

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS**

**CÍCERO TEMÍSTOCLES COUTINHO COSTA**

**ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA E IMUNOMODULADORA DE  
EXTRATOS DE *Cocos nucifera* L.**

**FORTALEZA-CE  
2008**

**CÍCERO TEMÍSTOCLES COUTINHO COSTA**

**ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA E IMUNOMODULADORA DE  
EXTRATOS DE *Cocos nucifera* L.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias.

**Área de Concentração:** Reprodução e Sanidade Animal.

**Linha de Pesquisa:** Reprodução e Sanidade de Pequenos Ruminantes.

**Orientadora:** Profa. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua.

**FORTALEZA-CE  
2008**

Atividade Anti-helmíntica e imunomoduladora de extratos de *Cocos nucifera* L.

Cícero Temístocles Coutinho Costa

**Tese Aprovada em: 19/12/2008**

**Nota obtida: 10,0**

**Banca Examinadora**

---

Profa. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua  
**Orientadora - UECE**

---

Dr. Luiz da Silva Vieira  
**Examinador - EMBRAPA**

---

Dra. Maria de Lourdes de Azevedo Rodrigues  
**Examinadora - UFRRJ**

---

Dra. Selene Maia de Morais  
**Examinadora/Co-Orientadora - UECE**

---

Dra. Ana Carolina Fonseca Lindoso Melo  
**Examinadora - UFPI**

Aos meus pais cujo esforço possibilitou a minha formação profissional e pessoal;

À minha esposa pelo apoio e amor incondicional

Dedico

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me guiado e dado forças por mais esta etapa da minha vida

À professora Dra. Cláudia Maria Leal Bevilaqua por sua orientação e dedicação, requisitos fundamentais para a realização desse trabalho.

À professora Dra. Selene Maia de Moraes por sua ajuda, dedicação e colaboração com seus ensinamentos que foram importantes para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento e a Dra. Adriana Tomé pela orientação e apoio, conferidos a mim na condução dos trabalhos relacionados à toxicologia.

A Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro pelos ensinamentos e toda a ajuda na execução dos trabalhos relacionados à imunomodulação.

Ao Dr. Luiz da Silva Vieira, a Dra. Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues e Dra. Ana Carolina Fonseca Lindoso Melo pela participação na banca de defesa da presente tese.

À Dra. Morsyleide de Freitas Rosa e aos funcionários da Unidade de Beneficiamento da Casca do Coco Verde pelo fornecimento do líquido da casca do coco verde;

A todos os colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias do PPGCV, que me ajudaram na realização deste projeto e estiveram ao meu lado durante este período, em especial Ana Lourdes Fernandes Camurça Vasconcelos, Michelline do Vale Maciel, Iara Tércia Freitas Macedo, Lorena Mayana Beserra de Oliveira, Roberta Braga da Rocha, Rafaella Albuquerque e Silva.

A todos os colegas do mestrado em Ciências Veterinárias do PPGCV, que fizeram parte dessa caminhada de quatro anos, passando juntos por mais uma etapa no caminho da nossa realização profissional.

A Adriana Maria Sales Albuquerque, Ana Cristina Sabóia Nascimento, Frederico Rocha Cavalcanti, César, Selmar e André, funcionários do PPGCV, que em muito me ajudaram durante todo o tempo do mestrado.

Ao biotério da Universidade Estadual do Ceará, especialmente à Profa. Germana Paixão, diretora do biotério, por conceder animais, equipamentos e rações para os experimentos.

Ao CNPq pelo apoio financeiro durante estes quatro anos de trabalho

À minha família que sempre me apoiou, principalmente nos momentos difíceis da realização deste trabalho, em especial a meu pai **Francisco Sérgio Costa** e minha mãe **Maria Irma Coutinho Costa**, exemplo de dedicação.

A minha esposa, **Maria Vivina Barros Monteiro** pela confiança em mim depositada e por ter sempre procurado estar presente com seus cuidados, carinhos e incentivo. Te agradeço com todo meu respeito, admiração e amor.

As demais pessoas que não foram aqui mencionadas, mas que contribuíram para a concretização deste trabalho.

## RESUMO

O desenvolvimento da resistência aos anti-helmínticos sintéticos exigiu a busca por alternativas de controle das nematodeoses gastrintestinais. Dentre estas, destaca-se o uso de plantas medicinais. O líquido da casca do coco verde (LCCV) foi extraído de *Cocos nucifera* L, seguido da obtenção do extrato butanólico a partir do LCCV. Os objetivos desse trabalho foram: 1) analisar quimicamente ambos os extratos através de testes fitoquímicos; 2) avaliar a eficácia do LCCV e do extrato butanólico sobre nematóides gastrintestinais de ovinos através dos testes de eclosão de ovos e de desenvolvimento larvar de *Haemonchus contortus*; 3) Avaliar a toxicidade aguda (v.o. e i.p.) em camundongos e toxicidade subcrônica e crônica em ratos (v.o.), para ambos os extratos; 4) estudar o efeito do extrato butanólico sobre parasitos intestinais de camundongos através do teste de redução da carga parasitária; 5) Analisar a atividade imunomoduladora do extrato butanólico em camundongos que após imunização com hemácias de carneiro (HC), foram tratados com 50 e 250 mg/kg do extrato butanólico, por via oral, durante 7 dias consecutivos. O título de anticorpos foi avaliado nos dias 7, 14 e 21 após o reforço com HC; enquanto a resposta imune celular (RIC) foi avaliada através do edema de pata nos tempos 24, 48 e 72 h. A migração celular (MC) foi avaliada 6 h após a administração do extrato butanólico nas concentrações de 10, 50 e 250 mg/ml por via s.c. Os testes fitoquímicos revelaram a presença de triterpenos, saponinas e taninos condensados em ambos os extratos. Quanto aos testes *in vitro*, o LCCV e o extrato butanólico apresentaram atividade ovicida de 100% nas concentrações de 2,5 e 10 mg ml<sup>-1</sup>, respectivamente. O efeito larvicida do LCCV e do extrato butanólico foi de 81,30 e de 99,80%, respectivamente, nas maiores concentrações. Com relação a toxicidade aguda, i.p., a DL<sub>10</sub> e DL<sub>50</sub> para o LCCV foi de 199,63 e de 305,02 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. A DL<sub>10</sub> do extrato butanólico foi de 247,32 mg kg<sup>-1</sup> e a DL<sub>50</sub> de 321,3 mg kg<sup>-1</sup>. Os extratos não apresentaram toxicidade por via oral. Nas toxicidades subcrônica e crônica, não houve alteração clínica considerável nos parâmetros hematológicos, bioquímico e histopatológico. Na eficácia em parasitos de camundongos, o extrato butanólico na dose de 1.000 mg/kg reduziu em 90,70% a carga parasitária (p<0,05). Porém o LCCV não apresentou atividade nas doses utilizadas. Com relação à imunomodulação, o extrato butanólico estimulou a produção de anticorpos a partir do 14º (P<0,05). Na RIC, não houve aumento do edema de pata quando comparado com os controles. Na MC verificou-se redução na migração de leucócitos totais (P>0,05). Baseado nos resultados obtidos, os extratos de *C. nucifera* são promissores no controle de nematóides gastrintestinais. Além disso, o extrato butanólico apresentou atividade imunomoduladora, já que estimulou a produção de anticorpos sem alterar a resposta imune celular.

**Palavras-chave:** Pequenos ruminantes, Nematóides gastrintestinais, Plantas medicinais, Taninos condensados, Coco.

## ABSTRACT

The development of resistance to synthetic anthelmintic required the search for alternatives for control of gastrointestinal nematodes. Among these, there is the use of medicinal plants. The liquid from the bark of the green coconut (LBGC) was extracted from *Cocos nucifera* L, followed by obtaining the butanol extract from LBGC. The objectives of this study were: 1) analyze the chemical composition based on tests phytochemicals; 2) To assess the effectiveness of LBGC and butanol extract on sheep gastrointestinal nematodes through hatching egg and larval development tests from *Haemonchus contortus*; 3) To assess the acute toxicity (p.o. and i.p.) in mice and subchronic and chronic toxicity (p.o.) in rats for both extracts.; 4) Study the effect of the butanol extract on mice intestinal parasites through of the worm burden reduction test; 5) analyze the immunomodulatory activity of butanol extract in mice that after immunization with sheep red blood cells (SRBC) were treated with 50 and 250 mg/kg of butanol extract, orally, for 7 consecutive days. The antibodies titre was determined on days 7, 14 and 21 after the boost with SRBC, while the cellular immune response (CIR) was evaluated by measuring foot thickness 24, 48, and 72 h. The cell migration (CM) was measured 6 h after administration the butanol extract at concentrations of 10, 50 and 250 mg/ml s.c. Phytochemical tests revealed the presence of triterpenes, saponins and condensed tannins in both extracts. In the *in vitro* tests, butanol extract and LBGC showed 100% ovicidal activity at concentrations of 2.5 and 10 mg ml<sup>-1</sup>, respectively. The larvicidal effect of LBGC and butanol extract was 81.30 and 99.80%, respectively, in higher concentrations. To acute toxicity, i.p., DL<sub>10</sub> and the LD<sub>50</sub> for LBGC was 199.63 and 305.02 mg kg<sup>-1</sup>, respectively. The DL<sub>10</sub> to butanol extract was 247.32 mg kg<sup>-1</sup> and LD<sub>50</sub> of 321.3 mg kg<sup>-1</sup>. The extracts showed no oral toxicity. In subchronic and chronic toxicity, there was no significant clinical change in the hematology, biochemical and pathological parameters. In the effectiveness of parasites into mice, the butanol extract at a dose of 1,000 mg kg<sup>-1</sup> decreased in 90.70% the worm burden (p <0.05). But the LCCV showed no activity at the doses used. To immunomodulation, the butanol extract stimulated the production of antibodies from day 14 (P <0.05). In CIR, there was no increase in mean paw thickness compared to controls. In MC there was reduction in total migration of leukocytes (P > 0.05). Based on the results, the extracts from *C. nucifera* are promising to control gastrointestinal nematodes. Moreover, the butanol extract showed immunomodulatory activity, as it stimulated the production of antibodies without altering the cellular immune response.

