EEPV “in vitro” no 2º ensaio.

Ao avaliar os tratamentos a 22°C a zero hora de incubação, verificou-se que o T1, T2 e T3 foram estatisticamente superiores ao T4 ($P < 0.0001$), que não diferiu do controle (Figura 3). No período de 1 e 2 horas de incubação, o T1 foi estatisticamente superior aos demais tratamentos ($P < 0.0001$), sendo que o T2 e T3 não diferiram entre si, porém foram superiores ao T4 e ao controle (Figura 3). Já nos períodos 4 e 8 horas, o T1 foi superior aos demais tratamentos ($P < 0.0001$) (Figura 3).

A 37°C, os tratamentos quando avaliados no período de zero e 1 hora, observou-se que o T1 foi o superior aos demais tratamentos ($P < 0.0001$), seguido por T2, sendo que T3, T4 e controle não diferiram estatisticamente ($P > 0.05$) (Figura 4). No período de 2 horas de incubação, o T1 continuou sendo o melhor tratamento, seguido pelo T2 e T3, porém T4 não diferiu do controle ($P > 0.05$) (Figura 4). Já quando avaliado 4 e 8 horas de incubação, os tratamentos T1 e T2 foram superiores aos demais tratamentos ($P < 0.0001$), porém não diferiram entre si. Nestes mesmos períodos o T3 foi superior e diferiu do T4 e do controle ($P < 0.0001$), sendo que estes dois últimos não apresentaram diferença estatística (Figura 4).

3.4. Microscopia Eletrônica.

Na microscopia eletrônica foi observada na amostra controle partículas virais esféricas medindo entre 125 a 250 nanômetros de diâmetro, apresentado um nucleocapsídeo envolto por um delicado envelope com cerca de 10 nanômetros, dotado de projeções de hemaglutinina típicas dos paramixovirus (Figura 5). Já na amostra contendo EEPV e NDV (Figura 6a e b) foi evidenciada uma desorganização do envelope viral, podendo ser ainda observadas as projeções de hemaglutinina no formato de “corda desenrolada”. O ácido nucléico tornou-se uma massa disforme, com posterior retração, deixando lacunas. Na figura 6b, o processo parece estar em fase mais adiantada.

3.5. Atividade virucida EEPV “in vivo”

Quando avaliados os tratamentos a 22°C no período de incubação zero hora, não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P>0.05$) (Figura 6). Nos períodos de 1, 2, 4 e 8 horas, os tratamentos T1, T2, T3 e T4 foram superiores ao controle ($P<0.0001$), mesmo não sendo diferentes entre si (Figura 6).

Quando avaliados os tratamentos a 37°C no período de incubação zero hora, não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P>0.05$) (Figura 7). No período de 1 hora, os tratamentos T1, T2, T3 e T4 foram superiores ao controle ($P<0.0001$), mesmo não sendo diferentes entre si (Figura 7). Em 2 e 4 horas de incubação, o T1 foi superior aos demais tratamentos ($P<0.0001$), sendo que T2, T3 e T4 foram superiores ao controle ($P<0.0001$) (Figura 7). Já em 8 horas, T1 e T2 foram superiores aos demais tratamentos ($P<0.0001$), mas não diferiram entre si. Os tratamentos T3 e T4 foram superiores ao controle ($P<0.0001$) (Figura 7).

4. Discussão

As enfermidades virais, as quais estão entre as principais ameaças à saúde humana e dos animais, podem ser minimizadas ou evitadas com utilização de medidas de biossegurança, bem como com emprego de substâncias virucidas. Contudo, o uso indiscriminado destas substâncias pode acarretar em problemas de toxicidade e resistência às drogas, fazendo com

que se aumentem as doses para supressão da replicação viral [26, 27]. Portanto, o sucesso da prevenção e tratamento de muitas enfermidades virais está relacionado ao desenvolvimento de novas drogas virucidas, ou mesmo no aperfeiçoamento das já existentes [28]. Neste estudo, a atividade virucida do EEPV “in vitro”, conforme esperado, não foi observada quando as diferentes concentrações de própolis avaliadas (4000 µg/dose, 400 µg/dose, 40 µg/dose, 4 µg/dose ou 0 µg/dose) foram associadas ao vírus e imediatamente testados por HA, havendo apenas a redução dos títulos virais a partir de 1 hora de incubação do NDV e EEPV em ambas temperaturas testadas (22 e 37°C). A ausência do efeito virucida na hora zero de incubação foi verificada apenas no primeiro ensaio in vitro. Também foi verificada uma relação virucida, concentração dependente, onde se observou que à medida que se aumentaram as concentrações do extrato de própolis, ocorreu um declínio dos títulos virais. Resultados semelhantes já foram descritos, utilizando extratos etanólico e aquoso de própolis e evidenciando que a atividade da própolis é tempo e concentração dependente [25, 29, 30]. Porém com relação ao tempo de incubação discordando destes autores vale ressaltar que no segundo ensaio in vitro alguns tratamentos já mostraram efeito virucida imediatamente após a combinação.

Quando avaliado o efeito de tratamento sobre a temperatura e período de incubação do NDV e o EEPV, os tratamentos que proporcionaram a maior atividade virucida nos ensaios in vitro, contra o NDV foram o T1 (4000µg/dose) e T2 (400µg/dose), quando incubados a partir de 2 horas e 4 horas de incubação respectivamente, sob a temperatura de 37°C, quando inativaram o vírus por completo (Figuras 2 e 4). Essa temperatura é ideal para a adsorção do vírus com a membrana celular, pois inicia o processo de reorganização das glicoproteínas para a adsorção com a membrana celular [15, 31, 32], sugerindo que os vírus acabam se tornando mais suscetíveis a ação de agentes virucidas/desinfetantes. A 22°C, obteve-se um resultado semelhante apenas com o T1, onde se observou que houve a necessidade de um maior tempo de incubação do vírus com o EEPV, o que sugere que a uma temperatura mais baixa, há uma necessidade de maior tempo de exposição do vírus à própolis. Estes resultados também podem estar relacionados devido à própolis ser uma substância resinosa que altera seu estado físico em função da temperatura. Com menos de 15°C ela fica mais endurecida, à medida que se aumenta a

temperatura torna-se mais maleável, a mais de 30°C aumenta a sua elasticidade, vindo a se fundir com mais de 60°C [33]. Com isso na temperatura de 22°C, acaba dificultando a sua associação com as partículas virais, já que a temperatura é uma medida da agitação térmica dos átomos e moléculas. Alguns autores sugerem que a ação do EEP sobre os vírus causa uma desagregação e desorganização das glicoproteínas do envelope viral, bem como das proteínas que compõe o nucleocapsídeo, expondo o material genético [29], o que se confirmou neste trabalho com a ME, a qual evidencia a desorganização do envelope viral, onde as projeções de hemaglutinina ficaram no formato de “corda desenrolada”. O ácido nucléico tornou-se uma massa disforme, com posterior retração, deixando lacunas (Figura 5a e b). Resultados muito semelhantes foram obtidos no segundo ensaio “in vitro”.

A maior parte dos estudos que avaliam as propriedades bioativas da própolis e de outros produtos naturais é realizada utilizando modelos in vitro. No entanto, os resultados promissores “in vitro”, nem sempre resultam em um produto final devido à falta de recursos, farmacocinética desfavorável, toxicidade, ou ainda ineficácia da propriedade bioativa em questão, in vivo. A correlação entre as concentrações “in vitro” de compostos virucidas e a sua relativa eficácia in vivo é pequena [26]. Neste sentido, ovos embrionados de galinha constituem um modelo biológico valioso para estudos in vivo com vírus de diversas famílias, com a vantagem de possuir baixo custo e aceitação das comissões de ética em experimentação animal e grupos de defesa dos animais. Além disso, o que destaca a utilização deste modelo biológico é o fato de que muitos aspectos da relação vírus-hospedeiro já foram esclarecidos através de estudos de vírus infectando o líquido alantóide [34, 35, 36, 37].

Os resultados do ensaio “in vivo” foram muito semelhantes aos resultados “in vitro”, apenas não ocorreu a inativação total do vírus, pois o NDV foi inoculado em ovos embrionados de galinha, onde estes promovem um ambiente propício a propagação de partículas virais remanescentes. Mas houve uma redução estatisticamente significativa do título viral mais evidente a 37°C, na utilização do T1 (4000µg/dose) essa redução foi de 3.01 para 0.60 (log10), obtida a partir de duas horas de incubação do NDV com EEPV, manifestada pelo teste de hemaglutinação (Figura 5b).

