

# ESTUDO DA AÇÃO DE *Nicotiana glauca* GRAHAM (ERVA- PARAGUAIA) COMO COADJUVANTE EM VACINA CONTRA A DOENÇA DE Newcastle EM FRANGOS DE CORTE

MARLETE BRUM CLEFF,<sup>1</sup> GEFERSON FISCHER,<sup>2</sup> CAREN GULARTE QUINCOZES,<sup>2</sup> MARCOS ANTÔNIO ANCIUTI,<sup>2</sup> ROGÉRIO FREITAG,<sup>2</sup> TELMO VIDOR,<sup>2</sup> FABIANE PEREIRA GENTILINI<sup>3</sup> E CARLOS EDUARDO NOGUEIRA<sup>3</sup>

1. Doutoranda, Departamento de Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas.

2. DSc., Professor Nível E, Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça, Universidade Federal de Pelotas.

3. DSc., Grupo de Estudos em Aves e Suínos (GEASPEL), do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal de Pelotas/RS – contato principal para correspondência.

## RESUMO

A *Nicotiana glauca* Graham é uma espécie nativa da Argentina, bem distribuída na América do Sul, sendo empregada, popularmente, contra dores de cabeça, dores reumáticas, cicatrização de feridas e úlceras, entre outros. Pesquisas têm avaliado a sua ação na potencialização da resposta imune. Assim, com este estudo, buscou-se avaliar a ação de um extrato aquoso de *Nicotiana glauca* Graham como coadjuvante imunológico em uma vacina contra a doença de Newcastle (DNC). Utilizaram-se 56 frangos de corte, distribuídos em quatro grupos experimentais, que receberam três doses da vacina, com ou sem adição de diferentes quantidades do extrato. Os resultados sorológicos

cos, obtidos através do teste de inibição da hemaglutinação, demonstraram diferença estatística ( $P < 0,05$ ) aos 60 dias de idade dos frangos, com incremento dos níveis de anticorpos contra a DNC, quando houve a inclusão de 5 mg/dose (Tratamento 3) do extrato, em relação à inclusão de 1 mg/dose (Tratamento 2) e 10 mg/dose (Tratamento 4), do mesmo extrato, porém sem diferir estatisticamente do controle (Tratamento 1). Estes resultados estimulam a realização de outros trabalhos, incluindo a realização do teste de citotoxicidade *in vitro* deste extrato, a fim de avaliar a sua ação efetiva como um coadjuvante imunológico.

**PALAVRAS-CHAVES:** Coadjuvante imunológico, *Nicotiana glauca* Graham, vacina.

## ABSTRACT

### THE ROLE OF *Nicotiana glauca* GRAHAM (PARAGUAYAN HERB) AS AN ADJUVANT IN IMMUNOMODULATION OF NEWCASTLE DISEASE VACCINE FOR BROILERS

The *Nicotiana glauca* is a native plant species from Argentina, but found all over South América, being used against headaches, rheumatism, injuries, ulcers, and so on. Researchers have considered it as having immunomodulation effect. This study was conducted to investigate the use of a aqueous extract of *Nicotiana glauca* Graham as an immunomodulator (adjuvant) of a Newcastle disease vaccine. A total of 56 broilers were distributed into 4 experimental groups. Each one of them

received 3 dosages of this vaccine with or without the addition of different concentrations of the extract Using hemmoagglutination inhibition techniques, the results have shown differences ( $P < 0.05$ ) in the third sera collection. An increase in the antibody titer with the inclusion of 5 mg/dosage of the extract (Treatment 3) as compared to 1 mg/dosage (Treatment 2) and 10 mg/dosage of the extract (Treatment 4) was observed. However, birds from Treatment 3 did not differ ( $P > 0.05$ ) from Treatment 1. These results

indicated that further investigations are required, including the use of cytotoxicity tests *in vitro*, to evaluate the immunomodulation effect of this extract.

KEY WORDS: Immunomodulation effect, *Nicotiana glauca* Graham, vaccine.