**Keywords:** Small ruminants, Intestinal nematodes, Medicinal plants, Condensed tannins, Coconut

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários-----	17
Figura 2. Estrutura química de um alcalóide (Teobromina)-----	18
Figura 3. Alcalóide verdadeiro (Nicotina)-----	18
Figura 4. Protoalcalóide (Colchicina)-----	18
Figura 5. Pseudoalcalóide (Coniina) -----	18
Figura 6. Estrutura química das cumarinas-----	20
Figura 7. Estrutura básica dos flavonóides-----	21
Figura 8. Tanino condensado – Procianidina-----	23
Figura 9. Monômero de tanino condensado Tipo 1-----	23
Figura 10. Monômero de tanino condensado Tipo 2-----	23
Figura 11. Estrutura química da procianidina e prodelfinidina e seus derivados galoil-----	24
Figura 12. Tanino hidrolisado-----	25
Figura 13. Estruturas de monoterpênos-----	29
Figura 14. Estruturas de sesquiterpênos-----	30
Figura 15. Estrutura de uma Saponina-----	31
Figura 16. Estrutura de uma Saponina esteroideal-----	32
Figura 17. Estrutura de uma Saponina triterpênica-----	32
Figura 18. Corte longitudinal do coco com suas partes-----	47

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Classe de flavonóides e algumas características-----22

**LISTA DE ABREVIATURAS**

CE<sub>50</sub> – concentração efetiva para inibir 50% da eclosão dos ovos e do desenvolvimento das larvas

DL<sub>10</sub> – dose letal para 10% dos camundongos

DL<sub>50</sub> – dose letal para 50% dos camundongos

DMSO – dimetilsulfóxido

dp – desvio padrão

g – grama

L1 – larvas de primeiro estágio

L2 – larvas de segundo estágio

L3 – larvas de terceiro estágio

LCCV – líquido da casca do coco verde

LBGC – liquid extracted from the bark of the green coconut

µl – microlitro

mg – miligrama

ml – mililitro

OH – hidroxila

CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono

ExBut – Extrato Butanólico

ATP – Adenosina Trifosfato

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

HCN – Ácido Cianídrico

HC – Hemácia de Carneiro

RIC – Resposta Imune Retardada

MC – Migração Celular

## SUMÁRIO

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE TABELAS**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	14
2.1. Plantas Medicinais	14
2.1.1 Generalidades	14
2.2. Principais Classes de Metabólitos Secundários	15
2.3. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica	33
2.4. Plantas Medicinais com Atividade Anti-helmíntica em Medicina Veterinária	37
2.5. Atividade Imunomoduladora	39
2.5.1. Imunomoduladores de origem endógena	40
2.5.2. Produtos microbianos com atividade imunomoduladora	40
2.5.3. Imunomoduladores sintéticos	42
2.5.4. Plantas medicinais com atividade imunomoduladora	44
2.6. <i>Cocos nucifera</i>	46
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	50
<b>4. HIPÓTESE CIENTÍFICA</b>	51
<b>5. OBJETIVOS</b>	52
<b>6. CAPÍTULO</b>	53
CAPÍTULO I	53
CAPÍTULO II	66
CAPÍTULO III	81
CAPÍTULO IV	88
<b>7. CONCLUSÕES GERAIS</b>	101
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	102
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	103
<b>10. ANEXOS</b>	123

## INTRODUÇÃO

A ovinocaprinoicultura desempenha importante papel sócio-econômico, principalmente para os pequenos produtores rurais, que têm a partir desses animais fonte de proteína e renda. Contudo, a eficiência produtiva desses animais é limitada, devido a problemas sanitários e nutricionais (PINHEIRO et. al., 2000).

O parasitismo por nematóides gastrintestinais é uma das principais causas de mortalidade de ovinos e caprinos no nordeste brasileiro (VIEIRA et al., 1997). Dentre os parasitos gastrintestinais, o nematóide *Haemonchus contortus* ocupa lugar de destaque devido a sua alta patogenicidade, sendo responsável por acentuadas perdas econômicas, decorrentes da diminuição da produtividade e mortalidade dos animais, particularmente dos jovens (UENO & GONÇALVES, 1998). Diante disso, a aplicação de medidas de controle das verminoses é essencial para o sucesso da produção de ruminantes. Esse controle é realizado, principalmente, com anti-helmínticos que visam reduzir os níveis de infecção dos animais e promover a descontaminação das pastagens (CHARLES, 1995).

No tocante a aplicação de anti-helmínticos, seu uso inadequado e contínuo resultou no desenvolvimento de populações resistentes a esses fármacos (COLES et al., 1992). São inúmeros os relatos de nematóides resistentes às várias classes de anti-helmínticos (VIEIRA & CAVALCANTE, 1999; MELO et al., 2003). Além da resistência, as drogas disponíveis no comércio apresentam outras desvantagens como os altos custos, poluem o meio ambiente e deixam resíduos químicos nos alimentos de origem animal (WALLER, et al., 1995; HERD, 1996). Considerando esses problemas, alternativas como a fitoterapia podem ser utilizadas para reduzir o uso desses fármacos. (VIEIRA et al., 1999).

As pesquisas com plantas, que apresentam atividade contra vírus, bactérias, fungos e parasitos, além da influência sobre os sistemas orgânicos como o digestivo, nervoso e imune, são crescentes, não sendo diferente na medicina veterinária onde as pesquisas com plantas objetivam a redução de problemas sanitários (NIEZEN et al., 1996).

Deve-se destacar que as propriedades das plantas medicinais não são tão largamente conhecidas como freqüentemente declarado. Em virtude deste problema é importante para o correto aproveitamento das plantas medicinais terem como etapa inicial obrigatória a sua validação pela pesquisa (MATOS, 1997). Testes *in vitro* e *in vivo* utilizando-se partes da planta ou até mesmo compostos químicos extraídos a partir delas, permitem avaliar diversas propriedades biológicas dentre elas a anti-helmíntica e imunomoduladora,

determinando, portanto, o primeiro passo para a caracterização de substâncias ativas da planta, abrindo novas possibilidades no sentido de otimizar a eficiência produtiva não só destes animais como também de outras espécies domésticas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Plantas Medicinais

#### 2.1.1. Generalidades

Desde o início da civilização o homem usa produtos de origem animal, vegetal, e mineral como fonte de princípios ativos. O homem pré-histórico, que aprendeu como os animais, a distinguir as plantas comestíveis daquelas que podiam ajudá-los a curar suas doenças, já lançavam mão da fitoterapia. Povos como os chineses, babilônios e egípcios já cultivavam diversas ervas que eram utilizadas como purgantes, vermífugos, diuréticos, anti-sépticos e cosméticos, além dos egípcios utilizarem diversos produtos para embalsamar suas múmias (RATES, 2001).

Nos últimos anos tem-se observado um interesse crescente no uso de produtos naturais, principalmente os derivados de plantas. De acordo com GURIB-FAKIM (2006), os produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todas as drogas utilizadas no mundo e as plantas medicinais contribuem com 25% deste total. Alguns exemplos de drogas obtidas a partir de plantas são a digoxina da *Digitalis* spp., quinina e quinidina obtidas da *Cinchona* spp., vincristina e vinblastina oriundas da *Catharanthus roseus*, atropina procedente de *Atropa belladonna* e morfina e codeína proveniente de *Papaver somniferum* (RATES, 2001).

A importância da medicina alternativa, em especial no Brasil, baseada em plantas medicinais, deve-se ao elevado custo do desenvolvimento de compostos sintéticos, já que a maioria das matérias primas é importada, inviabilizando desta forma, sua aquisição pela população. Vale salientar que a utilização de plantas medicinais traz vantagens ambientais já que são produtos biodegradáveis e seu suprimento é auto-sustentável devido à diversidade da flora medicinal (HAMMOND et al., 1997).