É provável que a atividade virucida da própolis não seja causada por apenas um composto químico, mas por um sinergismo entre seus constituintes

[29]. A atividade observada no presente estudo provavelmente esteja relacionada aos altos níveis de compostos fenólicos e flavonóides encontrados na própolis verde utilizada (Tabela 1), os quais atuam sobre o envelope viral [40, 41]. Amoros et al.[39] identificaram efeito virucida de uma própolis européia em vírus envelopados como os herpesvirus simplex tipos 1 e 2, o que não se repetiu em vírus não envelopados como o adenovirus e poliovirus tipo 2 e o vírus da estomatite vesicular. Brum [40] obteve a atividade virucida contra o HSV1, quando utilizado extrato de “*Geranium sanguineum* L.”, uma planta riquíssima em flavonóides, ácidos fenólicos e taninos. Nolkemper et al. [29] 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 e por Vilela [38], a qual encontrou inibição total de poxvírus tratado com EEPV e posterior inoculação em membrana corioalantoide .Neste estudo, um extrato etanólico de própolis verde demonstrou efeito virucida contra o NDV. Este efeito foi dependente da concentração de própolis utilizada, bem como do tempo e da temperatura de incubação entre o vírus e o extrato etanólico. Os resultados encontrados no sugerem a utilização deste EEPV como uma alternativa no combate a infecções pelo NDV.

Agradecimentos

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 da própolis bruta; Laboratório de Produtos Naturais do Programa de Mestrado Profissional em Farmácia da Universidade Bandeirante de São Paulo – UNIBAN - pelo treinamento prestado; Laboratório Bio-Vet S/A – Vargem Grande Paulista, SP – Brasil, pelo fornecimento da vacina comercial contra o NDV e à BASF - The Chemical Company -São Paulo, SP, Brasil - pelo fornecimento do emulsificante utilizado; Laboratório Regional de Diagnóstico, pela realização da Microscopia Eletrônica do NDV.

Referências

- [1] Calixto JB. Biodiversidade como fonte de medicamentos. Cienc. Cult. 2003; 55: 37-39.
- [2] Hasenclever L. Diagnóstico do Setor Farmacêutico Brasileiro. Relatório Final de Pesquisa. Instituto de Economia/UNESCO/FUJB, 2002.
- [3] Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie, 2000; 31:3-15.
- [4] Park YK., Alencar SM., Scamparini ARP, Aguiar C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. Ciência Rural, 2002; 32: 997-1003.
- [5] Castaldo S, Capasso F. Própolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia, 2002; 1:1-6.
- [6] Mucsi I, Beladi I, Puszai R, Bakay M, Gabor M. Antiviral effect of flavonoids. Proc 5th Hungarian Bioflavonoid Symp, 1977; 401-9.
- [7] Kaul T.N., Middleton E., Ogra P.L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. Journal Medical Virology, 1985; 15: 71-9.
- [8] Marcucci, MC. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes da própolis. Química Nova, 1996: 19: 529-36.
- [9] Park YK, Paredes-Guzman JF, Aguiar CL, Alencar SM, Fujiwara FY. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004; 52: 1100-3.

- [10] Huleihel M, Isanu V. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. *The Israel Medical Association Journal*, 2002; 4: 923-27.
- [11] Matsuo M, Sasaki N, Saga K, Kaneko T. Citotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 2005; 28: 253-9.
- [12] Arns C, Spilki FR & Almeida RS. PARAMYXOVIRIDAE, in: FLORES EF, *Virologia Veterinária*, Santa Maria ed. UFSM, 2007; 659-86.
- [13] Mayo MA. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. *Archives of Virology*, 2002; 147:1655-6.
- [14] Morrison TG. Structure and function of a paramyxovirus. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003; 1614: 73-84.
- [15] Casas JG. Búsqueda y caracterización biofísica de las regiones membranotrópicas de la glicoproteína S del SARS-CoV. Espanha, 2008. 273f. Tese doutorado (Instituto de Biología Molecular y Celular) Universidad Miguel Hernández de Elche.
- [16] Iorio RM, Field GM, Sauvron JM, Mirza AM, Deng R, Mahon PJ. Structural and functional relationship between the receptor recognition and neuraminidase activities of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein: receptor recognition is dependent on neuraminidase activity. *J Virol*; 2001; 75: 1918-27.
- [17] Alexander DJ, Manvell RJ, Lowings JP, Frost KM, Collins MS, Russell PH, Smith JE. Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isotates using monoclonal antibodies. *Avian Pathology*, Oxfordshire, 1997; 26: 399-418.

- [18] Nunes JES, Vasconcelos AC, Jorge MA, Guimarães EB, Paixão TA, Martins NRS, Resende JS. Estudo comparativo da virulência de amostras de vacina do vírus da doença de Newcastle em galinhas SPF por meio da análise morfométrica da espessura traqueal, *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2002; 5: 335-339.
- [19] Alexander DJ. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: Calnek, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; REID, W.M. and YODER, H.W. Eds, *Diseases of Poultry* 9th Edit., Iowa State University Press, Ames, 1991; 496-519.
- [20] OIE (Office International de Epizooties). Disease information, 2006;19.
- [21] Paulillo, AC & Doretto Junior L. Doença de Newcastle. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. & MACARI, M. (Eds.). *Doenças das aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2000; 267-281.
- [22] Alexander DJ. Newcastle Disease. *British Poultry Science*, 2001; 42:5-22.
- [23] Alexander DJ, Bell JG, Alders RG. Thecnology Review: Newcastle Disease. Roma, FAO, 2004; 1-61.
- [24] Orsi MA, Doretto Jr L, Camillo SCA, Reischak D, Ribeiro SAM, Ramazzoti A, Mendonça AO, Spilki FR, Buzinaro MG, Ferreira HL, Arns CW. Prevalence of Newcastle Disease Virus in Broiler Chickens (*Gallus gallus*) in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2010; 41: 349-57.
- [25] Fischer G, Dummer LA, Vidor T, Paulino N, Paulino AS. Avaliação da ação antiviral de uma solução de própolis sobre o Herpesvírus Bovino e o Vírus da Diarréia Viral dos Bovinos. In: VII Encontro de Pós-Graduação, 2005, Pelotas, RS.

- [26] Handel A, Longini IM, Antia R,. Antiviral resistance and the control of pandemic influenza: The roles of stochasticity, evolution and model details. J Theor Biol, 2009; 256:117-25
- [27] Van Rompay KKA. Evaluation of antiretrovirals in animal models of HIV infection. Antiviral Research, 2010; 85:159-75.
- [28] Freestone DS. The need for new antiviral agents. Antiviral Research, 1985; 5: 307-24.
- [29] Nolkemper S, Reichling J, Sensch KH, Schnitzler P. Mechanism of herpes simplex virus type2 suppression by propolis extracts. Phytomedicine, 2010; 17: 132-8.
- [30] Schnitzler P, Neuner A, Nolkemper S, Zundel C, Nowack H, Sensch KH and Reichling J. Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds, Phytotherapy Research, 2010; 24: 20-8.
- [31] Cobaleda C, Garcia-Sastre A and Villar E. Fusion between Newcastle disease virus and erythrocyte ghosts using octadecyl Rhodamine B fluorescence assay produces dequenching curves that fit the sum of two exponentials, Biochemical Journal, 1994; 300: 347-54.
- [32] Pedroso De Lima MC, Ramalho-Santos J, Martins MF. Kinetic modeling of Sendai virus fusion with PC-12 cells. Effect of pH and temperature on fusion and viral inactivation, European Journal of Biochemistry, 1992; 205: 181-6.
- [33] Santos CJ. Atividade antifúngica *in vitro* de própolis em *Fonsecaea Pedrosoi* utilizando ferramentas quimioterápicas associadas à espectroscopia no infravermelho, Brasil. 2009. 162f. Dissertação (Mestrado

em Ciências Médicas)-Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- [34] Rangan SRS, Sirsat SM. The fine structure of the normal chorio-allantoic membrane of the chick-embryo. *Quarterly journal of microscopical science*, 1962; 103: 17-23.
- [35] Bersano JG, Catroxo MHB, Villalobos EMC, Leme MCM, Martins AMCRPF., Peixoto, Z.M.P., Portugal, M.A.S.C., Monteiro, R.M., Ogata, R.A., Curi, N.A.. Varíola suína: estudo sobre a ocorrência de surtos nos Estados de São Paulo e Tocantins, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 2003; 70: 269-278.
- [36] Beltrão N, Furian TQ, Leão JA, Pereira RA, Moraes LB, Canal CW. Detecção do vírus da laringotraqueíte das galinhas no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2004; 24: 85-8.
- [37] Lierz M, Bergmann V, Isa G, Czerny CP, Lueschow D, Mwanzia J, Prusas C, Hafez HH. Avipoxvirus Infection in a Collection of Captive Stone Curlews (*Burhinus oedicnemus*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 2007; 21:50-5.
- [38] Vilela, CO. Atividade antimicrobiana de extrato etanólico de própolis verde, Brasil. 2010. 102f. Dissertação (Mestrado em Veterinária), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.
- [39] Amoros M, Sauvager F, Girre L, Cormier M. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie*, 1992; 23: 231–40.
- [40] Brum L.P. Atividade antiviral de compostos fenólicos (ácidos ferúlico e transcinâmico e dos flavonóides (quercetina e Kaenpherol) sobre os Herpesvirus Bovino tipo 1, Herpesvirus bovino tipo 5 e vírus da cinomose

canina, Brasil. 2006. 86f. Tese (Doutorado em Bioquímica agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.

