



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1010496-8 A2



(22) Data de Depósito: 30/12/2010

(43) Data da Publicação: 18/08/2015
(RPI 2328)

(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE
ADJUVANTE PARA VACINAS AVIÁRIAS

(51) Int.Cl.: A61K39/17; A61K39/215; A61P31/12;
A61K36/889

(73) Titular(es): C C de M Salgueiro (ACP Biotecnologia),
Fundação Universidade Estadual do Ceará

(72) Inventor(es): Cristiane Clemente de Mello Salgueiro,
José Ferreira Nunes, Márcia Helena Niza Ramalho
Sobral, Vinícius Madureira Maia

(57) Resumo: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE
ADJUVANTE PARA VACINAS AVIÁRIAS. A presente
invenção refere-se, de forma geral, ao uso da água de
coco em pó (ACP) ou desidratada como adjuvante para
vacinas aviárias, particularmente para vacinas vivas
aviárias aplicadas por diferentes vias.

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ADJUVANTE PARA VACINAS AVIÁRIAS

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se, de forma geral, ao uso da água de coco em pó (ACP) ou desidratada como adjuvante para vacinas aviárias, particularmente, para vacinas vivas aviárias aplicadas por diferentes vias. A presente invenção se situa no campo da biotecnologia.

Antecedentes da Invenção

10 A produção avícola é um empreendimento que requer investimento razoável, cujo retorno é proporcional à habilidade do empresário em maximizar os ganhos e minimizar as fontes de perdas. Seu crescimento não seria possível sem a adoção de medidas preventivas contra microrganismos causadores de
15 doenças como é o caso dos vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG), da Doença de Newcastle (DN), da Doença de Gumboro (DIB), da Doença de Marek (DM), da Bouba Aviária, da Encefalomielite; das bactérias *Mycoplasma gallisepticum* e *synoviae*, dentre outras.

20 Desde que Edward Jenner's descobriu a vacina contra a varíola, foi aberto um novo capítulo no combate aos agentes microbianos. A vacinação passou a ser o caminho mais viável e de melhor custo para prevenir, controlar e erradicar doenças infecciosas. A vacinação, em medicina veterinária, representa um fator fundamental para a melhoria do bem-estar animal, reduzindo o custo da produção do alimento de origem animal e diminuindo a
25 incidência de zoonoses. Além disso, as vacinas veterinárias, especialmente as da área avícola, movimentam um mercado internacional crescente de cerca de US\$ 3,1 bilhões (Kulcsar *et al.*, 2010).

30 Uma vez que problemas sanitários podem comprometer a exportação de produtos avícolas, essas medidas devem ser adotadas visando tanto à obtenção de melhores resultados zootécnicos, quanto ao compromisso com a produção regional e nacional. Sendo a vacinação a mais importante medida

preventiva contra as enfermidades, as vacinas, vivas ou atenuadas, e as mortas ou inativadas (Alexander, 2009), tem sido constantemente inovadas, pois as empresas vêm adotando programas de vacinação variáveis, empregando diferentes amostras vacinais e utilizando equipamentos diversos, num constante processo de aperfeiçoamento.

Atualmente, as vacinações que utilizam vacinas com vírus vivo são aplicadas, de forma individual ou massal, nas aves após o nascimento. A vacinação individual pode ser realizada por via ocular ou injetada por via subcutânea, enquanto que as vacinações por via massal podem ser realizadas por via oral (ou água de bebida) ou por via spray (ou nebulização) (Degefa *et al.*, 2004).

Para cada via de aplicação, o vírus vacinal, ou simplesmente a vacina, deve ser primeiramente diluído, para então ser distribuído. As vacinas vivas comerciais para aves podem ter forma liofilizada ou congelada e apresentação em doses múltiplas para 1.000, 2.000, 5.000 e até 10.000 aves, podendo também ser simples, com um único tipo de vírus, ou combinada, com mais de um tipo de vírus. São conservadas em temperatura de geladeira, entre 2°C a 8°C (Gallili e Ben-Nathan, 1998), por um período que varia de 18 a 24 meses, de acordo com o estipulado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2006). Após o frasco aberto, inicia-se a perda vertiginosa dos títulos de vírus vacinal, culminando-se em perda total da capacidade da vacina em causar imunidade após cerca de uma a duas horas, dependendo do tipo de vírus da vacina.

A utilização de substâncias adjuvantes auxilia a formação de uma resposta imune de maior intensidade, de maior duração e mais rápida com uma quantidade menor de antígeno, podendo assim diminuir custos na produção de vacinas. Em vacinas comerciais, os adjuvantes são usualmente de dois tipos: (a) adjuvantes veículos, que servem como matriz para os antígenos e também estimulam o sistema imunológico; ou (b) adjuvantes imuno-estimulantes, que estimulam o sistema imunológico, mas não realizam nenhuma função mecânica.

Vários mecanismos são propostos para explicar a eficiência dos adjuvantes e como eles podem melhorar a resposta da vacina ao antígeno. Os adjuvantes podem induzir inflamação local, aumentando o contato do antígeno com células adicionais que são atraídas para o local; formar um depósito de antígeno liberando-os mais lentamente e prolongando assim sua interação com o macrófago; aumentar a velocidade e duração da resposta imune; modular a avides, a especificidade, o isotipo e a distribuição de subclasses de anticorpos; estimular a imunidade mediada por células; induzir imunidade de mucosas e aumentar a resposta imunológica em indivíduos imunologicamente imaturos ou senis.

Segundo Rauw *et al.* (2010), o desenvolvimento de adjuvantes seguros e resistentes é necessário para maximizar a eficácia da vacinação e o aumento da indução da resposta imune local em aves para novas e/ou vacinas vivas convencionais administradas através de vias que interajam com a mucosa. Neste contexto, a toxina da cólera, os oligodeoxinucleotídeos estimuladores de CpG, as citocinas aviárias, a quitosina e outros adjuvantes têm sido investigados com sucesso para as vacinas vivas aviárias.

Singh e O'Hagan (2003) fizeram um levantamento dos adjuvantes atualmente utilizados para vacinas contra enfermidades em humanos e animais, assim definidos:

- Sais Minerais: hidróxido de alumínio; fosfato de alumínio; fosfato de cálcio;
- Adjuvantes Imuno-estimulantes: citocinas (IL-2, IL-12, GM-CSF); saponinas; derivados de MDP; DNA bacteriano (CpG); LPS; MPL e derivados sintéticos; Lipopeptídeos;
- Partículas Oleosas: emulsões em geral, como, p.ex.: emulsão de Freund;
- Partículas Adjuvantes: micro partículas PLG; partículas virais;
- Adjuvantes de Mucosa: enterotoxina; toxina colérica; quitosana.

Edelman (1997) lista um número de critérios que garantem a segurança de vacinas com adjuvantes. Além da segurança com respeito às reações

locais, reações sistêmicas (toxicidade geral, pirogenicidade), doenças auto-imunes, reações de hipersensibilidade, carcinogênese, teratogênese, etc., um adjuvante ideal deve ser definido quimicamente de forma que possa ser fabricado constantemente. A preparação deve induzir uma resposta imunológica protetora a antígenos fracos com baixas doses de proteínas e com poucas aplicações. Deve ser efetivo em induzir uma resposta mais persistente e de alta qualidade, deve ser estável em consideração a sua capacidade adjuvante e à ausência de toxicidade não apresentando nenhuma interação com o antígeno.

Apesar de muitas vacinas utilizando adjuvantes tradicionalmente sejam aplicadas por injeção via subcutânea ou intramuscular, outras vias de aplicação têm sido avaliadas, oferecendo importantes vantagens, como facilidade de administração, redução de efeitos adversos e ativação de imunidade local. Imunização de mucosa por via oral ou intranasal, por exemplo, pode ser particularmente vantajosa de ser usada em granjas, onde o acesso aos cuidados veterinários é mais difícil. Entretanto, esta via apresenta a desvantagem de ser usada em vacinas com vírus vivo, devido ao efeito deletério dos ácidos estomacais e intestinais sobre o vírus vacinal, necessitando de um adjuvante eficaz para tal.

