

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS – UNIMONTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – PPGCB
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ADJUVANTE DE EXTRATOS DE
ORIGEM VEGETAL NA INDUÇÃO DE RESPOSTA IMUNE DE
COBAIOS VACINADOS CONTRA O PARVOVÍRUS SUÍNO**

FERNANDA CÂNDIDA FILGUEIRAS

MONTES CLAROS – MINAS GERAIS
JULHO DE 2008

FERNANDA CÂNDIDA FILGUEIRAS

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ADJUVANTE DE EXTRATOS DE
ORIGEM VEGETAL NA INDUÇÃO DE RESPOSTA IMUNE DE
COBAIOS VACINADOS CONTRA O PARVOVÍRUS SUÍNO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Montes Claros, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Biologia e Conservação.

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Henrique Maia Valério

CO-ORIENTAÇÃO: Prof^a Dr^a Betânia Paiva Drumond

Dr. Igor Viana Brandi

MONTES CLAROS – MINAS GERAIS

JULHO DE 2008

F481a Filgueiras, Fernanda Cândida.
Avaliação da capacidade adjuvante de extratos de origem vegetal na indução de resposta imune de cobaios vacinados contra o parvovírus suíno [manuscrito] / Fernanda Cândida Filgueiras. – 2008.
59 f. : il.

Referências : f. 46-58.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia e Conservação, 2008.
Orientador: Prof. Dr. Henrique Maia Valério.

1.Extratos vegetais. 2. Vacinas. 3. Adjuvantes. 4. Parvovírus suíno.
I. Valério, Henrique Maia. II. Universidade Estadual de Montes Claros.
III. Título.



ATA DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE FERNANDA CÂNDIDA FILGUEIRAS. Aos 28 dias do mês de julho 2008 (28/07/2008), às nove horas, reuniu-se no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Estadual de Montes Claros a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado, indicada pelo Colegiado e composta pelos professores doutores Henrique Maia Valério, Dario Alves de Oliveira e Otto Domenici Mozzer, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Avaliação da Capacidade Adjuvante de Extratos de Origem Vegetal na Indução da Resposta Imune de Cobaíes Vacinados Contra o Parvovírus Suíno”, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas. Abrindo a sessão o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Henrique Maia Valério da Universidade Estadual de Montes Claros, após dar a conhecer aos presentes o teor da Normas Regimentais para o Trabalho Final, passou a palavra a candidata para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Pelas indicações da Comissão a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo tratar o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Montes Claros, 28 de julho de 2008


Prof. Dr. Henrique Maia Valério – Orientador- UNIMONTES


Prof. Dr. Dario Alves de Oliveira - UNIMONTES


Prof. Dr. Otto Domenici Mozzer - Vallée

*“Não vos preocupeis, pois, com o dia de amanhã:
o dia de amanhã terá as suas preocupações próprias.*

A cada dia basta o seu cuidado.”

(Mt 6, 34)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo direcionamento, fortaleza e conforto. À Maria pela evidente companhia.

Ao Igor pelo incentivo para o início desta dissertação, pela prontidão para o seu andamento e pelo apoio na conclusão.

Aos professores Henrique Valério e Betânia Drumond, pelo apoio em momentos críticos e pela atenção dispensada nas correções deste trabalho.

À todos os companheiros e amigos da Vallée, que me acompanharam durante toda essa jornada e estavam sempre prontos a me ajudar.

Aos meus familiares pela torcida, paciência e compreensão nos momentos de ausência.

À Adler pelo apoio constante e pelos conselhos nos momentos difíceis.

À amiga Fran, pela amizade e auxílio.

Aos professores, colegas e funcionários do PPGCB, pelos ensinamentos, prontidão e amizade.

Agradeço a Ronaldo pela exaustiva paciência e orientação nas análises estatísticas.

À Vallée S/A, que possibilitou a execução desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABELAS	4
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	5
1. INTRODUÇÃO	6
1.1. Parvovírus Suíno	6
1.2. Modelos animais	8
1.3. Adjuvantes de Vacinas	8
1.4. Emulsões	10
1.5. Nutrientes e Minerais imunostimulantes	12
1.6. Extratos de origem vegetal	14
1.6.1. Própolis	15
1.6.2. Buriti (<i>Mauritia flexuosa</i> Mart.)	15
1.6.3. Amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>)	16
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVO	19
3.1. Objetivo geral	19
3.2. Objetivos específicos	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Local	20
4.2. Soluções e Reagentes	21
4.2.1. Meio de Cultura celular e viral	21
4.2.2. Meio de Congelamento Celular	21
4.2.3. Tripsina	22
4.2.4. Tampão Salino Fosfatado	22
4.3. Pesquisa pelos adjuvantes teste	22
4.4. Linhagem Celular	22
4.4.1. Produção do Banco de Células	23
4.4.2. Sistema de Cultivo	23
4.5. Cepa Viral	23
4.5.1. Multiplicação Viral	23

4.6. Titulação Viral	24
4.7. Inativação Viral	24
4.8. Estudo de Adjuvantes	25
4.9. Testes de emulsão	25
4.10. Esterilidade das vacinas	27
4.11. Modelo experimental	27
4.12. Esquema de vacinação	27
4.13. Avaliação de inocuidade das vacinas	28
4.14. Coletas de sangue dos cobaios vacinados	28
4.15. Titulação de anticorpos neutralizantes	29
4.16. Avaliação da resposta imunológica de animais vacinados ao longo do tempo	29
4.17. Análise Estatística	30
5. RESULTADOS	31
5.1. Cultivo das células SK6	31
5.2. Multiplicação e inativação viral	31
5.3. Testes de EHL dos óleos de amendoim e buriti	32
5.4. Teste de inocuidade das vacinas	34
5.5. Avaliação da capacidade adjuvante dos óleos de amendoim, buriti e extrato de própolis verde sobre a síntese de anticorpos contra o parvovírus suíno... 34	34
5.6. Comparação da resposta imunológica induzida pelas vacinas experimentais frente a uma vacina comercial	36
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÕES	45
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
9. ANEXO	59

RESUMO

Um aspecto importante no desenvolvimento de vacinas inativadas é o adjuvante. Muitos dos adjuvantes de uso comum não são considerados ideais porque induzem resposta imune inapropriada ou apresentam contra-indicações. Nesse trabalho foram formuladas vacinas contra o parvovírus suíno (PVS) com o intuito de avaliar a capacidade adjuvante de extratos de origem vegetal, como óleo de amendoim, óleo de buriti e extrato de própolis verde em potencializar a resposta imune em cobaias. Os experimentos foram divididos em duas etapas. Os resultados da primeira etapa demonstraram títulos de anticorpos maiores induzidos pela vacina associada ao óleo de amendoim, aos 15 dias após a primeira vacinação, quando comparada com a vacina sem adjuvante. Porém esse mesmo resultado não foi observado na última coleta sorológica. Os adjuvantes formulados a base de extrato de própolis verde e hidróxido de alumínio produziram resposta de títulos de anticorpos semelhante entre si e diferentes da vacina sem adjuvante. A vacina com óleo de buriti não exerceu atividade adjuvante quando comparada à vacina controle, sem adjuvante, em nenhum dos dois tempos de coleta. Na segunda etapa do trabalho formulou-se novamente a vacina contendo própolis verde, hidróxido de alumínio e outra contendo a associação de hidróxido com própolis verde. Essas formulações e uma vacina comercial, considerada como de boa aceitação no mercado, foram inoculadas em cobaias. Os resultados demonstraram efeito adjuvante semelhante do hidróxido de alumínio, da associação de hidróxido com própolis verde e da vacina comercial. Diferente do resultado obtido nos estudos da primeira etapa, a vacina adicionada de própolis verde, separadamente, induziu os menores títulos de anticorpos dentre todas as outras vacinas formuladas para essa segunda parte do trabalho, sendo essa resposta diferente estatisticamente. Os resultados desse estudo demonstram que o extrato de própolis verde pode ser utilizado juntamente com o hidróxido de alumínio como adjuvante de vacina inativada contra o parvovírus suíno com boa resposta imunológica.

Palavras-chave: extratos vegetais, vacinas, adjuvantes, parvovirus suíno

ABSTRACT

An important aspect in development of inactivated vaccines is the adjuvant. The majority of adjuvants that are commonly used is not considered ideal because they induce inappropriate immune response or present side effects. In this work, vaccines against porcine parvovirus have been formulated to assess the adjuvant capacity of vegetal extracts as peanut oil, buriti oil and the extract of green propolis in inducing the immune response in guinea pigs. The experiments were divided in two stages. The vaccine formulated with peanut oil induced higher antibodies titers after 15 days post vaccination (dpv), but not after 60 dpv when compared to the vaccine formulated without adjuvant (control). The extract of green propolis and aluminum hydroxide induced similar antibody titers that were higher than the antibody titers induced by the vaccine without any adjuvant. The buriti oil didn't show adjuvant activity when it was compared to control vaccine. In the second stage of the work, vaccines were formulated using green propolis, aluminum hydroxide and hydroxide and green propolis association. These formulations and a commercial vaccine have been inoculated in guinea pigs. Similar antibody titers were observed in animals vaccinated with vaccine formulated with aluminum hydroxide and the association of hydroxide and green propolis and with the commercial vaccine. This study has been demonstrated that the extract of green propolis can be used with the aluminum hydroxide as adjuvant of inactivated vaccine against the porcine parvovirus providing a satisfactory immunologic response.

Key words: vegetal extracts, vaccines, adjuvants, porcine parvovirus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cobaios (<i>Cavia porcellus</i>) utilizados como modelo experimental das vacinas formuladas com diferentes adjuvantes contra o parvovírus suíno	21
Figura 2. Titulação viral do parvovírus suíno pela técnica da hemoaglutinação	24
Figura 3. Células SK6 infectadas pelo parvovírus suíno	31
Figura 4. Teste de emulsões com diferentes valores de EHL para o óleo de amendoim	32
Figura 5. Teste de emulsão para o óleo de buriti utilizando EHL de 1,8	33
Figura 6. Teste de emulsões com diferentes valores de EHL para o óleo de buriti	33
Figura 7. Títulos de anticorpos anti-PVS em cobaios induzidos por vacinas formuladas com diferentes adjuvantes, na resposta primária	35
Figura 8. Títulos de anticorpos anti-PVS em cobaios induzidos por vacinas formuladas com diferentes adjuvantes, na resposta secundária	36
Figura 9. Síntese de anticorpos neutralizantes produzidos por cobaios em resposta às vacinas formuladas com diferentes adjuvantes ao longo de 60 dias.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) utilizados para os testes de emulsões dos óleos de amendoim e buriti	26
Tabela 2. Relação da fase oleosa, aquosa e dos tensoativos Tween 80® e Span 80® definidos para estabelecer o Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) do óleo de amendoim ..	26
Tabela 3. Relação da fase oleosa, aquosa e dos tensoativos Tween 80® e Span 80® definidos para estabelecer o Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) do óleo de buriti	27
Tabela 4. Vacinas teste para os ensaios de avaliação imunológica	28
Tabela 5. Esquema de coleta de sangue dos animais para a avaliação da resposta imunológica ao longo do tempo	30
Tabela 6. Medidas da separação de fase das emulsões de amendoim utilizando EHL de 5,0 a 7,5 e óleo de buriti com EHL de 1,8 a 7,5	33

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A/O	Emulsões de água em óleo
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ABIEPCS	Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de carne suína
BSA	Soro Albumina Bovina (<i>Albumin Bovine Serum</i>)
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DMEM	<i>Dulbbeco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECP	Efeito Citopático
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
HA	Hemoaglutinação
HEPES	<i>N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid</i>
HI	Inibição da Hemoaglutinação
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
LTV	Laboratório de Tecnologia de Vacinas
O/A	Emulsões de óleo em água
PBS	Tampão salino-fosfatado (<i>phosphate buffer solution</i>)
PVS	Parvovírus Suíno
SFB	Soro Fetal Bovino
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
SK6	<i>Swine Kidney</i> tipo 6
UHA	Unidades Hemoaglutinantes

1. INTRODUÇÃO

O mercado de produtos para saúde animal movimenta cerca de 17 bilhões de dólares por ano em todo o mundo. O Brasil ocupa a terceira colocação em receita no ranking mundial deste setor, tendo obtido um faturamento de R\$ 2,4 bilhões no ano de 2007. De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN), o setor registrou um crescimento de 7,8% em relação ao ano de 2006, praticamente o dobro em relação a média que vinha registrando nos últimos dois anos (GAZETA MERCANTIL, 2008).

Segundo o relatório anual ABIPECS (2006) a produção nacional de carne suína vem crescendo nos últimos anos. No ano de 2006, esta cresceu quase 6,0%, atingindo 2,86 milhões de toneladas, o que corresponde a 162 mil toneladas a mais do que o ano de 2005. Em 2007, a produção foi de 3,0 milhões de toneladas. Diante deste cenário de crescimento do mercado, diversas empresas estão focando esforços no desenvolvimento de vacinas que resultem no aumento da produtividade da carne suína por reduzir o índice de doenças que ocasionam perda da produção animal (FERNANDES, 2005).

A parvovirose suína é a principal responsável pela perda de produtividade dos rebanhos de suínos no Brasil, devido a falhas reprodutivas. Martins e colaboradores (1984) verificaram elevada ocorrência de anticorpos contra o parvovírus suíno (PVS) em propriedades cujos animais não eram vacinados, indicando que este vírus já está estabelecido no país desde, pelo menos, a década de sessenta. As vacinas contra o parvovírus suíno, existentes no mercado, são formuladas, usualmente, com o antígeno inativado adicionado de adjuvantes aquosos ou oleosos.

1.1. Parvovírus suíno

O parvovírus suíno (PVS) pertence à família Parvoviridae, subfamília Parvovirinae e gênero *Parvovirus*. É um dos menores vírus que se conhece, com cerca de 20 nm de diâmetro, de forma icosaédrica, não envelopado, com genoma composto por uma única fita de DNA (TSAO *et al.*, 1991 citado por FIELDS *et al.*, 2001). O PVS causa uma enfermidade reprodutiva que acomete fêmeas suínas soronegativas quando estas são expostas ao vírus por via oronasal e os fetos ou embriões são infectados transplacentariamente (MENGELING, 1992).

A parvovirose suína apresenta uma distribuição mundial, sendo considerada uma das principais causas infecciosas de problemas reprodutivos nos suínos (THACKER e

GONZALEZ, 1988; DEE, 1995). A eficiência produtiva de uma suinocultura está intimamente relacionada com a eficácia reprodutiva, ou seja, número de leitões produzidos por porca, durante o ano. As manifestações clínicas da infecção pelo PVS em um rebanho incluem morte embrionária e fetal com reabsorção, fetos mumificados, pequenas leitegadas, natimortalidade e aumento do intervalo entre partos (VAN LEENGOED *et al.*, 1983) sem causar, contudo, quaisquer outros sinais clínicos em animais adultos (SOARES e BERSANO, 1998).

Gouveia e colaboradores (1984) estudando a prevalência de anticorpos contra o PVS no Estado de Minas Gerais, observaram 55,3% de positividade em 608 soros examinados, sendo que todos os rebanhos testados apresentaram animais soropositivos. Em outro estudo de plantéis suínos no Estado de São Paulo, 96% dos animais testados apresentaram títulos de anticorpos anti-PVS, quando as amostras de soro eram submetidas à técnica de Inibição da Hemoaglutinação (BERSANO *et al.*, 1993). Martins e colaboradores (1984), estudando animais pertencentes à granjas dos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, encontraram cerca de 80% dos animais sorologicamente positivos para o PVS.