- [41] Formica JV & Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. Food Chemical Toxicology, 1995; 33: 1061-80.

Legenda das tabelas e figuras

Tab.1. Relação dos componentes bioativos e suas concentrações, obtido por CLAE no extrato etanólico de própolis verde utilizado.

Fig.1 Cinética do título viral NDV quando incubado com cinco concentrações de EEPV (4000µg/dose, 400µg/dose, 40µg/dose, 4µg/dose, 0µg/dose) em cinco dos períodos (0, 1, 2, 4 e 8 horas) a 22°C “in vitro” – 1ºensaio.

Fig.2 Cinética do título viral NDV quando incubado com cinco concentrações de EEPV (4000µg/dose, 400µg/dose, 40µg/dose, 4µg/dose, 0µg/dose) em cinco dos períodos (0, 1, 2, 4 e 8 horas) a 37°C “in vitro” – 1ºensaio.

Fig.3 Cinética do título viral NDV quando incubado com cinco concentrações de EEPV (4000µg/dose, 400µg/dose, 40µg/dose, 4µg/dose, 0µg/dose) em cinco dos períodos (0, 1, 2, 4 e 8 horas) a 22°C “in vitro” – 2ºensaio.

Fig.4 Cinética do título viral NDV quando incubado com cinco concentrações de EEPV (4000µg/dose, 400µg/dose, 40µg/dose, 4µg/dose, 0µg/dose) em cinco dos períodos (0, 1, 2, 4 e 8 horas) a 37°C “in vitro” – 2ºensaio.

Fig.5. Partículas virais esféricas medindo entre 125 a 250 nanômetros de diâmetro, apresentando um nucleocapsídeo envolto por um delicado envelope com cerca de 10 nanômetros (◀). Controle negativo. Coloração negativa.

Fig.6. Partículas virais após incubação com o T1. (a) Desorganização do envelope viral (◀), projeções de hemaglutinina no formato de “corda desenrolada”. Ácido nucleico em forma de uma massa disforme, com posterior retração. (b) Processo parece estar em fase mais adiantada. Coloração negativa.

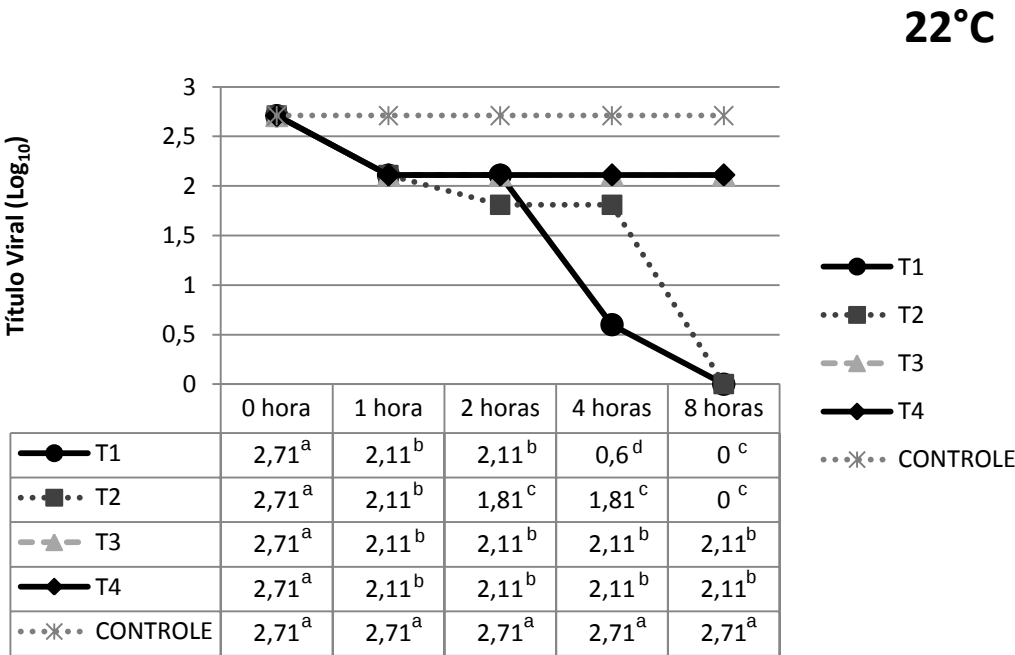
Fig.7 Cinética do título viral NDV quando incubado com cinco concentrações de EEPV (4000µg/dose, 400µg/dose, 40µg/dose, 4µg/dose, 0µg/dose) em cinco dos períodos (0, 1, 2, 4 e 8 horas) a 22°C “in vivo”.

Fig.8 Cinética do título viral NDV quando incubado com cinco concentrações de EEPV (4000µg/dose, 400µg/dose, 40µg/dose, 4µg/dose, 0µg/dose) em cinco dos períodos (0, 1, 2, 4 e 8 horas) a 37°C “in vivo”.

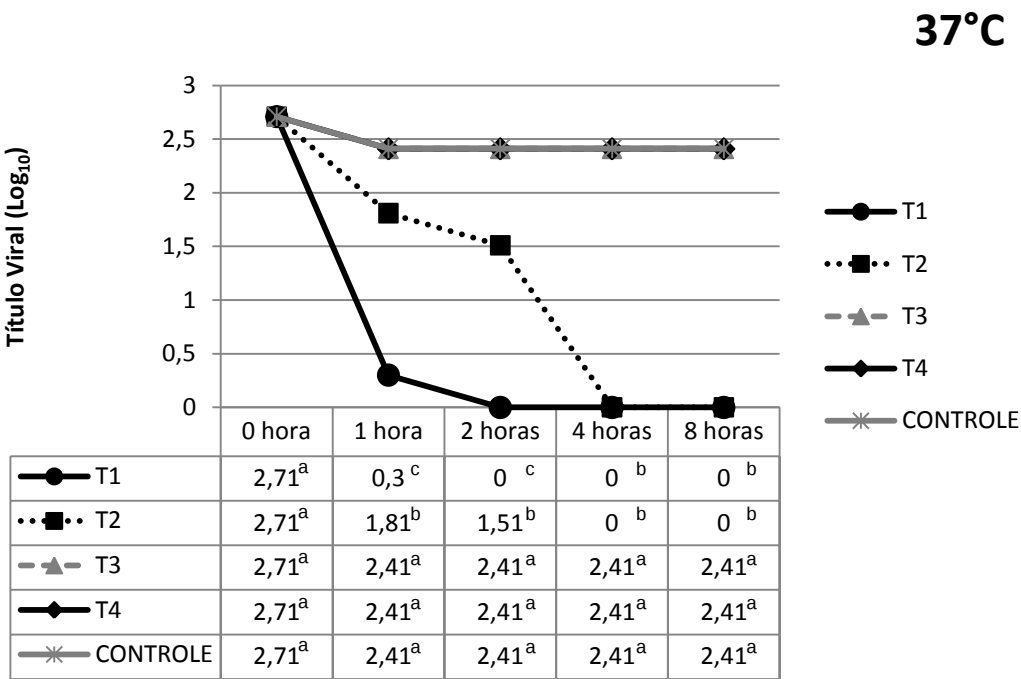
NUNES, et al., Tabela 1

Nome	Tempo de Retenção	Concentração. do extrato mole - EEPV(mg/g)
Ácido cafeico	2,88	0,87
Ácido p-cumárico	4,49	20,98
Ácido cafeico (derivado 1)	7,11	6,46
Ácido cafeico (derivado 2)	9,5	7,32
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 1)	12,73	7,61
Ácido cafeico (derivado 3)	14,12	3,27
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 2)	17,69	1,05
Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico	19,13	9,92
2,2-Dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano	20,91	0,91
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 3)	22,2	1,54
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 4)	25,14	5,88
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 5)	25,97	0,82
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C)	27,86	27,46
Ácido cinâmico (derivado 1)	30,94	11,91
Ácido 6-propenóico-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano	31,52	2,47