Vários estudos com o uso de micro partículas como adjuvante imunizante de mucosa foram realizados: em bovinos, usando micro partículas de alginato administrado via oral e intranasal (Bowerstock e Martin, 1999; Rebelatto *et al.*, 2001); em ratos, com micro partículas de polilactídeo co-glicolídeo para induzir imunidade sistêmica e de mucosa (Challacombe *et al.*, 1992, 1997; Eldridge *et al.*, 1990; O'Hagan, 1994). Além destas, a imunização de mucosa com micro partículas utilizadas como adjuvantes, induziram proteção contra uma série de bactérias, como *Bordetella pertussis*, *Chlamydia trachomatis* e *Salmonella typhimurium* (Singh e O'Hagan, 2003). Algumas toxinas bacterianas foram descritas como adjuvantes indutores de imunidade de mucosa, entretanto, em geral têm sido consideradas muito tóxicas para uso

em humanos e, para uso veterinário, têm sido manipuladas geneticamente para reduzir a toxicidade (Giuliani *et al.*, 1998).

5 Vale ressaltar, que apesar de todos os benefícios levantados para o uso de adjuvantes, muitos dos candidatos a adjuvantes nunca serão aceitos para uso em vacinações de rotina humana ou animal, devido a fatores relacionados à segurança, devendo-se ter uma atitude concreta entre o risco e o benefício, enfatizando sempre a segurança acima da eficácia, quando a vacina é aplicada em indivíduos saudáveis.

10 O mecanismo de ação e a resposta inflamatória induzida pelos adjuvantes são, atualmente, pouco entendidos. Nos processos de imunização deve haver, obrigatoriamente, uma resposta inflamatória, para que haja ativação dos mecanismos de imunidade específica (linfócitos B e T). A imunização deve ser direcionada para este fim. Portanto, a adição de adjuvantes pode ativar vários mecanismos de ação da resposta imunológica, 15 porém apenas alguns são relevantes para o estabelecimento de respostas antígeno-específicas eficientes. Desta forma, o estudo das características inflamatórias dos adjuvantes é importante na interpretação de sua capacidade de indução imunogênica e no entendimento dos efeitos colaterais associados ao seu uso.

20 Várias questões recentes têm servido para realçar a necessidade urgente para o desenvolvimento de vacinas novas e melhoradas para uso da avicultura industrial. Estes problemas são: a emergência de novas doenças, ressurgimento de infecções antigas e disseminação contínua de bactérias resistentes aos antibióticos. O desenvolvimento de adjuvantes também deve 25 ser conduzido a favor da redução de custos do processo de imunização das aves. Particularmente no campo da veterinária, um custo significativamente mais baixo por animal seria necessário, em comparação com vacinas humanas. Até agora, os adjuvantes utilizados extensivamente no campo veterinário, são as emulsões de óleo mineral ou hidróxido de alumínio como 30 compostos adicionais para imunopotencialização. No entanto, o desenvolvimento de novos adjuvantes deverá ser conduzido para uma melhor

compreensão do mecanismo de ação dos adjuvantes para as vacinas aviárias atualmente disponíveis no mercado e esta é uma área de pesquisa que requer ainda muito trabalho.

A Publicação PCT nº WO 99/21579 atribuída a RP SCHERER CORP, divulga uma “rápida” dispersão na composição de uma vacina liofilizada avícola contra Doença de Newcastle, como se estivesse “levemente compactado”. A apresentação é dada como uma “rede de matriz aberta”, como se fosse uma “espuma sólida”, referenciada pela Patente US nº 4,371,516 (equivalente a Patente UK Nº 1548022), como oposição a uma forma de comprimido. Além disso, as vacinas são direcionadas para administração oral, e orientada para retenção na mucosa. Adjuvantes servem para dar tempo suficiente para a distribuição da vacina e conseqüente absorção. A formulação da vacina divulgada não prevê a preparação de uma dose imunizante, nem de um meio estável.

A água de coco ou líquido endospermico proveniente do fruto do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), pertence à subfamília *Cocosidea* da família *Palmea*, sendo uma solução natural e estéril, ligeiramente ácida, apresentando um valor de pH na faixa de 4.0 a 5.6, que é função, principalmente, da variedade e grau de maturação (Campos *et al.*, 1996).

O coqueiro é considerado o terceiro cultivar de frutas em área plantada no Brasil, estando presente em 280 mil hectares e com 1,92 milhão de frutos produzidos. O maior produtor do Brasil é a Bahia, com 709.000 frutos, vindo depois o Pará (250.000), o Ceará (244.000), o Espírito Santo (180.000) e Pernambuco (134.000) (BRASIL/MAPA, 2005). É considerada como uma das principais frutas da pauta nacional de exportações (Pinheiro *et al.*, 2005).

O coco verde contém em torno de 400 mL de água, cerca de 25% do peso do fruto, contendo proteínas, sais, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, fatores de crescimento (fitohormônios) (Anurag e Rajamohan, 2003). É pobre em fosfolipídios (Laguna, 1996), possuindo ainda indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que lhe confere densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo (Blume e Marques Jr., 1994). É considerado como um repositório de

sais e algumas de suas aplicações terapêuticas, como utilização na forma de soro oral ou intravenoso, nos casos de cólera, problemas intestinais e estomacais tem sido citadas na literatura (Magalhães *et al.*, 2005; Anurag e Rajamohan, 2003).

5 A presença, na água de coco, de alcoóis, cetonas, lactonas, aldeídos e ésteres, todos com cadeia curta de carbono, são provavelmente responsáveis, em parte, por seu aroma, enquanto que o éster n-propiletanoato, por seu sabor. Entretanto, estes produtos despertam o interesse pela ação antioxidante, como um potencial aditivo alimentício antioxidante natural (Fonseca *et al.*, 2009).

10 Dos componentes mais importantes da água de coco podem ser mencionados os açúcares que, no início da maturação, apresentam-se na forma de açúcares redutores (glicose e frutose), cujas concentrações alcançam níveis máximos de 5% próximo ao sexto e sétimo mês, período em que a quantidade de água também é maior. Com a maturação, a concentração de açúcares
15 redutores diminui em até 1%, porém são formados açúcares não-redutores (sacarose), sendo, ao final da maturação, o teor de açúcares totais de, aproximadamente, 2% (Jayalekshmy *et al.*, 1984; Carvalho *et al.*, 2006).

Existem outros componentes na água de coco que mostram atividades semelhantes à das citocininas (Nunes e Salles, 1993), modulando atividades
20 fisiológicas como a floração, expressão sexual e formação de frutos, consideradas excelentes para as células (Nunes e Salgueiro, 1999). Na Índia, foram isoladas e identificadas, na água de coco, substâncias promotoras de crescimento, como citocinas endógenas e ainda traços de zeatinina ribozídeo. A zeatinina é a citocina natural mais ativa, sendo dez vezes mais potente que a
25 cinetina. Além das funções relacionadas com a planta, verificou-se que algumas citocininas e alguns de seus derivados poderiam ser utilizados em aplicações médicas, como a supressão de crescimento de tumores em mamíferos, prevenção de formação de coágulos no sangue e retardo no envelhecimento do fibroblasto humano (Ge *et al.*, 2006).