A possibilidade de utilizar as plantas medicinais como fonte de substâncias medicamentosas reside na capacidade de produzirem, a partir de seu metabolismo, substâncias químicas que exercem alguma atividade sobre outros organismos vivos. Baseado nessas atividades é que se procuram os efeitos terapêuticos para o tratamento de

doenças tanto em animais como em humanos (PROPPENGA, 2000). As plantas podem sintetizar dois tipos de metabólitos: primários e secundários. Os metabólitos primários são substâncias amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo em praticamente todos os organismos. Nas plantas superiores tais compostos se concentram freqüentemente em sementes e órgãos de armazenamento e são necessários para o desenvolvimento fisiológico, já que possuem papel importante no metabolismo celular básico. São usados principalmente como matéria prima industrial, alimento ou aditivo alimentar e inclui produtos tais como, óleos vegetais, ácidos graxos (usados para fazer sabões e detergentes), carboidratos como o amido, a pectina e a celulose e as proteínas (CHAGAS, 2004).

Os metabólitos secundários são compostos derivados biologicamente dos metabólitos primários. Eles são freqüentemente armazenados pelas plantas em quantidades menores do que os metabólitos primários, sendo às vezes sintetizado em estágios de desenvolvimento distinto da planta, o que muitas vezes dificulta sua extração e purificação. Desta forma, muitos metabólitos secundários podem ser considerados como materiais especiais ou químicos refinados e são mais valorizados no mercado. Eles são usados comercialmente como compostos biologicamente ativos. A utilidade comercial dos metabólitos secundários pode ser exemplificada pela nicotina, morfina, cocaína, óleos de eucalipto, etc. Muito destes metabólitos freqüentemente tem estruturas altamente complexas, que determinam sua atividade biológica e não podem ser economicamente sintetizados. Um bom exemplo é a azadirachtina extraída do Nim com estrutura bastante complexa é utilizada como inseticida. Uma vantagem econômica tanto dos metabólitos primários e secundários é a facilidade de obtenção através de processos relativamente simples, como a destilação a vapor ou por extração com solventes aquosos ou orgânicos (CHAGAS, 2004).

## **2.2. Principais Classes de Metabólitos Secundários**

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção do vegetal apesar de possuírem estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas interessantes. Atualmente, sabe-se que muitas destas substâncias estão envolvidas diretamente na adaptação do vegetal ao seu meio, através de funções como: defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra raios ultravioleta, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes. (SANTOS, 2004).

Um ponto que chama a atenção é a elevada capacidade biossintética do metabolismo secundário, já que há grande produção tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto a sua diversidade numa mesma espécie. Um exemplo é a *Catharanthus roseus* que em relação aos alcalóides é capaz de produzir e acumular mais de 90 compostos diferentes (ROBBERS et. al. 1996).

Em várias espécies, o local de biossíntese está restrito a um órgão, enquanto que os produtos são acumulados em toda a planta ou em órgãos diferentes devido a um sistema de transporte intercelular. Às vezes, o local de compartimentalização é de fundamental importância para a sobrevivência da planta. Os glicosídeos cianogênicos são estocados nos vacúolos das células epidérmicas e, portanto, encontram-se isolados das hidrolases. Somente em situações em que os tecidos são danificados como durante a mastigação, é que os glicosídeos cianogênicos e as hidrolases interagem, havendo liberação de ácido cianídrico (HCN) (SANTOS, 2004).

Todo o metabolismo vegetal está condicionado aos processos fotossintéticos que são agrupados em duas categorias: reações de claro, nas quais a energia solar será absorvida por moléculas de clorofila e transferida destas para moléculas armazenadoras de energia (ATP e NADPH), e reações de escuro, nas quais as moléculas de ATP e NADPH servirão, respectivamente, como fonte de energia e força redutora no processo de fixação do CO<sub>2</sub>, o qual será convertido principalmente em glicose (ROBBERS et. al. 1996).

Através do metabolismo da glicose são formados praticamente todos os metabólitos primários e secundários. Esta é convertida em moléculas de ácido pirúvico que podem seguir duas vias diferentes. Na primeira, moléculas de piruvato entram na via do ácido chiquímico para formar todos os metabólitos secundários aromáticos (alcalóides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, ligninas e lignanas, cumarinas e taninos hidrossolúveis). Na segunda, o piruvato continua sendo oxidado até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (acetil-coA) (SANTOS, 2004). Estas podem seguir três vias diferentes: via do ciclo do ácido cítrico, via do mevalonato e via da condensação do acetato, formando os chamados derivados do acetato. Entrando no ciclo do ácido cítrico, serão formados os alcalóides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos. A via do mevalonato origina os terpenóides e os esteróis, enquanto as acetogeninas resultam da condensação do acetato. A combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades do acetato ou derivados destes, poderá resultar na produção de antraquinonas, flavonóides e dos taninos condensados (Figura 1) (SANTOS, 2004).

Vale salientar que os metabólitos secundários podem ser encontrados na forma livre, sendo denominados genericamente de agliconas, ou estar ligados a uma ou mais unidades de açúcar, formando o que se denomina de heterosídeo.

A seguir serão discutidas as características das principais classes de metabólitos secundários.

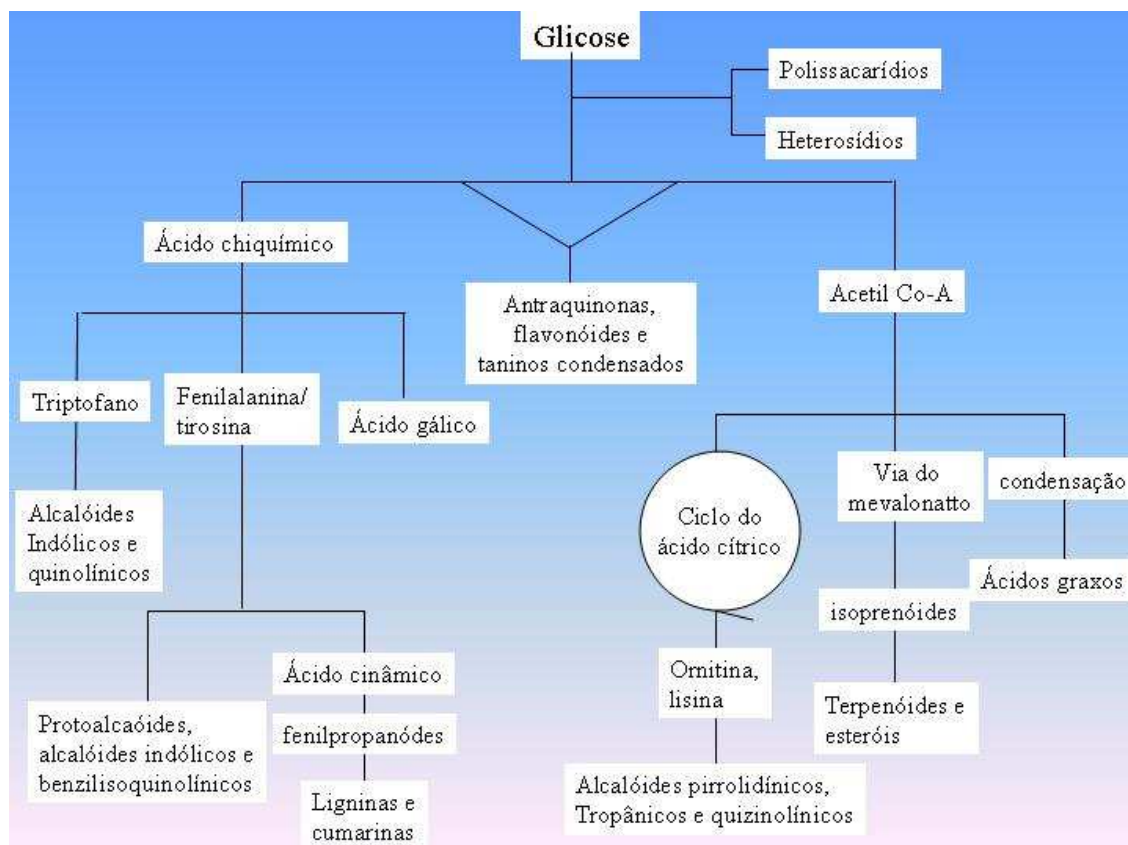


Figura 1. Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.

Fonte: SANTOS, 2004

## Alcalóides

Os alcalóides são substâncias de caráter alcalino que ocorrem naturalmente, sobretudo nas angiospermas e são originados, geralmente, a partir de aminoácidos. Porém tais substâncias ocorrem também em microrganismos (fungos) e animais marinhos. Basicamente são constituídos por um átomo de nitrogênio, oriundos dos aminoácidos e um anel heterocíclico (Figura 2). Podem ser classificados em alcalóides verdadeiros (Figura 3), protoalcalóides (Figura 4) e pseudoalcalóides (Figura 5). Os alcalóides verdadeiros são formados pelo átomo de nitrogênio pertencente ao anel heterocíclico, enquanto os

protoalcalóides, o nitrogênio não pertence ao anel heterocíclico. Os pseudoalcalóides são os compostos nitrogenados cujos precursores não são aminoácidos, mas sim outras substâncias como os terpenos e esteróides (HENRIQUES et al., 2004).