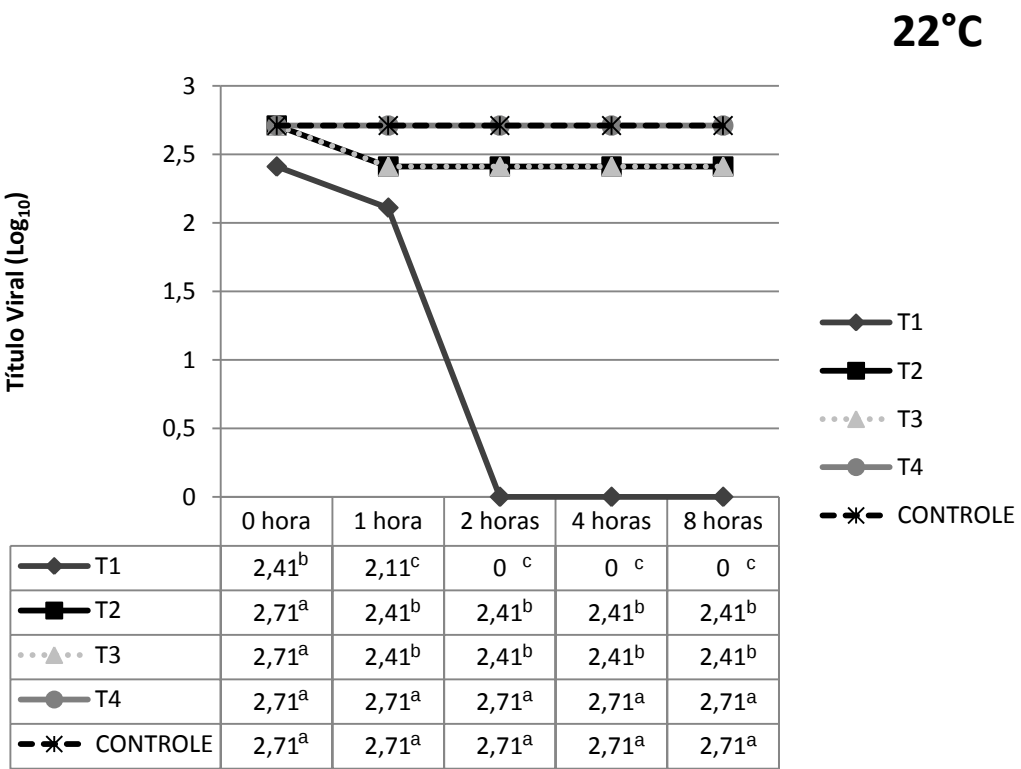
NUNES, et al., Figura 1



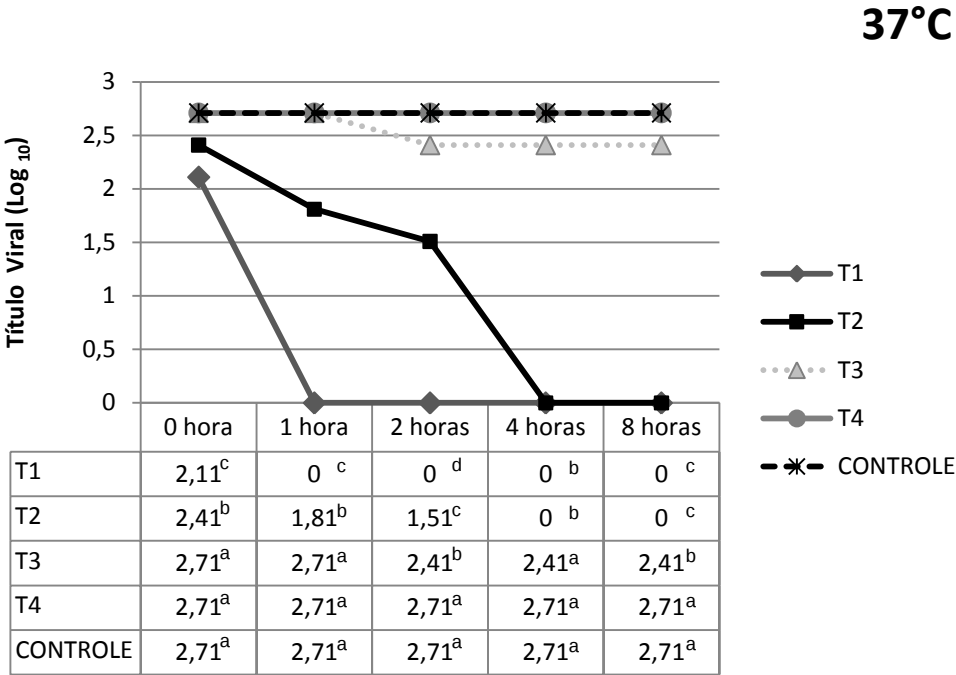
NUNES, et al., Figura 2



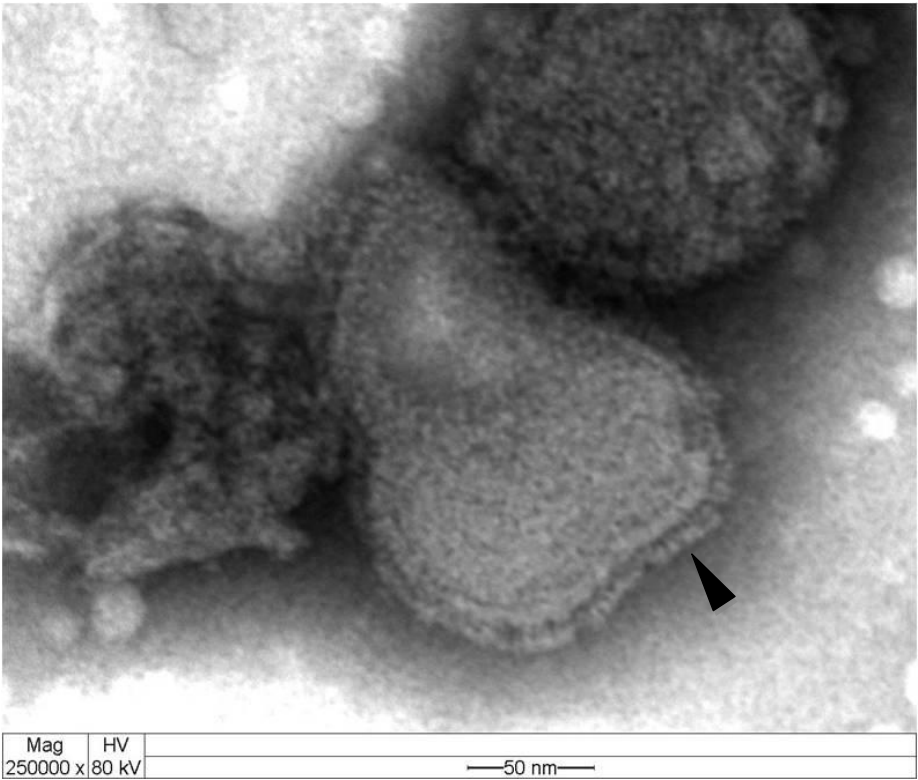
NUNES, et al., Figura 3



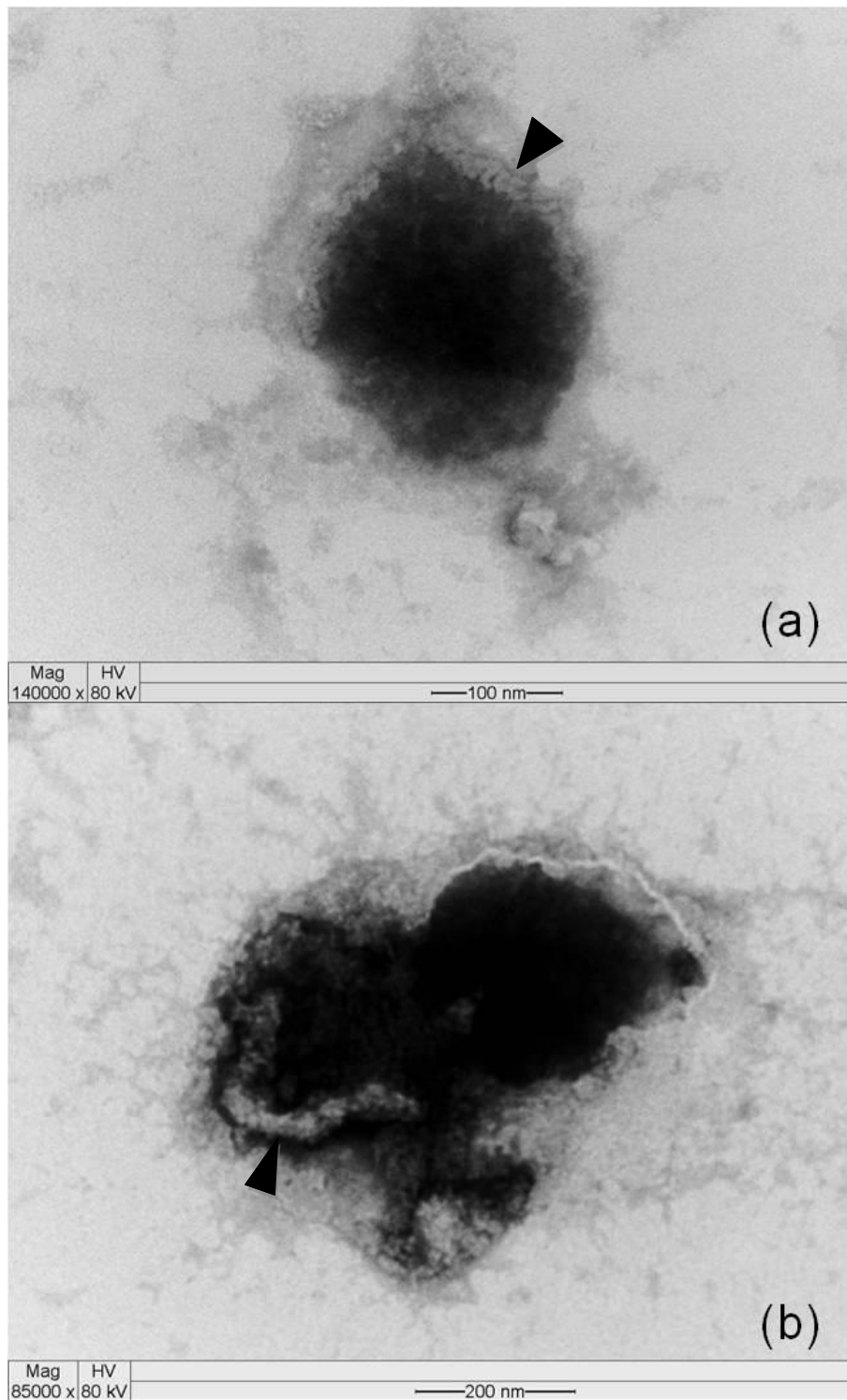
NUNES, et al., Figura 4



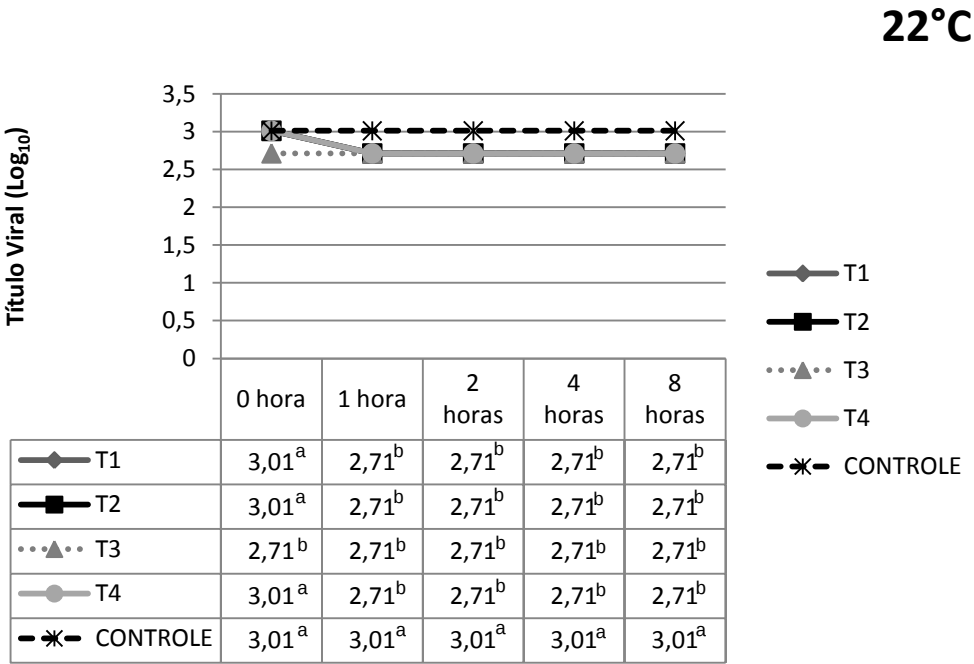
NUNES, et al., Figura 5



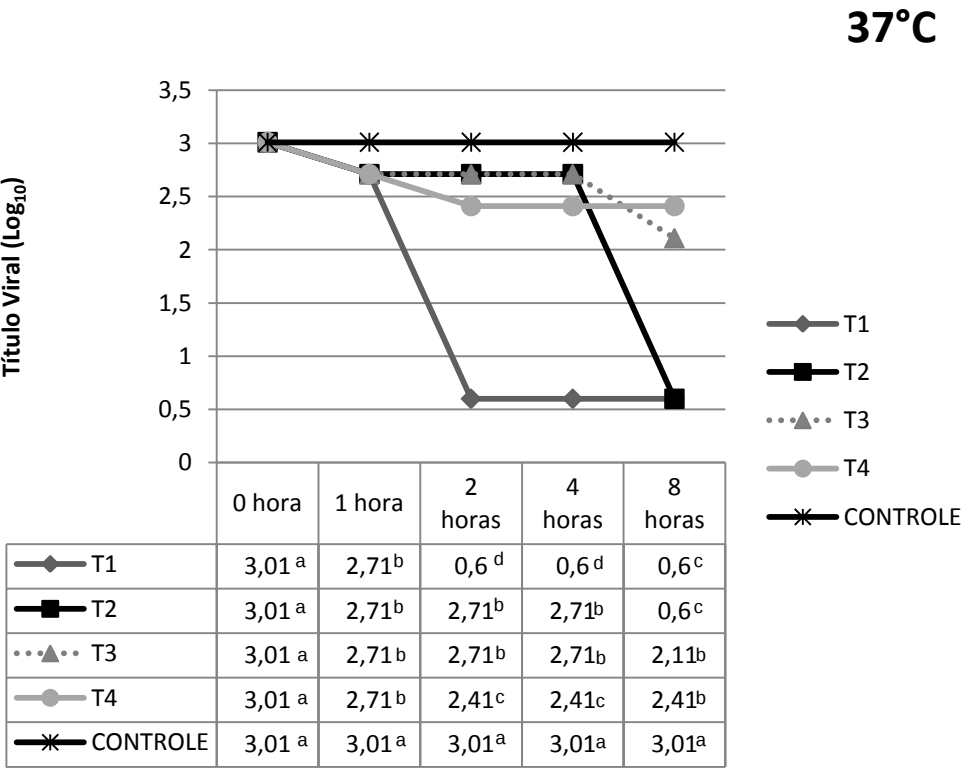
NUNES, et al., Figura 6



NUNES, et al. Figura 7



NUNES, et al., Figura 8



4. CONCLUSÃO

- O extrato etanólico de própolis verde utilizado está em conformidade com os padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- O extrato etanólico de própolis verde nas concentrações utilizadas (4000µg/dose, 400µg/dose, 40µg/dose e 4µg/dose), não é prejudicial para o desenvolvimento de embriões de galinha.
- O extrato etanólico de própolis verde demonstrou efeito virucida contra o *Paramixovirus aviário tipo 1*, tanto *in vitro*, quando *in vivo*;
- O efeito virucida do EEPV foi dependente da concentração do extrato etanólico de própolis verde utilizado, bem como do tempo de incubação entre o vírus e o extrato etanólico;
- O extrato etanólico de própolis verde rico em compostos fenólicos, nas concentrações de 4000µg/dose, 400µg/dose, destruiu o envelope viral do NDV, a qual foi demonstrada por microscopia eletrônica.
- O extrato etanólico de própolis verde pode ser utilizado como uma alternativa de agente virucida natural contra o NDV.

5. REFERÊNCIAS

AHN M, KUMAZAWA S, USUI Y, NAKAMURA J, MATSUKA M, ZHU F, NAKAYAMA T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various áreas of China. **Food and Chemical** v. 101, p. 1400-1409, 2007.

ALEXANDER DJ. Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae infections. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Mc Douglas LR, Saif YM, editors. **Diseases of poultry**. 10th ed. Ames, IO: Iowa State University Press; p. 541–569, 1997.

ALLAN, W. H., J. E. LANCASTER, AND B. TOTH. The production and use of the use of Newcastle disease vaccines. **FAO misc. publ.**, Rome. p. 58-61. 1973.

