

ATIVIDADE ANTIVIRAL DE UMA AMOSTRA DE PRÓPOLIS VERDE RICA EM COMPOSTOS FENÓLICOS FRENTE AO CORONAVÍRUS CANINO

FINGER, Paula Fonseca; NUNES, Cristina Freitas; SILVA, Luis Gustavo Crochemore; MEDEIROS, Daiana Maciel; FÁCCIO, Cacciane; CASTRO, Clarissa Caetano; HÜBNER, Silvia de Oliveira

*Laboratório de Virologia e Imunologia - Faculdade de Veterinária - UFPel
paulaafinger@hotmail.com*

1 INTRODUÇÃO

A própolis é uma complexa mistura de substâncias que as abelhas coletam de várias plantas, transformando-as através da adição de enzimas salivares, e que é utilizada na colméia para diversas finalidades, como vedação e embalsamento de insetos invasores mortos (LONGHINI *et al.*, 2007). O nome própolis é derivado do grego *pro*, em defesa de, e *polis* a cidade, o que quer dizer “em defesa da cidade ou da colméia” (MARCUCCI, 1996).

Apesar de amplamente utilizada na medicina popular, por muito tempo a própolis foi considerada um subproduto da criação de abelhas. No entanto, vem despertando o interesse de pesquisadores pelo mundo todo em razão das suas inúmeras propriedades bioativas já relatadas, como ação antibacteriana, antifúngica, imunomoduladora, virucida e antiviral (MARCUCCI, 1996).

O coronavírus canino (CCoV) é um vírus RNA de fita simples, polaridade positiva, com envelope, pertencente ao gênero *Coronavirus*, família *Coronaviridae*. O CCoV tem sido associado a surtos esporádicos de gastroenterite moderada em cães de todas as idades, porém com maior gravidade em filhotes. Quando a infecção ocorre associada com a parvovirose, a doença é grave e frequentemente fatal para os filhotes (PRATELLI *et al.*, 1999). Surtos causados pelo coronavírus, isolado ou em associação com outros agentes, têm sido relatados em vários países (NAYLOR *et al.*, 2001). Estudos para o CCoV são escassos, entretanto, CASTRO *et al.* (2010) relatam a presença de anticorpos em 45,5% (10/22) de cães não vacinados. Em cães vacinados, somente 47,8% (33/69) apresentaram soroconversão nesse mesmo estudo. MOSCA *et al.* (2002) por RT-PCR detectaram RNA viral em 20% (3/15) das amostras de fezes caninas testadas.

Esse trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antiviral de uma solução de própolis verde frente a uma amostra do coronavírus canino *in vitro*, utilizando linhagem celular de rim de felino (CRFK).

2 METODOLOGIA

Para avaliação da atividade antiviral da própolis contra o CCoV, testes de citotoxicidade foram previamente realizados com a suspensão de própolis verde em células CRFK, determinando-se uma concentração de 15 µg/mL de suspensão de própolis como a maior dose incapaz de causar dano celular.

Em uma placa de fundo chato com 96 cavidades foi colocado 50 µl de meio de crescimento celular E-MEM (meio essencial mínimo de Eagle) contendo 10% de soro fetal bovino e após foi adicionado o mesmo volume de suspensão de células CRFK, deixando a placa em estufa 5% CO₂ a 37°C por 24 horas para a formação de

uma monocamada confluyente. Posteriormente o meio foi removido e foi adicionada a suspensão de própolis verde a 15 µg/mL. A placa foi deixada em estufa a 37° C contendo 5% de CO₂ por um período de 4 horas. Ao término deste período, foram realizadas titulações do vírus CCoV, amostra do Laboratório de Virologia da UFPel, pelo método de diluição final, em base logarítmica de 10, entre 10⁻¹ e 10⁻⁸. As diluições foram adicionadas em quadruplicata na placa, incubando a mesma em estufa 5% CO₂ a 37°C por 48 horas. O título foi determinado como dose infectante para cultivo celular a 50% (DICC₅₀/50 µl).

A leitura do título viral foi realizada pelo método de Behrens & Kärber (MAYR *et al.*, 1982), tendo como base a ausência ou presença de efeito citopático, verificado em microscópio invertido.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O tratamento das células com própolis verde na concentração de 15 µg/ml resultou numa diferença significativa em relação à titulação do CCoV. Em células não tratadas, o CCoV apresentou um título de 10^{6,75} DICC₅₀/50 µl. Após 4 horas de incubação com a própolis verde, o título viral foi reduzido para 10⁵ DICC₅₀/50 µl. A ação antiviral foi atribuída à própolis, uma vez que a concentração utilizada esteve abaixo dos níveis tóxicos para a célula CRFK, como determinado em testes realizados anteriormente no Laboratório de Virologia da UFPel.

Conforme MENEZES (2005), os principais compostos químicos isolados da própolis até o momento podem ser organizados em alguns grupos principais, como: ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos graxo, aminoácidos, esteróides, cetonas, charconas e di-hidrocharconas, flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenóides, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, E, bem como diversos minerais, sendo os flavonóides os compostos que vêm chamando a atenção de pesquisadores. Os flavonóides são compostos fenólicos que compreendem um amplo grupo de substâncias naturais não sintetizadas pelos animais (BEECHER, 2003).

Análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra utilizada no presente estudo demonstrou a predominância de compostos fenólicos como ácido cinâmico e derivados, conforme pode ser observado na Tabela 1. É possível que a redução no título viral deva-se a competição dos compostos fenólicos por receptores celulares utilizados pelo CCoV. Já foi relatado que compostos fenólicos, incluindo os flavonóides, possuem a capacidade de ligar-se a glicoproteínas, dificultando a ligação e a entrada na célula e, conseqüentemente, a interação do vírus aos receptores celulares. Segundo LIU *et al.* (2005) estes compostos possuem capacidade de se ligar aos receptores celulares modificando sua estrutura química ou bloqueando o sítio de ligação do vírus.

De acordo com IVANOVSKA *et al.* (1995), o ácido cinâmico atua na defesa do hospedeiro, estimulando a proliferação de linfócitos e induzindo produção de IL-1 e IL-2. SFORCIN *et al.* (2002) sugerem que macrófagos ativado por extrato de própolis produzem citocinas como TNF-α e interleucina 12 que agem nas células NK, aumentando a sua atividade citotóxica. Em estudo realizado por NUNES *et al.*, (2003) foi demonstrado que a própolis proporcionou ativação de linfócitos e proliferação de IFN-γ.

No presente estudo é possível que o tratamento das células tenha induzido a expressão de citocinas, tal como interferon, que possui ação antiviral. Novos estudos

são necessários para elucidar o mecanismo de ação exercido pelo extrato de própolis verde contra o CCoV.

Tabela 1: Análise por cromatografia de alta eficiência da amostra de própolis verde

Componente identificado na própolis	Extrato seco
2,2-Dimetil-6-carboxietanol-2H-benzopirano	3,17
2,2-Dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-ácido propanóico	9,77
3,5-Diprenil-4-ácido hidroxicinâmico (1-9 derivado)	17,75
3,5-Diprenil-4- ácido hidroxicinâmico (artepilim C)	27,77
3-Prenil-4- ácido hidroxicinâmico	5,71
Ácido cafeico	2,43
Ácido cafeico (1 derivado)	11,35
Derivado de ácido cinâmico	65,98
Ácido Ferúlico	7,21
Camferol (1 derivado)	20,45
p-Ácido cumárico	18,03
Pinobanksina	31,48
Total (mg/g de resina bruta)	221,10
Total (%)	22,11

4 CONCLUSÕES

No estudo realizado, a própolis verde na concentração de 15 µg/mL exerceu efeito na multiplicação do CCoV. A própolis reduziu o título do vírus de $10^{6,75}$ DICC₅₀/50 µl para 10^5 DICC₅₀/50 µl, após 4 horas de incubação das células com o extrato. Os resultados obtidos confirmam a ação antiviral da própolis, demonstrada também por outros autores frente a outros vírus. Faz-se necessário que sejam realizados estudos mais aprofundados com relação ao mecanismo de ação desses componentes da própolis, principalmente os flavonóides, com relação ao CCoV.

5 REFERÊNCIAS

BEECHER , G.R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **Journal of Nutrition**, v.133, n.10, p.3248S-3254S, 2003.

CASTRO, C. C., JOHANN, J. M.; FINGER, P. F.; NUNES, C. F.; VARGAS, G. D.; FISCHER, G.; HÜBNER, S. O. Canine coronavirus (CCoV) in dogs vaccinated and unvaccinated domiciliated in Pelotas, RS, Brazil. **Semina** (Londrina), 2010. *In press*.

IVANOVSKA, N., NEYCHEV, H., STEFANOVA, Z., BANKOVA, V., POPOV, S., 1995. Influence of cinnamic acid on lymphocyte proliferation, cytokine release and *Klebsiella* infection in mice. *Apidologie* 26, 73–81.

LIU S., LU H., ZHAO Q., HE Y., NIU J., DEBNATH A.K., WU S., JIANG S. Theaflavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41. **Biochim. Biophys Acta**. v.25, p.270-281, 2005.

LONGHINI, Renata; RAKSA, Sheila M.; OLIVEIRA, Ana Carla P.; SVIDZINSKI, Terezinha I. E.; FRANCO, Selma L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica, **Revista brasileira de farmacognosia**, João Pessoa, v.17, n.3, p. ???, 2007.

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

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

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p.405-411, 2005.

MOSCA, X. et al. Canine coronavirus detection in feces by RT-PCR. In : **ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA**, 13., Águas de Lindóia, 2002. Resumos... São Paulo : Sociedade Brasileira de Virologia, 2002. V.7, n.1, p.81.

NAYLOR, M.J.; MONCKTON, R.P.; LEHRBACH, P.R.; DEANE, E.M. Canine coronavirus in australian dogs. **Australian Veterinary Journal**, v.79, p.116-119, 2001.

PRATELLI, Annamaria; TEMPESTA, Maria; ROPERTO, Franco P.; SAGAZIO, Paola; CARMICHAEL, Leland; BUONAVOGLIA, Canio. Fatal coronavirus infection in puppies following canine parvovirus 2b infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p.550-553, 1999.

NUNES, A. S., FACCIOLI, L. H., SFORCIN, J. M. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 93-97, 2003.

SFORCIN, J.M.; KANENO, R.; FUNARI, S.R.C. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of brazilian propolis on natural killer activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.8, n.1, p.19-29, 2002.