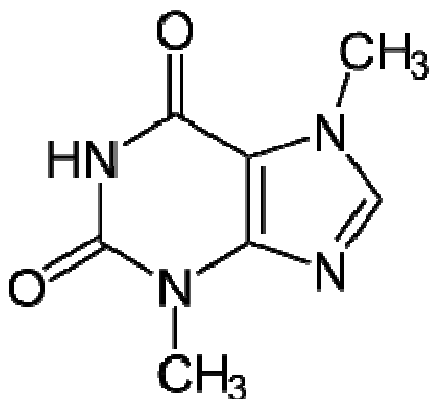


Figura 2. Estrutura química de um alcalóide (Teobromina)  
Fonte: ALTIMARI et al., 2006

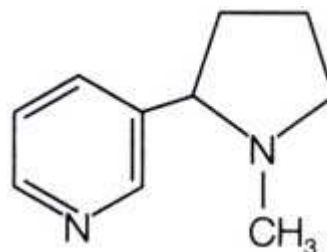


Figura 3. Alcalóide verdadeiro (Nicotina)  
Fonte: GOBBO-NETO, 2007

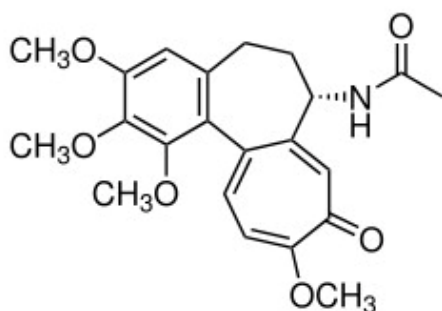


Figura 4. Protoalcalóide (Colchicina)  
Fonte: SERTOX, 2008

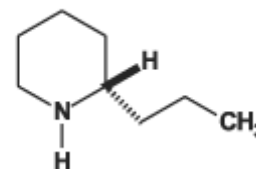


Figura 5. Pseudoalcalóide (coniina)  
Fonte: GOBBO-NETO, 2007

Esses compostos podem ser encontrados em todas as partes do vegetal, porém há locais onde ocorre acúmulo preferencial, como por exemplo, nos tecidos em crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos. Raramente estão em tecidos mortos. Vale salientar que o local de estoque dos alcalóides é diferente daquele onde é sintetizado. Por exemplo: a nicotina é formada nas raízes das plantas do tabaco, mas é translocado para as folhas nas quais é armazenado.

A função dos alcalóides nas plantas ainda é controversa. O que se tem observado é que plantas ricas em alcalóides são evitadas por animais ou insetos em sua dieta, isto devido a sua toxicidade e/ou o seu gosto amargo. Porém, segundo HENRIQUES et al (2004), a produção dos alcalóides não deve ser entendida como sendo específica para a

proteção das plantas. Isso porque, as plantas que não produzem teriam sido extintas. Desta forma há várias hipóteses com relação à função dos alcalóides nos vegetais: os alcalóides seriam produtos de detoxificação de substâncias nocivas geradas pelo metabolismo primário, funcionariam como uma reserva de nitrogênio, atuariam como hormônios de crescimento de forma a inibir a germinação devido ao seu poder quelante e/ou citotóxico.

Os alcalóides se subdividem em inúmeras subclasses, de acordo com o aminoácido precursor. Desta forma temos:

- Triptofano: alcalóides indólicos e quinolínicos;
- Ornitina e lisina: alcalóides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quimolizidínicos;
- Fenilalanina e tirosina: protoalcalóide, alcalóides isoquinolínicos e benzilisoquinolínicos.

No reino vegetal, esses compostos estão distribuídos em um amplo número de famílias botânicas, como Erythroxylaceae (*Erythroxylon coca* - coca), Rubiaceae (*Pausinystalia yohimbe* - ioimbina), Leguminosae (*Physostigma venenosum* - fisostigmina), Solanaceae (*Atropa belladonna* – atropina, *Datura stramonium* – escopolamina), Apocynaceae (*Catharanthus roseus* – vincristina e vimblastina, *Rauwolfia serpentina* - reserpina) entre outras. Entre alcalóides com ação farmacológica destacam-se, entre outros, os alcalóides tropânicos como a atropina, a escopolamina, e a hiosciamina, todos com ação anticolinérgica. Nos alcalóides indólicos, cita-se substâncias como a reserpina (anti-hipertensivos), ioimbina (simpaticolítico), e fisostigmina (colinérgico). Já os alcalóides pirrolizidínicos têm ação de proteção da planta contra predadores, sendo substâncias muito tóxicas, agindo de maneira deletéria principalmente sobre hepatócitos (BARRACA, 1999).

## Cumarinas

As cumarinas são substâncias derivadas do metabolismo da fenilalanina, através da via do ácido chiquímico ou por via mista (ácido chiquímico e acetato). Estruturalmente são lactonas do ácido *o*-hidróxi-cinâmico, sendo o representante mais simples a cumarina (1,2 benzopirona) (Figura 6). Com exceção da cumarina simples, todas as cumarinas são substituídas por um grupo hidroxila na posição 7. A 7-hidróxi-cumarina, também conhecida como umbeliferona é a precursora das cumarinas 6,7-di-hidroxiladas e 6,7,8-tri-

hidroxiladas. Esses grupos podem ser metilados ou glicosilados. Essas substâncias possuem isômeros denominados de cromonas (KUSTER & ROCHA, 2004).

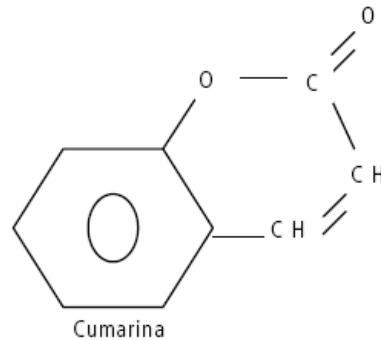


Figura 6. Estrutura química das cumarinas  
Fonte: SOARES, 2002

A produção de cumarinas pelos vegetais pode ser induzida em resposta a um estresse biótico e abiótico, por uma deficiência nutricional, por mensageiros químicos como os hormônios vegetais.

Encontram-se amplamente distribuídas em todo o reino vegetal, principalmente em angiosperma. Algumas famílias contêm grande variedade de cumarinas principalmente: leguminosas, asteráceas, e, sobretudo umbelíferas e rutáceas (BRUNETON, 1991). Vale ressaltar que também podem ser encontradas em fungos e bactérias.

Seu interesse terapêutico abrange as ações vasodilatadoras, espasmolíticas e antitrombóticas, como as cumarinas derivadas da família Apiaceae. A umbeliferona possui ligeiras propriedades antibióticas frente à *Brucella* (BRUNETON, 1991), além de ações antiespasmódica, inibidora de carcinogênese, antiarritmica e antimutagênica (KUSTER & ROCHA, 2004).

Os anticoagulantes cumarínicos utilizados atualmente foram sintetizados a partir do modelo dicumarol, derivado cumarínico responsável por hemorragias observadas no gado que consome forragem a base de Meliloto (*Melilotus officinallis*) mal conservado. (BRUNETON, 1991). Algumas cumarinas, como o presente na *Artemisia escoparia*, tem atividade imunossupressora, relaxante vascular, hipolipidêmica e hipotensora (KUSTER & ROCHA, 2004). As cumarinas sintetizadas por fungos inferiores são importantes devido à sua toxicidade: é o caso das aflatoxinas cancerígenas. Essas toxinas se elaboram por cepas de *Aspergillus* sp. que se desenvolvem em determinadas condições de temperatura e umidade. (BRUNETON, 1991).

## Flavonóides

Os flavonóides, compostos fenólicos, são em sua maioria pigmentos responsáveis pela coloração de flores e alguns frutos de ampla distribuição na natureza. Sua presença nos vegetais parece estar relacionada com funções de defesa (proteção contra raios ultravioleta, ações antifúngica e antibacteriana) e de atração de polinizadores (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004).

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal (FRACARO, 2004).

Essas substâncias são encontradas em abundância em angiospermas, apresentando nesse grupo vegetal enorme diversidade estrutural. Porém em algas é quase ausente e nas pteridófitas é encontrado, porém com pequena variação estrutural (FRACARO, 2004).

Estruturalmente, há diversas formas, sendo que o esqueleto básico dos flavonóides é caracterizado, em sua grande maioria, por possuir 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído por dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono (Figura 7). Os flavonóides de origem natural apresentam-se freqüentemente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcar. Esta forma conjugada também é conhecida como heterosídeo. São denominados *O*-heterosídeos quando a ligação se dá por intermédio de uma hidroxila e de *C*-heterosídeo quando a ligação se dá com um átomo de carbono. Desta forma há diversas formas estruturais dos flavonóides. Na tabela 1 estão demonstradas as principais classes de flavonóides e suas características (SOARES, 2002).

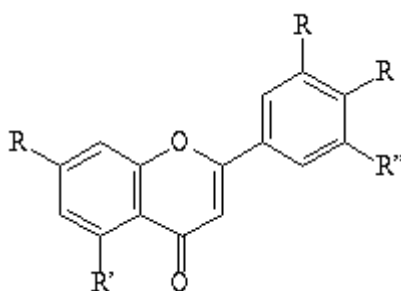


Figura 7. Estrutura básica dos flavonóides  
Fonte: FACUNDO, et al., 2008

Economicamente os flavonóides despertam interesse em função de suas diferentes propriedades, como o fato de alguns apresentarem cor e poderem ser usados como pigmentos, curtimento de couros e corantes de alimentos. A importância farmacológica reside

de algumas propriedades atribuídas a essa classe de compostos como: antitumoral, antiinflamatória, antiviral, antioxidante, dentre outras (ZUANAZZI & MONTANHA, 2004).