Na região sul do Brasil, considerada como o pólo mais tecnificado da suinocultura brasileira, os dados referentes a reprodução e a produção são da ordem de 9,5 leitões/parto e 1,9 partos/porca/ano, respectivamente. Leitoas que apresentam soroconversão para o parvovírus produziram 0,9 leitões/ano a menos do que as não infectadas (GOMES 1992). Parke e Burgess (1993) realizaram uma análise econômica da doença: num rebanho com 100 matrizes eles constatarem perdas de aproximadamente 6 mil dólares em um ano, demonstrando que a parvovirose é um grande problema do desempenho reprodutivo e produtivo da suinocultura.

A prevenção desta doença tem sido feita pela vacinação, ou pelo método de retroinfecção, objetivando a imunização de todas as leitoas de rebanhos infectados antes da primeira cobertura (LOBATO *et al.*, 1993). A vacinação é o método de controle específico mais seguro e eficaz de proporcionar imunidade a um plantel suíno frente à parvovirose suína. Vacinas atenuadas e inativadas têm sido produzidas e testadas em animais de laboratório e suínos por vários pesquisadores, mas, devido a maior segurança, as vacinas inativadas são as mais utilizadas em todo o mundo (THOMSON e PROZESKY, 1994). O esquema de vacinação varia, mas de uma maneira geral todos os animais, duas semanas após serem vacinados, devem receber um reforço (FERNANDES, 2005).

O diagnóstico direto da parvovirose suína é baseado na detecção e identificação de antígenos virais pelas técnicas de hemoaglutinação em suspensão de órgãos fetais (HA) ou imunofluorescência em cortes de tecidos fetais (MENGELING e PAUL, 1986).

1.2. Modelos animais

O estabelecimento de modelos animais tem dinamizado as pesquisas em diversas áreas da microbiologia, incluindo estudos de patogenia, desenvolvimento de vacinas e terapêuticos. O uso de modelos experimentais apresenta vantagens para testes de vacinas como a possibilidade de avaliar grande número de animais, permitindo maior reprodutibilidade dos resultados, a manutenção desses animais em condições controláveis, minimizando fatores que possam interferir nos resultados, a facilidade de obtenção de animais que não tiveram contato prévio com o agente contra o qual a vacina está sendo testada e a redução dos custos (NIEWIESK e PRINCE, 2002).

Lobato (1990) comparando os títulos de anticorpos em suínos e cobaios após inoculação de duas doses de uma vacina inativada contra o parvovírus suíno mostrou que os cobaios responderam com diferentes títulos a diferentes quantidades de antígeno e apresentaram boa resposta à primeira e à segunda vacinação. Diante destes resultados, o autor afirma que o cobaio é um animal eficiente para estabelecer o valor de vacinas inativadas contra o parvovírus suíno. Da mesma forma, Fernandes (2005), em seu estudo com vacinas inativadas contra o parvovírus suíno, verificou um perfil de resposta em suínos bastante semelhante ao perfil da resposta em cobaios. Desta forma utilizou-se neste trabalho o cobaio como modelo experimental.

1.3. Adjuvantes de vacinas

As principais categorias de vacinas veterinárias comerciais são as inativadas e as atenuadas. As vacinas que apresentam os agentes de infecção atenuados geneticamente apresentam mecanismos endógenos que aumentam a resposta imune celular e humoral, porém podem ser responsáveis por efeitos adversos (SHIRODKAR *et al.*, 1990; BOMFORD, 1989). Essas reações podem ser contornadas pelo uso de vacinas contendo o antígeno inativado. No entanto, o antígeno inativado é um imunógeno fraco, gerando resposta imune apenas do tipo humoral, em muitas ocasiões com baixo título de anticorpos e que persistem por curto período de tempo (CORTESE *et al.*, 1998), necessitando assim de agentes exógenos para alcançar níveis apropriados de imunogenicidade (SHIRODKAR *et al.*, 1990).

O termo adjuvante (do latim, *adjuvare*, ajudar) foi primeiramente descrito na década de 1920 como uma substância que, usada em combinação com um antígeno específico, produz mais imunidade que o antígeno sozinho (SINGH e O'HAGAN, 1999), potencializando as respostas imune humoral e/ou celular (ZUFFA *et al.*, 1985; STORNI *et al.*, 2005; BARR *et al.*, 2006). A adição desses adjuvantes imunológicos em vacinas inativadas pode induzir resposta imune mais potente e duradoura, ou seja, tanto em relação aos títulos médios de anticorpos quanto ao período de proteção pós-vacinal (THOMAS, 1986). Além disso, os adjuvantes podem servir para outros propósitos como, aumentar a estabilidade de vacinas que contenham mais de um componente, reduzir a toxicidade dos constituintes da vacina e reduzir a quantidade de antígeno ou o número de imunizações necessárias para uma proteção imunológica específica (SHIRODKAR *et al.*, 1990). Aumentando a potência das vacinas pelo uso de adjuvantes também pode-se reduzir a dose de vacina requerida para atingir uma resposta imune protetora. Por exemplo, quando adicionado de adjuvante, utilizou-se apenas 10% do antígeno de superfície do vírus da hepatite B quando comparado ao antígeno puro (DONELLY, 1997).

Ungar (1966) trabalhando com vacina antitetânica observou que para o incremento da imunogenicidade do toxóide tetânico e conseqüente taxa de imunização foi necessária a inclusão de adjuvantes imunológicos e que um bom adjuvante pode aumentar a potência de toxóides comerciais em níveis superiores a 1000 vezes.

Teoricamente, cada molécula ou substância capaz de amplificar ou intensificar a cascata de eventos imunológicos que compõem a resposta imune pode ser reconhecida como adjuvante (SCHIJS, 2000).

Os adjuvantes podem ser divididos em dois grupos principais: adjuvantes solúveis em água e adjuvantes oleosos (WOODARD, 1990). Adjuvantes aquosos incluem o hidróxido de alumínio, o qual é amplamente utilizado clinicamente (HORZINEK *et al.*, 1997) sendo o único adjuvante aprovado para o uso em humanos (BOMFORD, 1989). Sua atividade biológica consiste de pelo menos três componentes: formação de depósito de antígeno nos tecidos levando à exposição prolongada, produção de antígenos particulados para facilitar a ação das células apresentadoras de antígeno e ativação do complemento e estimulação de macrófagos por induzir retenção e ativação de linfócitos (revisado por HUNTER, 2002). Preparações de adjuvantes oleosos, são extensivamente usados em vacinas veterinárias e caracterizam-se pela formação de depósitos, esta massa depositada de adjuvante e antígenos permanece no tecido por um período prolongado, atraindo assim leucócitos. Os géis de alumínio e os óleos minerais são os principais adjuvantes de vacinas

veterinárias (HORZINEK *et al.*, 1997). Devido a alguns efeitos adversos provocados pelos óleos minerais, como a formação de lesões ulcerativas no local da injeção, os óleos vegetais, por conterem componentes que são metabolizados ou excretados pelo organismo do animal, são testados na tentativa de superar as objeções dos adjuvantes oleosos de base mineral (EDELMAN, 1980).

Atualmente, alguns tipos de óleos vegetais vêm sendo estudados como adjuvantes alternativos como por exemplo, o óleo de soja e o de amendoim (CHANG *et al.*, 1998), principalmente pelo fato de serem biodegradáveis e de baixo custo de obtenção. Além disso eles apresentam, normalmente, menos reações adversas indesejáveis, como ocorre com adjuvantes baseados em óleos de natureza mineral.

As primeiras análises sobre o efeito de óleos vegetais utilizados como adjuvantes de vacinas foram realizados por Hilleman em 1966. Na ocasião, uma formulação que continha 86% de óleo de amendoim, 10% de Arlacel A[®] (surfactante) e 4% de monoesterato de alumínio (estabilizador), nomeada *adjuvant 65*[®], mostrou-se muito potente, segura e comparável ao Adjuvante Incompleto de Freund, ao ser testada em humanos. Porém, mesmo tendo sido licenciada em alguns países, seu uso foi suspenso devido à reatividade em humanos quando presente em determinados lotes de vacinas. Murray e colaboradores (1972), mostraram que a tal reatividade poderia estar relacionada ao Arlacel A[®], composto químico carcinógeno em alguns tipos de camundongos.

Kimura e colaboradores (1978), mostraram que a emulsão de óleo de sésamo é tão efetiva quanto o adjuvante incompleto de Freund na estimulação da produção de anticorpos, permanecendo estável por pelo menos três meses a 4°C, sem diminuir sua capacidade adjuvante, causando menor reação nos tecidos e linfonodos regionais.

1.4. Emulsões

Emulsões são sistemas heterogêneos compostos, geralmente, por dois líquidos imiscíveis, um dos quais está disperso no outro na forma de gotículas, caracterizando cada qual uma fase da emulsão, ou seja, uma fase aquosa e uma fase oleosa (SILVA e SOARES, 1996; LIEBERMAN *et al.*, 1988). Para uma emulsão é necessário que um líquido se encontre dividido em pequeníssimos glóbulos no seio de um outro, sendo que a fase que se apresentar dividida constitui a fase interna, dispersa ou descontínua, ao passo que o líquido que rodeia as gotículas da fase dispersa é denominado fase externa, dispersante ou contínua (PRISTA *et al.*, 1992).

A estabilidade das emulsões deve-se, principalmente, ao uso de tensoativos na sua preparação, compostos anfifílicos em cuja molécula existem grupamentos hidrófilos e lipófilos, que posicionam-se entre as duas fases da emulsão (aquosa e oleosa), originando a película interfacial que diminui a tensão entre elas estabilizando o sistema (GRIFFIN, 1949; LACHMAN *et al.*, 1986).

A instabilidade de uma emulsão é causada pela incompatibilidade entre os dois líquidos que formam a emulsão, gerando forças de repulsão entre os líquidos. Quanto maior a tensão interfacial, tanto maior será a repulsão e mais rápida a separação dos líquidos. A propriedade que gera a tensão interfacial é a polaridade da molécula. Quanto maiores as diferenças de polaridade entre os líquidos a serem combinados em uma emulsão, tanto mais difícil será manter a emulsão estável (CARMINI, 1997).

A formulação de antígenos em emulsões de óleo em água (O/A) permite uma disseminação mais rápida da fase oleosa, reduzindo a inflamação no lugar da aplicação comparado com a emulsão de água em óleo (A/O) (WOODARD, 1989), conhecida como adjuvantes depósito. Estes tipos de adjuvantes aumentam as respostas dos anticorpos lentamente e liberam pequenas quantidades do antígeno durante um longo período de tempo (ALEXANDER e BREWER, 1995). Para produzir uma emulsão óleo em água são utilizadas misturas de fase aquosa e oleosa contendo emulsificantes para estabilizar as gotículas de óleo (OTT *et al.*, 1995). Antígenos podem ser incorporados na emulsão durante o processo de emulsificação ou adicionados à emulsão após ela ter sido formada (DONELLY, 1997). Os antígenos hidrofílicos pode ser emulsificados em A/O e os antígenos lipofílicos em emulsões de O/A (BECHER, 1965).

O Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) é uma característica dos tensoativos e está intimamente ligado à estrutura da molécula do tensoativo. EHL representa um sistema de classificação dos tensoativos, tendo como base os parâmetros de solubilidade desses compostos em solventes polares e/ou apolares (TREGUIER *et al.*, 1972).

A determinação do EHL é realizada pela preparação de emulsões seriadas dos óleos obtidas a custa de um emulgente ou um par destes de EHL conhecidos, misturados em proporções variáveis, de modo a originarem valores definidos e escalonados de EHL. O EHL de um determinado óleo corresponderá ao EHL da mistura do par de tensoativos que, dentro das condições operatórias de trabalho, permitirá obter com esse óleo uma emulsão mais estável (PRISTA *et al.*, 1992; TREGUIER *et al.*, 1972).

O EHL da mistura receberá um valor intermediário entre os valores de EHL dos dois tensoativos. A fórmula abaixo é utilizada para calcular o valor do EHL da mistura dos tensoativos:

$$\text{EHL}_m = \frac{\text{EHL}_a \cdot (X) + \text{EHL}_b \cdot (100-X)}{100}$$

onde:

EHL_m = equivale ao EHL da mistura de tensoativos

EHL_a = equivale ao EHL do tensoativo lipófilo

EHL_b = equivale ao EHL do tensoativo hidrófilo

X = equivale a fração percentual do tensoativo lipófilo

Em muitos estudos realizados com o intuito de encontrar um par de tensoativos ótimo para obter um sistema emulsionado estável, é prática comum manter constante a quantidade total da mistura de tensoativos, enquanto os limites dos tensoativos hidrófilos e lipófilos são variados. Embora o sistema EHL seja muito simples de trabalhar, sua principal desvantagem tem sido a falta de precisão para predizer a composição ótima requerida para formular emulsões (LIN, 1991).

1.5. Nutrientes e minerais imunoestimulantes

Há alguns anos identificou-se que algumas substâncias biológicas podem influenciar na prevenção de várias doenças por ativar o sistema de defesa do organismo. Estas substâncias foram designadas imunoestimulantes, e podem ser produzidas por diferentes fontes (ENGSTAD e ROBERTSEN, 1993).

Várias classes de substâncias, naturalmente presentes nos alimentos, apresentam propriedades funcionais fisiológicas. Os minerais e nutrientes mais conhecidos que atribuem funções fisiológicas no sentido de estimular o sistema imune são selênio, zinco, β-caroteno, piridoxina (vitamina B₆), vitamina B₁₂, ácido ascórbico (vitamina C), α-tocoferol (vitamina E), colecalciferol (vitamina D) e flavonóides (KRUNGER e MANN, 2003; ASSIS, 2007; BRUNETTO *et al.*, 2007).

Os carotenóides têm sido relacionados com a ativação do sistema imune e a redução do risco de doenças degenerativas. Tais efeitos biológicos estão atribuídos à propriedade antioxidante dos carotenóides (BRITTON, 1995). Dos mais de 600 carotenóides conhecidos, aproximadamente 50 são precursores da vitamina A. Entre os carotenóides, o β-caroteno é o mais abundante em alimentos e o que apresenta a maior atividade desta vitamina (AMBRÓSIO *et al.*, 2006).

A vitamina A exerce inúmeras funções no organismo, destacando, por sua relevância, a visão, o crescimento, a manutenção do tecido epitelial e da função imunológica (OLSON, 1969; LI e NORRIS, 1996; EL BEITUNE *et al.*, 2003). Em estudos experimentais, a deficiência de vitamina A associa-se à redução da produção de anticorpos contra polissacarídeos bacterianos e antígenos protéicos (PARENT *et al.*, 1984).

As concentrações fisiológicas dos retinóides estão relacionadas à resistência orgânica contra as infecções. Nesse contexto, há evidências de que os retinóides modulam a resposta de células fagocitárias, estimulando a fagocitose e a ativação da citotoxicidade mediada por células (GARBE *et al.*, 1992; SEMBA *et al.*, 1993).

Entre os imunoestimulantes mais estudados estão o zinco orgânico e a vitamina E (revisado por CARDOSO *et al.*, 2004). A vitamina E está presente em grandes quantidades nos óleos vegetais e sementes oleaginosas (AZZI e STOCKER, 2000) e tem atuação importante sobre o sistema imune. Possui influência na proliferação das células que compõe o sistema imune e de produção de anticorpos, e também apresenta ação antioxidante e protetora da integridade das membranas (revisado por CARDOSO *et al.*, 2004). A vitamina E estimula a atividade de macrófagos e neutrófilos circulantes e também é relatada como estimulante da atividade de linfócitos T, resultando no aumento na atividade fagocítica e de produção de anticorpos contra diversos antígenos (revisado por CARDOSO *et al.*, 2004).

A vitamina E tem a capacidade de impedir a propagação das reações induzidas pelos radicais livres nas membranas biológicas. Os danos oxidativos podem ser inibidos pela ação antioxidante dessa vitamina, juntamente com a vitamina C e os carotenóides, constituindo um dos principais mecanismos de defesa endógena do organismo (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

De acordo com Tengerdy e Lacetera (1991), as vitaminas A e E são imunopotenciadores porque elas protegem as células sensíveis do sistema imune dos danos oxidativos e aumentam a interação celular por alteração da membrana.