## INTRODUÇÃO

A fitoterapia manteve seu domínio, como a forma de cura, até os anos 1940, quando a sulfa revolucionou a terapia das infecções. A partir daí, as substâncias sintéticas dominaram o mercado terapêutico. Porém, nas últimas décadas, houve um ressurgimento do interesse nas plantas como fontes de novos fármacos, em virtude de sua grande diversidade molecular, que é muito superior àquela derivada dos processos de síntese (POTTERAT & HOSTETTMANN, 1995; ROBBERS et al., 1997; YUNES & CALIXTO, 2001; GUERRA & NODARI, 2003). Além disso, os produtos naturais muitas vezes exibem propriedades adicionais às drogas antimicrobianas a eles associados (NISBET & MOORE, 1997).

O gênero *Nicotiana* possui cerca de noventa espécies com distribuição cosmopolita. *Nicotiana glauca* Graham pertence à família *Solanaceae*, subfamília *Cestroidea*, gênero *Nicotiana* e espécie *glauca*, sendo considerada a espécie mais rara de tabaco (STEENKAMP et al., 2002; NURIT et al., 2005). Popularmente as partes mais utilizadas desta planta são as folhas, tanto frescas como secas, aplicadas externamente no tratamento de diversas afecções (JANAKAT & AL-MERIE, 2002; STEENKAMP et al., 2002; NURIT et al., 2005). O principal componente químico do gênero *Nicotiana* são os alcalóides, como a nicotina, nornicotina, nicotimina, anabasina, anabatina (SHMELTZ, 1971; MARICONI, 1981). Na espécie *glauca* o principal componente é a anabasina (STEENKAMP et al., 2002; NURIT et al., 2005), um alcalóide piridímico que tem como precursor biogenético o ácido nicotínico (HENRIQUES et al., 2003). A anabasina, também chamada neonicotina, é o princípio tóxico da planta, apresentando uma massa molecular de

162,23 e uma  $DL_{50}$  de 22mg/kg (STEENKAMP et al., 2002).

Os alcalóides têm sido empregados na terapêutica atual puros ou em associações, e também na forma de derivados, ou ainda na forma de matéria-prima para a síntese de fármacos (SAMUELSON, 1992; EVANS, 1996; CORDEL et al., 2001; COYLE & KERSHAM, 2001).

Quando a fitoterapia trata de questões referentes ao sistema imune, procura fazê-lo de modo a estimular todo o sistema na direção de um equilíbrio. Diversas plantas utilizadas para esse fim não afetam a capacidade de memória das células deste sistema, mas atuam como um estimulante geral, sendo consideradas imunoestimulantes ou imunomoduladoras (DALSGAARD, 1974; MANOSROI et al., 2004; SILVA et al., 2005). Entre as plantas da região sul do Brasil, a *Nicotiana glauca* Graham, associada a outras plantas, tem sido estudada quanto ao seu potencial como coadjuvante imunológico em vacinas (VIDOR et al., 1998; FELDENS, 2000).

As vacinas tradicionais são heterogêneas e contêm vários componentes microbianos que funcionam como adjuvantes, e que têm sido eliminados da nova geração de vacinas (SINGH & O'HAGAN, 2002; STORNI et al., 2005), particularmente aquelas baseadas em proteínas recombinantes e vacinas de DNA. Isso as torna menos reatogênicas do que as vacinas tradicionais, mas também menos imunogênicas. O sucesso na inativação de patógenos através da imunização profilática depende grandemente da habilidade do sistema imune em reconhecer e responder mais efetivamente ao antígeno, preferencialmente com dano mínimo ao tecido saudável (JANEWAY et al., 2002; TORTORA et al., 2003). Por isso, há necessidade do desenvolvimento de novos adjuvantes capazes de aumentar a imunogenicidade dos antígenos, melhorando a qualidade das

vacinas (COX & COULTER, 1997; SINGH & O'HAGAN, 2002; STORNI et al., 2005).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da *Nicotiana glauca* Graham como coadjuvante em vacina contra a doença de Newcastle sobre a resposta imunológica de frangos de corte.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Preparação do extrato aquoso de *Nicotiana glauca* Graham

Registrou-se, no Herbário da Universidade Federal de Pelotas – UFPel – sob n.º. PEL 23.405, uma amostra da planta *Nicotiana glauca* Graham, colhida no mês de março de 2004, na cidade de Pelotas, Sul do Brasil. Encaminharam-se as folhas deste exemplar, colhidas manualmente, ao Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Veterinária da UFPel, onde foram distribuídas em bandejas forradas para secagem em estufa a 40°C, durante uma hora. Posteriormente, foram trituradas e acondicionadas em frascos hermeticamente fechados.