ALMEIDA, Gustavo Henrique Joazeiro de; MALERBO-SOUZA, Darclet Teresinha Efeito da solução hidroalcoólica de própolis e ivermectina sobre o OOPG de Elimeria SPP em Coelhos Nova Zelândia Branco, **Revista Primeiros Passos** ano 7, n. 14 p. 101-109, 2008.

BARBOSA, M.H.; ZUFFI, F.B.; MARUXO, H.B.; JORGE, L.L.R. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas, **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22 n.3, p.318-322, 2009.

BIAVATTI, M. W.; BELLAYER, M.H.; VOLPATO, L.; COSTA, C.; BELLAYER, C. Preliminary studies of alternative feed additives for broilers: Alternanthera brasiliensis extract, propolis extract and linseed oil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 5, p. 147-151, 2003.

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.

BRUM, L., Atividade antiviral de compostos fenólicos (Acido ferúlico e transcinâmico) e dos flavonóides (Quercetina e Kaempferol) sobre os

Herpesvírus bovino 1, Herpesvírus bovino 5 e vírus da cinomose canina. Brasil. 2006. 86f. **Tese** (Doutorado em Bioquímica agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, n. 36, p. 347-363, 1998

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

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

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**, v.142 n.3, p.432-434. 2009.

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

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 origin. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** 5, 435-441, 2008.

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.

FISCHER G, DUMMER LA, VIDOR T, PAULINO N, PAULINO AS. Avaliação da ação antiviral de uma solução de própolis sobre o Herpesvírus Bovino e o Vírus da Diarréia Viral dos Bovinos. In: **VII Encontro de Pós-Graduação**, 2005, Pelotas, RS, 2005

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. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v.26;25, 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.