Os flavonóides englobam uma classe importante de substâncias de origem natural encontrados com frequência na natureza, unicamente em vegetais. Tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre os sistemas biológicos, por exemplo, como imunoestimulante (LOPES, 2003).

1.6. Extratos de origem vegetal

A utilização de extratos vegetais naturais data de milhares de anos e muitos deles têm fornecido a base para modernos medicamentos (UTIYAMA, 2004). Os compostos naturais, além de diversos, são extremamente específicos nas suas atividades biológicas, constituindo uma das maiores fontes para a descoberta de novos produtos. O interesse por esses compostos voltou a crescer tendo como expectativa diminuir o custo de pesquisa e desenvolvimento de produtos (WERBACH e MURRAY, 1994). Recentemente, o desenvolvimento de produtos, a partir de espécies vegetais, tem sido retomado no cenário mundial, acompanhado de um aumento significativo nos investimentos em pesquisa. A prospecção de novas moléculas volta a constituir uma demanda da indústria farmacêutica no sentido de diminuir custos e aumentar a eficácia dos produtos comerciais voltados para saúde humana e animal (VILLAS BOAS e GADELHA, 2007).

Apesar de pouco explorados, os produtos vegetais continuam sendo uma das maiores fontes para a descoberta de novos medicamentos. Cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e cerca de 30% são originários de plantas, isoladas diretamente ou produzidos por síntese a partir de um precursor vegetal (KIRKPATRICK, 2002). Dos produtos anticâncer e antimicrobianos presentes no mercado cerca de 60-80% são derivados dos vegetais (CRAGG *et al.*, 1997).

O desenvolvimento de produtos de base natural ainda é complexo, envolvendo estudos químicos, farmacológicos e clínicos (DREWS, 2000). Muitas vezes, o conhecimento da população sobre os produtos naturais que as rodeiam pode ajudar os pesquisadores a direcionar suas buscas por produtos que realmente apresentam efetividade.

Extratos oleosos de origem vegetal representam uma fonte de ácidos graxos (COLLI, 2003) e vitaminas. O papel dos ácidos graxos poliinsaturados sobre o sistema imune vem sendo bastante estudado nos últimos anos. Os interesses atuais giram em torno dos ácidos graxos ômega 3 (ácido linolênico) e 6 (ácido linoléico), que são encontrados em peixes, óleos vegetais e alguns tipos de sementes oleaginosas (ANDRADE e DO CARMO, 2006; PIMENTEL *et al.*, 2005). Além de possuírem alto valor energético, eles apresentam grande importância pelo seu papel farmacológico, pois participam de reações inflamatórias e estão diretamente relacionados à resistência imune (WAITZBERG e BORGES, 2002; CURI *et al.*, 2002; MAHAN, 1998).

1.6.1. Própolis

A própolis, que revela uma variedade de atividades biológicas contra vírus, bactérias, fungos, protozoários patogênicos e também células tumorais, é um material resinoso produzido por abelhas (CASTRO, 2001). Muitos trabalhos ilustram a diversidade de atividades biológicas da própolis e, dentre elas, a imunomoduladora, apesar de que muitos dos mecanismos de ação ainda são desconhecidos (ORSI *et al.*, 2000; CASTRO, 2001; PARK, 2002; GONSALES *et al.*, 2006; ORSI *et al.*, 2006;).

Estudos químicos revelaram a complexa composição da própolis, com mais de 300 constituintes, incluindo alguns compostos fenólicos tais como flavonóides e derivados dos ácidos hidroxicinâmico. Estas características podem variar de acordo com as espécies das abelhas e o período do ano. No entanto, a origem botânica parece ser o fator mais importante a ser considerado na tentativa de explicar a variabilidade química entre diferentes amostras de própolis (BANKOVA *et al.*, 2000).

A própolis verde, encontrada somente no Brasil, é produzida a partir de uma planta comumente conhecida como “Alecrim do Campo” (*Baccharis dracunculifolia*). Esta espécie não é adaptada às condições naturais de outros países conferindo para a própolis verde características químicas e biológicas próprias (MIYATAKA *et al.*, 1997).

1.6.2. Buriti (*Mauritia flexuosa* Mart.)

O buriti, de bom aproveitamento econômico no estado selvagem, e mais ainda se for racionalmente melhorado e cultivado, atualmente encontra-se sub utilizado. O seu aproveitamento atual se restringe apenas aos interesses domésticos das populações locais. É encontrado principalmente na região norte, como também em extensas áreas do Brasil Central (GODOY e RODRIGUEZ-AMAYA, 1995).

Fruta nativa do cerrado, o buriti apresenta teores de vitaminas do complexo B, tais como as vitaminas B1, B2 e PP, equivalentes ou superiores aos encontrados em frutas como o abacate, a banana e a goiaba, tradicionalmente consideradas como boas fontes destas vitaminas (EMBRAPA, 2008).

Existem vários alimentos que são fontes de carotenóides, entretanto o buriti e o dendê, que são frutos de palmeiras, se destacam como as fontes mais ricas de pró-vitamina A, encontradas na biodiversidade brasileira (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997). Devido às grandes quantidades de β -caroteno, α -caroteno e γ -caroteno, o buriti é uma das maiores reservas naturais de pró-vitamina A, apresentando um valor de vitamina A em torno de 6.500 ER (equivalentes de retinol) / 100 g, levando-se em consideração apenas as pró-

vitaminas e suas respectivas atividades (GODOY e RODRIGUEZ-AMAYA, 1995). O teor de vitamina A do óleo de buriti é também superior ao óleo de milho refinado, óleo de fígado de bacalhau e de cenoura (PEIXOTO, 1973).

O óleo de buriti revelou-se 10 vezes mais rico em β -caroteno que o óleo de dendê (MARIATH *et al.*, 1989), sendo detectado em quantidades substanciais, numa faixa de 334,8 a 398,1 $\mu\text{g/g}$, representando em média 70% dos carotenóides totais presentes no buriti (GODOY e RODRIGUEZ-AMAYA, 1995). O buriti também é rico em cálcio (113 mg/100 g), possui 26 mg/100 g de ácido ascórbico, 19 mg/100 g de fósforo, 3,5 mg/100 g de ferro e 11,4 g/100 g de fibra (PEIXOTO, 1973). A polpa corresponde a 30% do fruto, apresentando 23% de óleo que contém alto teor de ácido oléico e ácidos insaturados (EMBRAPA CERRADOS, 2002).

1.6.3. Amendoim (*Arachis hypogaea*)

O amendoim é rico em energia e seu grão contém 45-50% de óleo (KASAI *et al.*, 1998), composto principalmente pelos ácidos oléico, linoléico e palmítico, perfazendo mais de 80% do total dos ácidos graxos da semente do amendoim. A importância do consumo do amendoim reside no fato de ser um alimento de alto valor nutricional, rico em proteínas, vitaminas do complexo B e E e vários minerais, em que o potássio, magnésio, fósforo, ferro e zinco são os principais (EMBRAPA, 2005).

Amendoins são uma boa fonte de niacina, portanto contribuem para uma boa saúde do cérebro e da circulação sanguínea (BUTTERWORTH, 2004). Pesquisas recentes sobre amendoins e nozes em geral encontraram antioxidantes e outras substâncias químicas que podem trazer benefícios à saúde (DILLEHAY, 2007). São também uma fonte importante de resveratrol, um composto químico estudado por suas características contra o envelhecimento e também por estar associado à redução de algumas doenças cardiovasculares e de risco de câncer (YAO, 2004).

De acordo com o PDCAAS (*protein digestibility corrected amino acids score*), as proteínas do amendoim e de outros legumes, como a soja, por exemplo, apresentam valores nutricionais equivalentes as proteínas da carne e de ovos para o crescimento e saúde humanos (YAO, 2004).

2. JUSTIFICATIVA

Dados do IBAMA relatam que o Brasil detém cerca de 20% de toda a biodiversidade do planeta. O fato do Brasil contar com uma notável riqueza biológica lhe dá uma vantagem competitiva para o desenvolvimento da biotecnologia, gerando maior agilidade nos processos de transformação do conhecimento científico em produtos e processos inovadores. Produtos de origem vegetal atendem aos mais diversos segmentos industriais, devido às propriedades medicinais e o seu uso sustentável proporciona o desenvolvimento de produtos de uso comercial e a conservação dos recursos naturais.

A prospecção de novos produtos, a partir de espécies vegetais, contribui para o conhecimento da biodiversidade e do seu potencial, favorecendo o crescimento econômico. Portanto, pesquisas com extratos vegetais são promissoras e de fundamental importância na área da bioprospecção, sendo fomentadas por diversas instituições públicas e privadas.

A indústria farmacêutica tem experimentado ondas de inovações, com o surgimento, nos últimos anos, de um crescente interesse nas substâncias de fontes naturais. Os óleos vegetais, por exemplo, apresentam inúmeros benefícios, muitos contêm vitaminas e minerais que exercem importante papel no funcionamento do sistema imune. Além disso, os óleos são fontes de ácidos graxos, importantes para a regulação de processos fisiológicos do organismo, sendo alguns deles reportados como agentes imunorreguladores, exercendo ação sobre células-T.

Progressos recentes no desenvolvimento de vacinas têm permitido seu uso não somente como produto profilático, mas também no tratamento de câncer, desordens imunológicas e infecções crônicas. A produção de vacinas virais inativadas é um processo que envolve a propagação celular seguida da introdução do vírus para sua multiplicação. Ao final do processo, o agente infeccioso é submetido a uma etapa de inativação e, na formulação final do produto, adicionam-se, ainda, adjuvantes à suspensão de antígenos.

As vacinas virais inativadas são normalmente produzidas a partir de amostras virulentas, que são tratadas com agentes químicos ou físicos que levam à perda de infectividade, mas não da imunogenicidade. Desde que elaboradas adequadamente, essas vacinas são seguras, pois não há multiplicação do agente infeccioso. Entretanto, as vacinas inativadas devem conter grandes quantidades do antígeno e, normalmente, exigem mais de uma aplicação, além do uso de adjuvantes para induzir uma resposta imunológica adequada.

Há mais de 60 anos os adjuvantes vêm sendo utilizados na imunologia experimental e na vacinação animal onde seu uso adequado dispensa doses elevadas, bem como aplicações freqüentes do antígeno sensibilizante. A escolha do adjuvante de uma vacina é, sem dúvida, uma das principais etapas a serem cumpridas durante o projeto de desenvolvimento de um produto. O seu uso nas vacinas é uma tendência do mercado por conferir imunidade com altos índices de eficácia, induzindo e prolongando a resposta imune.

A parvovirose suína é uma doença infecciosa causada pelo parvovírus suíno, caracterizada por perdas econômicas devido a falhas reprodutivas nos animais infectados. É um dos problemas mais sérios da suinocultura industrial em todo o mundo, sendo enzoótica em grande número de rebanhos sorologicamente testados. O uso de vacinas inativadas tem-se mostrado o método mais efetivo para o controle da parvovirose suína, garantindo que fêmeas adultas desenvolvam imunidade ativa antes da primeira procriação.

Neste estudo, a capacidade adjuvante de extratos de origem vegetal é testada na formulação de vacinas contendo o parvovírus suíno inativado como antígeno, sendo avaliada a resposta imunológica de cobaios vacinados. A execução do projeto foi realizada em parceria da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes) com a Vallée S.A. (Montes Claros - MG), empresa nacional do setor veterinário, promovendo a integração entre esses dois setores para o desenvolvimento de novos produtos imunobiológicos.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de extratos de origem vegetal como adjuvante de vacinas experimentais inativadas contra o parvovírus suíno.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial do extrato de própolis verde e óleos de buriti e amendoim em estimular o sistema imunológico, quando incorporado a vacinas contra o parvovírus suíno.
- Determinar o valor do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) para os óleos de amendoim e buriti que proporcione uma maior estabilidade das emulsões.
- Avaliar a inocuidade do extrato de própolis verde e óleos de buriti e amendoim quando utilizado como adjuvante nas vacinas contra o Parvovírus Suíno.
- Comparar a resposta imune dos animais vacinados com a vacina experimental frente a vacina comercial disponível contra o parvovírus suíno.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local

O trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Vacinas (LTV) da Vallée S/A. A imunização dos animais foi realizada no Biotério de pesquisa e desenvolvimento da Vallée S/A, que possui salas separadas para criação, infecção e quarentena de cobaias.

Utilizou-se na pesquisa cobaias (*Cavia porcellus*) de ambos os sexos e de peso variando de 350 g a 450 g. Os animais foram mantidos em instalações projetadas para criação e/ou infecção de animais de forma a atender às recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os cobaias foram alojados em gaiolas de polipropileno, que eram limpas três vezes por semana, substituindo as gaiolas sujas por outras limpas e forradas com maravalha especial de pinus.

No Biotério, os animais foram mantidos à temperatura de 22 a 24°C. As salas de criação são dotadas de um sistema de ventilação para controlar a temperatura e umidade, com 10 a 15 trocas de ar por hora. Foi estabelecido o fotoperíodo nas salas dos animais para 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

Foram fornecidas, aos animais, água filtrada em frascos de plástico com rolhas de borracha, usadas como tampa, e bico em aço inox além de ração peletizada específica para cobaias (Figura 1). Tanto a ração quanto a água eram trocadas às segundas, quartas e sextas-feiras. Todos os resíduos gerados no biotério foram destinados à incineração.

Os experimentos com a utilização dos animais foram aprovados quanto aos princípios éticos de experimentação animal pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, conforme protocolo 229/2007 e certificado de aprovação para uso de animais (Anexo 1).

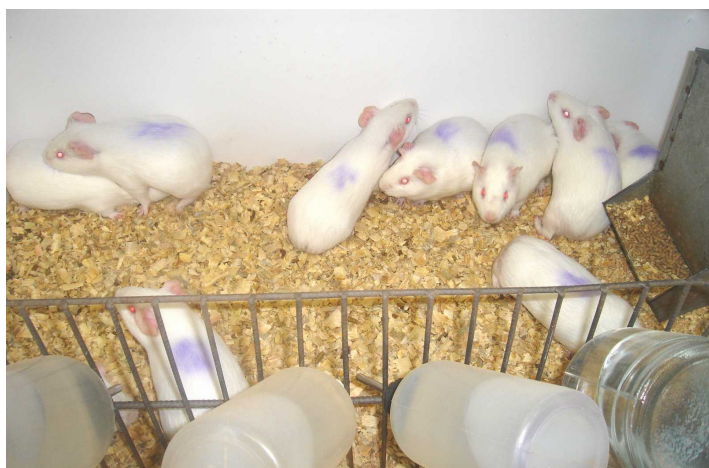


Figura 1: Cobaias (*Cavia porcellus*) utilizados como modelo experimental das vacinas formuladas com diferentes adjuvantes contra o parvovírus suíno.

4.2. Soluções e Reagentes

4.2.1. Meio de cultura celular e viral

Utilizou-se para o cultivo das células o meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – DMEM (Invitrogen[®]) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab[®]), 1,5 g/L de bicarbonato de sódio e de solução de antibiótico e antimicótico, composta de 7 g/L de penicilina G potássica, 16 g/L de sulfato de neomicina e 0,025 g/L de fungizon. Para o preparo utilizou-se água ultrapura produzida pelo sistema Milli Q (Millipore[®]). O pH foi ajustado para 7,0.

O meio de infecção possui a mesma constituição do meio de células acrescido de 5,6 g/L de tampão HEPES (GIBCO[®]) e suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB).

A esterilização dos meios formulados foi feita por filtração em filtro descartável de 0,22 μm (Millipore[®]). Os meios foram armazenados a temperatura de 4°C até o momento do uso (FERNANDES, 2005)

4.2.2. Meio de congelamento celular

Utilizou-se para o congelamento das células o meio DMEM suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino e 10% de Dimetilsulfóxido – DMSO (Merck[®]). O meio foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 μm (Millipore[®]) (conforme Procedimento Operacional Padrão (POP) – LTV/Vallée).