Para obtenção do extrato bruto aquoso, utilizaram-se 25 g de folhas e 250 mL de água destilada. O material vegetal e a água foram colocados em balão e mantidos sob uma chapa de aquecimento com agitação constante e vigorosa, até alcançar lentamente a temperatura de 70°C, sendo mantido nestas condições por uma hora. Após decantação por quinze minutos, a solução aquosa foi filtrada e reservada. Repetiu-se o procedimento até a obtenção de três extrações do mesmo material vegetal inicial.

Distribuiu-se parte do extrato bruto aquoso em pequenos frascos, tendo sido liofilizada, enquanto que se congelou outra alíquota a -70°C, sendo mantidas desta forma até o momento de utilização no experimento.

### Animais

Utilizaram-se 56 frangos de corte, fêmeas, da linhagem Ross, alojados com um dia de idade, em boxes de 4 m<sup>2</sup>. As aves foram distribuídas em quatro grupos de quatorze animais, sendo empregadas no experimento a partir do 14º dia de idade, permitindo, assim, o desenvolvimento corporal apropriado e possibilitando o desaparecimento dos anticorpos maternos. Forneceram-se ração e água à vontade nos trinta dias iniciais do período experimental. Após este período, a ração passou a ser restringida de modo a evitar o ganho de peso excessivo dos frangos, uma vez que estes seriam criados até 120 dias de idade.

### Caracterização dos tratamentos

Para caracterizar os tratamentos (Quadro 1), as quantidades do extrato da planta utilizada no estudo foram as seguintes: 0mg/dose (T1); 10mg/dose (T2); 5mg/dose (T3); e 1 mL/dose (T4).

Utilizou-se uma vacina comercial contra a doença de Newcastle (DNC), que é preparada com vírus inativado e emulsionado em óleo mineral. Esta vacina é recomendada na dose de 0,5 mL por ave. A escolha desta vacina levou em consideração a facilidade de mensuração dos níveis de anticorpos contra o vírus da DNC, através da técnica de inibição da hemaglutinação (IH). O inóculo foi preparado emulsificando o extrato da planta ao óleo mineral associado ao vírus presente na vacina comercial.

Os animais receberam três doses de 0,5 mL da vacina, com ou sem adição de diferentes quantidades do extrato da planta *N. glauca*. Os inóculos foram aplicados aos 14, 44 e 74 dias de idade por via intramuscular profunda.

**QUADRO 1.** Composição dos inóculos experimentais – Pelotas, 2004.

Tratamento	Extrato	Antígeno	Nº. de animais	Dose	
T1	Controle	0mg	0,5mL/dose	14	1,5mL/ave
T2	N. glauca	10mg	0,5mL/dose	14	1,5mL/ave
T3	N. glauca	5mg	0,5mL/dose	14	1,5mL/ave
T4	N. glauca	1mL	0,5mL/dose	14	1,5mL/ave

## Sorologia

A determinação da eficiência dos extratos aquosos da planta *N. glauca* como coadjuvante imunológico, refletindo-se no aumento de títulos de anticorpos contra o vírus da DNC, foi medida através da prova de inibição da hemaglutinação (IH), conforme descrita por ELIAS Jr. (1986). Resumidamente, foram feitas quatro colheitas de sangue para a obtenção dos soros aos 14, 30, 60 e 90 dias de idade das aves. O vírus usado no teste de IH constituiu-se de amostra La Sota, derivada de vacina comercial passada em ovos embrionados. Utilizaram-se microplacas de poliestireno, contendo 96 cavidades, com fundo em "V". O ensaio foi desenhado de acordo com o método beta, no qual diluições seriadas do soro são misturadas com concentrações fixas e constantes do vírus. Os soros foram diluídos com um volume-padrão de PBS (0,025 mL) variando entre 1:2 a 1:2048. A cada diluição foram adicionados 0,025 mL do antígeno contendo quatro unidades hemaglutinantes (UHA). As hemáceas de galinha a 1%, utilizadas como sistema indicador, foram adicionadas após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente; depois desse tempo, efetuou-se a leitura dos resultados. A recíproca da diluição mais alta em que houve a inibição total do antígeno correspondeu ao título de anticorpos dos soros. O teste foi expresso em termos de  $\text{Log}_{10}$ .