GONG, Y.; RAJ, K.M.; LUSCOMBE, C.A.; GADAWSHY, I.; TAM, T.; CHU, J. GIBSON, D; CARLSON, R.; SACKS, S.L. The synergistic effects of betulin witch acyclovir against herpes simplex virus. **Antiviral Research**. v. 64, p. 127-130, 2004.

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

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.

HOLLANDS, I. et al. Efficacy of propolis against infection by intestinal Eimeria in rabbits. **Revista Cubana de Ciencias Veterinarias**, Habana, v. 15, p. 157-163, 1984.

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

KOC, A. N., SILICI, S., AYANGIL, D., FERAHBAŞ, A., CANKAYA, S. Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by using microdilution assay, **Mycoses**, v. 48, n.3, p. 205-210, 2005.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ. M.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis product. **Acta Pharmaceutica**, v.55, p. 423-430, 2005.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA. V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S.J. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Ethnopharmacol.**, v. 64, 235–240, 1999.
KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins, **Food Chemistry**, v. 84, p. 329–339, 2004.

LINDENFELSER, L. A. Antimicrobial activity of propolis. **American Bee Journal**, v.107, n.3, p.90-92, 1967.

LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C., RANDAU, K.P; ROLIM NETO P.J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p. 447-454, 2008.

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.

MARCUCCI, M.C., Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis, **Química Nova**, v.19, n.5, p. 529-536, 1996.

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.

OIE (Office International de Epizooties). **Disease information**, v. 19, n. 17, 2006.

Orsatti C L; Missima F; Pagliarone A C; Bachiega T F; Búfalo M C; Araújo J P; Sforcin J M. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice.

ORSOLIC, N., BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **Journal. Ethnopharmacology**, v.84, p.265-273, 2003.

OTA, C.; UNTERKIRCHER, C.; FANTINATO, V. & SHIMIZU, M.T. - Antifungal activity of propolis 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.; 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.

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.

Phytotherapy research, v.24, n.8, p.1141-1146, 2010.

QUINTERO-MORA, M.L.; LONDOÑO-OROZCO, A.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F.; MANZANO-GAYOSSO, P.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, R.; SOTO-ZÁRATE, C.I.; CARRILLO-MIRANDA, L.; PENIERES-CARRILLO, G.; GARCIA-TOVAR, C.G.; CRUZ-SANCHEZ, T.A. Effect of Mexican propolis extracts from *Apis mellifera* on *Candida albicans* in vitro growth. **Revista Iberoamericana de Micología**. v.25, p.22-26, 2008.

SHELLER S, KROL W, SWIACIK J, OWCZAREK S, GABRYS J, SHANI J., Antitumoral property of ethanolic extract of propolis in mice-bearing Ehrlich carcinoma, as compared to bleomycin. **Zeitschrift für Naturforschung C**. v.44, p.1063-1065, 1989.

SCHNITZLER, P.; NEUNER, A.; NOLKEMPER, S.; ZUNDEL, C.; NOWACK, H.; SENSCH, K.H. AND REICHLING, J. Antiviral Activity and Mode of Action of Propolis Extracts and Selected Compounds. **Phytotherapy Research**, 24: p.20–28, 2009.

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

SPRADBROW, P. B. Newcastle disease in village chickens. **Poultry Science Review**, 5, 57–97, 1994.

VEIGA JUNIOR, V.F E PINTO, A.C. PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? **Química Nova**, v. 28, n.3, p. 519-528, 2005

VIEGAS JR., C. e BOLZANI, V.S. OS PRODUTOS NATURAIS E A QUÍMICA MEDICINAL MODERNA, **Química. Nova**, v.29, n. 2, p. 326-337, 2006

6. ANEXOS

ISSN 0100-4042 *printed version*
ISSN 1678-7064 *online version*

- [Guidelines for publication](#)
- [Preparation of manuscripts](#)
- [Submission of articles](#)
- [Revised manuscripts](#)
- [Copyright 2009 Brazilian Chemical Society](#)

Guidelines for publication

GENERAL - Articles suitable for publication in the journal Química Nova are those that cover the traditional fields of chemistry, as well as articles on chemical education, the history of chemistry, science policy, etc., besides articles on related fields, as long as they have a substantial chemical content. Articles should conform to one of the categories below:

Original Articles (in Portuguese, English or Spanish): for communicating original research. Articles should follow the usual form of presentation, including *introduction, results, experimental section*, etc., as appropriate for the work being submitted. They should have a maximum of 25 pages, including figures, tables, diagrams, etc. All pages should be numbered.

Review Articles (in Portuguese, English or Spanish): for communicating progress in a specific field of chemistry, with the objective of providing a critical account of the state of the art from the point of view of the highly qualified and experienced specialist. They should have a maximum of 40 pages, including figures, tables, diagrams, etc. All pages should be numbered.

It is essential for authors to have publications in the field reviewed attesting their experience and qualification. Before submitting the manuscript, authors should send an e-mail to the editors with an abstract of the review and a letter explaining the relevance of the publication. The material will be examined by the editors and, once approved, authors will be requested to submit the full manuscript, according to QN guidelines. This manuscript will then be submitted to referees.

The editorial board of QN may occasionally invite qualified researchers to submit a review article.

Articles on Education (in Portuguese, English or Spanish): for communicating research on the teaching of chemistry and for disseminating innovative experiments in undergraduate and post-graduate teaching. They should have a maximum of 25 pages, including figures, tables, diagrams, etc. All pages should be numbered.

Technical Notes (in Portuguese, English or Spanish): for communicating methods, validation of methods, techniques, equipment and accessories developed in the

author's laboratory. They should have a maximum of 25 pages, including figures, tables, diagrams, etc. All pages should be numbered.

General Subjects (in Portuguese, English or Spanish): subjects of general interest for chemists, such as science policy, undergraduate and post-graduate programs, history of chemistry, etc. They should have a maximum of 40 pages, including figures, tables, diagrams, etc. All pages should be numbered.

Preparation of manuscripts

All manuscripts should be typed double spaced using only Microsoft Word. A single file of the whole manuscript should then be generated in *.pdf*-format to be submitted through *QV*'s on-line system. The Journal no longer accepts submissions in any other form.

The first page should have the title of the article and the name and the address of the authors. If authors have different addresses, these should follow each author's name immediately. Authors should be grouped by address. The corresponding author should be the one submitting the article on line and should be identified by an asterisk (*) and an e-mail given on the page's footer (only one e-mail).

The second page should have the title and an abstract of the article, both in English, with a maximum of 100 words, and three keywords, also in English.

The number of figures (including graphs, diagrams, etc.) should not exceed 7 and should be of adequate graphic quality (only white background). For more figures, see the item Supplementary Materials. Figures, tables, diagrams, etc., should be placed after the references, duly identified by a number. Scanned figures should be at a resolution of 800 dpi/bitmap for line graphs. Diagrams containing chemical structures should be of high graphical quality and always be of the same size, so that they can be uniformly reduced. Figures should have a maximum width of one Journal column (8.5 cm).

Color figures will have their publication costs charged to the authors when the article is ready for publication. Only at that time can the printer inform the amount to be charged.

For figures, graphs, diagrams, tables, etc., identical to material already published in the literature, authors should seek permission for publication from the companies or scientific societies holding the copyrights and send it to the editors of *QV* together with the final form of the manuscript.

References should be numbered consecutively throughout the text, in the form of superscripts, following punctuation marks (if any). The list of references should be placed at the end of the text. Captions for figures, graphs and diagrams should be given on a separate page, not together with the figures. Table headings should be given with the tables. The final part of the manuscript should be the figures, graphs, diagrams, tables and charts. In the text, the insertion point of each of these should be indicated.

References

Journals

Journal abbreviations should be used, as defined by the Chemical Abstracts Service Source Index (see <http://www.cas.org/sent.html>). If the official short form can

not be determined and it is not obvious how to abbreviate the title, the full journal title should be given.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, 67, 518.

If the journal can not be easily accessed, its Chemical Abstracts number should be given, as follows:

2. Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, 19, 708.(CA 85:78051s).

If the article has a DOI number but its complete reference is not given, the DOI number should be cited as follows:

3. Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

It is recommended to give composite references instead of a list of separate references. The style of composite references is as follows:

4. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, 147, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, 7, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 473.

Patents

Patents should be identified as follows (if possible, the Chemical Abstracts number should be given in parentheses):

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 79 73,771 **1979**. (CA 91:P193174v)
6. Kadin, S.B.; *US pat.* 4,730,004 **1988**. (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. *Br PI* 9.604.468-3, **1999**.

Books

with editors

8. Regitz, M. In *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, chap. 2.

without editors

9. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Computer programs (software)

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; University of Göttingen, Germany, 1993.

Theses

11. Velandia, J. R.; *Doctoral Thesis*, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Brazil, 1997.

Presentations at meetings

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Abstracts, 20th Annual Meeting of the Brazilian Chemical Society*, Poços de Caldas, Brazil, 1998.

Internet pages

13. <http://www.s bq.org.br/jbcs>, accessed June 2001.