Tabela 1. Classe de flavonóides e algumas características.

Classes	Características
Flavonas flavonóis e seus <i>O</i> -heterosídeos	Co-pigmentação em flores; protetores contra raios UV nas folhas
<i>C</i> -heterosídeos	-
Antocianos	Pigmentação do vermelho até o azul
Chalconas	Pigmentação amarela
Auronas	Pigmentação amarela
Di-hidro-flavonóis	Estão presentes freqüentemente em tecidos de madeiras
Flavonas	Podem apresentar sabor amargo
Di-hidro-chalconas	Podem apresentar sabor amargo
Flavanas, leucoantocianidinas e Proantocianidinas	Substâncias adstringentes com propriedades tanantes
Isoflavonóides	Propriedades estrogênicas e/ou antifúngicas
Neoflavonóides	-
Biflavonóides	Propriedades antifúngicas

Fonte: ZUANAZZI & MONTANHA, 2004

## Taninos

Taninos são compostos fenólicos com elevado peso molecular e estão associados aos mecanismos de defesa das plantas contra insetos (PAIS, 1998). São encontrados em grandes quantidades nos vacúolos das células das plantas, além de depósitos na epiderme das folhas (LI & MAPLESDEN, 1998). Tais compostos podem ser divididos de acordo com sua estrutura química e propriedades em dois grupos: taninos condensados e hidrolisados.

Taninos condensados ou não hidrolisáveis são oligômeros e polímeros formados pela ligação de dois ou mais monômeros de flavan-3-ol (catequina) ou flavan-3-4diol (Figura 8). Essa classe de taninos também é denominada proantocianidina devido à produção de pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, tais como cianidina e delphinidina (ZUANAZZI et al., 2000). A presença ou não da hidroxila (OH), assim como

sua localização na estrutura dos monômeros de flavan-3-ol resulta em diferentes classificações dos taninos condensados. Desta forma os taninos condensados podem ser divididos em tipo 1, aquele que apresenta uma hidroxila na posição C-5 do anel A (Figura 9), e tipo 2, que não apresenta hidroxila na mesma posição (Figura 10) (ZUANAZZI, 2000).

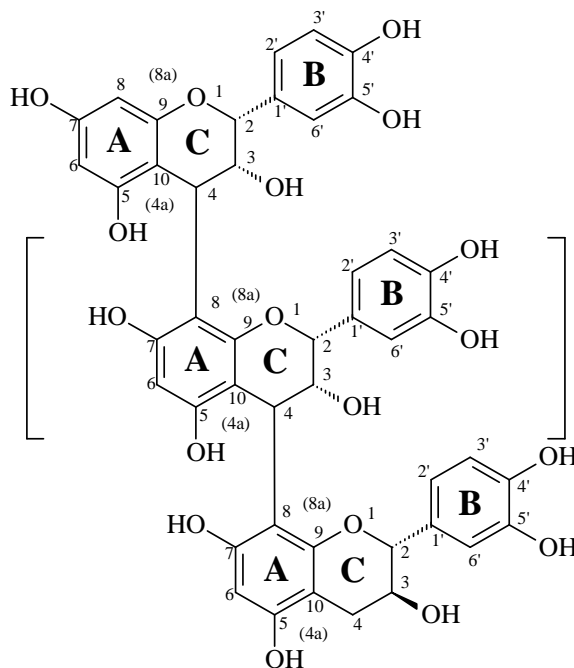


Figura 8. Tanino condensado – Procianidina

Os taninos condensados podem ser classificados de acordo com a presença de OH na posição C-3 do anel B (R3) em prodelfinidina ou na ausência desta OH em procianidina (Figura 11). Os monômeros de procianidinas são a catequina e a epicatequina enquanto os monômeros de prodelfinidina são a galocatequina e a epigalocatequina (BRUNET & HOSTE, 2006). Vale ressaltar que tanto a procianidina quanto a prodelfinidina podem possuir um grupo galato na posição C-3 do anel C (R1 e R2), resultando nos derivados galoil de procianidina e prodelfinidina (Figura 11).

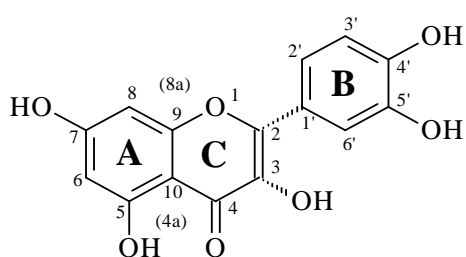


Figura 9. Monômero de tanino condensado Tipo 1

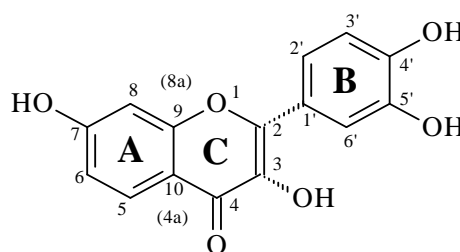


Figura 10. Monômero de tanino condensado Tipo 2

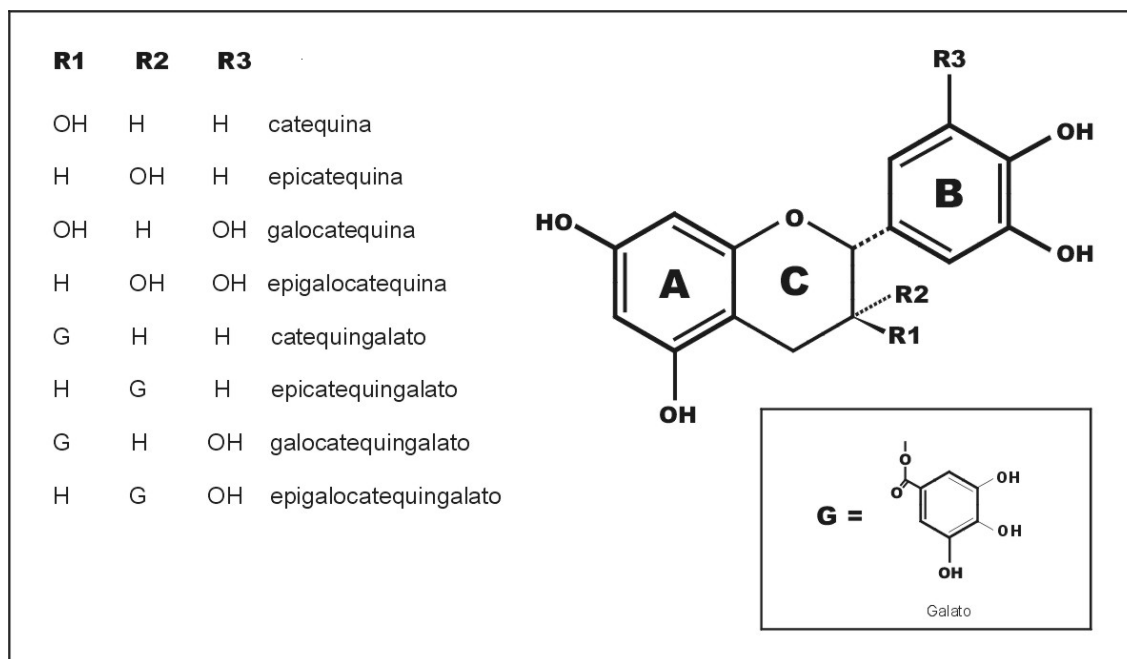


Figura 11. Estrutura química da procianidina e prodelfinidina e seus derivados galoil.

Os taninos condensados estão amplamente presentes em gimnospermas e angiospermas, principalmente em plantas lenhosas e em outras classes de vegetais muito utilizados para a alimentação humana e animal (QUEIROZ et al., 2002). Eles perfazem, aproximadamente, a metade da matéria seca da casca de muitas árvores além de se constituírem na segunda fonte de polifenóis do reino vegetal, perdendo apenas para a lignina (QUEIROZ et al., 2002). Uma das mais importantes propriedades químicas dessa classe de taninos é a habilidade de formar complexos com macromoléculas tais como proteínas e carboidratos, sendo inclusive, o aspecto mais determinante dos efeitos nutricionais e toxicológicos em pequenos ruminantes (OTERO & HIDALGO, 2004).

Os taninos hidrolisáveis são compostos que após hidrólise produzem carboidratos e ácidos fenólicos. São unidos por ligações éster-carboxila, sendo prontamente hidrolisáveis em condições ácidas ou básicas (NASCIMENTO & MORAIS, 1996).

A unidade básica estrutural desse tipo de tanino é um poliol, normalmente a D-glucose, com seus grupos hidroxilas esterificados pelo ácido gálico (galotaninos) ou pelo ácido hexadiidroxifênico (elagitaninos) (Figura 12). Portanto os taninos hidrolisáveis são divididos, de acordo com o produto de hidrólise, em galotaninos, que produzem ácido gálico, e em elagitaninos, que produzem ácido elágico (NASCIMENTO & MORAIS, 1996; GALVEZ et al., 1997). Estes taninos não são muito comuns em madeiras, quando comparados aos taninos condensados.