30 A água de coco *in natura* proveniente de frutos com idade de seis meses (variedade verde da praia ou anão maduro) apresenta uma osmolaridade em

torno de 500 mOsmol/KgH₂O e um pH entre 4.5 e 5.0. No entanto, a utilização da água de coco como diluente se depara com algumas dificuldades de ordem prática, tais como a disponibilidade de frutos com características ideais e a impossibilidade de armazenamento do produto (Uchoa, 2004), pois o tempo de
5 estocagem é altamente dependente dos métodos de conservação aplicados. Esses métodos devem objetivar a inibição da atividade enzimática e a garantia da qualidade microbiológica após a abertura do fruto, observando-se a manutenção, o máximo possível, das características sensoriais originais (Magalhães *et al.*, 2005).

10 Desse modo, Salgueiro *et al.* (2002) desenvolveram um diluente à base de água de coco, sendo este padronizado na forma de pó, permitindo a conservação das suas características benéficas e facilitando o seu uso em regiões onde não se disponham do fruto.

A água de coco de frutos jovens contém substâncias promotoras de
15 crescimento ainda não identificadas (De Martin, 1980).

A água de coco tem sido muito utilizada em biotecnologias relacionadas à reprodução animal. Excelentes resultados têm sido obtidos com a utilização da água de coco como diluente e conservante de sêmen de animais em geral, aumentando a vida útil e a motilidade dos espermatozóides. Estudos vêm sendo
20 utilizados na preservação do sêmen de espécies como caprinos (Freitas, 1988; Toniolli, 1989a, Araújo, 1990; Salles, 1989; Rodrigues *et al.*, 1994), ovinos (Freitas, 1992; Cruz, 1994; Sousa *et al.*, 1994), suínos (Toniolli, 1989b; Toniolli e Mesquita, 1990), canídeos (Montezuma Jr. *et al.*, 1994; Uchoa *et al.*, 2002; Uchoa, 2004; Cardoso *et al.*, 2006), peixe de água doce como o Tambaqui
25 (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) (Farias *et al.*, 1999) e abelhas (Almeida e Soares, 2002).

Segundo Anurag e Rajamohan (2003), a água de coco verde tem capacidade de reduzir o risco de doenças coronarianas, devido à grande quantidade de potássio, cálcio e magnésio e do aminoácido arginina; com este
30 propósito, estudaram o efeito cardioprotetor da água de coco verde em infartes

do miocárdio induzidos experimentalmente em ratos, obtendo resultados satisfatórios.

Na química orgânica sintética, a água de coco vem sendo estudada, com excelentes resultados, como biocatalizador em processos de redução e reações hidrolíticas (Fonseca *et al.*, 2009).

Nogueira e Vasconcelos (2000) utilizaram água de coco como meio de cultura em conservante de córnea de coelhos. O conservante água de coco não apresentou qualquer alteração em olhos de coelho após uso demorado, comprovada sua higidez frente aos exames biomicroscópico (*in vivo*) e histopatológico. Demonstrou *in vitro* ter propriedades de manutenção da deturgência e na conservação do epitélio e endotélio.

A água de coco foi utilizada por Gopikrishna *et al.* (2008), como meio de conservação para dentes destinados à implante. A água de coco foi comparada com um meio de conservação tradicional, o HBSS, e com o leite, para se observar a manutenção da viabilidade das células do ligamento periodontal, usando a prova de collagenase-dispase. Todos os resultados obtidos com a água de coco neste estudo foram significativamente superiores aos do meio HBSS e ao leite. Outros estudos com água de coco como meio de conservação para dentes destinados a implantes foram realizados por Moreira-Neto *et al.* (2009), avaliando a viabilidade dos fibroblastos.

O problema consiste no fato de que a água de coco é um produto oriundo de vegetações tipicamente tropicais, o que limita a sua difusão em trabalhos em regiões de clima temperado. Por ser rica em nutrientes, a água de coco é suscetível à contaminação e, por isso, de difícil conservação. O caráter estéril da água de coco só é mantido no interior do fruto íntegro, estando susceptível a contaminação microbiana quando exposta ao ambiente por conta da abertura do fruto. A presença de fungos contaminantes, causadores de deteriorização do coco, ocorre próximo ao olho e ao pedúnculo (Jangchud *et al.*, 2007), podendo ser carregado para o interior do fruto no momento de sua abertura. A contaminação bacteriana, além de comprometer sua estabilidade, pode levar à deteriorização em apenas um dia após a extração (Matsui *et al.*, 2008). Além do

mais, poucas são as pessoas aptas a identificar exatamente o estágio de frutificação ideal para uso como conservante celular.

A popularização do uso da água de coco está limitada, em primeiro lugar, à inexistência de padronização deste insumo tão importante. Uma revisão bibliográfica sugere ter havido usos inadequados. Uma série de fatores como variedade, tipo de cultivar, idade, sanidade e fatores ambientais, influencia substancialmente sua complexa composição. Sua labilidade tem, inclusive, dificultado os esforços de inúmeros pesquisadores, muitos deles ligados à indústria, de obter na prateleira, a água de coco *in natura*, sob forma estável e duradoura (Neves *et al.*, 2005). Até mesmo o índice de poluição do solo e do ambiente influencia sua composição (Petroianu *et al.*, 2004).

Em 1997 iniciou-se, no Estado do Ceará, um estudo que levou à padronização do fruto que seria o ideal para a utilização em processos biotecnológicos. Uma vez selecionado o fruto ideal, buscou-se a estabilização da água de coco, fato logrado no início de 2002.

Com base nos primeiros resultados obtidos com a água de coco *in natura*, a padronização e estabilização da água de coco na forma de pó (ACP), em não perdendo suas características físico-químicas, garante a simplificação de sua utilização, podendo representar uma alternativa para a difusão de várias biotecnologias. Tal fato propiciou a padronização dos meios de conservação até então em estudo, não só para sêmen como para outros tipos celulares. Esses meios de conservação devem levar em conta as características de pH, osmolaridade e composição que possam influenciar diretamente na capacidade de manter as células viáveis após certo tempo. Em relação ao pH e osmolaridade, quanto mais próxima às condições fisiológicas (300 mOsm/Kg H₂O e pH 7.0), melhor a capacidade do meio para preservar a vitalidade da células (Moreira-Neto *et al.*, 2009).

Já que as amostras são diretamente secas e transformadas em pó, as reações são inibidas pela mudança de fase e, portanto, mantêm inalterada todas as suas qualidades.

Os cálculos de rendimento permitem restituir, quando de sua reconstituição em água destilada, os parâmetros originais do líquido endospermico exigidos na manutenção de suas propriedades (Nunes *et al.*, 2005).

5 O processo de produção de água de coco em pó, o qual já possui pedido de patente, se baseia numa seqüência de procedimentos. Conforme a finalidade do produto, o fruto é selecionado em função de suas propriedades físico-químicas, como: volume, peso, diâmetro do albúmen, pH, osmolaridade, teor de carboidratos, teor de aminoácidos, teor de minerais, dentre outros. A obtenção
10 do fruto é iniciada pela rigorosa seleção e higienização do mesmo, seguida de colheita do líquido endospermico do coco (água de coco), sob forma asséptica, realizada amostragem após a filtração. O líquido filtrado é homogeneizado e bombeado para o sistema de secagem. Submetidas a um tratamento térmico, a mostra é seca e transformada em um pó, destituído de água livre, com alta
15 solubilidade (Nunes *et al.*, 2005).

Tal processo está baseado na padronização e estabilização da água de coco na forma de pó (ACP) e na subsequente formulação dos meios de conservação, onde são acrescentados aditivos específicos, dependendo do tipo de material biológico a ser conservado. Referidos meios poderão ser utilizados
20 para a conservação celular de todas as espécies animais, incluindo o homem (Nunes e Salgueiro, 2005a).

O produto básico (líquido endospermico do coco), em sua forma processada, confere estabilidade e longevidade de prateleira, sem problemas de acondicionamento, e supera as tecnologias de conservação conhecidas, uma
25 vez que mantém as propriedades inerentes do produto original. A uniformidade do produto, obtida mediante rigoroso controle de processamento, em condições específicas, leva à manutenção dos valores agregados do endosperma líquido do coco (Nunes e Salgueiro, 2005b).