Unpublished material

For articles accepted for publication: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, in press. For articles submitted but not yet accepted: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submitted. For unpublished articles or personal communications: Magalhães, U. H.; unpublished or Magalhães, U. H.; personal communication. Unpublished results must only be cited with explicit permission from those who obtained them.

Whenever possible, authors should follow IUPAC recommendations and use the International System of Units.

Submission of articles

QN provides on-line submission which can be accessed through a login and a password. It is possible to register on our home page (<http://quimicanova.s bq.org.br>) using the option *New User*. Users of the JBCS platform are already recorded in the database (which is common to both journals) and should use the same login and password. After having registered, authors can easily follow on-screen instructions. The submission of a single file of the complete manuscript in .pdf format is requested. A tool is available for generating a .pdf file from .doc or .rtf files, with automatic transmission to the author's e-mail. As soon as submission is completed, the system will inform automatically by e-mail a temporary number for the manuscript. After the submission has been checked by the editors, another e-mail will be sent with the final manuscript reference code.

If the e-mail with the temporary reference number is not received, submission of the article has not been completed and authors have a maximum of 5 (five) days to complete it. Thereafter the system does not allow submitting the manuscript and the process has to be started over again.

Authors can follow the status of manuscripts directly through the system.

On submitting an article, an accompanying letter is requested, which should be typed in the appropriate space provided on the electronic form. In this letter, the e-mails of all authors must be given. Also, the names, affiliation and e-mails of three or four prospective referees, which should not belong to the same institution(s) as the authors, should be given.

Supplementary material This resource was created so that the printed version of

the manuscript would contain only the strictly necessary number of figures and tables (6 or 7 single figures). Since this material will be available only in the on-line version, figures, tables and diagrams in color, presented as supplementary material, will not be charged to authors and there is no page limit. However, the material should be of good graphical quality.

Supplementary material should be placed at the end of the manuscript and clearly indicated as such. A single .pdf-document, including the supplementary material, should be submitted.

Editors, at any time of the editing process, may ask authors to split off part of the manuscript, presenting it as supplementary material.

Revised manuscripts

Manuscripts returned to authors for revision should be sent back to the editors within three months. Thereafter they will be considered withdrawn and the system will close the process, not allowing it to be reopened. In this case, the article has to be resubmitted, starting a new process.

The revised manuscript should be submitted by the author who originally submitted the article, using the same login and password. On-screen instructions should be followed for sending the complete .pdf-document of the revised version, as well as for answering the referees' comments, detailing changes made in the new version and, in case some of the referees' suggestions were not accepted, justifying the reason for this. The two files should be sent using the link *Revised Version* on the *Author's Home* page of the on-line submission system of QN.

As soon as submission is completed, the system will inform automatically by e-mail a temporary number for the manuscript. After the submission has been checked by the editors, another e-mail will be sent with the final manuscript reference code.

If the e-mail with the temporary reference number is not received, submission of the article has not been completed and authors have a maximum of 5 (five) days to complete it. Thereafter the system does not allow submitting the manuscript and the process has to be started over again.

Authors can follow the status of manuscripts directly through the system.

FINAL VERSION At the time the final version is requested, authors will receive specific instructions regarding programs to be used for preparing text, figures, tables, etc. Files in .pdf-format will then no longer be asked for.

If figures are scanned, this should be done at high resolution (800 dpi/bitmap for lines) using extensions tif or jpg, at the dimensions specified by the editors. Photographs or drawings in color (300 dpi/grayscale) should have extensions tif or jpg and a maximum width of 8.5 cm, so that they can be applied to the standards of the Journal. Other possible extensions: cdr, eps, cdx or opj. Schemes of chemical structures should all be of the same size, so that they can be uniformly reduced.

The editors of QN reserve the right to make small changes to the manuscript, if

necessary, to adjust them to the norms of the Journal or improve the style, respecting naturally the content of the article. Whatever the nature of the manuscript, it should be original in terms of methodology, information, interpretation or critique. The quality of the article will be attested by two referees, indicated by the editors.

Copyright 2009 Brazilian Chemical Society

Manuscripts submitted for publication in this Journal should not have been published previously and should not be submitted or published simultaneously in any other journal. On submitting a manuscript, authors agree that the copyright of the article is transferred to the Brazilian Chemical Society (SBQ) when and if the article is accepted for publication. The copyright encompasses exclusive rights for reproducing and distributing articles, including reprints, photographic reproductions, microfilms or any other reproductions of similar nature, including translations. No part of the publication may be reproduced, stored in data banks or transmitted in any form or by any means, either electronic, electrostatic, mechanical, by photocopying, recording on magnetic media or any other form without written permission from the copyright holders. Although every effort is undertaken by SBQ, editors and editorial board to guarantee that no incorrect or misleading data, opinions or affirmations are published in this Journal, the content of articles and advertisements is the sole responsibility of the respective authors and advertisers. Consequently SBQ, editorial board, editors and respective employees, directors and agents exempt themselves completely from any responsibilities for the consequences of any such incorrect or misleading data, opinions or affirmations.

[\[Home\]](#) [\[About this journal\]](#) [\[Editorial board\]](#) [\[Subscription\]](#)



All the content of the journal, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons License](#)

Secretaria Executiva
Av. Prof. Lineu Prestes, 748 - Bloco 3 - Superior
05508-000 São Paulo SP - Brasil
C.P. 26.037 - 05599-970
Tel.: (55 11) 3032-2299
Fax: (55 11) 3814-3602

ANEXO B - Formatado de acordo com as normas da revista International Journal of Antimicrobial Agent.

ELSEVIER

Browse Journals > International Journal of Antimicrobial Agents > Guide For Authors

International Journal of Antimicrobial Agents

Official Journal of the International Society of Chemotherapy



ISSN: 0924-8579

Imprint: ELSEVIER

Guide for Authors



[Printer-friendly](#)

Official Journal of the International Society of Chemotherapy

These guidelines generally follow the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals". The complete document appears at ➡ <http://www.icmje.org>.

Submission

The Journal now accepts online submissions only. Manuscripts can be submitted at <http://ees.elsevier.com/ijaa/>. Once the manuscript has been uploaded, our system automatically generates an electronic pdf proof, which is then used for reviewing. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revisions, will be managed via this system. Authors may also track the progress of their paper using this system to final decision.

If you have any problems submitting your paper through this system, please contact the Editorial Office on: e-mail: ijaa@elsevier.com; tel: +44 (0)1865 843270; fax: +44 (0)1865 843992.

Journal Publishing Agreement

Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a "Journal Publishing Agreement" (for more information on this and copyright see ➡ <http://www.elsevier.com/authors>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form.

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, Philadelphia, PA, USA: phone (+1) 215 239 3804, fax (+1) 215 239 3805, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage (➡ <http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

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.

Authorship

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.

Article types

The following types of manuscripts are routinely accepted (please note that word count is from abstract to references but excluding references):

Original Articles: The form of these articles is discussed fully below; an abstract is required.

They should be no longer than 4000 words (as above, please note that word count also excludes tables, figures and legends). IJAA will be happy to consider papers of veterinary origin as long as there is some linkage of the scientific work back to human antibiotic use.

Letters: Headings should not be used in a letter; no abstract or keywords are required. The text should be no more than 800 words; there should be a maximum of 5 references and one table or figure may be included.

Reviews: An abstract and keywords are required. The text should be divided into sections by suitable headings. Tables and figures may be used as appropriate for the text. They should be no longer than 5000 words.

Opinions and Commentaries: These take the same form as a review.

Short Communications: These should be no more than 2,500 words, with up to 15 references and a maximum of 3 figures or tables.

Leaders: These tend to be invited papers but unsolicited Leaders are welcome. There are no abstract, keywords or section headings.

It is strongly advised that Authors provide a list of 4 or 5 potential reviewers (e-mail, phone and fax numbers) who are knowledgeable in the subject matter, have no conflict of interest, and are likely to agree to review the manuscript.

Submission Checklist

Please ensure that the following are including in your submission:

- " One author designated as corresponding author:
- " Their E-mail address
- " Full postal address
- " Telephone and fax numbers
- " Keywords
- "Cover letter addressed to the Editor, introducing the manuscript and confirming that it is not being submitted concurrently elsewhere"
- " All figure captions
- " All tables (including title, description, footnotes)
- " All necessary files have been uploaded as attachments to the e-mail
- " Manuscript has been spell checked
- " All text pages have been numbered
- " 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 or to be reproduced in black-and-white

Manuscripts

Please type all pages with double spacing and wide margins on one side of the paper. Words to be printed in italics are to be underlined. Title page, abstract, tables, legends to figures and reference list should each be provided on separate pages of the manuscript.

Use a true type font such as Times New Roman or Arial. The text should be in single-column format. Number the pages. In order to help our reviewers please number each line of the manuscript. 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 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 facility in Word or as

a separate file in Excel. 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. Do not prepare tables in Powerpoint. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also: <http://www.elsevier.com/authors>). 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 *illustrations*.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the spellchecker.