## Análise estatística

Os dados foram analisados através de pacote estatístico, sendo utilizados os testes GLM e Scheffé para comparar os títulos de anticorpos entre os diferentes tratamentos e colheitas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho utilizou-se o extrato aquoso das folhas de *Nicotiana glauca* Graham. Na medicina popular o macerado das folhas secas da *Nicotiana glauca* Graham tem sido utilizado para tratamento de feridas de difícil cicatrização. Além disso, as folhas frescas e secas de *Nicotiana*

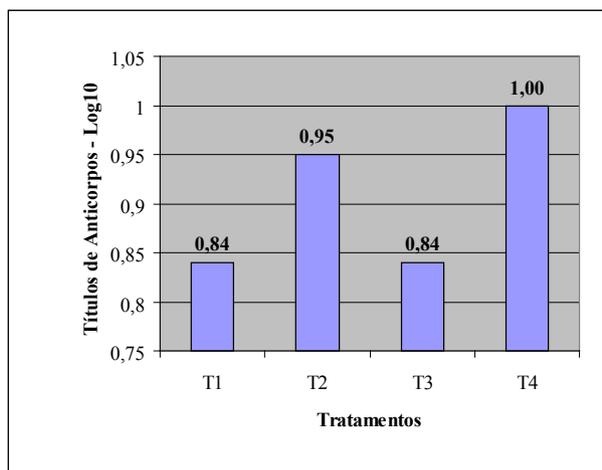
*glauca* Graham são muito utilizadas no Brasil com diversas indicações (NURIT et al., 2005). O que torna o conhecimento tradicional de interesse para a ciência é que se trata do relato verbal da observação sistemática de fenômenos biológicos. A ausência de educação e de cultura formais não é o mesmo que falta de conhecimento. Este rico saber pode representar um atalho para a descoberta de novas moléculas (ELIZABETSKY & SOUZA, 2003). O uso popular e mesmo o tradicional não são suficientes, porém, para validar eticamente as plantas medicinais como de uso eficaz e seguro. A preconização ou a autorização oficial do uso medicamentoso de uma planta deve ser fundamentada em evidências experimentais comprovadas (LAPA et al., 2003).

Neste estudo, avaliou-se a ação de diferentes quantidades do extrato aquoso de *Nicotiana glauca* Graham como coadjuvante em vacina para uso veterinário, visando obter melhores respostas imunológicas. DALSGAARD (1974), DALSGAARD (1978), MAYR & GUERREIRO (1988) e MANOSROI et al. (2004) descrevem a utilização de substâncias derivadas de plantas que estimulam o sistema imune, sendo atribuído, a tais substâncias, atividade paraimune. É conhecido o fato de que substâncias paraimunes são fortes ativadoras dos macrófagos, incrementando a produção de citocinas e, conseqüentemente, estabelecendo um estímulo à resposta imune celular (MANOSROI et al., 2004).

Os soros obtidos aos 14 dias de idade dos frangos, antes da primeira inoculação, indicam que todos os animais apresentavam níveis de anticorpos que, provavelmente, foram transmitidos pelas matrizes, ou seja, anticorpos passivos (Figura 1).

As imunoglobulinas séricas são facilmente transferidas do soro da galinha para a gema, enquanto esta ainda se encontra no ovário. Na gema, a IgG é encontrada em níveis equivalentes aos do soro da galinha. Além disso, à medida que o ovo passa pelos diferentes seguimentos do oviduto, a IgM e a IgA das secreções do oviduto são adquiridas com a albumina, de forma que, quando o pintinho eclode, ele possui IgG no seu soro e IgM e IgA no intestino (TIZARD, 1998). As aves

do Tratamento 4, aos 14 dias de idade e antes da primeira inoculação, apresentaram, em média, um nível mais elevado de anticorpos, embora sem significância estatística ( $P>0,01$ ).