Nunes *et al.* (2005) descrevem alguns produtos à base de água de coco
30 em pó que já se encontram em fase experimental: meio para desenvolvimento de células germinais; meio de manutenção, crescimento e maturação celular;

meio de capacitação espermática; meio de lavagem celular; meio de coleta, lavagem, cultivo, manutenção e criopreservação para embriões; meio de criopreservação espermática; meio de criopreservação de ovócitos; meio de conservação e criopreservação de tecidos; meio de conservação e
5 criopreservação de órgãos para transplante; meios de cultivo de microrganismos (fungos, bactérias, vírus), protozoários e insetos; geles associados a biopolímeros para uso médico e veterinário na elaboração de membranas de hidrogel substitutivas; produtos cerâmicos para próteses ósseas e dentárias; como biomaterial; produtos de confeitaria; bebidas isotônicas, repositores
10 energéticos, alimentos funcionais, produtos nutricionais para pacientes hospitalares; produtos cosméticos; juntamente com frutas e/ou verduras naturais, produtos de confeitaria, bebidas isotônicas, repositores energéticos, alimentos funcionais, produtos nutricionais para pacientes hospitalares e de produtos cosméticos (ou seja, antes de ser transformada em pó, a água de coco
15 é acrescida de proporções variáveis de frutos e/ou verduras naturais, fazendo com que os valores nutricionais desses produtos sejam agregados aos da água de coco).

Neste contexto, Salgueiro *et al.* (2002) desenvolveram a água de coco estabilizada e padronizada na forma de pó, permitindo a conservação das suas
20 características benéficas e facilitando o seu uso em regiões onde não se disponham do fruto.

No âmbito patentário, foram localizados alguns documentos relevantes que serão descritos a seguir.

O documento WO 2007/020017 revela uma composição de vacina para
25 aves com administração via aerosol compreendendo partículas semelhantes a vírus. A presente invenção difere deste documento por o adjuvante ser composto por a água de coco em pó.

O documento CN 101690810 revela um adjuvante de vacina contra
doença de Newcastle, bronquite infecciosa, síndrome da queda de ovos e gripe
30 aviária que é composto principalmente de polissacarídeos e saponinas

medicinais chineses. A presente invenção difere deste documento por ser composta principalmente de a água de coco em pó.

O documento US 4,073,743 revela um processo de preparação de uma emulsão água em óleo para o uso como adjuvante de vacina podendo ser usado
5 óleo de coco. A presente invenção difere deste documento por o adjuvante ser composto de a água de coco em pó.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta ao olhar dos inventores possui novidade
10 e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

Em um aspecto, a presente invenção proporciona o uso de água de coco desidratada como adjuvante para vacinas aviárias. A novidade da presente
15 invenção está centrada no fato de que se utiliza de um composto recentemente desenvolvido, a água de coco desidratada, como adjuvante de vacinas aviárias, dada suas vantagens quanto à durabilidade, quando comparada à água de coco *in natura* e a outros diluentes e adjuvantes convencionais.

É, portanto, um objeto da presente invenção o processo de obtenção de adjuvante para vacinas aviárias compreendendo as etapas de:
20

- a) obter de 60% a 100% a água de coco em pó;
- b) suplementar a água de coco em pó com reguladores de pH;
- c) diluir em água ultra pura ou bidestilada ou destilada ou potável;

Em uma realização preferencial, para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias à base de água de coco em pó aplicada via spray é obtida
25 preferencialmente 70% a 98% de água de coco em pó mais preferencialmente 93,68%.

Em uma realização preferencial, para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias à base de água de coco em pó aplicada via água de beber é obtida
30 preferencialmente 80% a 100% de água de coco em pó mais preferencialmente 100%.

Em uma realização preferencial para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias à base de água de coco em pó é suplementada preferencialmente com 2 a 12% de reguladores de pH, mais preferencialmente 6,36%.

5 Em uma realização preferencial para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias à base de água de coco em pó é diluída preferencialmente em água ultra pura.

Em uma realização preferencial, para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias à base de água de coco em pó aplicada via spray é
10 suplementada preferencialmente com 1% a 30% de glicerol, mais preferencialmente 10%.

É um objeto adicional da presente invenção o adjuvante de vacinas aviárias obtido pelo processo descrito acima.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados
15 pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Descrição Detalhada da Invenção

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma
20 das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo, sem limitar o escopo da mesma.

Processo de Obtenção de Adjuvantes para Vacinas Aviárias

Em um aspecto, a presente invenção proporciona o processo de obtenção de adjuvante para vacinas aviárias compreendendo as etapas de:

- 25 a) obter de 60% a 100% a água de coco em pó;
 b) suplementar a água de coco em pó com reguladores de pH;
 c) diluir em água ultra pura ou bidestilada ou destilada ou potável;

Em uma realização preferencial, para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias à base de água de coco em pó aplicada via spray é obtida
30 preferencialmente 70% a 98% de água de coco em pó mais preferencialmente 93,68%.

Em uma realização preferencial, para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias à base de água de coco em pó aplicada via água de beber é obtida preferencialmente 80% a 100% de água de coco em pó mais preferencialmente 100%.

- 5 Em uma realização preferencial para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias à base de água de coco em pó é suplementada preferencialmente com 2 a 12% de reguladores de pH, mais preferencialmente 6,36%.

- 10 Em uma realização preferencial para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias à base de água de coco em pó é diluída preferencialmente em água ultra pura.

- 15 Em uma realização preferencial, para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias à base de água de coco em pó aplicada via spray é suplementada preferencialmente com 1% a 30% de glicerol, mais preferencialmente 10%.

Em uma realização preferencial para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias à base de água de coco em pó aplicada via spray, o pH da composição é mensurado obtendo-se preferencialmente valores entre 7,0 e 7,8, mais preferencialmente 7,4.

- 20 Em uma realização preferencial para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias à base de água de coco em pó aplicada via água de beber, o pH da composição é mensurado obtendo-se preferencialmente valores entre 6,0 e 7,0, mais preferencialmente 6,7.

- 25 Em uma realização preferencial para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias à base de água de coco em pó aplicada via spray, a osmolaridade da composição é mensurada obtendo-se preferencialmente valores entre 280 mOsm/Kg H₂O a 320 mOsm/Kg H₂O, mais preferencialmente 294 mOsm/Kg H₂O.

- 30 Em uma realização preferencial para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias à base de água de coco em pó aplicada via água de beber, a osmolaridade da composição é mensurada obtendo-se preferencialmente

valores entre 1 mOsm/Kg H₂O a 20 mOsm/Kg H₂O, mais preferencialmente 10 mOsm/Kg H₂O.

Água de Coco Desidratada (em Pó)

5 Tendo a água de coco desidratada (ou em pó) uma composição rica e balanceada, promove condições fisiológicas para manutenção do antígeno vacinal, além de pH e pressão osmótica ajustados e viabilidade metabólica ideal. Os minerais contidos na sua composição, como o sódio e o potássio, são fundamentais para a viabilidade do antígeno; os açúcares (frutose e glicose)
10 como fonte energética, e os aminoácidos promovem sua manutenção. Além disso, é um produto atóxico e inócuo e não interage com o antígeno. Todas estas condições fazem da ACP um produto para ser utilizado como adjuvante de vacinas aviárias.

Adjuvante para Vacina

15 Um adjuvante é qualquer substância que faz melhorar, modificar, acelerar ou prolongar a resposta imunológica aos antígenos da vacina (Lima *et al.*, 2004). Os adjuvantes promovem o desenvolvimento de uma poderosa e duradoura resposta imunológica. Qualquer material, natural ou sintético, que aumente ou ocasione resposta imune a um antígeno é considerado um
20 adjuvante (Resende, 2004).