The title page should include: the title, the name(s) and affiliation(s) of the author(s), an address for correspondence, and telephone/fax numbers for editorial queries. All articles should include an Abstract (a single paragraph) of no more than 250 words and 3-6 key words for abstracting and indexing purposes.

Please **do not split** the article into separate files (title page as one file, text as another, etc.). Ensure that the letter 'l' and digit '1' (also letter 'O' and digit '0') have been used properly, and structure your article (tabs, indents, etc.) consistently. Characters not available on your computer (Greek letters, mathematical symbols, etc.) should not be left open but indicated by a unique code (e.g., α , @, #, etc., for the Greek letter). Such codes should be used consistently throughout the entire text. Please make a list of such codes and provide a key. Do not allow your computer to introduce word splits and do not use a 'justified' layout. Please adhere strictly to the general instructions on style/arrangement and, in particular, the reference style of the journal. It is very important that you save your file in the standard format for the program you are using. If your computer features the option to save files 'in flat ASCII', please do not use it.

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).

Provide the following data in your submission (in the order given). This is required for all types of paper submitted.

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.

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 250 words). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. Do not cite references in the abstract. Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided in the abstract, 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, using British spelling and 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.

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.

Include in figure legends and table texts technical details of methods used, while describing the methods themselves in the main text.

Results/Discussion. This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate in a Short Communication but not in an Original Article. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Acknowledgement. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. When the work included in a paper has been supported by a grant from any source, this must be indicated. A connection of any author with companies producing any substances or apparatus used in the work should be declared. Authors will be asked to respond to a form e-mailed to them when their paper is accepted (see the 'conflict of interest' section below). 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.

References. References should be numbered consecutively (with parentheses) as they appear in the text. Type the reference list with double spacing on a separate sheet. References should accord with the system used in *Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals* (N Engl J Med 1991;324:424-428).

Examples:

1 Taylor DN, Sanchez JL, Candler W et al. Treatment of traveller's diarrhea: ciprofloxacin plus loperamide compared with ciprofloxacin alone. *Ann Intern Med* 1991;114:731-734.

2 Mackowiak PA, ed. *Fever. Basic Mechanisms and Management*. New York: Raven Press, 1991.

3 Rubin M, Pizzo PA. Monotherapy in neutropenic cancer patients. In: Peterson PK, Verhoef J, eds. *Antimicrobial Agents Annual 3*. Amsterdam: Elsevier, 1988.

Please note that all authors should be listed when six or less; when seven or more, list only the first six and add 'et al.'. Do not include references to personal communications, unpublished data or manuscripts either 'in preparation' or 'submitted for publication'. If essential, such material may be incorporated into the appropriate place in the text. *Recheck references in the text against reference list after your manuscript has been revised.*

Illustrations. Photographs should be presented as high quality jpg (jpeg) or tiff files with high contrast. Magnification should be indicated by a line representing the actual scale of reproduction (0.1 mm, 1mm or 10 mm); the use of magnification factors is to be avoided where possible. Illustrations will not be redrawn by the Publisher: line figures should be suitable for direct reproduction. They should be prepared with black on white background, or be black-and-white images; *they should be completely and consistently lettered, the size of the lettering being appropriate to that of the illustration, taking into account the necessary reduction in size.*

Illustrations should be designed to fit either a single column (84 mm wide) or the full text width (175mm). However, if specifically requested by the author(s), plates may be reproduced larger than the typeset area; all originals for these should have the same proportions to achieve uniformity in their presentation. *N.B. When plates are required to fill the entire page, the originals should have the dimensions 215 x 285 mm and contain no essential information or labelling near the edges.* Further information about artwork can be found on the World Wide Web: access under  <http://www.elsevier.com/locate/authorartwork>

Colour figures. Colour figures will be included subject to the authors' agreement to defray the cost.

Specific remarks *Mathematical formulae.* Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics. Use the solidus (/) instead of

a horizontal line,

e.g., Xp/Ym

Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text).

Tables. Number tables consecutively 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.

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.

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. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

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 tumour from a chronic lymphatic leukaemia (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.

Editorial Review

All manuscripts are subject to peer review. If changes are requested, revisions received later than 3 months after this request will be treated as new submissions.

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. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Language and language services

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information.

Page charges

The Journal does not charge a submission fee.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will 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.

Queries

All questions arising after acceptance of a manuscript by the editor, especially those relating to proofs, publication and reprints should be directed to the publishers, Elsevier Ireland Ltd., Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland. Tel: +353 61 709600, Fax: +353 61 709100, E-mail: support@elsevier.com. In the USA and Canada: For further information, contact Elsevier Inc., Attn: Journal Information Center, 360 Park Avenue South, New York, NY 10010, USA. Tel: +1 212 6333750; Fax: +1 212 6333990; Telex: 420-643 AEP Ui; E-mail: usinfo-f@elsevier.com.

Policy and Ethics

Declarations

Upon submission you will be required to complete and upload this form ([pdf version](#) or [word version](#)) to declare funding, conflict of interest and to indicate whether ethical approval was sought. This information must also be inserted into your manuscript under the acknowledgements section with the headings below. If you have no declaration to make please insert the following statements into your manuscript:

Funding: None

Competing interests: None declared

Ethical approval: Not required

Ethics

Work on human beings that is submitted to IJAA should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki; Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989. The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s) in which it was performed and that subjects gave informed consent to the work (see declarations section above). Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used.

Competing interests

See the declarations section above. 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

See the declarations section. All sources of funding should be declared. 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.

Randomised controlled trials

All randomised controlled trials submitted for publication in IJAA should include a completed Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) flow chart. Please refer to the CONSORT statement website at <http://www.consort-statement.org> for more information. IJAA has adopted the proposal from the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) which require, as a condition of consideration for publication of clinical trials, registration in a public trials registry. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. For this purpose, a clinical trial is defined as any research project that prospectively assigns human subjects to intervention or comparison groups to study the cause-and-effect relationship between a medical intervention and a health outcome. Studies designed for other purposes, such as to study pharmacokinetics or major toxicity (e.g. phase I trials) would be exempt. Further information can be found at www.icmje.org. Revisions received later than 3 months after this request will be

treated as new submissions.

Authors in Japan please note: If you would like information about how to have the English of your paper checked, corrected and improved (*before submission*), please contact our Tokyo office who will inform you of the services provided by language correctors: Elsevier Japan, 9-15 Higashi-Azabu 1-chome, Minato-ku, Tokyo, 106 Japan, Tokyo; Tel: +81-3-5561-5032; Fax: +81-3-5561-5032.

Proofs will be sent to the authors to be carefully checked for printer's errors. *Changes or additions to the edited manuscript cannot be allowed at this stage.* Corrected proofs should be returned to the publisher by email within two days of receipt.

Page charges will not be made.

Twenty-five free reprints will be supplied. The publisher will send authors a form enabling further reprints to be ordered at prices listed on the form.

Illustrations Photographs should be presented as high quality jpg (jpeg) or tiff files with high contrast. Magnification should be indicated by a line representing the actual scale of reproduction (0.1 mm, 1mm or 10 mm); the use of magnification factors is to be avoided where possible. Illustrations will not be redrawn by the Publisher: line figures should be suitable for direct reproduction. They should be prepared with black on white background, or be black-and-white images; *they should be completely and consistently lettered, the size of the lettering being appropriate to that of the illustration, taking into account the necessary reduction in size.*

Illustrations should be designed to fit either a single column (84 mm wide) or the full text width (175mm). However, if specifically requested by the author(s), plates may be reproduced larger than the typeset area; all originals for these should have the same proportions to achieve uniformity in their presentation. *N.B. When plates are required to fill the entire page, the originals should have the dimensions 215 x 285 mm and contain no essential information or labelling near the edges.* Further information about artwork can be found on the World Wide Web: access under ➡ <http://www.elsevier.com/locate/authorartwork>

Colour figures will be included subject to the authors' agreement to defray the cost.

Tables All tables must be cited in the text and have titles. Number them consecutively with Arabic numerals. Table titles should be complete but brief. Information other than that defining the data should be presented as footnotes. Only horizontal rules should be included, and kept to a minimum.

All questions arising after acceptance of a manuscript by the editor, especially those relating to proofs, publication and reprints should be directed to the publishers, Elsevier Ireland Ltd., Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland. Tel: +353 61 709600, Fax: +353 61 709100, E-mail: Editors@elsevier.ie. **In the USA and Canada:** For further information, contact Elsevier Inc., Attn: Journal Information Center, 360 Park Avenue South, New York, NY 10010, USA. Tel: +1 212 6333750; Telefax: +1 212 6333990; Telex: 420-643 AEP Ui; E-mail: usinfo-f@elsevier.com.

Funding body agreements and policies

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

Sponsored Articles:

International Journal of Antimicrobial Agents offers authors the option to sponsor non-subscriber access to their articles on Elsevier's electronic publishing platforms. For more information please view our Sponsored Articles information page. ➡ <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/sponsoredarticles>.

[!\[\]\(54c7d7321666f2244cd6c3415aefd30e_img.jpg\) Top of Page](#)



[Printer-friendly version](#)