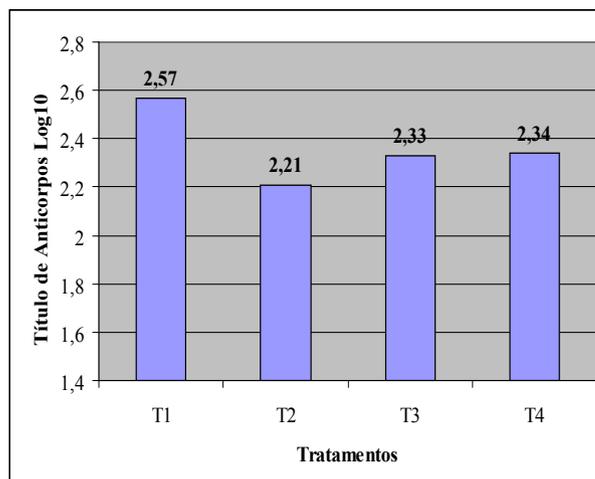


**FIGURA 1.** Médias dos títulos de anticorpos ( $\text{Log}_{10}$ ) obtidos aos 14 dias de idade, antes da primeira inoculação ( $P>0,05$ ).

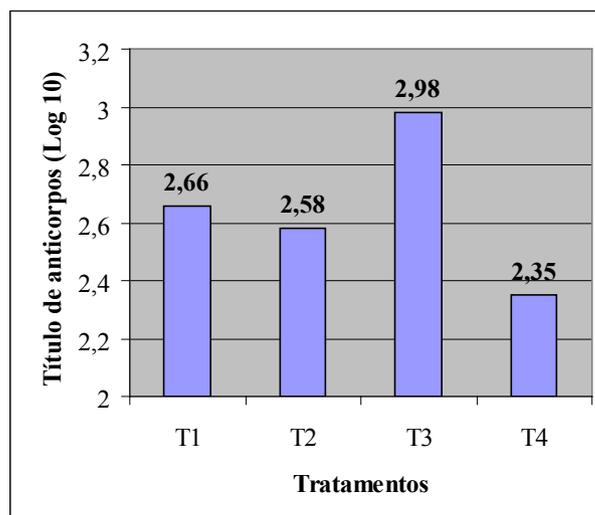
A média do título de anticorpos mensurada aos 30 dias de idade não diferiu estatisticamente entre os tratamentos. Porém, os níveis de anticorpos obtidos no Tratamento 1 foram superiores aos demais tratamentos (Figura 2). Estes resultados foram coerentes com os dados encontrados na literatura (TIZARD, 1998; JANEWAY et al., 2002; TORTORA et al., 2003), sugerindo que os títulos de anticorpos, neste período inicial de estimulação do sistema imunológico, e com a utilização de vacinas oleosas inativadas, são baixos, variando de acordo com a dose, com o tamanho da gota na emulsão e com a proporção de água/óleo utilizada na vacina (JANSEN et al., 2005).

Aos 60 dias de idade pode-se observar diferença estatisticamente significativa ( $P<0,05$ ) do Tratamento 3 em relação aos tratamentos 2 e 4. O Tratamento 3, quando comparado ao Tratamento 1, apresentou níveis mais elevados de anticorpos. Esse resultado pode sugerir uma indução de resposta humoral máxima à segunda dose de vacina no Tratamento 3. Esta diferença, no entanto, não foi estatisticamente significativa (Figura 3). É interessante observar que, quando

a análise estatística utiliza os valores absolutos, não os logarítmicos desses dados, o Tratamento 3 apresenta diferença estatística com relação aos outros três tratamentos.



**FIGURA 2.** Médias dos títulos de anticorpos ( $\text{Log}_{10}$ ) obtidos aos 30 dias de idade dos frangos ( $P>0,05$ ).



**FIGURA 3.** Médias dos títulos de anticorpos ( $\text{Log}_{10}$ ) obtidos aos 60 dias de idade dos frangos. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ( $P<0,05$ ).