Por sua capacidade de manutenção celular, o produto manterá viável o vírus vivo vacinal por um período superior a duas horas, após a vacina ter sido diluída, minimizando prováveis falhas no manejo de vacinação relacionadas ao tempo de distribuição da vacina para as aves e conservação da mesma,
25 proporcionando resultados para a vacinação mais seguros e estáveis, com produção de anticorpos em títulos de proteção e com uniformidade.

No caso do vírus vacinal inativado, em aplicação endógena, o produto utilizado como adjuvante, devido a sua alta concentração de açúcares e minerais, promoverá um aumento da reação inflamatória local, com migração
30 de células indutoras de imunidade, com a grande vantagem de ocasionar uma menor reação local, quando comparado às soluções oleosas utilizados na

rotina. Sendo um produto natural, com custo de produção inferior aos similares industriais existentes, com estabilidade de armazenamento em prateleira e de fácil manipulação, atingirá todo o mercado nacional e internacional tanto da avicultura industrial quanto da criação de aves caipiras, silvestres e exóticas.

5 A invenção será utilizada também como adjuvante de vacina utilizada em aves, sem se limitar apenas a aves, compreendendo frangos de corte, poedeiras comerciais, aves reprodutoras, perus, codornas e avestruzes, aves caipiras, exóticas e silvestres de qualquer raça, em qualquer idade, momento da criação, clima e em qualquer lugar do mundo.

10 O adjuvante será individual para cada tipo de vírus ou combinação deles, aplicados de forma massal por via água de bebida (oral) ou nebulização (spray), e na forma individual, pelas vias ocular e injetável podendo ser adaptado para os agentes da Doença de Newcastle, Bronquite Infecciosa das Galinhas, Doença de Gumboro, Encefalomielite Aviária, Bouda Aviária, Doença
15 de Marek, Influenza Aviária, Rinotraqueíte dos Perus, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, Laringotraqueíte Aviária, ou qualquer outro vírus ou bactéria que causar enfermidade em aves e que não esteja aqui descrito.

Podendo também o adjuvante ser para vacinas com antígenos vivos ou
20 inativados; com apenas um vírus vacinal ou em associação com mais vírus, bem como em vacinas recombinantes, sem excluir nenhuma outra forma de vacina, atuando como adjuvantes imunoestimulante e/ou adjuvante de mucosa.

Tais produtos podem conter veículos, excipientes e quaisquer ingredientes adequados à finalidade visada. Tais ingredientes são, em si,
25 conhecidos pelo homem da técnica, e não são como tais, de forma individual, objeto de proteção aqui reivindicada. Os ingredientes que podem ser utilizados, não excluindo a utilização de nenhum outro, são: antibióticos, antifúngicos, antioxidantes, glicerol, corantes alimentícios, surfactantes, vitaminas, minerais, citoquinas, saponinas, lipopeptídeos, emulsões, quitosana, etc.

Formas aceitáveis para a composição da invenção, sem excluir quaisquer outras, são, por exemplo, suspensão, emulsão, dispersão, solução, gel, óleo, pó, cápsula, tablete, líquido injetável, aerossol, liofilizada, etc.

É um objeto adicional da presente invenção o adjuvante de vacinas aviárias obtido pelo processo descrito acima.

Exemplo 1. Realização Preferencial

A metodologia aplicada esteve de acordo com o REGULAMENTO TÉCNICO PARA A PRODUÇÃO, O CONTROLE E O USO DE VACINAS E DILUENTES PARA A AVICULTURA, Instrução Normativa MAPA nº07, de 10 de Março de 2005. Dou 20/03/2006.

Vacinas

Foram utilizadas as vacinas comerciais contra a Doença de Newcastle (DN) e contra Bronquite Infecciosa (BIG), cepas HB1 e Mass H120, respectivamente. A escolha desses vírus vacinais deveu-se ao fato de serem considerados os mais lábeis e sensíveis dentre os muitos já apresentados. Devido a este fator, pode-se extrapolar os resultados obtidos para os demais.

Titulação das vacinas contra DN e BIG associadas com os adjuvantes à base de água de coco em pó (ACP)

Cada tipo de vacina foi diluído em PBS (*Phosphate-Buffer Saline*) e em ACP, em cinco diluições, sendo inoculadas em grupos de cinco ovos, com idade entre 09 a 11 dias de incubação. Para cada grupo houve um grupo controle negativo, inoculado com solução salina estéril.

As vacinas contra BIG foram inoculadas nos ovos SPF (ovos livres de patógenos específicos) imediatamente após a diluição nos respectivos meios, enquanto que as vacinas contra DN foram diluídas e mantidas em temperatura ambiente (25°C) durante quatro horas, sendo então inoculadas.

O título da vacina foi calculado a partir da proporção de indivíduos infectados (positivos) dentre um universo de indivíduos inoculados e corresponde à recíproca da maior diluição onde sejam observados sinais específicos de infecção em 50% dos substratos inoculados. O título das

vacinas foi calculado pelo método de Reed x Muench, e dado em DIE 50%/dose inoculada.

A tabela 1 mostra os títulos das vacinas encontradas, após diluição com os produtos à base de água de coco em pó, bem como dos produtos comerciais disponíveis, o tempo de exposição após a diluição e os títulos vacinais preconizados como aceitáveis pelo MAPA, para cada um dos vírus vacinais.

Tabela 1. Título das vacinas contra Doença de Newcastle e Bronquite Infecciosa das Galinhas, segundo o diluente utilizado e o início da inoculação das vacinas.

Diluente	Tipo Vírus	Tempo Diluição	Título (0,2 mL)	Título mínimo/dose (MAPA)
PBS	DN	0 h	$10^{7,68}$ DIE50%	$10^{6,2}$ DIE50%
ACP		4 h	$10^{6,6}$ DIE50%	
PBS		4h	$10^{6,5}$ DIE50%	
PBS	BIG	0 h	$10^{3,68}$ DIE50%	$10^{3,0}$ DIE50%
ACP		0 h	$10^{3,68}$ DIE50%	$10^{3,0}$ DIE50%

Os resultados demonstram títulos protetivos em todos os experimentos, dentro do preconizado pelo MAPA.

Inocuidade da ACP pelas vias ocular, oral e spray em frangos de corte

Foi inoculado o equivalente a 10 (dez) doses por ave em cada uma das vias testadas, com oito dias de idade, para cada uma das vacinas. As aves foram mantidas em observação por 21 dias. No final deste período, não foi observada nenhum tipo de lesão, em nenhuma das vias utilizadas, nem qualquer outro sinal que denote que o produto seja agressivo ao animal.

Sorologia

Foi testada a capacidade da ACP em promover a formação de anticorpos protetivos, contra os vírus da Doença de Newcastle e da Bronquite Infecciosa das Galinhas. As supracitadas vacinas foram diluídas em ACP ou em diluentes comerciais disponíveis. As vacinações foram realizadas em

frangos de corte, em situação semelhante à encontrada nas criações de campo.

Foram alojados 800 pintos de corte de um dia de idade, não vacinados, em dois galpões experimentais da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará. Os mesmos foram criados numa densidade de 10 aves/m² e temperatura ambiente controlada por ventiladores, recebendo ração balanceada e água *ad libitum*, até os 50 dias de idade, quando foram descartados para a venda.

Uma parte destas aves, 200 delas, foi alojada em outro galpão, não recebendo nenhuma vacina, sendo considerado como galpão controle. As demais aves foram divididas igualmente e aleatoriamente em vários grupos, onde cada grupo recebeu uma vacina com uma via de aplicação diferente e sempre um grupo utilizou a ACP, enquanto seu grupo espelho recebeu o diluente comercial. Todas as aves foram vacinadas com oito dias de idade.