Os taninos hidrolisáveis são encontrados em abundância em folhas, frutas, vagens de dicotiledôneas, mas não têm sido detectados em monocotiledôneas (ZUANAZZI et al., 2000).

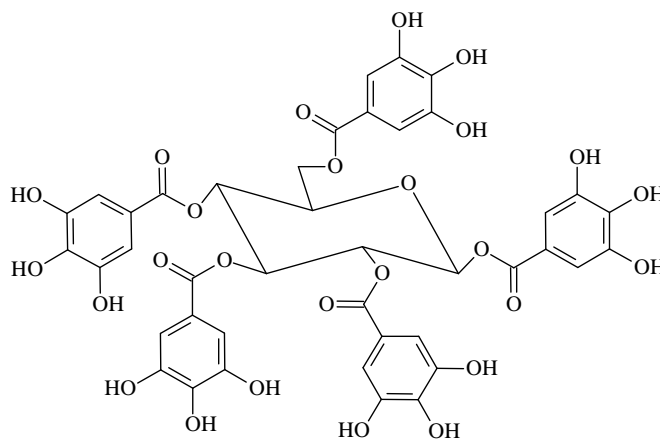


Figura 12. Tanino hidrolisado

O papel biológico dos taninos nas plantas tem sido investigado e acredita-se que esteja envolvido na defesa química das plantas contra o ataque de herbívoros vertebrados ou invertebrados (TEMMINK et al., 1989) e contra microrganismos patogênicos (TAKECHI et al., 1985). Foi observada inibição da alimentação de herbívoros quando ingerem plantas com altos teores de taninos. Os modos de ação propostos contra herbívoros seriam: diminuição da palatabilidade pelo sabor adstringente, dificuldades na digestão pela complexação dos taninos com enzimas digestivas e/ou com proteínas da planta e, por último, produtos tóxicos formados no trato digestivo a partir da hidrólise dos taninos (ZUANAZZI et al., 2000).

A quantidade e o tipo de taninos sintetizados pelas plantas variam consideravelmente dependendo da espécie, do cultivo, do tecido e de condições ambientais. Geralmente a concentração é maior em espécies que prosperam em solos agrícolas pobres ou de baixa calagem, tal como ocorre nas regiões tropicais e subtropicais (OTERO & HIDALGO, 2004). Além disso, as concentrações de taninos são maiores nas partes dos vegetais expostas ao sol, indicando, portanto, uma relação entre a fase dependente de luz da fotossíntese com a produção de taninos (HEIL et al., 2002).

Vale ressaltar a diferença de taninos entre espécies de um mesmo gênero vegetal, de forma que essa diferença influi na atividade biológica dos taninos. Isso foi bem observado quando caprinos tratados com *Acacia nilotica* e *Acacia karoo* apresentaram diferentes

resultados entre as duas espécies. Os animais tratados com *A. nilotica* apresentaram maior redução na contagem de ovos de nematóides eliminados nas fezes e na carga de parasitos gastrintestinais adultos presentes no animal quando comparado com *A. karoo* (KAHIYA et al., 2003).

Plantas ricas em taninos condensados são empregadas na medicina tradicional como remédios para o tratamento de diversas moléstias, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996).

Os prováveis mecanismos responsáveis pela atividade farmacológica dos taninos seriam: a capacidade de formar complexos com outras moléculas incluindo polissacarídeos e proteínas; formar complexos com íons metálicos como o ferro, manganês, cobre, alumínio, etc. e de exercer a atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres (OKUDA, 2005).

Nos últimos anos, vários grupos têm investigado as atividades farmacológicas e biológicas dos taninos. Dentre essas atividades pode-se citar:

- atividade antimicrobiana do extrato etanólico do caroço da semente de *Mangifera indica* (MKE), rico em compostos polifenóis (97% de taninos hidrolisáveis), tanto sobre bactérias Gram + quanto Gram – (KABUKI et al., 2000);
- atividade anti-helmíntica: redução de 95% da eclosão de ovos de *Haemonchus contortus* tratados com o extrato etanólico do caroço de semente de *M. indica*, manga (COSTA et al., 2002);
- inibição de enzimas: os taninos mostraram capacidade de inibir praticamente todas as enzimas testadas *in vitro*. Tal fato deve-se a formação do complexo taninos/proteínas, cujo efeito *in vitro* pode ser extrapolado para enzimas extracelulares como a glucosiltransferase, que é produzida por duas bactérias, *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*, encontrados na cavidade bucal do homem. Essa enzima catalisa a formação de dextranas, que se sedimentam sobre os dentes e, com isso, facilitam a adesão das bactérias à superfície lisa dos dentes favorecendo a formação de placas, que são os pressupostos da cárie e inflamações da gengiva. Portanto o efeito da inativação da glucosiltransferase pelos taninos evitaria a

formação da placa dental e de inflamações na região bucal e garganta (ZUANAZZI et al., 2000);

- o atividade antioxidante e seqüestradora de radicais livres: íons metálicos como  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  foram reduzidos a  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{+}$ , respectivamente quando postos em contato com soluções de taninos a temperatura ambiente (OKUDA, 2005).

Além desses efeitos, estudos têm revelado que os taninos condensados na concentração de 2-4% de matéria seca (MS) na forragem têm aumentado a quantidade de proteínas não degradadas em nível do intestino delgado, melhorando, desta forma, a utilização de aminoácidos essenciais em ruminantes (OTERO & HIDALGO, 2004).

A maior disponibilidade de proteínas em nível do intestino delgado tem sido responsabilizada pela maior produtividade animal. Caprinos alimentados com pastagens contendo taninos condensados tiveram aumento de peso ao nascer, ganho de peso e redução de mortalidade dos recém nascidos. Com relação às cabras observou-se recuperação do peso após o parto mais rápido do que o grupo que recebeu polietileno glicol (PEG), substância que se liga aos taninos impedindo sua ativação (KABASA et al., 2004).

Deve-se ressaltar que o pequeno ruminante ao possuir a sua disposição uma maior quantidade de aminoácidos absorvidos a nível de intestino delgado, haverá uma melhora tanto da homeostase quanto do sistema imune do hospedeiro contribuindo com a resiliência do animal frente a desafios como o parasitismo gastrintestinal (COOP & KRIAZAKIS, 2001). ABBOTT et al. (1988) sugeriram um aumento da resposta imune como consequência da maior disponibilidade de proteína. PAOLINI et al. (2003) observaram que animais tratados com taninos apresentaram um aumento no número de células inflamatórias, incluindo eosinófilos, mastócitos e leucócitos, apesar de não diferirem do grupo controle significativamente. A maior disponibilidade de proteína no rúmen poderia também ser responsável por maior reposição protéica, compensando assim, a perda ocasionada pelo parasitismo, melhorando desta forma, o estado geral do animal. Experimentos demonstraram que essas perdas são consideráveis, variando de 20 a 125 g de proteína por dia em *T. colubriformis* (SOULSBY, 1987).

Além dos efeitos indiretos obtidos dos taninos condensados sobre o parasitismo gastrintestinal, há trabalhos, *in vivo*, que indicam o efeito direto sobre os nematóides gastrintestinais. PAOLINI et al. (2003) observaram diminuição da contagem de ovos nas fezes de caprinos infectados experimentalmente com *H. contortus* tratados com suspensão

aquosa de quebracho, correspondendo a 5% da dieta de MS, durante oito dias. Porém não foi observada diferença quanto à carga parasitária entre grupo tratado e controle. Neste caso tudo indica que a ação dos taninos ocorreu sobre a fecundidade do parasito. Resultados semelhantes também foram obtidos em caprinos infectados por *H. contortus* quando tratados com *A. karoo*, porém nesse experimento observou-se redução de 34% da carga parasitária, mostrando que a diferença na quantidade e tipo de tanino influencia a atividade anti-helmíntica (KAHIYA et al., 2003). Vale ressaltar que o efeito antiparasitário não se restringe somente a *H. contortus*, mas também houve redução de *T. colubriformis* e *Nematodirus battus*. Estes nematóides tiveram fecundidade e carga parasitária reduzidos quando os animais portadores de tais infecções receberam 8% v/v de quebracho (ATHANASIADOU et al., 2001). MINHO (2006) ao avaliar, durante 60 dias, o efeito da dose de 1,6 g/kg/PV de extrato de *Acacia mearnsii* (15% de taninos condensados) fornecido, por dois dias consecutivos, a ovinos portadores de infecção natural, observou uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) do OPG após 30 dias no grupo tratado em relação ao controle. Para avaliação da carga parasitária, os animais foram sacrificados no 58º dia de experimento, observando-se redução da carga parasitária de *H. contortus* ( $P < 0,01$ ), o mesmo não ocorrendo para *T. colubriformis* ( $P > 0,05$ ). Porém, quando se utilizou ovinos experimentalmente infectados com os mesmos nematóides, os animais foram submetidos no máximo a dois dias de tratamento com o extrato de *A. mearnsii* e o sacrifício para avaliação da carga parasitária ocorreu no nono dia pós-tratamento. Nesta ocasião não se observou diferença estatística quanto ao OPG nem da carga parasitária entre o grupo tratado e controle (MINHO, 2006).