Esses resultados sugerem que a planta *Nicotiana glauca* Graham tem um efeito imunomodulador, o que pode ser otimizado utilizando-se outras formas de produção do extrato e/ou

formulação da vacina. Não foi possível identificar a explicação biológica para o fato de a resposta imune dos animais inoculados com a menor dose de extrato (5 mg – T3) haver sido superior à daqueles vacinados com uma dose maior (10 mg - T2). No entanto, é possível sugerir a ocorrência de efeito tóxico na maior dose, como descrito por AMOROS et al. (1992), utilizando outras moléculas vegetais, em testes *in vitro*.

Com relação ao Tratamento 4, em que se utilizou o extrato líquido congelado, não foi possível afirmar que os títulos de anticorpos obtidos relacionaram-se à proporção adicionada de extrato. O que pôde ser observado é que os títulos obtidos neste tratamento, quando comparados ao controle (Tratamento 1), foram menores em todos os testes sorológicos pós-inoculação. Faz-se necessária, neste caso, uma análise em separado, pois este grupo foi incluído por representar a forma de utilização mais popular da planta. Porém, por se tratar de extrato líquido, se desconhece a concentração que efetivamente foi adicionada ao inóculo neste tratamento, o que provavelmente interferiu nos resultados.

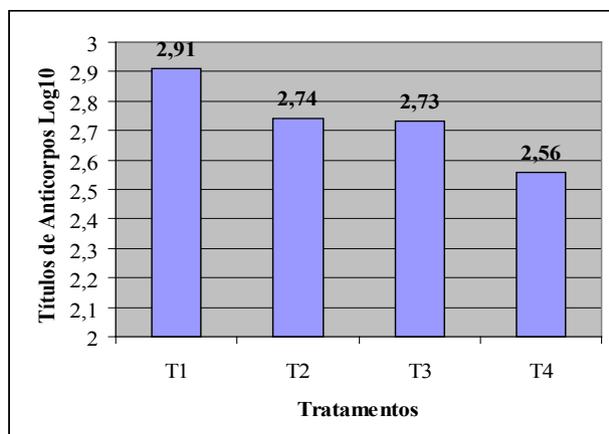
Os resultados sorológicos obtidos aos 90 dias de idade dos frangos não diferiram estatisticamente. Porém, observou-se uma queda nos níveis de anticorpos contra o vírus da DNC do Tratamento 3, enquanto que nos demais tratamentos os níveis foram crescentes até a estabilização (Figura 4). Resultado semelhante foi obtido por VIDOR et al. (1998), que observaram uma queda nos níveis de anticorpos após 35 dias da segunda inoculação.

Os dados sorológicos obtidos neste estudo não demonstraram diferença estatística em relação ao controle quanto à adição de diferentes concentrações de extrato aquoso da planta *Nicotiana glauca* Graham em uma vacina oleosa contra a DNC aplicada em frangos de corte (Figura 5). Contudo, pôde-se perceber diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre o Tratamento 3 e os Tratamentos 2 e 4, aos 60 dias de idade (Figura 3), verificando-se que a inclusão de extrato aquoso da planta resultou em incremento dos níveis de anticorpos à dose de 5mg de extrato seco. Ao contrário, com o aumento da

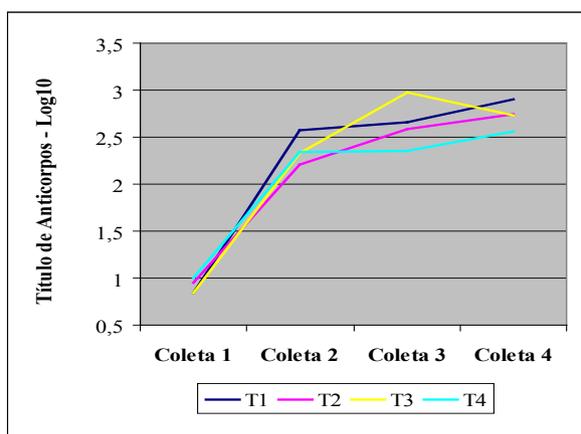
concentração do extrato, não se observou efeito modulador do sistema imunológico em relação ao Tratamento 1 (grupo-controle). VIDOR et al. (1998), em experimento realizado em frangos de corte com vacinas inativadas oleosas contra a DNC, demonstraram que a associação do extrato das plantas *Nicotiana glauca* Graham e *Chrysanthemum vulgare* na quantidade de 10mg/dose da vacina promoveu um efeito imunestimulante na resposta humoral, induzindo níveis de anticorpos significativamente mais elevados, quando comparados ao grupo-controle. Em média, os títulos alcançados foram 3,5 vezes mais altos em testes de IH. Já FELDENS (2000), ao acrescentarem uma associação de extrato vegetal bruto das plantas *Nicotiana glauca* Graham e *Chrysanthemum vulgare* a uma vacina inativada oleosa, contra o herpesvírus bovino tipo 5, não observaram incremento dos níveis de anticorpos em nenhuma das coletas sorológicas. Um fato importante a salientar é que tanto VIDOR et al. (1998) como FELDENS (2000) utilizaram associação das duas plantas, o que não permite, assim, fazer uma comparação adequada.