4.2.3. Tripsina

A formulação da solução de tripsina, utilizada para o desprendimento celular, continha cloreto de sódio (10 g/L), cloreto de potássio (0,25 g/L), fosfato de sódio bibásico (1,44 g/L), fosfato de potássio monobásico (0,25 g/L), fungison (0,0025 g/L), penicilina (0,07 g/L), Verseno triplex – EDTA (0,5 g/L), tripsina 1:250 (2,5 g/L) e solução de vermelho de fenol a 1% (1,2 mL/L). A esterilização da solução foi feita por filtração em membrana de 0,22 µm (Millipore®) e esta foi armazenada a -20°C (conforme POP – LTV/Vallée).

4.2.4. Tampão salino-fosfatado

Preparou-se tampão salino-fosfatado (PBS) para diluição do vírus, de soro e para a lavagem das hemácias. A solução foi preparada pela mistura de cloreto de sódio (8,5 g/L), fosfato de sódio bibásico (1,2 g/L), fosfato de sódio monobásico (0,253 g/L) e solução de Soro albumina bovina – BSA (Sigma®) a 22% (4,55 mL/L). O pH foi ajustado para 7,2 com solução de hidróxido de sódio 1,0 N ou ácido clorídrico 1,0 N. A solução foi filtrada em membrana 0,22 µm (Millipore®) e armazenada a 4°C (conforme POP – LTV/Vallée).

4.3. Pesquisa pelos adjuvantes testes

Durante a pesquisa dos adjuvantes a serem testados seguiu-se alguns passos. Primeiramente buscou-se extratos de origem vegetal que apresentassem substâncias com potencial em estimular o sistema imunológico e que pertencessem a flora nacional. Dessa forma seriam agregados a prospecção de espécies vegetais, com potencial comercial, e o uso sustentável dos recursos naturais. Um outro passo foi à busca por empresas que trabalhassem com os extratos de interesse.

De posse de lista de espécies tidas como promissoras buscou-se fornecedores especializados no ramo de extração. O óleo de buriti, amendoim e extrato de própolis verde atenderam aos requisitos propostos, sendo cedidos gentilmente pelas empresas Croda do Brasil Ltda, Campestre Indústria e Comércio de Óleos Vegetais Ltda e MN Própolis Ind. e Com. Exp. Ltda, respectivamente.

4.4. Linhagem Celular

A multiplicação do vírus foi realizada em células de rim de suínos, SK6 (*Swine Kidney*), obtidas junto à *American Type Culture Collection* (ATCC).

4.4.1. Produção do Banco de células

Para a produção do Banco de Trabalho de Células, culturas iniciadas com $1,0 \times 10^5$ céls/mL e 48 horas de cultivo, foram tratadas com tripsina para o desprendimento das células. A concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer e as células suspensas em meio de congelamento de forma a obter uma concentração final de $6,0 \times 10^6$ céls/mL. A suspensão celular foi distribuída em criotubos e as ampolas transferidas para o ultrafreezer (ThermoForma[®]), onde permaneceram à temperatura de -80°C até o momento do uso (conforme POP – LTV/Vallée).

4.4.2. Sistema de Cultivo

As células foram produzidas em garrafas tipo T de poliestireno (Corning[®]) com área de 75 cm^2 . Realizou-se sub-cultivos a cada 2 dias com o meio DMEM, preparado conforme item 4.2.1, e mantidos à temperatura de 37°C . Para isso utilizou-se 3 mL de PBS para lavar a monocamada e cerca de 3 mL de solução de tripsina para a dissociação das células por degradação da matriz extracelular, permitindo a suspensão e determinação da concentração celular e início de um novo cultivo, com uma concentração inicial de $1,0 \times 10^5$ céls/mL (conforme POP – LTV/Vallée).

4.5. Cepa viral

Utilizou-se a cepa NADL2 do Parvovírus Suíno proveniente da ATCC para a produção do antígeno viral.

4.5.1. Multiplicação viral

O vírus foi multiplicado em células SK6, de acordo com protocolo descrito por Fernandes (2005). Monocamadas confluentes de SK6 foram tratadas com tripsina e suspensas em meio de cultura celular na concentração de $1,0 \times 10^5$ céls/mL. As células foram distribuídas em garrafas T75 e, após 24 horas, inoculadas com 3 mL da cepa padrão NADL2 (ATCC) com título de 512 UHA, diluída 1000 x. As células foram incubadas a 37°C por uma hora. A cada 15 minutos a garrafa era lentamente agitada para proporcionar uma melhor adsorção viral. Após a adsorção, completou-se o volume para 19 mL com meio de infecção (conforme POP – LTV/Vallée).

As células inoculadas foram incubadas a 37°C por 120 horas. Visando o rompimento celular e a conseqüente liberação das partículas virais ao meio externo foram

realizados três ciclos de congelamento e descongelamento. A suspensão viral foi coletada e clarificada por centrifugação a 320 x g, por 15 minutos (SOARES e BERSANO, 1998).

4.6. Titulação viral

A titulação viral foi feita pelo teste de hemoaglutinação (HA), realizada em placas de microtitulação de 96 poços com fundo em V, segundo o método descrito por Joo *et al.* (1976).

O vírus produzido foi acrescido nas placas e realizada diluição seriada (1: 2 a 1: 2.048) utilizando tampão fosfato salina (PBS) como diluente. Hemácias de cobaias foram lavadas com PBS e diluídas a fim de se obter suspensão de hemácias a 0,6% de células em 100 mL de PBS e transferida aos poços da microplaca. As placas foram incubadas durante 60 minutos à temperatura de 25°C.

Realizou-se a leitura pela observação ou não da aglutinação das hemácias. A presença de hemácias aglutinadas indicava a presença do vírus. O título foi dado pela recíproca da maior diluição que produziu a completa aglutinação das hemácias.

Como títulos hemoaglutinantes são expressos como a recíproca da maior diluição do vírus que causa hemoaglutinação completa (Figura 2C) (JOO *et al.*, 1976), diluições contendo suspensões virais que apresentavam aglutinação parcial ou incompleta (Figura 2B), não foram considerados para a titulação.

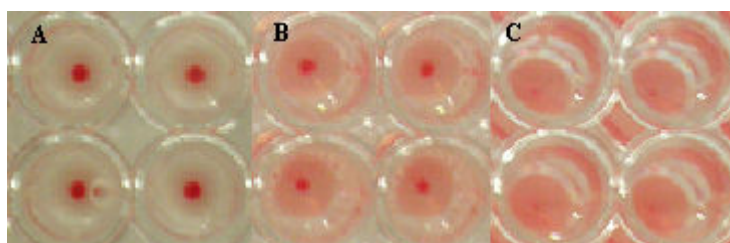


Figura 2. Titulação viral do parvovírus suíno pela técnica da hemoaglutinação. Poços da microplaca com ausência do parvovírus suíno, demonstrada pela precipitação das hemácias (A); poços da microplaca com aglutinação incompleta das hemácias (B) e poços da microplaca com aglutinação completa das hemácias (C).

4.7. Inativação Viral

Após a clarificação viral foi adicionado β -propiolactona na concentração final de 0,4% e a suspensão foi mantida a 100 rpm, 37°C por seis horas. O pH foi ajustado para 7,5 com bicarbonato de sódio 7,5%, sempre que necessário (LOBATO, 1990). Após a inativação, a suspensão viral foi mantida sob refrigeração a 4°C até o momento do uso.

O controle de vírus residual não inativado foi feito através da inoculação de uma alíquota de vírus inativado em células SK6, que foram observadas quanto à presença ou ausência de efeito citopático (ECP). Realizou-se três sub-cultivos com sete dias de incubação cada (adaptado de Fernandes, 2005).

4.8. Estudos de Adjuvantes

Após a inativação, foram preparadas cinco formulações de vacinas, duas oleosas e três aquosas. A quantidade de antígeno foi padronizada com título de 15.360 unidades hemoaglutinantes (UHA)/dose em todas as vacinas formuladas. As vacinas oleaginosas foram formuladas na proporção de 58% de fase oleosa, 2% de tensoativo e 40% de fase antigênica (vírus inativado) com título hemoaglutinante de 1024 UHA. Já as vacinas aquosas foram obtidas pela adição de 20% de adjuvante na porção viral inativada. As vacinas aquosas foram mantidas em agitação para que ocorresse a adsorção do antígeno com o adjuvante e as oleosas foram emulsionadas.

Os experimentos foram realizados em duas etapas. Na primeira etapa foram formulados 05 tipos de vacinas com vírus inativado e os seguintes adjuvantes:

- a) óleo de buriti, obtido junto à empresa Croda do Brasil Ltda, Campinas – SP.
- b) óleo de amendoim, obtido junto à empresa Campestre Indústria e Comércio de Óleos Vegetais Ltda, São Bernardo do Campo – SP.
- c) extrato de própolis verde, com concentração de 20% (m/v), obtido junto à empresa MN Própolis Ind. e Com. Exp. Ltda, Mogi das Cruzes – SP.
- d) hidróxido de alumínio produzido pela Vallée S/A como controle positivo dos adjuvantes aquosos.
- e) meio de cultura: controle negativo.

4.9. Testes de emulsão

Realizou-se a determinação do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) das preparações contendo óleos de amendoim e buriti. Foram testadas emulsões seriadas dos óleos utilizando tensoativos de EHL conhecidos, misturados em proporções variáveis, de modo a obter valores definidos e escalonados de EHL. Os tensoativos utilizados foram Trioleato de sorbitana (Span 85[®], de EHL 1,8), Monooleato de sorbitana (Span 80[®], EHL 4,3) e Monooleato de polioxietilenosorbitano (Tween 80[®], EHL 15).

Utilizou-se 40% da fase aquosa, 58% da fase oleosa e 2% de tensoativos. As emulsões foram preparadas utilizando agitador mecânico Silverson® a 5000 rpm por 10 minutos. Os valores de EHL testados estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) utilizados para os testes de emulsões dos óleos de amendoim e buriti.

ÓLEOS	EHL
Amendoim	5,0; 5,3; 5,9; 6,4; 7,0 e 7,5
Buriti	1,8; 5,0; 5,3; 6,4; 7,0 e 7,5

As emulsões preparadas foram mantidas em repouso à temperatura de 4°C. Admite-se que o valor de EHL da emulsão mais estável corresponde ao do óleo em ensaio (ZANIN *et al.*, 2002). O EHL da emulsão é a soma dos valores correspondentes aos do EHL dos seus constituintes, de acordo com as respectivas concentrações (WILKINSON *et al.*, 1990). Para a formulação das vacinas a serem testadas, utilizou-se a emulsão que apresentou maior estabilidade dentre todos os valores de EHL testados (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Relação da fase oleosa, aquosa e dos tensoativos Tween 80® e Span 80® definidos para estabelecer o Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) do óleo de amendoim.

Emulsão	Tween 80 (%)	Span 80 (%)	Fase oleosa (mL)	Fase aquosa (mL)	EHL
1	7	93	58	40	5,0
2	9	91	58	40	5,3
3	15	85	58	40	5,9
4	20	80	58	40	6,4
5	25	75	58	40	7,0
6	30	70	58	40	7,5

Para a emulsão 7 utilizou-se o óleo de buriti. Os volumes da fase oleosa e aquosa corresponderam aos apresentados na tabela 3 e como surfactante empregou-se o Span 85®, representando 100% do tensoativo utilizado para este teste de emulsão, sendo o valor do EHL de 1,8.

Tabela 3. Relação da fase oleosa, aquosa e dos tensoativos Tween 80[®] e Span 80[®] definidos para estabelecer o Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) do óleo de buriti.

Emulsão	Tween 80 (%)	Span 80 (%)	Fase oleosa (mL)	Fase aquosa (mL)	EHL
8	7	93	58	40	5,0
9	9	91	58	40	5,3
10	20	80	58	40	6,4
11	25	75	58	40	7,0
12	30	70	58	40	7,5

4.10. Esterilidade das vacinas

Empregou-se caldo tioglicolato e triptose, para a verificação do crescimento de bactérias e ágar Sabouraud, para a observação da possível presença de fungos. Amostras das vacinas foram transferidas para tubos contendo caldo tioglicolato e triptose, mantidos a 37°C e caldo Sabouraud, incubados à temperatura ambiente. Realizou-se as leituras diariamente por um período de 14 dias (USP, 2007).

4.11. Modelo experimental

Como o enfoque deste trabalho é o da prospecção por extratos com potencial adjuvante em vacinas contra o PVS, utilizou-se cobaias como modelo experimental com o intuito de obter uma visão geral da atuação dos diferentes adjuvantes experimentais. Além disso, o uso desses animais contribui por diminuir o custo para sua aquisição e manutenção além da facilidade de manejo para as coletas dos volumes sanguíneos adequados às necessidades da análise.

4.12. Esquema de vacinação

Os testes de avaliação imunológica das vacinas foram realizados no biotério experimental da Vallée S.A. Os animais foram divididos ao acaso em seis grupos de 10 animais para cada vacina. A Tabela 4 apresenta os grupos de animais vacinados. Os animais do grupo 5 receberam vacina contendo meio de cultura, os do grupo 6 não foram vacinados.

Os animais foram vacinados revacinados 15 dias após a primeira vacinação (LOBATO *et al.*, 1993). A via de administração das vacinas foi subcutânea.

Tabela 4: Vacinas teste para os ensaios de avaliação imunológica.

Grupos	Vacinas
1	Adjuvante buriti
2	Adjuvante amendoim
3	Adjuvante própolis verde
4	Adjuvante hidróxido de alumínio
5	Sem adjuvante
6	Grupo controle

4.13. Avaliação de Inocuidade das vacinas

Todas as formulações de vacinas foram avaliadas quanto à inocuidade em cobaias. Os animais foram avaliados durante 7 dias depois de cada uma das doses. Manifestação dolorosa no local da aplicação, desenvolvimento de nódulos e alterações de comportamento foram os principais parâmetros avaliados.

4.14. Coletas de sangue dos cobaias vacinados

Coletou-se amostras de sangue dos animais vacinados no dia 0 (dia da vacinação) e dias 15 e 60 após a primeira vacinação (FERNANDES, 2005). As coletas de sangue foram realizadas por punção cardíaca, permitindo a coleta de sangue em quantidade satisfatória para obtenção de soro para realização da titulação de anticorpos neutralizantes em triplicata.

Cada animal foi injetado por via subcutânea com atropina, na dose de 0,044 mg/ kg. De 10 a 15 minutos após, os animais foram anestesiados via intramuscular com 100 µL/100 g peso vivo de uma solução contendo 2,5 mg/ 0,1 mL quetamina e 1 mg/ 0,1 mL de cloridrato de xilazina. No momento da coleta, o cobaio foi posicionado em decúbito lateral direito, fixando-se firmemente as extremidades. Uma área de aproximadamente 1,25 cm², cobrindo o 4º e 5º espaços inter-costais, e 2,5 cm da linha média, foi desinfetada com álcool iodado. A posição do coração foi localizada mediante a palpação digital de seus batimentos. A punção foi realizada com agulha 20 x 38 mm através do espaço intercostal correspondente, permitindo que o sangue fluísse lentamente para o interior da seringa e quando se completou a extração, a seringa foi retirada lentamente (MANSONE, 1999).

Cerca de 2 mL de sangue foram coletados em tubos de ensaio. As amostras foram processadas, por centrifugação a 400 x g por 15 minutos, para obtenção de um soro límpido e livre de hemácias que foi então armazenado à temperatura de -20°C. Estas

amostras de soro foram testadas para verificar a presença de anticorpos neutralizantes contra o parvovírus suíno.