Para obtenção de soro destinado às provas sorológicas, foram coletadas amostras de sangue, por punção da veia braquial, em 20 aves de cada um dos tratamentos, escolhidas aleatoriamente, e sempre nas mesmas idades. Os soros obtidos foram devidamente identificados e armazenados em refrigerador a -18°C, até o momento da realização das provas sorológicas indicadas para cada uma das vacinas utilizada.

Para mensurar a proteção contra a Doença de Newcastle, foi utilizada a prova sorológica denominada Inibição de Hemoaglutinação, e para a Bronquite Infecciosa das Galinhas, o Teste de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbert Assay*). Os resultados demonstraram não haverem diferenças estatísticas entre os grupos, com os grupos onde se utilizou ACP apresentando títulos numericamente mais uniformes.

Desafio Viral – Potência

Para avaliar a capacidade do vírus estabilizado com ACP em conferir proteção contra BIG, foi realizado desafio viral em 105 aves SPF alojadas em sete gaiolas isoladoras para desafios virais, recebendo ração balanceada e água *ad libitum*.

As aves de cada grupo (n=15) foram vacinadas através da via spray e água de bebida, com as vacinas contra BIG adicionadas de ACP ou do equivalente comercial disponível, no 8º dia de idade, com exceção do grupo 4 (Controle Positivo). No 28º dia de vida, receberam inoculação do vírus patogênico, com exceção do grupo 7 (Controle Negativo).

Após a inoculação, o aparecimento de sinais clínicos e a mortalidade foram avaliados em cada um dos experimentos, por um período de cinco dias, momento em que as aves foram retiradas dos isoladores, sacrificadas e coletados “swabs” traqueais para isolamento viral, e traquéias para exames histopatológicos, onde foram observadas as lesões, mensuradas em escores.

Também foram coletadas amostras de sangue de dez aves em cada grupo, 16 dias após a vacinação e no dia do descarte, para avaliação da presença de anticorpos, através do teste de ELISA.

A tabela 2 demonstra os grupos, a vacinação contra BIG utilizando a amostra H-120, o tipo de diluente utilizado, a via de vacinação e a realização ou não do desafio viral.

Tabela 2. Desafio viral para Bronquite Infecciosa das Galinhas, com 0,03 mL, via ocular, da amostra de referência M41, com dose cheia na DIE 50% obtida na titulação.

Grupos	Vacinação BIG	Diluente/ Adjuvante	Via Aplicação	Desafio
1	sim	ACP-202+	Spray	Sim
2	sim	Diluente Comercial	Spray	Sim
3	sim	ACP-202+	Spray	Não
4	não	-	-	Sim
5	sim	ACP-203+	água de bebida	Sim
6	sim	leite em pó desnatado	água de bebida	Sim

7	sim	ACP-203+	água de bebida	Não
---	-----	----------	----------------	-----

Tabela 3. Número de aves que apresentavam sinais clínicos* de espirro e/ou estertores, sobre o total de aves avaliadas por grupo (*ronqueira).

Grupo	Nº de aves com sinal clínico sobre total aves avaliadas por grupo
1	07/15
2	10/15
3	0/15
4	02/15
5	07/15
6	0/15
7	0/15

5 Tabela 4. Resultado qualitativo do teste Elisa para Bronquite Infecciosa das Galinhas.

Grupos	Coletas	Nº de amostras	Resultado
1	1	10	10/10 negativas
	2	10	10/10 negativas
2	1	10	10/10 negativas
	2	10	10/10 negativas
3	1	09	09/09 negativas
	2	10	10/10 negativas
4	1	10	10/10 negativas
	2	10	10/10 negativas
5	1	10	10/10 negativas
	2	10	10/10 negativas

6	1	10	10/10 negativas
	2	10	04/10 positivas
7	1	10	10/10 negativas
	2	10	10/10 negativas

Tabela 5. Avaliação do desafio do vírus da BIG, através da colheita de suabes traqueais de cada ave e de cada grupo.

Identificação		Isolamento viral
Pool 1 grupo 1	Aves 1, 2, 3, 4 e 5	Positivo
Pool 2 grupo 1	Aves 6, 7, 8, 9 e 10	Positivo
Pool 3 grupo 1	Aves 11, 12, 13, 14 e 15	Positivo
Pool 1 grupo 2	Aves 1, 2, 3, 4 e 5	Positivo
Pool 2 grupo 2	Aves 6, 7, 8, 9 e 10	Positivo
Pool 3 grupo 2	Aves 11, 12, 13, 14 e 15	Positivo
Pool 1 grupo 3	Aves 1, 2, 3, 4 e 5	Negativo
Pool 2 grupo 3	Aves 6, 7, 8, 9 e 10	Negativo
Pool 3 grupo 3	Aves 11, 12, 13, 14 e 15	Negativo
Pool 1 grupo 4	Aves 1, 2, 3, 4 e 5	Positivo
Pool 2 grupo 4	Aves 6, 7, 8, 9 e 10	Positivo
Pool 3 grupo 4	Aves 11, 12, 13, 14 e 15	Positivo
Pool 1 grupo 5	Aves 1, 2, 3, 4 e 5	Positivo
Pool 2 grupo 5	Aves 6, 7, 8, 9 e 10	Positivo
Pool 3 grupo 5	Aves 11, 12, 13, 14 e 15	Positivo
Pool 1 grupo 6	Aves 1, 2, 3, 4 e 5	Positivo
Pool 2 grupo 6	Aves 6, 7, 8, 9 e 10	Positivo
Pool 3 grupo 6	Aves 11, 12, 13, 14 e 15	Positivo
Pool 1 grupo 7	Aves 1, 2, 3, 4 e 5	Negativo
Pool 2 grupo 7	Aves 6, 7, 8, 9 e 10	Negativo
Pool 3 grupo 7	Aves 11, 12, 13, 14 e 15	Negativo

Controles inoculados apenas com diluente	-	Negativo
Controles não inoculados	-	Negativo

O resultado da análise histológica das traquéias coletadas no momento do descarte das aves está resumido abaixo:

- a. As traquéias dos grupos 03, 06 e 07 não apresentaram alterações importantes em todas as amostras analisadas;
- b. As traquéias dos grupos 01, 02, 04 e 05 apresentaram lesões severas, compatíveis com desafio viral respiratório. As lesões apresentaram características de infecção subaguda a crônica.

Teste de Esterilidade

Os produtos finais foram testados quanto à sua esterilidade para bactérias aeróbicas, bactérias anaeróbicas e fungos, utilizando meios de cultura apropriados como o Meio de Caseína de Soja Digerida, Infusão de Cérebro-Coração (BHI), Meio Fluido Tioglicolato e *Sabouraud* Líquido, visando flora aeróbica, anaeróbica e fungos. A sensibilidade dos meios utilizados foi testada antes do início do experimento. Foram testadas 10 amostras de cada um dos adjuvantes, devidamente re-hidratados em água bidestilada estéril.

a) *Pesquisa de bactérias da flora aeróbica*: Foram inoculados 0,2 mL do adjuvante, equivalente a cada amostra a ser testada, em dois tubos contendo 40 mL de meio fluido de caseína de soja digerida ou BHI. Um tubo foi incubado a 32°C e outro a 22°C, sendo a leitura realizada após 14 dias.

b) *Pesquisa de flora anaeróbica*: Foram inoculados, em profundidade, 0,1 mL do adjuvante, equivalente a cada amostra a ser testada, em tubo para eliminação do oxigênio. A incubação foi realizada em anaerobiose estrita a 37°C por 14 dias, em meio Fluido Tioglicolato.

c) *Pesquisa de fungos*: Foram inoculados 0,2 mL do adjuvante de cada partida, em um frasco individual contendo 40 mL de meio *Sabouraud*, incubados a 22°C por 14 dias.