O método utilizado neste trabalho visou à mensuração dos níveis de anticorpos, ou seja, só avaliou a imunidade humoral, o que não permite afirmar que o extrato vegetal não tenha interferido na resposta imunecelular, que não foi avaliada. Trabalhos utilizando outras medidas da resposta imunológica ou com desafio podem colaborar para compreender melhor o efeito do extrato de *Nicotiana glauca* Graham na formação da resposta imune.

Outro dado que deve ser mencionado é que, com base nos resultados sorológicos obtidos através da técnica de IH, notou-se uma diferença individual marcante, em que alguns animais obtiveram títulos de anticorpos muito elevados e outros se mantiveram com títulos baixos, com uma pequena resposta ao estímulo antigênico (TIZARD, 1998; JANEWAY et al., 2002). Diante desses resultados, aventa-se a hipótese de que trabalhos envolvendo um número maior de animais e de observações podem contribuir para o esclarecimento das diferentes questões formuladas no presente estudo.



**FIGURA 4.** Médias dos títulos de anticorpos ( $\text{Log}_{10}$ ) obtidos aos 90 dias de idade dos frangos.



**FIGURA 5.** Médias de títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra o vírus da DNC ( $\text{Log}_{10}$ ) obtidos nos Tratamentos 1, 2, 3 e 4, aos 14, 30, 60 e 90 dias de idade dos frangos.

## CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos neste estudo pode-se concluir que: (1) a adição de diferentes concentrações de extrato aquoso da planta *Nicotiana glauca* Graham em uma vacina oleosa contra a Doença de Newcastle, aplicada em frangos de corte, não apresentou diferença estatística em incremento de anticorpos quando comparada a um tratamento-controle; (2) a adição de extrato aquoso da planta à dose de 5mg resultou em incremento dos níveis de anticorpos no teste sorológico da terceira coleta (60 dias); (3) ao aumentar

a concentração do extrato para 10mg/kg, não se observou efeito modulador do sistema imunológico em relação ao tratamento-controle.

## REFERÊNCIAS

AMOROS, M.; SAUVAGER, F.; GIRRE, L.; CORMIER, M. In vitro antiviral activity of propolis. **Apidologie**, 1992, v. 23, p. 231-240.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytoterapy Research**, v. 15, p. 183-205, 2001.

COYLE, J.; KERSHAM, P. Galantamine, a cholinesterase inhibitor that allosterically modulates nicotinic receptors: effects on the course of Alzheimer's disease. **Biology Psychiatry**, 2001, v. 49, n. 3, p. 289-299.

COX, J.C.; COULTER, A.R. Adjuvants: a classification and review of their modes of action. **Vaccine**, 1997, v.15, n.3, p. 248-256.

DALSGAARD, K. Saponin adjuvants III. Isolation of a substance from *Quillaja saponaria* Molina with adjuvant activity in foot-and-mouth disease vaccines. **Archive Gesamte. Virusforsch**, v. 44, p. 243-254, 1974.

DALSGAARD, K. A study of the isolation and characterization of the saponin quil A. Evaluation of its adjuvant activity, with a special reference to the application in the vaccination of cattle against foot-and-mouth disease. **Acta Veterinária Scandinavica**, 1978, v. 69, p. 1-40.