### **Óleos essenciais**

São líquidos oleosos voláteis dotados de forte aroma, extraídos principalmente de plantas por arraste a vapor, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (SILVA, 2007; SIMÕES & SPITZER, 2004). Também são denominados de óleos voláteis ou óleos etérios. Essas denominações são resultantes de suas características físico-químicas como a volatilidade, o aroma intenso e agradável e a solubilidade em solventes orgânicos apolares como o éter (SIMÕES & SPITZER, 2004).

Quimicamente, a grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados fenilpropanóides ou de triterpenoídes (SIMÕES & SPITZER, 2004).

Os fenilpropanóides constituem uma classe de compostos fenólicos provenientes da via do ácido chiquímico. Possuem atividade antioxidante (MATSUDA et al., 2003), larvicida contra *Aedes aegypti* (SIMAS et al., 2004). Vale salientar que um dos fenilpropanóides mais comum é o eugenol que possui atividade anti-helmintica (PESSOA et al., 2002).

A grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados terpenóides. Terpenóides são substâncias derivadas de unidades do isopreno. Os esqueletos carbonados dos terpenóides são formados pela condensação de um número variável de unidades pentacarbonadas (unidades isopropênicas). Assim de acordo com a quantidade de átomos de carbono os terpenóides podem ser: isopreno (unidade básica – 5 carbonos), monoterpenóides (10 átomos de carbonos), sesquiterpenóides (15 átomos de carbono), diterpenóides (20 átomos de carbono), sesterpenos (25 átomos de carbono), triterpenóides (30 átomos de carbono), tetraterpenóides (40 átomos de carbonos), polisoprenóides (n átomos de carbono) (ALVES, 2001).

Os óleos essenciais são constituídos principalmente de monoterpenos (Figura 13) e os sesquiterpenos (Figura 14). Diterpenos são encontrados apenas nos óleos essenciais extraídos com solventes orgânicos (SIMÕES & SPITZER, 2004).

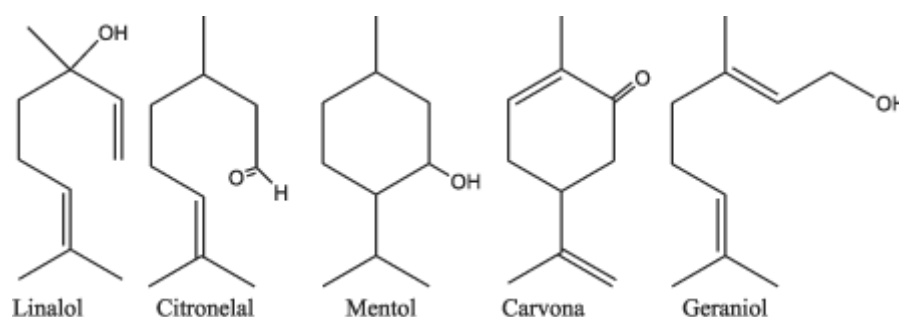


Figura 13. Estruturas de monoterpenos

Fonte: SIMAS et al., 2004

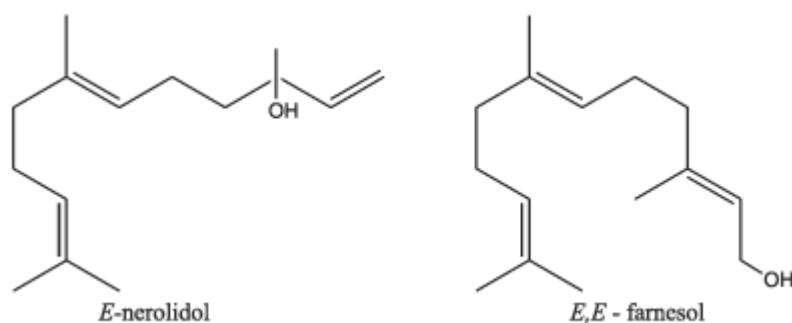


Figura 14. Estruturas de sesquiterpenos

Fonte: SIMAS et al., 2004

Os óleos essenciais são raramente encontrados em angiospermas monocotiledôneas, com exceção nas gramíneas. Porém é nas gimnospermas dicotiledôneas que se encontram as plantas ricas em óleos essenciais (SILVA, 2007).

Com relação à localização, os óleos podem ser encontrados em estruturas especializadas, como os pêlos glandulares, células parenquimáticas. Podem estar estocados também nas flores (laranjeira), folhas (eucalipto) cascas de caule (canela), rizomas (gingibre), frutos (erva-doce), dentre outros (SIMÕES & SPITZER, 2004).

A imensa maioria dos terpenos é específica do reino vegetal, mas esta especificidade não é absoluta: em animais marinhos (Celentéreos, Esporângios) não é rara a presença de sesquiterpenos e diterpenos de estrutura variada, e os ferormônios monoterpênicos presentes em alguns insetos não necessariamente são oriundos das plantas de que se alimentam (BRUNETON, 1991).

A volatilidade e marcado odor desses óleos constituem um elemento de comunicação química: seu papel na polinização e dispersão das diásporas é inquestionável. Também, constituem um meio de defesa frente a predadores (SILVA, 2007; SIMÕES & SPITZER, 2004).

Entre ações de óleos essenciais pode-se citar a carminativa (menta); antiespasmódica (camomila, alho); estimulante sobre as secreções do aparelho digestivo (gingibre); cardiovascular (cânfora); irritante tópica (essência de terebintina); secretolítica (eucalipto); estimulante (capim-limão) ou provocando convulsões (canela) do sistema nervoso; anestésica (cravo-da-índia); antiinflamatória (camomila), anti-séptica (timol) e anti-helmíntica (timol e anetol) (CAMURÇA-VASCONCELOS, 2006; SIMÕES & SPITZER, 2004).

Os dados disponíveis sobre efeitos tóxicos crônicos, ainda são poucos conhecidos. O mesmo não ocorre com a toxicidade aguda cujos efeitos já são bem mais conhecidos. Desta temos: reações cutâneas como a irritação da pele provocada pelo óleo da mostarda, sensibilização cutânea provocada pela canela e fototoxicidade induzida pelos óleos dos frutos cítricos. Há relatos de toxicidade sobre o sistema nervoso central como os efeitos convulsivantes da cânfora que podem inclusive provocar crises epileptiformes e efeitos psicotrópicos como o óleo essencial de noz-moscada que causa excitação, alucinações visuais e distorções de cores (SIMÕES & SPITZER, 2004).

### Saponinas

As saponinas, também chamadas saponosídeos, são glicosídeos formados por várias unidades de monossacarídeos ligados a um núcleo fundamental denominado de aglicona (Figura 15). O núcleo aglicona pode ser constituído por esteróides ou triterpenos. O nome provém do fato de formarem espuma abundante quando agitadas na água, à semelhança do sabão. Esta propriedade decorre de sua estrutura química, na qual açúcares solúveis estão ligados a esteróides lipofílicos ou triterpênicos (MATOS, 2007). Elas reduzem a tensão superficial da água, e causam, *in vitro*, a hemólise de eritrócitos.

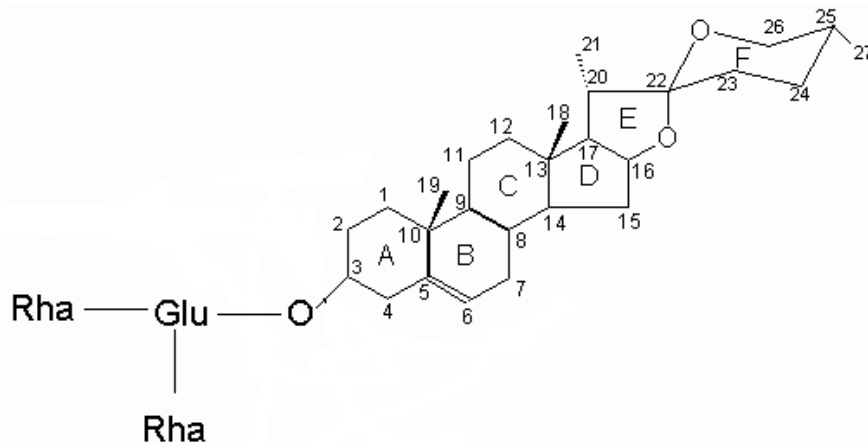


Figura 15. Estrutura de uma Saponina  
Fonte: LÉON, 2008

A classificação das saponinas geralmente é feita de acordo com o núcleo fundamental aglicona, podendo ser denominadas saponinas esteroidais ou saponinas triterpênicas. As saponinas esteroidais são formadas por um esqueleto de 27 carbonos e núcleo esteroidal (Figura 16). São encontradas quase que exclusivamente nas monocotiledôneas. Os gêneros *Smilax*, *Dioscorea*, *Agave* e *Yucca*, são ricas nesse tipo de saponina.