4.15. Titulação de anticorpos neutralizantes

Os anticorpos contra o parvovírus suíno foram detectados e titulados através do teste de Inibição da Hemoaglutinação (HI). As reações de HI foram realizadas conforme descrito por Joo *et al.* (1976).

Resumidamente, os soros foram inativados pelo calor (56°C por 30 minutos) e adsorvidos à temperatura ambiente por uma hora com uma solução de caulim a 25% em solução salina borato (pH 9,0). Os adsorventes foram removidos por centrifugação a 1.500 x g por 10 minutos e o sobrenadante tratado com eritrócitos de cobaio à temperatura de 4°C por 1 hora. Novamente as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado. Os soros originais foram considerados como tendo sido diluídos 1:4 durante este tratamento.

Utilizou-se 100 µL de cada amostra de soro para a realização de diluições seriadas na base 2. Os soros foram diluídos de 1: 8 até 1: 262.144 em PBS seriadamente, de forma a completar um volume final de 50 µL para cada diluição, sobre as quais foram adicionados 50 µL de amostra viral positiva em HA, diluída de forma a conter 4 unidades hemoaglutinantes (UHA)/50 µL de solução. A mistura vírus/soro foi incubada por uma hora a 25°C. Em seguida, foram adicionados 50 µL de hemácias de cobaias 0,6% de células para 100 mL de PBS. Realizou-se a leitura das placas, após a incubação por duas horas à temperatura de 25°C, pela observação ou não da aglutinação das hemácias. O título foi dado pela recíproca da maior diluição que resultou em HA negativo, demonstrada pela ausência de hemoaglutinação das hemácias.

4.16. Avaliação da resposta imunológica de animais vacinados ao longo do tempo

Na segunda etapa avaliou-se a resposta das melhores vacinas frente a uma vacina comercial. A vacina que induziu a produção de maior título de anticorpos neutralizantes dentre as testadas na primeira etapa e a vacina controle foram formuladas novamente e comparadas com uma vacina comercial contra o parvovírus suíno, como forma de inferir sua eficácia.

Nesta fase utilizou-se quatro grupos de animais e cada grupo foi inoculado com uma das vacinas. Em intervalos de 15 dias, iniciando no dia da primovacinação, subgrupos de 3 animais foram anestesiados e amostras de sangue coletadas. A Tabela 5 apresenta o esquema de coleta de sangue dos animais para a avaliação da resposta imunológica. As

amostras de sangue foram processadas para a titulação de anticorpos neutralizantes. Todas as análises da segunda etapa deste trabalho foram realizadas nas mesmas condições que as análises da primeira etapa.

Tabela 5. Esquema de coleta de sangue dos animais para a avaliação da resposta imunológica ao longo do tempo.

Vacinas	Dias de coleta de sangue					Total de animais
	0	15	30	45	60	
1	3	3	3	3	3	15
2	3	3	3	3	3	15
3	3	3	3	3	3	15
4	3	3	3	3	3	15

4.17. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa 'R' versão 2.6.0. A normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste 'F'. As médias aritméticas dos logaritmos na base 2 (Log 2) dos títulos de anticorpos foram submetidas a análise de variância, considerando 5% de probabilidade, e para verificar diferença estatística entre as médias foram realizadas comparações de médias com utilização do contraste.

5. RESULTADOS

5.1. Cultivo das células SK6

O cultivo das células SK6 utilizando garrafas T 75 como sistema de cultivo se desenvolveu sem dificuldades. Após 72 horas de incubação a 37°C, o meio apresentava-se ácido e com células em suspensão, mas a monocamada mostrava-se completa. A fim de reduzir a acidez do meio as células passaram a ser cultivadas no tempo de 48 horas, onde a monocamada também apresentava-se completa.

5.2. Multiplicação e Inativação Viral

O vírus utilizado para a produção do banco de trabalho apresentava título viral de 256 UHA/ 50µL. Na multiplicação o título hemoaglutinante subiu de 256 UHA/ 50µL para 512 UHA/ 50µL. O parvovírus suíno, do banco de trabalho, foi multiplicado em 19 garrafas T 75, contendo células SK6, a fim de produzir antígeno para formulação das vacinas. Após cerca de 72 horas de infecção já se observava buracos na monocamada em decorrência do desprendimento celular. O vírus foi coletado com 120 horas de incubação, momento em que a monocamada apresentava-se bastante destruída (Figura 3). O título hemoaglutinante desta produção foi de 1024 UHA/ 50µL.

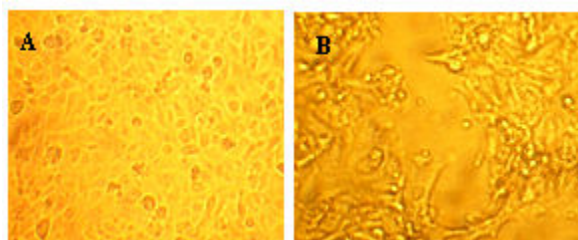


Figura 3. Células SK6 infectadas pelo parvovírus suíno. Aspecto da monocamada de células SK6 íntegra (A); monocamada de células SK6 com efeito citopático provocado pelo parvovírus suíno após 96 horas de incubação (B).

Ao final do teste de pesquisa de vírus residual não foi observado alterações na monocamada das células quando esta foi comparada à monocamada de células não infectadas, sendo a suspensão viral considerada inativada que posteriormente foi utilizada para a formulação das vacinas.

5.3. Testes de EHL dos óleos de amendoim e buriti

A análise das emulsões com o óleo de buriti e óleo de amendoim foi feita por visualização macroscópica da separação de fases oleosas e aquosas (Figuras 4, 5 e 6). A emulsão 2, composta de 58% do óleo de amendoim, 40% de fase aquosa e 2% dos tensoativos Tween 80[®] e Span 80[®], nas proporções de 9 e 91 %, respectivamente, mostrou-se a mais homogênea, correspondendo a emulsão de maior estabilidade dentre todas testadas com o óleo de amendoim (Tabela 6). A emulsão 1, composta de fase oleosa e aquosa igual a da emulsão 2 e com porcentagens dos tensoativos Tween 80[®] e Span 80[®] correspondente a 7 % e 93 %, respectivamente e com EHL de 5,0, apresentou separação de fases de menor porcentagem (21%) em relação as emulsões 3 (15% Tween 80[®] e 85% Span 80[®]), 4 (20% Tween 80[®] e 80% Span 80[®]), 5 (25% Tween 80[®] e 75% Span 80[®]) e 6 (30% Tween 80[®] e 70% Span 80[®]), que tiveram completa separação de fases, e consequentemente perda verdadeira da estabilidade da emulsão (Tabela 6 e Figura 4).

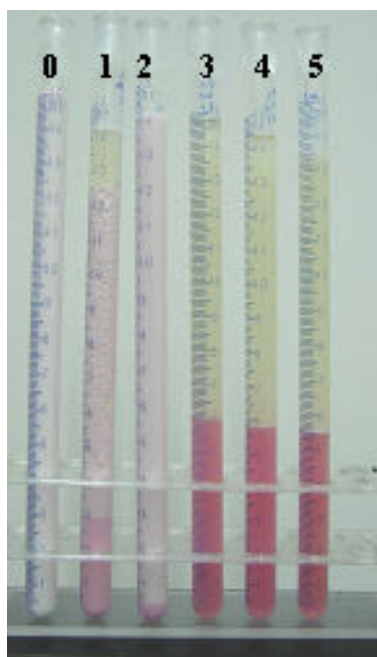


Figura 4. Teste de emulsões com diferentes valores de EHL para o óleo de amendoim. Controle oleoso (0), EHL=5 (1), EHL=5,3 (2), EHL=5,9 (3), EHL=6,4 (4), EHL=7,0 (5).



Figura 5. Teste de emulsão para o óleo de buriti utilizando EHL de 1,8.

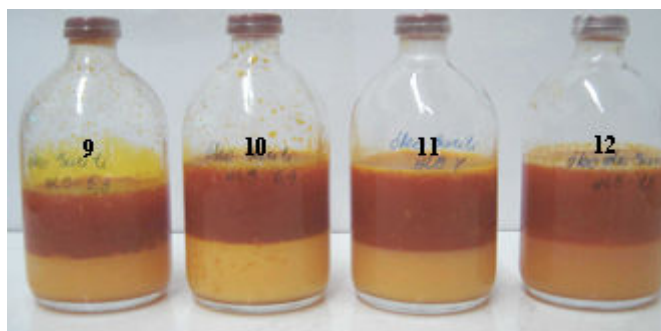


Figura 6. Teste de emulsões com diferentes valores de EHL para o óleo de buriti. EHL=5,3 (9), EHL=6,4 (10), EHL=7,0 (11), EHL=7,5 (12).

Tabela 6: Medidas da separação de fase das emulsões de amendoim utilizando EHL de 5,0 a 7,5 e óleo de buriti com EHL de 1,8 a 7,5.

Emulsão	Óleos	EHL	Separação de fases (%)
1	Amendoim	5,0	21,0
2	Amendoim	5,3	2,8
3	Amendoim	5,9	40,3
4	Amendoim	6,4	40,3
5	Amendoim	7,0	40,7
6	Amendoim	7,5	40,8
7	Buriti	1,8	(*)
8	Buriti	5,0	21,3
9	Buriti	5,3	28,0
10	Buriti	6,4	21,5
11	Buriti	7,0	31,4
12	Buriti	7,5	32,8

* não houve separação de fase evidente

Obs: os valores de separação de fases correspondem à fração aquosa, calculados com base no volume total de amostra

Diante desses resultados, verificou-se que o valor de EHL que proporcionou uma maior estabilidade em emulsões com o óleo de amendoim na concentração de 58% foi próximo de 5,3.

Utilizando o óleo de buriti para os testes de emulsões, o valor de EHL que proporcionou uma emulsão mais estável foi de 1,8. Já as emulsões 8 a 12 apresentaram separação de suas fases. As figuras 5 e 6 mostram as emulsões para o óleo de buriti.

Com base nestes resultados, para a formulação das vacinas foram utilizados EHLs nos valores de 5,3 e 1,8 para os óleos de amendoim e de buriti, respectivamente.

5.4. Teste de inocuidade das vacinas

As vacinas inoculadas em cobaios não induziram manifestações adversas nos animais durante o período de observação, que foi de 7 dias. O comportamento dos animais vacinados não diferiu dos animais que não receberam vacina, não houve queda de peso e o local da aplicação permaneceu inalterado para todas as vacinas testadas.

5.5. Avaliação da capacidade adjuvante dos óleos de amendoim, buriti e extrato de própolis verde sobre a síntese de anticorpos contra o parvovírus suíno.

A presença de anticorpos nos soros dos cobaios de cada grupo experimental foi avaliada pelo teste de Inibição da Hemoaglutinação (HI) após a vacinação dos animais com vacinas contendo diferentes adjuvantes. Os animais do grupo controle, que não receberam vacina, foram mantidos no mesmo ambiente e não apresentaram anticorpos contra o PVS, indicando que não houve infecção dos animais e que os títulos de anticorpos demonstrados pela técnica empregada são devidos ao estímulo imunológico promovido pelas vacinas.

Durante a primeira etapa desse trabalho, verificou-se que os títulos de anticorpos anti-PVS dos animais inoculados com a vacina formulada com o óleo de amendoim como adjuvante, no tempo de 15 dias após a primovacinação, foram maiores e diferiram significativamente dos títulos de anticorpos dos animais vacinados com vacinas contendo própolis, óleo de buriti, hidróxido de alumínio ou vacina sem adjuvante (Figura 7). O efeito adjuvante do óleo de amendoim contudo, não foi persistente, não apresentando diferença significativa em relação ao grupo que recebeu vacina sem adjuvante, no último tempo de coleta (Figura 8).

Sessenta dias após a primovacinação, os títulos de anticorpos dos animais que receberam a vacina contendo própolis ou hidróxido de alumínio foram maiores do que os títulos dos cobaios inoculados com a vacina que não continha adjuvante. Os títulos de

anticorpos dos animais vacinados com a vacina contendo o extrato de própolis verde como adjuvante não diferiu significativamente dos títulos dos animais inoculados com a vacina controle contendo hidróxido de alumínio em nenhum dos dois tempos de coleta de soro desta primeira etapa do teste (Figuras 7 e 8).

Ainda nesse último tempo de coleta, os títulos de anticorpos induzidos pela vacina contendo óleo de amendoim foram similares aos títulos dos animais inoculados com a vacina sem adjuvante (Figura 8). A vacina formulada com o óleo de buriti não exerceu atividade adjuvante quando comparada a vacina controle, sem adjuvante, nos dois tempos analisados (Figuras 7 e 8).

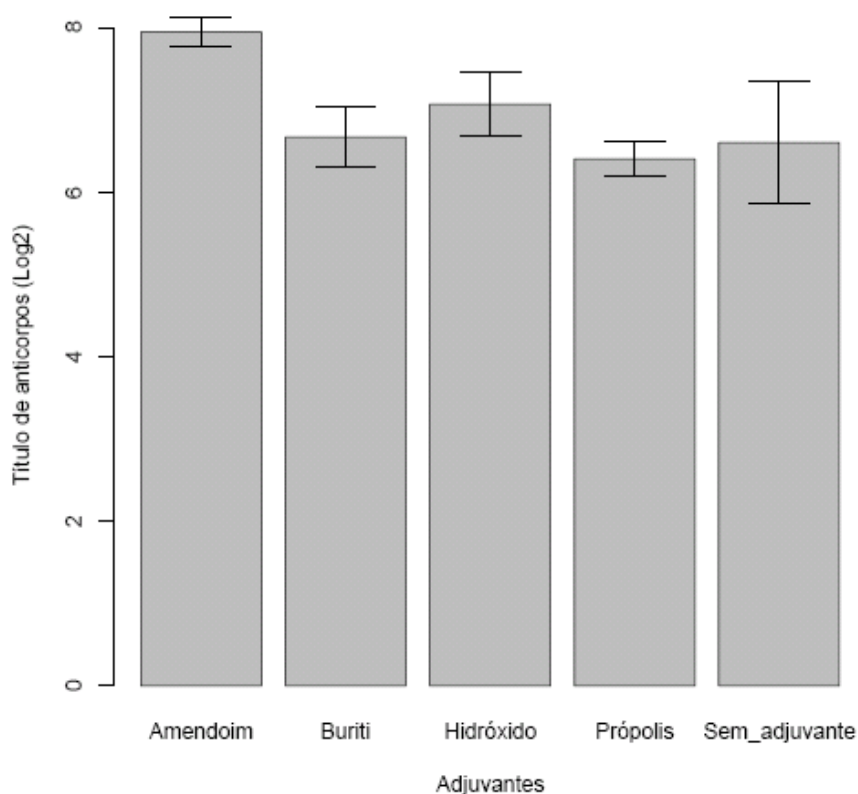


Figura 7. Títulos de anticorpos anti-PVS em cobaias induzidos por vacinas formuladas com diferentes adjuvantes, na resposta primária.