Após 14 dias em cultivo em temperaturas adequadas para cada tipo de meio utilizado, não foi identificado crescimento bacteriano nem de fungos, em nenhuma das 10 amostras inoculadas.

Referências Bibliográficas

- ALEXANDER, D. J. Newcastle Disease. In: The World Organization of Animal Welfare (Eds.). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, OIE Terrestrial Manual, p. 576-589, 2009.
- ALMEIDA, R.; SOARES, A.E.E. Usage of green coconut water and different tissue culture media for in vitro honey bee semen storage (*Apis mellifera*; HYMENOPTERA: APOIDEA). *Interciencia*, v.27, n.6, p.317-321, 2002.
- ANURAG, P.; RAJAMOHAN, T. Cardioprotective effect of tender coconut water in experimental myocardial infarction. *Plant Foods for Human Nutrition*, v.58, p.1-12, 2003.
- ARAÚJO, A.A. *Utilização da água de coco "in natura" com adição de gema de ovo como diluidor do sêmen caprino*. Fortaleza, 1990. Tese (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará – UECE, 1990).
- BLUME, H.; MARQUES Jr, A.P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.18, p.97-104, 1994.
- BOWERSOCK, T.L.; MARTIN, S. Vaccine delivery to animals. *Advantage Drug Delivery Reviews*, v.38, p.167-194, 1999.
- BRASIL/MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Estatísticas. *Agricultura Brasileira em Números, Anuário 2005*. Lavouras Permanentes – Coco da Baía.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, *Instrução Normativa nº7, de 10 de Março de 2006: Regulamento Técnico para a Produção, Controle e o Uso de Vacinas e Diluentes para a Avicultura*, 2006.
- CAMPOS, C.F.; SOUZA, P.E.A.; COELHO, J.V.; GLÓRIA, M.B.A. Chemical composition, enzyme activity and effect of enzyme inactivation on flavor quality of green coconut water. *Journal of Food Processing and Preservation*, v.20, p.487-500, 1996.

- CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. *Animal Reproduction Science*, v.92, p.384-391, 2006.
- CARVALHO, J.M; MAIA, G.A.; DE SOUSA, P.H.M.; MAIA Jr., G.A. Água de coco: propriedades nutricionais, funcionais e processamento. Revisões, *Semana Ciências Agrárias*, Londrina, v.27, n.3, p.437-452, 2006.
- CHALLACOMBE, S.J.; RAHMAN, D.; JEFFERY, H.; DAVIS, S.S.; O'HAGAN, D.T. Enhanced secretory IgA and systemic IgG antibody responses after oral immunization with biodegradable micro particles containing antigen. *Immunology*, v.76, p.164-168, 1992.
- CHALLACOMBE, S.J.; RAHMAN, D.; O'HAGAN, D.T. Salivary, gut, vaginal and nasal antibody responses after oral immunization with biodegradable micro particles. *Vaccine*, v.15, n.2, p.169-175, 1997.
- CRUZ, J.F. *Conservação e fertilidade do sêmen ovino mantido à temperatura de +4°C por um período de 48 horas diluído em frações ativas da água de coco*. Fortaleza, 1994. Tese (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará – UECE, 1994).
- DEGEFA, T.; DADI, L.; YAMI, A.; GIMARIAN, K.; NASSIR, M. Technical and economic evaluation of different methods of Newcastle disease vaccine administration. *Journal of Veterinary Medicine*, v.51, p.365-369, 2004.
- DE MARTIN, Z.J. Processamento: produtos, características e utilização. *Frutos Tropicais – Coco*, São Paulo: ITAL, p. 183-254, 1980.
- EDELMAN, R. Adjuvantes for the future. *New Generations Vaccines*, 2nd ed., p.173-192, 1997.
- ELDRIDGE, J.H.; HAMMOND, C.J.; MEULBROCK, J.A.; STAAS, J.K.; GILLEY, R.M.; TICE, T.R. Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches. *Journal Controlled Release*, v.11, p.205-214, 1990.
- FARIAS, J.O.; NUNES, J.F.; CARVALHO, M.A.M., *et al.* Avaliação "in vitro" e "in vivo" do sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER)

conservado à temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. *Revista Científica de Produção Animal*, v.1, p.44-58, 1999.

FONSECA, A.M.; MONTE, F.J.Q.; OLIVEIRA, M.C.F.; MATTOS, M.C.; CORDELL, G.A.; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, T.L.G. Coconut water (*Cocos nucifera* L.) – A new biocatalyst system for organic synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.57, n.1-4, p.78-82, 2009.

FREITAS, J.V.F. *Sincronização do ciclo estral e fertilidade de cabras submetidas a dois níveis de gonadotrofina coriônica (eCG) inseminadas artificialmente*. Fortaleza, 1988. Monografia (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará – UECE, 1988).

FREITAS, J.V.F. *Parâmetros andrológicos e avaliação “in vitro” do sêmen de ovinos deslanados criados na região litorânea do Nordeste brasileiro em estação seca e chuvosa*. Fortaleza, 1992. Tese (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará – UECE, 1992).

GALLILI, G.E.; BEN-NATHAN, D. Newcastle disease vaccines. *Biothechnology Advances*, v.16, n. 2, p.343-366, 1998.

GE, L.; YONG, J.W.H.; TAN, S.N.; YANG, X.H.; ONG, E.S. Analysis of cytokinin nucleotides in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, v.1133, p.322-331, 2006.

GIULIANI, M.M.; DEL GIUDICE, G.; GIANNELLI, V.; DOUGAN, G.; DOUCE, G.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M. Mucosal adjuvanticity and immunogenicity of LTR72, a novel mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with partial knockout of ADP-ribosyltransferase activity. *The Journal of Experimental Medicine*, v.187, p.1123-1132, 1998.

GOPIKRISHNA, V.; THOMAS, T.; KANDASWAMY, D. A quantitative analysis of coconut water: a new storage media for avulsed teeth. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology*, v.105, p.e61-e65, 2008.

- JANGCHUD, K.; PUCHAKAWIMOL, P.; JANGCHUD, A. Quality changes of burnt aromatic coconut during 28-day storage in different packages. *LWT – Food Science and Technology*, v.40, p.1232-1239, 2007.
- JAYALEKSHMY, A.; ARUMAGHAN, C.; NARAYANAN, S.; MATHEW, A.G.
 5 Changes in the chemical composition of coconut water during maturation. *Journal of Food Science and Technology*, v.23, n.4, p.203-207, 1984.
- KULCSAR, G.; FARSANG, A.; SOOS, T. Testing for viral contaminants of veterinary vaccines in Hungary. *Biologicals*, v.38, n.3, p.346-349, 2010.
- LAGUNA, L.E. *Determinações físico-químicas da água de coco verde em duas variedades “Cocus nucifera” coco da praia e anão*. Fortaleza, 1996. Monografia
 10 (Especialização em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes da Universidade Estadual do Ceará - UECE, 1996).
- LIMA, K.M.; SANTOS, S.A.; RODRIGUES Jr., J.M.; SILVA, C.L. Vaccine adjuvant: it makes the difference. *Vaccine*, v.22, p.2374-2379, 2004.
- 15 MAGALHÃES, M.P.; GOMES, F.S.; MODESTA, R.C.D.; MATTA, V.M.; CABRAL, L.M.C. Conservação de água de coco verde por filtração com membrana. *Ciência e Tecnologia do Alimento*, v.25, n.1, p.72-77, 2005.
- MATSUI, K.N.; GUT, J.A.W.; OLIVEIRA, P.V.; TADINI, C.C. Inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in green coconut water by microwave
 20 processing. *Journal of Food Engineering*, v. 88, p.168-176, 2008.
- MONTEZUMA Jr., P.A.; VIANA NETO, R.; NUNES, J.F. Utilização da água de coco “in natura”, com adição de gema de ovo, como diluente de congelamento do sêmen canino, em paillets de 0,5ml. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. *Anais...* Olinda, p. 535, 1994.
- 25 MOREIRA-NETO, J.J.S.; GONDIM, J.O.; RADDI, M.S.G.; PANSANI, C.A. Viability of human fibroblasts in coconut water as a storage medium. *International Endodontic Journal*, v.42, n.9, p.827-830, 2009.
- NEVES, J.P.; NUNES, J.F.; MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H., *et al.* Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: GONÇALVES, P.B.D.;
 30 FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, J.V.F. (Org.). *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. 2. ed. Varela: São Paulo, 2005.