ELIAS JR., S.L. **Controle da doença de Newcastle:** avaliação de esquemas de vacinação. Pelotas, 1986, 75 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas.

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G. C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: ELISABETSKY, E.; SOUZA, G. C. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre, RS: Editora Universidade/UFRGS, 2003. p. 107.

EVANS, W.C. **Trease and Evan's pharmacognosy.** 14. ed. London: Saunders, 1996. 612 p.

FELDENS, O. **Avaliação do efeito paraimune de extratos vegetais (*Nicotiana glauca* e *Crhysanthemum vulgare*) em bovinos vacinados contra o herpesvírus bovino tipo 5 (HVB-5).** Pelotas, RS, 62 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas.

- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEI, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. DE; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora Universidade, 2003. p. 13.
- HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Editora Universidade/UFRGS, 2003. p.765.
- JANAKAT, S.; AL-MERIE, H. Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*. **Journal of Ethnopharmacology**, 2002, v. 83, p. 135-138.
- JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5. ed. Artmed: Porto Alegre, 2002. 767 p.
- JANSEN, T.; HOFMANS, M.P.; THEELEN, M.J.; SHIJNS, V.E. Structure-Activity relations of wather-in-oil vaccine formulations and induced antigen-specific antibody responses. **Vaccine**, v. 23, p. 1053-1060, 2005.
- LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R. O.; MANOSROI, A.; SARAPHANCHOTIWITTHAYA, A.; MANOSROI, J. Immunomodulatory activities of fractions from hot aqueous extract of wood from *Clausena excavata*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 302-308, 2004.
- MARICONI, F. A. M. Inseticidas e seu emprego no combate às pragas. In: MARICONI, F.A.M. **Defensivos**. 5. ed. São Paulo: Nobel, 1981. 122 p.
- MAYR, A.; GUERREIRO, O. Fortschritte bei der Immunisierung und Paramunisierung von Nutztieren. **Praktische Tierarzt**, v.10, p. 865-870, 1980.
- NISBET, L. J.; MOORE, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? **Current Opinions Biotechnology**, n.8, p.708-712, 1997.
- NURIT, K.; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S. Estudo etnomedicinal e farmacobotânico de *Nicotiana glauca* Graham (Solanaceae). Disponível em: <http://www.adaltech.com.br/evento/useugoeldi/resumoshtm/resumos/R0533-2.htm>. Acesso em: 4 fev. 2005.
- POTTERAT, O.; HOSTETTMANN, K. Plant sources of natural drugs and compounds. In: \_\_\_\_\_. **Encyclopedia of environmental biology**. v. 3. London: Academic Press, 1995.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; VARRO, E. **Farmacognosia, farmacobiotechnologia**. 2. ed. Premier: São Paulo, 1997. p. 372.
- SAMUELSSON, G. **Drugs of natural origin, a textbook of pharmacognosy**. Stockholm: Swedish Pharmaceutical, 1992. 320 p.
- SHMELTZ, I. Nicotine and other tobacco alkaloids. In: \_\_\_\_\_. **Naturally occurring insecticides**. New York: Marcel Dekker, 1971. p. 99.
- SINGH, M.; O'HAGAN, D.T. Recent advances in vaccine adjuvants. **Pharmacological Research**, n. 6, v.19, p. 715-728, 2002.
- STEENKAMP, P. A.; HEERDEN, F. R.; VAN WYK, B. E. Accidental fatal poisoning by *Nicotiana glauca*: identification of anabasine by high performance liquid chromatography/protodiode array/mass spectrometry. **Forensic Science International**, v.127, p. 208-217, 2002.
- STORNI, T.; KÜNDIG, T. M.; SENTI, G.; JOHANSEN, P. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.333-355, 2005.
- TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 5. ed. Roca: São Paulo, 1998. 543 p.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Artmed: Porto Alegre, 2003. 827 p.
- VIDOR, A. C.; JANTZEN, M.M.; PONSATI, R.; VIDOR, T. Efeito imunoestimulante de moléculas vegetais. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, UFPEL, UCPEL, FURG. UFPel, 7., 1998, Pelotas. **Anais...** Pelotas, 1998. p. 391.
- YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Argos: Chapecó, 2001. 500 p.