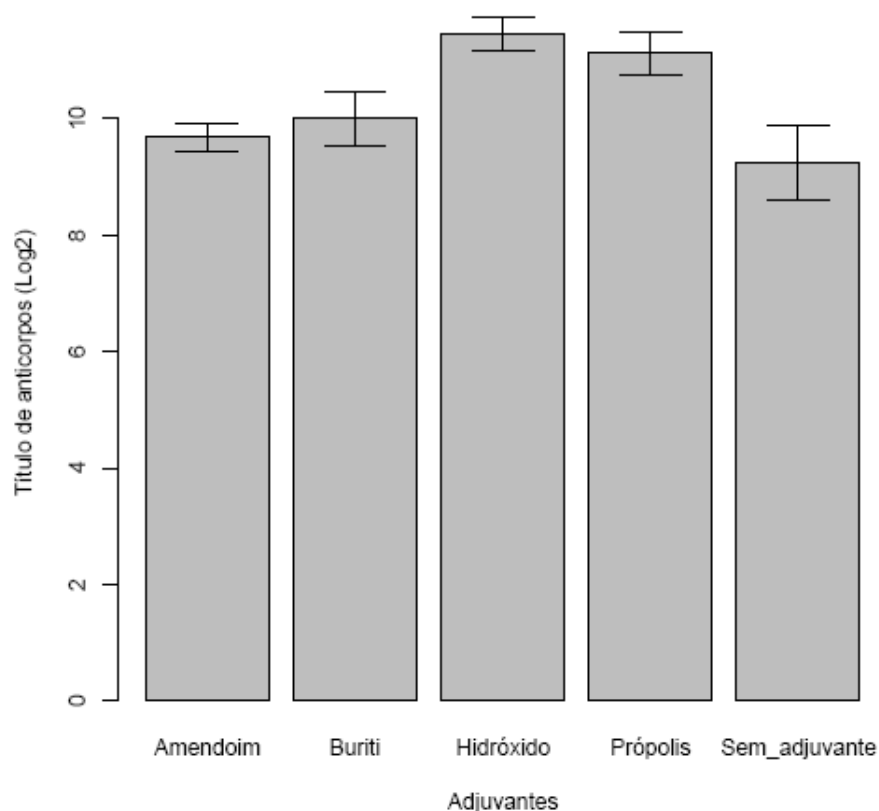


Figura 8. Títulos de anticorpos anti-PVS em cobaios induzidos por vacinas formuladas com diferentes adjuvantes, na resposta secundária.

5.6. Comparação da resposta imunológica induzida pelas vacinas experimentais frente a uma vacina comercial

De acordo com os resultados de títulos de anticorpos dos animais imunizados com as diferentes formulações de vacinas na primeira etapa desse trabalho, foram formuladas novamente as vacinas que apresentaram melhores resultados e comparadas com uma vacina comercial, tida como indutora de boa resposta imunológica contra a parvovirose suína.

Na primeira etapa verificou-se semelhança na resposta imune induzida pela vacina contendo extrato de própolis verde, que é uma vacina experimental, quando comparada ao seu controle, hidróxido de alumínio. Dessa forma decidiu-se desenvolver novamente a vacina contendo própolis (20%) e uma outra contendo a mistura do extrato de própolis e hidróxido (10 % de cada componente). Estas vacinas foram usadas paralelamente com a vacina comercial e vacinas contendo como adjuvante hidróxido de alumínio (20%).

Estatisticamente, os títulos de anticorpos nos animais vacinados com as vacinas contendo o hidróxido de alumínio e a mistura de hidróxido com própolis foram similares e apresentaram mesmo padrão de diferença quando comparados com os títulos de anticorpos

dos animais com a vacina comercial. Já a vacina contendo própolis verde induziu uma menor produção de títulos de anticorpos quando comparada às outras vacinas utilizadas nessa etapa, sendo esta diferença significativa (Figura 9).

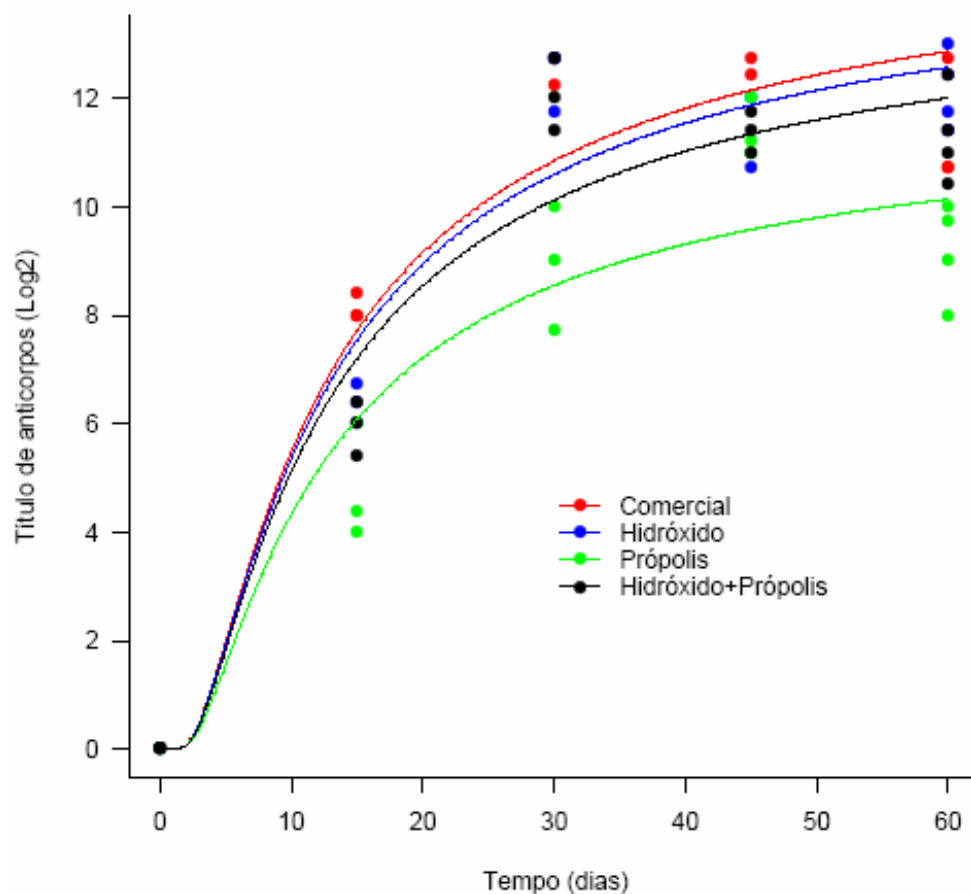


Figura 9. Síntese de anticorpos neutralizantes produzidos por cobaias em resposta às vacinas formuladas com diferentes adjuvantes ao longo de 60 dias.

6. DISCUSSÃO

Muitas espécies encontradas na pesquisa pelos adjuvantes a serem testados nesse trabalho foram consideradas promissoras, mas o seu uso foi impossibilitado devido à falta de extratos comerciais destas plantas. Como a ótica de uma instituição privada é, muitas vezes, mais direcionada ao aumento de escala de produção, torna-se mais viável a busca por fornecedores que trabalhem no ramo da extração dos compostos vegetais, para obtenção de matéria-prima de qualidade que garanta uniformidade dos resultados. Caso os estudos clínicos mostrem que o produto induz proteção, para uma maior chance de reprodutibilidade dos resultados as vacinas posteriores devem ser produzidas com as mesmas especificações da preparação utilizada nos testes.

Os óleos de amendoim e buriti para serem incorporados nas vacinas oleosas foram testados quanto à estabilidade de suas emulsões. De todos os experimentos conduzidos para buscar a estabilidade das emulsões desses óleos, apenas duas situações se aproximaram da maior estabilidade, quando analisada macroscopicamente. Lashmar e colaboradores (1995) concluíram que a estabilidade de emulsões representa o maior desafio para a formulação de vacinas, sendo esta afetada pelo procedimento de fabricação, pelos tensoativos e óleos utilizados. Essa dificuldade também foi observada neste trabalho ao preparar as emulsões do tipo água em óleo para os óleos de amendoim e buriti. Já Silva (2000) demonstrou facilidade ao preparar emulsões com três diferentes óleos vegetais (soja, milho e oliva) utilizando a Fração V da ovalbumina nas proporções de 1:1. Estas emulsões foram feitas manualmente, com a ajuda de seringas e foram consideradas adequadas, pois quando gotejadas em água, não perderam a sua forma original. Silva (2000) não explicitou o momento de inoculação das formulações e se a esterilidade foi mantida com esse procedimento. No caso deste trabalho, essa forma manual de emulsificação não foi testada, no entanto, mesmo ao utilizar agitador mecânico Silverson®, específico para preparação de emulsões, apenas duas misturas apresentaram maior estabilidade, quando comparada às outras tentativas.

Silva e Soares (1996) demonstraram que a mistura de tensoativos de baixo e alto valores de EHL pode originar sistemas melhores, formando película interfacial mais compacta e estável. Esta técnica foi utilizada neste trabalho para o óleo de amendoim com bons resultados onde foram misturados tensoativos com valores de EHL de 15 e 4,3 obtendo considerável estabilidade da emulsão. Já para o óleo de buriti a estabilidade foi conferida apenas com tensoativo de baixo valor de EHL demonstrando a necessidade de

surfactantes mais lipofílicos para a sua estabilidade em uma emulsão água em óleo. Dessa forma observou-se neste trabalho, que a mistura de tensoativos de baixo e alto valores de EHL aplicou-se para o óleo de amendoim, mas não para o de buriti.

Zanin e colaboradores (2002), trabalhando com 16 óleos diferentes de origem vegetal (óleos de amêndoa doce, abacate, apricot, avelã, gergelim, girassol, gérmen de trigo, macadâmia, prímula, borragem, rosa mosqueta, jojoba, camelina, semente de maracujá, semente de uva e coco), demonstraram os valores de EHL variando entre 6,76 e 7,79. Estes valores não corresponderam aos encontrados com os óleos de amendoim e buriti aqui estudados, provavelmente devido a variações nas concentrações dos óleos, dos tensoativos e metodologias adotadas.

Segundo Griffin (1949) um óleo ou uma mistura de óleos pode ter dois valores de EHL: um valor mais baixo, correspondendo ao valor para formar a emulsão água em óleo e um outro mais alto, correspondendo ao valor para formação de emulsão óleo em água. Tanto para o óleo de amendoim quanto o de buriti, os EHLs utilizados corresponderam a emulsões do tipo água em óleo. Na emulsão água em óleo, as pequenas gotículas de água são estabilizadas por surfactante em uma fase de óleo contínua, ou seja, antígenos solúveis em água podem ser emulsionados com óleo (BECHER, 1965). Este tipo de emulsão é preferencial para uma liberação gradual do antígeno durante um longo período de tempo (ALEXANDER e BREWER, 1995). Apesar da emulsão feita com o óleo de buriti representar uma emulsão do tipo água em óleo, não foi observado efeito adjuvante superior ao encontrado com a vacina que não recebeu adjuvante. Segundo Mota (2006), o efeito depósito dos adjuvantes oleosos não deve ser o único mecanismo responsável pela ação adjuvante de emulsões lipídicas. Ao estudar ação adjuvante do óleo de arroz comercial comestível e óleo de amendoim da marca Sigma quando associados a uma proteína (ovalbumina) e utilizando camundongos “swiss” como modelo experimental, Mota (2006) verificou que o óleo de arroz apresentou a emulsão mais estável e, portanto, com maior efeito depósito, no entanto este óleo não foi o melhor adjuvante em todas as etapas testadas. Ainda em seus estudos, o óleo de amendoim da marca Sigma apresentou emulsão menos estável e efeito adjuvante melhor. No presente trabalho, observou-se uma emulsão estável macroscopicamente para o óleo de buriti e uma separação de fases de 2,8 %, para o óleo de amendoim. No entanto, o óleo de amendoim exerceu melhor atividade adjuvante que o óleo de buriti quando associados a antígenos inativados do parvovírus suíno, embora esta atividade não tenha sido persistente (Figura 8).

Jordão (2006) ao realizar teste de inocuidade com uma vacina viral com o óleo ISA (SEPPIC) 50 e antígeno inativado do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) verificou formação de abscesso nos sítios de aplicação em cobaios, com posterior regressão e cicatrização. Esta manifestação clínica não foi observada no presente trabalho para os óleos vegetais de amendoim e buriti, demonstrando sua inocuidade. Jordão (2006) ainda não verificou reação indesejada nos locais de aplicação de uma vacina aquosa contra o BVDV adsorvido com o hidróxido de alumínio na concentração de 20%. Resultados parecidos foram encontrados neste trabalho, em que a utilização de hidróxido nessa mesma concentração não provocou danos visíveis nos locais de aplicação da vacina, indicando que a concentração de 20% desse adjuvante não provoca abscesso no local da injeção.

Cunha e colaboradores (1998) em um estudo utilizando vacinas inativadas contra a doença de Aujeszky, demonstraram que a resposta humoral foi mais precoce e maior nos grupos experimentais que receberam duas doses de vacina. Vannier (1982) concluiu que uma dupla vacinação é necessária para a promoção de uma imunidade sólida com vacina inativada. Estudos realizados por Alva-Valdes e colaboradores (1983) demonstraram que 89% dos suínos vacinados com duas doses de vacina inativada contra a pseudorabia, eram sororreagentes no primeiro mês após a vacinação. Esses dados foram compatíveis com o resultados obtidos nesse estudo. A resposta imune, representada pela produção de anticorpos neutralizantes, foi observada na totalidade dos animais após a primovacinação e revacinação, sendo que a prática de aplicação de um reforço vacinal propiciou uma resposta imune de maior intensidade, demonstrando que a aplicação de uma segunda dose para vacinas inativadas contra o parvovírus suíno desencadeia uma maior produção de anticorpos. Chamelet e colaboradores (1982) explicam que o desenvolvimento de uma resposta imune mais rápida e mais intensa após a segunda aplicação de vacinas inativadas ocorre em razão da presença de um aumento no número de células imunocompetentes de memória.

A soroconversão de todos os animais, independente do tipo de adjuvante recebido, revelou que o PVS inativado estava presente em títulos suficientes para ativar o sistema imunológico dos cobaios vacinados. Como a resposta imune induzida por antígenos inativados é dependente da concentração de antígeno (CHEN, 1985), o título viral de 15360 UHA/dose das vacinas formuladas neste trabalho pode ter sido responsável pela produção de anticorpos neutralizantes observados em todos os animais que receberam doses das vacinas, incluindo a vacina sem adição de adjuvante. No entanto, quantitativamente, observou-se diferença no perfil sorológico pós-vacinal induzido pelas

vacinas avaliadas, o que pode ser explicado pela estimulação da resposta imune pelos diferentes adjuvantes utilizados.

Analisando os resultados obtidos, verificou-se que os animais que receberam vacina com óleo de amendoim como adjuvante tiveram maiores títulos de anticorpos neutralizantes, duas semanas após a primovacinação, quando comparados com animais que receberam a vacina que não continha adjuvante. Quando os títulos de anticorpos desses mesmos animais foram comparados no tempo de 60 dias após a primovacinação não mais se observou diferença de títulos entre os animais que receberam essas duas vacinas. Essa diferença de título de anticorpos obtida em tempos diferentes ocorreu provavelmente devido à metabolização do óleo pelo organismo do animal, indicando que o óleo de amendoim não fica retido no local da aplicação da vacina por longos períodos. Silva (2000), estudando efeito adjuvante do óleo de milho sobre a síntese de imunoglobulinas totais anti-ovalbumina, verificou diferença significativa em relação a vacina sem adjuvante e semelhança com a vacina contendo hidróxido de alumínio, aos 14 dias da resposta primária e queda do título aos 35 dias após a primeira vacinação. Os resultados encontrados por Silva (2000) ao estudar o óleo de milho como adjuvante são semelhantes aos resultados desse trabalho para o óleo de amendoim.

Nos tempos de 15 e 60 dias após a primovacinação, a vacina contendo extrato de própolis verde demonstrou exercer efeito parecido ao do hidróxido de alumínio, que é o único adjuvante aprovado para uso em humanos e também muito utilizado em vacinas veterinárias. As vacinas contendo hidróxido de alumínio e extrato de própolis verde demonstraram possuir ação a longo prazo ao passo que a vacina com o óleo de amendoim apresentou ação a curto prazo. Isso indica que as vacinas com hidróxido de alumínio e extrato de própolis seriam mais indicadas em programas de vacinação preventiva por apresentarem títulos de anticorpos mais elevados em um período maior de proteção pós-vacinal, quando comparados com as vacinas formuladas com o óleo de amendoim e sem adjuvante. A importância do uso dos adjuvantes hidróxido e própolis também se deve a um maior intervalo de proteção pós-vacinal, o que direciona a redução de práticas de manejo e de custos de vacinação. Por outro lado, o óleo de amendoim associado a antígenos contra o parvovírus suíno poderia ser indicado para estudos de resposta primária precoce onde há a necessidade de uma maior concentração de anticorpos, no organismo do animal, em um curto intervalo de tempo onde, possivelmente, seria capaz de impedir surtos da doença, além de representar uma formulação inócua, sem reações adversas de ordem geral e/ou local para os animais.