NOGUEIRA, R.D.M.; VASCONCELOS, P.R.L. Água de coco como meio de cultura em conservante de córneas: estudo experimental em coelhos. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, v.59, p.395-401, 2000.

NUNES, J.F.; SALLES, M.G.F. El agua de coco (*Cocos nucifera* L.) in natura, integral y añadida del medio de cultura semi intensivo. *Revista Científica de Ciências Veterinárias*, v.3, p.273-282, 1993.

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos. *Revista Científica de Produção Animal*, v.1, p.17-26, 1999.

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. Biotécnicas da reprodução animal – caprinos e ovinos. In: 57ª SBPC, 2005, Fortaleza. *Anais da 57ª SBPC*. 2005a. Simpósio: Caprinocultura no Nordeste.

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. Atualização em biotécnicas da reprodução animal - caprinos. In: II CONERA - CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2005, Teresina. *Anais... II Colégio Brasileiro de Reprodução Animal*. 2005b.

NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M.; GONDIM, J.M. Novos produtos com base na água de coco em pó. In: 12ª SEMANA INTERNACIONAL DA FRUTICULTURA, FLORICULTURA E AGROINDÚSTRIA - FRUTAL 2005, 2005, *Anais...* Fortaleza, 2005.

O'HAGAN, D.T.; RAHMAN, D.; JEFFERY, H.; SHARIF, S.; CHALLACOMBE, S.J. Controlled release micro particles for oral immunization. *International Journal of Pharmaceutics*, v.108, n.2, p.133-139, 1994.

PETROIANU, G.A.; KOSANOVIC, M.; SHEHATTA, I.S.; MAHGOUB, B.; SALEH, A.; MALECK, W.H. Green coconut water for intravenous use: Trace and minor element content. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, v.17, n.4, p.273-282, 2004.

PINHEIRO, A.M.; MACHADO, P.H.; DA COSTA, J.M.C.; MAIA, G.A.; FERNANDES, A.G.; RODRIGUES, M.C.P.; HERNANDEZ, F.F.H.

Caracterização química, físico-química, microbiológica e sensorial de diferentes

marcas de água de coco obtidas pelo processo asséptico. *Revista Ciência Agronômica*, v.36, n.2, p.209-214, 2005.

RAUW, F.; GARDIN, Y.; PALYA, V.; ANBARI, S.; GONZE, M.; LEMAIRE, S.; VAN DEN BERG, T.; LAMBRECHT, B. The positive adjuvant effect of chitosan an antigen-specific cell-mediated immunity after chickens vaccination with live Newcastle disease vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.134, p.249-258, 2010.

REBELATTO, M.C.; GUIMOND, P.; BOWERSTOCK, T.L.; HOGENESCH, H. Induction of systemic and mucosal immune response in cattle by intranasal administration of pig serum albumin in alginate micro particles. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.83, p.93-105, 2001.

RESENDE, F.C.B.; PASSOLD, J.; FERREIRA, S.I.A.C.; ZANETTI, C.R.; LIMA, C.H. Vaccine adjuvants: possibilities for use in humans or animals. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, v.27, n.3, p.116-124, 2004.

RODRIGUES, A.P.R.; TORRES, M.Z.G.; OLIVEIRA, L.F.; NUNES, J.F. Água de coco sob a forma estabilizada de gel e sua fração ativa adicionada ou não de gema de ovo como diluída do semen caprino. In: XXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1994, Olinda - PE, *Anais...* 1994.

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.L.P., *et al.* Utilização de diluentes à base de água de coco *in natura* e em pó na inseminação artificial programada de cabras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Supl., n.5, p.96-98, 2002.

SALLES, M.G.F. *Água de coco (Cocos nucifera L.) "in natura" e sob a forma de gel e estabilizada como diluidor de sêmen caprino*. Porto Alegre, 1989. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRS, 1989).

SINGH, M.; O'HAGAN, D.T. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *International Journal for Parasitology*, v.33, p.469-478, 2003.

SOUSA, N.M.; TEIXEIRA, M.D.A.; OLIVEIRA, L.F. Água de coco sob a forma de fração ativa liofilizada adicionada ou não de gema de ovo e gel, como

diluidor do sêmen ovino. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. *Anais...* Olinda, p. 583, 1994.

TONIOLLI, R. Estudos das características “in vitro” do sêmen caprino de raças nativas do Nordeste brasileiro diluído em água de coco sob a forma “in natura”, estabilizada e de gel. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.13, p.209-220, 1989a.

TONIOLLI, R. Conservação do sêmen suíno em água de coco. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. *Anais...* Belo Horizonte, p.138-142, 1989b.

10 TONIOLLI, R.; MESQUITA, D.S.M. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com B.T.S. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.14, p.249-254, 1990.

UCHOA, D.C.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Inseminação artificial a fresco em cadelas da raça boxer com diferentes diluidores de sêmen. *Revista*
15 *Brasileira de Reprodução Animal*, supl., n.5, p.150-152, 2002.

UCHOA, D.C. *Inseminação artificial em cadelas com sêmen a fresco com diluentes à base de água de coco*. Fortaleza, 2004. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará – UECE, 2004).

Reivindicações

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ADJUVANTE PARA VACINAS AVIÁRIAS

1. Processo de obtenção de adjuvante para vacinas aviárias
5 compreendendo as etapas de:

- a) obter de 60% a 100% a água de coco em pó;
- b) suplementar a água de coco em pó com reguladores de pH;
- c) diluir em água ultra pura ou bidestilada ou destilada ou potável;

2. Processo para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias, de
10 acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela etapa a) compreender a obtenção de 70% a 98% de água de coco em pó.

3. Processo para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pela vacina ser aplicada via spray.

4. Processo para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias, de
15 acordo com a reivindicação 3, caracterizado pela etapa a) compreender a obtenção de cerca de 93,68% de água de coco em pó.

5. Processo para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pela composição final ser suplementada com 1% a 30% de glicerol.

20 6. Processo para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pela composição final ser suplementada com cerca de 10% de glicerol.

7. Processo para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela etapa a) compreender a
25 obtenção de 80% a 100% de água de coco em pó.

8. Processo para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pela vacina ser aplicada via água de beber.

9. Processo para obtenção de adjuvante para vacinas aviárias aplicadas
30 via água de beber, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pela etapa a) compreender a obtenção de cerca de 100% de água de coco em pó.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela etapa b) compreender a suplementação com 2 a 12% de reguladores de pH.

5 11. Processo, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pela etapa b) compreender a suplementação com cerca de 6,36% de reguladores de pH.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela etapa c) compreender a diluição em água ultra pura.

13. Adjuvante para vacinas aviárias caracterizado por ser obtido pelo processo de acordo com qualquer reivindicação de 1 a 12.

Resumo

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ADJUVANTE PARA VACINAS AVIÁRIAS

- 5 A presente invenção refere-se, de forma geral, ao uso da água de coco em pó (ACP) ou desidratada como adjuvante para vacinas aviárias, particularmente para vacinas vivas aviárias aplicadas por diferentes vias.