Apesar de sua alta concentração de carotenóides, substâncias precursoras da vitamina A, relacionadas com a ativação do sistema imune (BRITTON, 1995), o óleo de buriti não exerceu atividade adjuvante quando comparado à vacina sem adjuvante. Esse óleo pode ter sido absorvido pelo organismo do animal mais rapidamente que o óleo de amendoim e não apresentou retenção do antígeno no local da injeção, sendo rapidamente degradado e removido, estimulando fracamente o sistema imunológico dos animais para produção de anticorpos contra o parvovírus suíno. O'Hagan e colaboradores (2001) mostraram que, diferentes adjuvantes tendem a favorecer tipos específicos de resposta possibilitando a seleção do adjuvante para cada situação. Gupta e Siber (1995) relatam a capacidade adjuvante limitada como um problema no processo de obtenção de adjuvantes para vacinas e que ocorre pelo fato de que alguns adjuvantes são efetivos para alguns antígenos e ineficazes para outros. Dessa forma, considerando o potencial medicinal do óleo de buriti, este ainda poderia ser testado como adjuvante em associação a outros tipos de antígenos inativados.

A busca por adjuvantes de origem vegetal que induzam uma boa resposta imunológica baseia-se no fato de que muitos dos adjuvantes minerais que fazem parte de muitas emulsões oleosas de vacinas utilizadas atualmente apresentam algumas desvantagens como longa permanência de resíduos nos tecidos causando reações adversas locais indesejadas e/ou sistêmicas, além de poderem ser carcinogênicos (ALTKEN e SURVASHE, 1974; EDELMAN, 1980). Esses efeitos colaterais dos adjuvantes de base mineral são devido ao fato de estes não serem biodegradáveis. Foi visando eliminar as desvantagens da utilização do óleo mineral, que adjuvantes a base de óleos vegetais de amendoim e buriti foram testados neste trabalho.

Em geral, os adjuvantes oleosos permitem a liberação do antígeno no organismo do hospedeiro de forma gradual e por um período de tempo prolongado, conferindo imunidade mais duradoura do que aquela induzida por adjuvantes aquosos ou vacinas vivas, mas para os adjuvantes de base vegetal testados isso não foi observado. Tal resultado provavelmente ocorreu porque os óleos vegetais são mais facilmente absorvidos pelo organismo do animal do que os óleos minerais (EDELMAN, 1980), não exercendo assim atividade total de liberação gradual do antígeno.

Na segunda etapa deste trabalho, foi avaliada a resposta imunológica de cobaias vacinados com diferentes formulações e comparada com a resposta induzida por uma vacina comercial, de boa aceitação no mercado, ao longo de 60 dias. Durante a formulação da vacina contendo o extrato de própolis verde, separadamente, observou-se uma perda do

extrato nas paredes do frasco utilizado para a mistura da própolis com o antígeno. Já na formulação da vacina contendo a mistura de própolis com hidróxido não foi verificada perda alguma dos adjuvantes, demonstrando compatibilidade entre os dois componentes.

O fato de não haver diferença na resposta de título de anticorpos neutralizantes pelos animais vacinados com a formulação contendo apenas hidróxido e da formulação em que a própolis foi associada ao hidróxido de alumínio demonstra que a própolis pode ser utilizada juntamente com o hidróxido como adjuvante de vacina com uma boa resposta imunológica. Como as vacinas veterinárias se encontram atreladas ao uso dos sais de alumínio ou de emulsões oleosas (HORZINEK *et al.*, 1997), o uso da própolis para estimular resposta imune a antígenos seria apropriado considerando que um dos problemas encontrados na produção de vacinas é a disponibilidade de substâncias que potencializam a ação de antígenos poucos imunogênicos ao induzir resposta imune potente, duradoura e sem contra-indicações.

O uso do extrato de própolis verde em uma formulação contendo hidróxido de alumínio seria apropriado pela capacidade de redução de possíveis efeitos colaterais nos animais, provocados pelo hidróxido, por se tratar de um produto natural que apresenta inúmeras propriedades terapêuticas. A própolis se destaca por possuir ação antiviral, antiinflamatória, antioxidante, antiparasitária e antitumoral (CASTRO, 2001; ANSORGE *et al.*, 2003; FISCHER *et al.*, 2005; DANTAS *et al.*, 2006,). Além disso, a própolis também tem sido descrita como uma substância com atuação sobre o sistema imunológico (ORSI *et al.*, 2000), promovendo a ativação de macrófagos, que desempenham um papel fundamental na defesa do organismo através da fagocitose (ORSOLIC e BASIC, 2003).

Tendo em vista que a resposta da vacina comercial, considerada de boa aceitação no mercado e aprovada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, não difere significativamente da associação de própolis e hidróxido de alumínio como adjuvante sugere-se que esta vacina experimental é capaz de gerar uma resposta imune em cobaias com resultados promissores. Porém mais estudos devem ser conduzidos para avaliar a capacidade da própolis como adjuvante junto a espécie alvo e outros antígenos .

Fischer e colaboradores (2007), ao estudarem a associação de um extrato de própolis com o hidróxido de alumínio e antígeno do herpesvírus suíno tipo 1, verificaram um aumento na resposta imune quando comparado com um tratamento em que o antígeno foi utilizado isoladamente com o hidróxido de alumínio. No presente trabalho, não foi encontrada diferença significativa entre os títulos de anticorpos dos animais vacinados com hidróxido separadamente dos que receberam vacina com a mistura de hidróxido e própolis.

O melhor aproveitamento da própolis por Fisher e colaboradores (2007), pode ser devido ao uso do extrato seco da própolis, proporcionando um melhor resultado que o encontrado neste trabalho. Eles ressaltaram ainda que o efeito adjuvante da própolis verde tornou-se mais evidente no teste de capacidade de proteção vacinal, uma vez que a inclusão do extrato etanólico da própolis verde nas vacinas experimentais aumentou o percentual de animais protegidos após o desafio com o herpesvírus suíno tipo 1.

Como durante esta última etapa verificou-se perda do extrato de própolis no frasco durante a formulação da vacina contendo este adjuvante e a resposta de título de anticorpos foi menor que a apresentada na primeira etapa do trabalho, decidiu-se formular novamente essa vacina com o propósito de esclarecer o efeito adjuvante desse tipo de extrato. A nova formulação apresentou deposição do extrato de própolis no fundo do frasco e na tentativa de suspender a massa depositada, o fundo do frasco foi imerso em banho maria à 37°C por 1 minuto. O procedimento foi bem sucedido, sendo essa a forma utilizada no desprendimento da massa do extrato depositada no fundo do frasco no momento de aplicação da vacina. Desta forma, este trabalho tem ainda como perspectiva, o teste da própolis isoladamente como adjuvante vacinal.

Os resultados desse trabalho permitiram o conhecimento do potencial adjuvante de extratos de origem vegetal pertencentes à biodiversidade brasileira. O óleo de amendoim e extrato de própolis verde apresentaram importância biológica quando associados a vacinas inativadas contra o parvovírus suíno. Com base em mais estudos, a possibilidade de uso comercial de vacinas formuladas com estes extratos poderá favorecer o crescimento econômico ao gerar empregos e impostos, além de melhorar o nível científico do país a partir de pesquisas que levem a um maior conhecimento das funções exercidas por estas substâncias naturais. Ainda se destaca o uso desses extratos associados a práticas de conservação da biodiversidade, quando se pensa no uso sustentável dos recursos como forma de valorização das riquezas naturais.

7. CONCLUSÕES

- A emulsão de óleo de amendoim que foi mais estável foi a formulada com 58% de fase oleosa, 40% de fase aquosa e 2% de tensoativos (9% de Tween 80[®] e 91% de Span 80[®]).
- A emulsão macroscopicamente estável do óleo de buriti foi formulada com 58% de fase oleosa, 40% de fase aquosa e 2% do tensoativo Span 85[®].
- Nas condições experimentais utilizadas, os valores de EHL para os óleos de buriti e amendoim estão em torno de 1,8 e 5,3, respectivamente.
- As vacinas formuladas com os adjuvantes experimentais não induziram reações adversas nos locais de aplicação das mesmas, bem como no comportamento dos animais.
- A vacina experimental com óleo de amendoim induziu a produção de anticorpos neutralizantes após a primovacinação, contudo esta não foi persistente.
- O óleo de buriti não apresentou atividade adjuvante no modelo estudado, neste trabalho.
- As vacinas contendo hidróxido de alumínio ou própolis, como adjuvante, induziram a produção de níveis similares de anticorpos, tanto na resposta primária quanto na secundária.
- As vacinas contendo hidróxido de alumínio, extrato de própolis verde com o hidróxido de alumínio ou a vacina comercial apresentaram capacidade similar na indução de anticorpos neutralizantes contra o parvovírus suíno em cobaios, sendo de considerada importância estudos para avaliar a resposta dessas vacinas na espécie alvo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABIPECS, Relatório Anual ABIPECS 2006. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/relatorios/ABIPECS_relatorio_2006_pt.pdf>. Acesso em 13/Fev/2008.

ALEXANDER, J., BREWER, J. M. Adjuvants and their modes of action. *Livestock Production Science*. v. 42. p. 153-162. 1995.

ALTKEN, I. D., e SURVASHE, B. D. Observations on the serological and dermal responses of turkeys to a single subcutaneous inoculation of inactivated Newcastle disease vaccine in mineral oil adjuvant. *Avian Pathology*. v. 3. p. 211-222. 1974.

ALVA-VALDES, R., GLOCK, R. D., KLUGE, J. P., HILL, H. T. The effects of challenge on the humoral and cellular immune responses in pseudorabies vaccinated swine. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. v. 47. n. 4. p. 451-455. 1983.

AMBRÓSIO, C. L. B, CAMPOS, F. A. C. S, FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose. *Revista de nutrição*. v. 19. n. 2. p. 233-243. 2006.

ANDRADE, P. M. M. e DO CARMO, M. G. T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. *Mn metabólica*. v.8. n. 3. 2006.

ANSORGE, S., REINHOLD, D., LENDECKEL, U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- β 1 production of human immune cells. *Zeitschrift fur Naturforschung*. v. 58. 2003.

ASSIS, F. A. Efeito do selênio orgânico e da vitamina 'E' no crescimento tumoral e na resposta imunológica ao tumor experimental de Ehrlich. Belo Horizonte. [Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG]. 109 p. 2007.

AZZI A, STOCKER A. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Progress in Lipid Research*. v. 39. n. 3. p. 231-55. 2000.

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

BARR, T. A., CARLRING, J., HEATH, A. W. Co-stimulatory agonists as immunological adjuvants. *Vaccine*. v. 24. p. 3399-3407. 2006.

BECHER, P. Testing and emulsion properties. *Emulsions: Theory and Practice*. Reinhold. 2^a ed. New York. p. 381. 1965.

BERSANO, J. G., SCHOTTEN, M. H. S., KROEFF, S. S., BASTOS, G. M. Dados preliminares sobre a ocorrência de anticorpos para o Parvovírus Suíno no Estado de São Paulo. In: Reunião Anual do Instituto Biológico. São Paulo. Resumos. v.6. p. 17. 1993.

BIANCHI, M. L. P, ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*. v. 12. n. 2. p. 123-130. 1999.

BOMFORD, R. Adjuvants for anti-parasite vaccines. *Veterinary Parasitology*. v. 5. p. 41-46. 1989.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Faseb Journal*. v. 9. n. 15. p. 15518. 1995.

BRUNETTO, M. A., GOMES, M. O. S., JEREMIAS, J. T., OLIVEIRA, L. D., CARCIOFI, A. C. Imunonutrição: o papel da dieta no restabelecimento das defesas naturais. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 35. p. 230-232. 2007.

BUTTERWORTH, J. China, Peoples Republic of Oilseeds and Products, China's Peanut Sector, USDA Foreign Agricultural Service GAIN Report. 2004.

CARDOSO, A. L. S. P., ALBUQUERQUE, R., TESSARI, E. N. C. Influência de Níveis de Zinco e Vitamina E, isolados e associados, sobre a Resposta Imunológica Humoral em Frangos de Corte Vacinados. *Arquivos do Instituto Biológico - São Paulo* v.71. p.741-749. 2004.

CARMINI, M. A. Estabilidade de emulsões cosméticas: Estudos de variáveis e parâmetros de influência. Encontro Científico Empresarial para as indústrias farmacêuticas e cosméticas. São Paulo. 1997.

CASTRO, S. L. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. *Journal of Biomedical Science*. v.3. p. 49-83. 2001.

CHAMELETI, E. L. B.; AZEVEDO I, M. P. A.; FAVORETTO, S. R.; KERBRIE, S. V. K.; SOUZA, L. T. M. A reduced schedule for anti-rabic pre-exposure vaccination in humans and annual assessment booster doses. *Revista de Saúde Pública*. v. 16. n. 3. p. 144-148. 1982.

CHANG, J. C. C., DIVELEY, J. P., SAVARY, J. R., JENSEN, F. C. Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant. *Advanced Drug Delivery Review*. v. 32. p. 173-186. 1998.

CHEN, K. S. Adjuvant enhancement of humoral immune response to chemically inactivated bovine viral diarrhea virus. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. v. 49. p. 91-94. 1985.

CRAGG, G. M. NEWMAN, D. J. SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*. v. 60. p. 52-60. 1997.

COLLI C, SARDINHA F, FILISETTI TMCC. Alimentos Funcionais. In: Guia de Medicina Ambulatorial e Hospitalar. São Paulo. p. 66-67. 2003.

CORTESE, V. S. WHITTAKER, R. ELLIS, J. RIDPATH, J. F. BOLIN, S. R. Specificity and duration of neutralizing antibodies induced in healthy cattle after administration of a modified live-virus vaccine against bovine diarrhea. *American Journal of Veterinary Research*. v. 59. p. 848-850. 1998.

CUNHA, E. M. S., PEIXOTO, Z. M. P., KOTAIT, I., BERSANO, J. G., ISHIZUKA, M. M., BACCARO, M. R. Eficácia de vacina inativada contra a doença de Aujeszky: infecção experimental em suínos. *Journal of Veterinary Research and Animal Science* v. 35. n. 4. p. 188-194. 1998.

CURI, R., MIYASAKA C.K., POMPÉIA C., PROCOPIO J. Entendendo a gordura-os ácidos graxos. Manole. p. 43-48. 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.

DEE, S.A. Viral causes of porcine reproductive failure - part II. Compendium Veterinary Practice v.17. p. 1159-1170. 1995

DONELLY, J. J. New developments in adjuvants. Elsevier Science Ireland Ltd. 1997.

DREWS, J. Drug discovery: a historical perspective. Science. v. 287. p. 1960-1964. 2000.

EDELMAN, R. Vaccine Adjuvants. Reviews of infectious diseases. v. 2. n. 3. 1980.

EMBRAPA CERRADOS. Frutas nativas do cerrado brasileiro: aproveitamento alimentar. Planaltina: Embrapa Cerrado. Biblioteca: CPAC (FD FD079 UMT) 2002.

EMBRAPA. Frutas nativas do cerrado: qualidade nutricional e sabor peculiar. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/cenargenda/pdf/nativacerrado.pdf>>. Acesso em 21/Jan/2008 a.

EMBRAPA. Cozinha experimental de amendoim. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2005/setembro/foldernoticia.20056.8798480371/noticia.2005-09-28.7443987696/?searchterm=amendoim>>. Acesso em 04/Mar/2008 b.

ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B. Recognition of yeast cell wall glucan by atlantic salmon (*Salmon salar* L.) macrophages. Developmental and Comparative Immunology. v.17. p. 319. 1993.

FERNANDES, F. T. Desenvolvimento de uma vacina inativada contra parvovirose suína. São Paulo. [Dissertação (Mestrado) – Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT]. 119 p. 2005.

FIELDS, B. N.; MUZYCZKA, N.; BERNS, K.I. Fields Virology. 4th ed. vol. 2. Lippincott – Raven Pub. Philadelphia. 2001.

FISCHER, G., DUMMER, L. A., VIDOR, T., PAULINO, N., PAULINO, A. S. Avaliação da ação antiviral de uma solução de própolis sobre o Herpesvírus Bovino e o Vírus da Diarréia Viral dos Bovinos. In: Encontro de pós-graduação. Pelotas. RS. Anais. Pelotas. 2005.

FISCHER, G., CONCEIÇÃO, F. R., LEITE, F. P. L., DUMMER, L. A., VARGAS, L. D., HUBNER, S. O., DELLAGOSTIN, O. A., 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. 25. p. 1250-1256. 2007.

GARBE A; BUCK J., HAMMERLING U. Retinoids are important cofactors in T cell activation. Journal of Experimental Medicine. V. 176. p. 109-117. 1992.

GAZETA MERCANTIL. Dobram vendas de produtos veterinários. Disponível em: <<http://www.gazetamercantil.com.br/integraNoticia>>. Acesso em 13/Fev/2008.

GRIFFIN, W. C. Classification of Surface-Active Agents by “HLB”. Journal of the Society of Cosmetic Chemists. p. 311-326. 1949.

GODOY, H. T. & RODRIGUEZ-AMAYA. Buriti (*Mauritia vinifera* Mart.), uma fonte riquíssima de pró-vitamina A. Archives of Biology and Technology. v. 38. n. 1. p. 109-120. 1995.

GOMES, M. F. M. Documentos 26, Embrapa Concórdia. 108 p. 1992.

GONSALES, G. Z., ORSI, R. O., FUNARI, S. R. C., FERNANDES JUNIOR, A. Antibacterial Activity of Propolis collected in different regions of Brazil. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases v. 12. p. 124-32. 2006.

GOUVEIA, A.M.G., GOMEZ, M.C., REIS, R. Alterações reprodutivas e prevalência de anticorpos inibidores de hemoaglutinação para o parvovírus suíno no estado de Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v.4. p.17-22. 1984.

GUPTA, R. K., SIBER, G. R. Adjuvant for human vaccines – current status, problems and future prospects. *Vaccine*. v. 13. n. 14. p. 1263-1276. 1995.

HILLEMANN, M. R. Critical Appraisal of emulsified oil adjuvants applied to viral vaccine. *Progress in Medical Virology*. v. 8. n. 15. p. 131-182. 1966.

HOGENESCH, H. Mechanisms of stimulation of the immune responses by aluminum adjuvants. *Vaccine*. v. 20. p. 34-39. 2002.

HORZINEK, M. C.; SCHIJNS, V. E. C. J.; DENIS, M.; DESMETTRE, P.; BABIUK, L. A. *Veterinary Vaccinology*. Capítulo 6. 1997.

HUNTER, R. L. Overview of vaccine adjuvants: present and future. Published by Elsevier Science Ltd. 2002.

JOO, H. S., DONALDSON – WOOD, C. R. and JOHNSON, R. H.. A standardised haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody. *Australian Veterinary Journal*. v. 52. p. 422-424. 1976.

JORDÃO, R. S. Resposta sorológica de cobaias imunizadas com vacinas inativadas, oleosa e aquosa, contendo isolado brasileiro do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em comparação com vacina comercial. São Paulo. [Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo]. 62 p. 2006.

KASAI, FRANCISCO SEIITI; ATHAYDE, MANOEL LUIZ FERREIRA; GODOY, IGNÁCIO JOSÉ DE. Adubação Fosfatada e Épocas de Colheita do Amendoim: Efeitos na Produção de Óleo e de Proteína. *Bragantia*. Campinas v. 57. n. 1. 1998.

KIMURA, J., NARIUCHI, H., WATANABE, T., MATUHASI, T., OKAYASU, I., HATAKEYAMA, S. Studies on the adjuvant effect of water-in-oil-in-water emulsion

(w/o/w) of sesame oil. I. Enhanced and persistent antibody formation bu antigen incorporated into the water-in-oil-in-water emulsion. Japanese Journal Experimental Medicine. v. 48. n. 2. p. 149-202. 1978.

KIRKPATRICK, P. Antibacterial drugs: stitching together naturally. Nature Reviews Drug Discovery. v. 1. p. 748. . 2002.

KRUNGER, C. L, MANN, S. W. Safety evaluation of funcional ingredients. Food and Chemical Toxicology. v. 41. p. 793-805. 2003.

LACHMAN, L.; LIERBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. The theory and practice of industrial pharmacy. Philadelphia:Lea & Febiger. p. 514-517. 1986.

LASHMAR, U. T., RICHARDSON, J. P., ERBOD, A. Correlation of physical parameters of an oil-in-water emulsion with manufacturing procedures and stability. International Journal of Pharmaceutics. v. 125. p. 315-325. 1995.

LIN, T. J. Adverse effects of excess surfactants upon emulsification. Cosmet. & Toilet. v. 106. p. 71-80. 1991.

LIEBERMAN, H. A., RIEGER, M. M., BANKER, G. S. Pharmaceutical dosage forms: disperse systems. 2. Ed. New York: Maecel Dekker. v.1. 1988.

LOBATO, Z. I. P. Avaliação da resposta sorológica de suínos imunizados contra parvovirose suína com uma vacina inativada experimental e pelo método de feed back (retroinfecção). [Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais]. 90 p. 1990.

LOBATO, Z. I. P., REIS, R. LEITE, M. C. Avaliação da resposta sorológica de suínos imunizados contra parvovirose suína com uma vacina inativada experimental Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia v. 45. n.2. p. 161-171. 1993.

LOPES, R. M. Flavonóides. Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento. p. 18-22. 2003.

MAHAN L. K., ESCOTT-STUMP S. Lipídeos. In: Krause: alimentos, nutrição & dietoterapia. 9ª ed. São Paulo: Roca. p. 51-53. 1998.

MANSONE, F. Anestesiologia veterinária: Farmacologia e técnicas. 3 ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. Brasil. 255 p. 1999.

MARIATH, J. G. R.; LIMA, M. C. C.; SANTOS, L. M. P. Vitamin A activity of buriti (*Mauritia vinifera* Mart.) and its effectiveness in the treatment and prevention of xerophthalmia. American Journal Clinical Nutrition. v. 49. P. 849-853. 1989.

MARTINS, R. M., ROEHE, P. M., GUIMARÃES, L. G. In: Congresso Nacional de Veterinários Especialistas em Suínos. Anais. Curitiba. p. 19. 1984.

MENGELING, W. L. Porcine Parvovirus infection. In: LEMAN, A. D., STRAW, B., GLOCK, R. D. Diseases of swines. 6. ed. Ames: Iowa State University. p. 411-424. 1992.

MENGELING, W. L., PAUL, P. S. Interepizootic Survival of Porcine Parvovirus. Journal of the American Veterinary Medical Association. v. 11. p. 1293-1295. 1986.

MIYATAKA, H. NISHIKI, M. MATSUMOTO, H. FUJIMOTO, T. MATSUKA, M. ISOBE, A. SATOH, T. Evaluation of propolis. I: Evaluation of Brazilian and chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. Biological & pharmaceutical bulletin v.20. p. 496-501. 1997.

MOTA, E. F. Atividade adjuvante dos óleos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e arroz (*Oryza sativa* L.) na resposta imune humoral e celular. Fortaleza. [Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará]. 181 p. 2006.

MURRAY, R.; COHEN, P.; HARDEGREE, M. C. Mineral oil adjuvants: Biologiacal and chemical studies. Annals os Allergy. v. 30. n.3. p. 146-151. 1972.

NIEWIESK, S., PRINCE, G. Diversifying animal models: the use of hispid cotton rats (*Sigmodon hispidus*) in infectious diseases. Laboratory Animals. v. 36. p. 357-372. 2002.

O'HAGAN, D. T., MACKICHAN, M. L., SINGH, M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomolecular Engineering*. v. 18. p. 69-85. 2001.

ORSI, R. O., FUNARI, S. R. C., SOARES, A. M. V. C., CALVI, S. A., OLIVEIRA, S. L., SFORCIN, J. M., BANKOVA, V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. v. 6. p. 205-219. 2000.

ORSI, R. O., SFORCIN, J. M., FUNARI, S. R. C., FERNANDES JR. A., BANKOVA, V. Synergistic effect of propolis and antibiotics on the *Salmonella* Thypi. *Brazilian journal of microbiology*. v. 37. p. 108-12. 2006.

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

OTT, G., BARCHFELD, G. L., VAN NEST, G. Enhancement of humoral response against human influenza vaccine with the simple submicron oil/water emulsion adjuvant MF59. *Vaccine*. v. 13. P.1557-1562. 1995.

PARENT G; ROUSSEAU-PREVOST R; CARLIER Y & CAPRON A. Influence of vitamin A on the immune response of *Schistosoma mansoni*-infected rats. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 78. p. 380-384. 1984.

PARK, Y. K. 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.

PARKE, C. R., BURGESS, G. W. An Economic assessment of porcine parvovirus vaccination. *Australian Veterinary Journal*. v. 70. p. 177. 1993.

PEIXOTO, A. R. Plantas oleaginosas arbóreas. São Paulo. 284 p. 1973.

PIMENTEL, B. M. V, FRANCKI, M., GOLLUCKE, B. P. Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Editora Varela. 2005.

PRISTA, S. M.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica. Calouste Gulbenkian. 4 ed. v1. p. 169-170. 1992.

RESENDE, F. C. B., PASSOLD, J., FERREIRA, S. I. A. C., ZANETTI, C. R., LIMA, H. C. Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais. Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia v. 27. n. 3. p. 116-124. 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed, and stored foods. John Snow, Inc/OMNI Project. 88p. 1997.

SCHIJNS, V. E. J. C. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. Current opinion in immunology. v.12. p. 456-463. 2000.

SEMBA R. D; MUHIL AL; WARD BJ; GRIFFIN DE; SCOTT AL; NATADISASTRA G; WEST KP JR & SOMMER A. Abnormal Tcell subset proportions in vitamin-A-deficient children. Lancet. v. 341. p. 5-8. 1993.

SHIRODKAR, R. L. HUTCHINSON, D. L. PERRY, J. L. Aluminum compounds used as adjuvants in vaccines. Pharmaceutical Research. v. 7. p. 1282-1288. 1990.

SILVA, C. E., SOARES, C. I. Tecnologia de emulsões. Cosmet. & Toilet. ed. português. v.8. p. 37-46. 1996.

SILVA, A. C. M. Atividade imunoadjuvante e inflamatória de óleos vegetais. Fortaleza. [Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará]. 77 p. 2000.

SINGH, M., O'HAGAN, D. T. Advances in vaccine adjuvants. Nature Biotechnology. v. 17. p. 1075-1081. 1999.

SOARES, R. M. & BERSANO, J. G. Isolamento de Parvovírus Suíno de tecidos fetais de fêmeas suínas acometidas por distúrbios reprodutivos no Estado de São Paulo. Arquivos do Instituto Biológico - São Paulo. v.65. n.2. p.79-85. 1998.

STORNI, T., KUNDIG, T. M., SENTI, G., JOHANSEN, P. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Advanced Drug Delivery*. v. 57. p. 333-355. 2005.

TENGERDY, R. P. & LACETERA, N. G. Vitamin E adjuvant formulations in mice. *Vaccine*. v. 9. p. 204-205. 1991.

THACKER, B. J. & GONZALEZ, P. L. Infectious reproductive diseases in swine. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. v.10. p. 669 – 680. 1988.

THOMAS, P. C. BASS, E. P., HENNING, E. R., SHARP, A. J. Can an immunomodulating adjuvant enhance and extend the protection of killed BVD virus vaccine? *Veterinary Medicine*. v. 81. p. 974-976. 1986.

TREGUIER, J. P., LO, I., SEILLER, M., PUISIEUX, F. La formulation des émulsions méthodes utilisées pour le choix des émulsionnants. *Journal of pharmaceutical science and technology*. v. 7. p. 371-381. 1972.

UNGAR, J. Panel and discussions on Immunology. In: BERN & STUTGART Principles on Tetanus. Hans Huber Publ. p. 232-329. 1966.

UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION. *US Pharmacopeia* 29. Sterility tests <71>. 2007.

UTIYAMA, C. E. Utilização de agentes antimicrobianos, probióticos, prebióticos e extratos vegetais como promotores do crescimento de leitões recém-desmamados. São Paulo [Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo]. 94 p. 2004.

VAN LEENGOED, L. A., VOS, J., GRUYS, E., RONDHUIS, P., BRAND, A. Porcine parvovirus infection: review and diagnosis in a sow herd with reproductive failure. *Veterinary Quarterly*. v.5. p. 131-141. 1983.

VANNIER, P. Efficiency of an inactivated virus vaccine against Aujeszky's disease for fattening pigs with or without passive immunity. In: Aujeszky's disease. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science. v. 17. p. 181-190. 1982.

VILLAS BOAS, G. K e GADELHA, C. A. G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. Cad. Saúde Pública. v.23. n. 6. p. 1463-1471. 2007.

ZANIN, S. M. W., MIGUEL, M. D., CHIMELLI, M. C., OLIVEIRA, A. B. Determinação do equilíbrio hidrófico-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. Curitiba. Visão acadêmica. v.3. n. 1. p. 13-18. 2002.

ZUFFA, A., ZUFFA, T., ZAJAC, J. Study of immunity induced by the inactivated oil-adjuvant vaccine after natural infection with the vírus of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) in cattle. Journal of the American Veterinary Medical Association. v. 32. p. 724-735. 1985.

WAITZBERG D. L, BORGES V. C. Gorduras. In: Nutrição oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica. 3ª edição. São Paulo: Atheneu. p. 59-64. 2002.

WERBACH, M. R., MURRAY, M. T. Botanical influences on illness: a sourcebook of clinical research. Los Angeles: Third line Press. 1994.

WILKINSON, J. B., MOORE, R.J. Cosmetologia de Harry Madrid: Ediciones Dias de Santos S.A. p. 806-818. 1990.

WOODARD, L. F.. Adjuvant activity of water insoluble surfactants. Lab. Animal Sci. v.39 p. 222-225. 1989.

WOODARD, L. F., Surface chemistry and classification on vaccine adjuvants and vehicles. In: Mizraki, A. (Ed.). Bacterial Vaccines. Alan R. Liss, Inc., New York. p. 281-306. 1990.

YAO, G. Peanut Production and Utilization in the People's Republic of China, University of Georgia, 2004.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 229/2007**, relativo ao projeto intitulado **"Avaliação da capacidade adjuvante de extratos de origem vegetal na indução da resposta imune de cobaios vacinados contra o parvovírus suíno"**, que tem como responsável **Henrique Maia Valério**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **26/ 03/2008**.

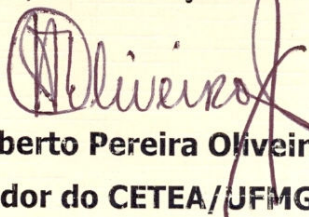
Este certificado expira-se em **26/ 03 / 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 229/2007**, related to the project entitled **"Evaluation of adjuvant capacity of vegetal extracts to induce immune response in guinea pigs vaccinated against porcine parvovirus"**, under the supervision of **Henrique Maia Valério**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 26, 2008**.

This certificate expires in **March 26, 2013**.

Belo Horizonte, 27 de Março de 2008.



Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br