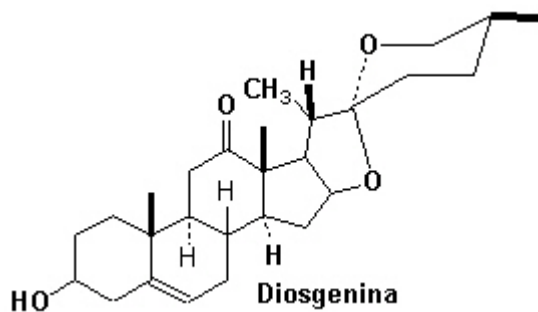


Figura 16. Estrutura de uma Saponina esteroidal

Fonte: <http://www.eps.ufsc.br/teses99/oashi/cap6b.html#6.1.3>

As saponinas triterpênicas são constituídas por esqueleto de 30 carbonos e núcleo triterpênico (Figura 17). São encontradas predominantemente nas dicotiledôneas, principalmente nas famílias Sapindaceae, Sapotaceae, Polygonaceae, Caryophyllaceae e Araliaceae (SCHENKEL et al., 2004).

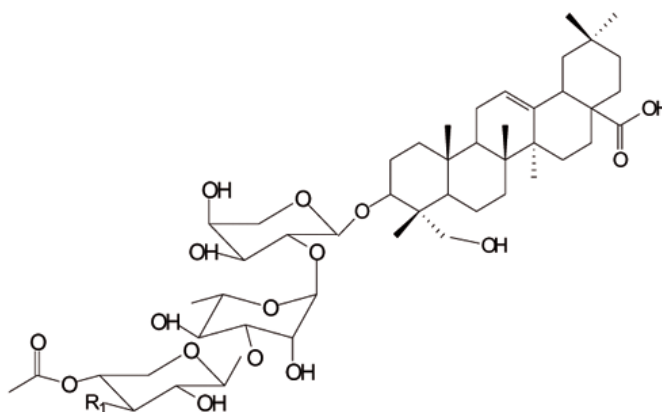


Figura 17. Estrutura de uma Saponina triterpênica

Fonte: TSUZUKI, et al., 2007

A ação lipofílica das saponinas facilita a complexação das mesmas com esteróides, proteínas e fosfolípídeos das membranas celulares alterando a permeabilidade das mesmas, ou causando sua destruição (SCHENKEL et al., 2004). Baseado nesta ação sobre as membranas observa-se as atividades hemolíticas e spermicidas. Além disso, há relatos de propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antiinflamatórias, antiviral e ação hipocolesteremiante (SCHENKEL et al., 2004). Além disso, extratos ricos em saponinas oriundo de plantas como a *Yucca schidigera* e *Quillaja saponaria*, têm sido investigadas quanto ao aumento na produtividade de ruminantes (WANG et al., 2000) e de

monogástricos (HAUPTLI & LOVATTO, 2006). Um exemplo foi o aumento de 12% do escore corporal de porcas alimentadas com dietas contendo saponinas (HAUPTLI & LOVATTO, 2006). Isso é possível porque as saponinas aumentam a permeabilidade da mucosa intestinal melhorando a absorção e digestão do alimento. Além disso, a maior eficiência da síntese das proteínas microbiana observada na presença das saponinas de *Yucca* e *Quillaja* em sistemas de fermentação do rúmen *in vitro*, pode ser vantajoso para ruminantes, principalmente, em baixas dietas protéicas (MAKKAR et al., 1997). Ademais observou-se que essas saponinas apresentaram atividade 100% larvicida sobre *Aedes aegypti* e *Culex pipiens* (PELAH et al., 2002).

As sapogeninas esteroidais são de considerável importância econômica como precursoras de muitos esteróides farmacologicamente ativos, inclusive anticoncepcionais de via oral, de corticosteróides e de hormônios sexuais. A sapogenina de maior importância econômica é a diosgenina, cuja extração comercial é feita quase sempre que inteiramente das espécies dioscóreas. Entretanto, a indústria baseia-se na coleta de plantas, que estão se tornando raras em algumas áreas e a cada dia se torna mais difícil e mais dispendioso explorar as fontes selvagens inexploradas anteriormente. Outra sapogenina esteroidal obtida comercialmente é a hecogenina, a qual é extraída do suco do sisal, o produto descartado durante o processo de desfibramento das folhas da *Agave sisalana*. O consumo mundial de esteróides assume na época atual grandes proporções. O movimento mundial de venda de hormônios sexuais, drogas antiinflamatórias, anovulatórios e outros medicamentos de natureza esteroidal é da ordem de bilhões de dólares por ano (SCHENKEL et al., 2004).

Portanto, dentre os metabólitos secundários analisados observa-se a possibilidade de utilizá-los como anti-helmínticos (taninos condensados e óleos essenciais) e como imunomoduladores (taninos condensados e saponinas). Porém há a necessidade da validação desses compostos utilizando testes *in vitro* e *in vivo*.

### **2.3. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica**

Para verificar a eficácia anti-helmíntica, seja de anti-helmínticos sintéticos ou de plantas medicinais, utilizam-se testes *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vitro* se constituem na observação da ação do fármaco pelo contato direto com os estágios de ovo ou larva do parasito para avaliar seu efeito sobre a eclosão de ovos e desenvolvimento ou motilidade de larvas. O teste de eclosão de ovos se baseia na capacidade dos benzimidazóis, mais

especificamente o tiabendazol, de inibir o desenvolvimento e conseqüentemente a eclosão de ovos frescos de nematóides, isolados a partir de um processo de passagem em tamises com abertura entre malhas decrescente (HUBERT & KERBOEUF, 1992). A partir dos resultados obtidos no teste calcula-se a concentração efetiva para inibir a eclosão de 50% dos ovos ( $CE_{50}$ ). As vantagens deste teste se concentram na rapidez, simplicidade e baixo custo. Uma desvantagem é a não identificação dos nematóides resistentes, por causa da similaridade em tamanho e aparência dos ovos de diversos gêneros de nematóides (ECHEVARRIA, et al., 1996).

Outro teste *in vitro* disponível para avaliar a ação anti-helmíntica de plantas ou seus constituintes ativos é o teste de desenvolvimento larvar que se baseia na inibição do desenvolvimento de L1 a L3. A vantagem desse teste é a possibilidade de diferenciar as espécies resistentes aos anti-helmínticos (COLES et al., 1992). Segundo COLES et al. (1992) os métodos de LACEY (1987) e HUBERT & KERBOEUF (1992) são os testes mais recomendáveis, já que mostraram boa correlação com o percentual de eficácia dos testes *in vivo*. O teste de motilidade larvar tem demonstrado ser um teste com resultados controversos. ECHEVARRIA et al. (1996) e VÁRADY & CORBA (1999) observaram resultados discordantes sugerindo que o teste seja subjetivo, quanto à classificação de uma larva paralisada. Porém GEERTS et al. (1989) não observaram diferença entre seus achados e a literatura disponível, além de não terem encontrado influência na manipulação dos operadores, tempo de incubação, temperatura e tempo de observação.

Atualmente estes testes além de verificarem a ação de anti-helmínticos sintéticos têm sido utilizados para avaliação preliminar ou triagem de plantas com atividade ovicida ou larvicida (ATHANASIADOU et al., 2001; PESSOA et al, 2002; COSTA et al, 2002; ASSIS et al., 2003; MACIEL et al., 2006; COSTA et al., 2008).

Obtendo-se resultados promissores com os testes *in vitro*, passa-se aos testes pré-clínicos que incluem os testes de toxicidade e eficácia utilizando animais de laboratório.

Os estudos toxicológicos são aplicados em animais de laboratório sob condições previamente estabelecidas para permitir a determinação dos possíveis efeitos decorrentes da exposição a determinadas substâncias (BARROS & DAVINO, 2003). A avaliação toxicológica de produtos em organismos vivos pode envolver a avaliação dos efeitos obtidos após 24 horas da administração (toxicidade aguda) ou após administrações em doses repetidas (toxicidade sub-crônica e crônica). Outros estudos como toxicidade reprodutiva, estudos de efeitos neurotóxicos e/ou teratogênicos e estudos de efeitos carcinogênicos e/ou mutagênicos podem fazer parte de uma avaliação mais detalhada dos

efeitos da administração de fitoterápicos em animais (CAMURÇA-VASCONCELOS, 2005).

Após determinação de eficácia *in vitro* do extrato acetato de etila de *S. anthelmia* (erva-lombrigueira) sobre ovos e larvas de *H. contortus*, este extrato foi selecionado para estudo toxicológico em animais de laboratório. O extrato acetato de etila de *S. anthelmia* apresentou  $CE_{50}$  de 345,9 mg/kg por via oral em camundongos (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2004) e não demonstrou toxicidade sistêmica significativa em administrações orais durante 30 e 60 dias em ratos (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005). FONTENELLE (2005) avaliou a toxicidade aguda dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta) e *Croton zehntneri* (canela de cunha, canela-brava) verificando que estes óleos administrados por via oral não apresentaram qualquer toxicidade até 3 g/kg. Assim sendo, a determinação da toxicidade auxilia na escolha das doses a serem usadas nos testes *in vivo*, portanto são de fundamental importância na validação de plantas medicinais.

Após a realização dos testes toxicológicos, animais de laboratório podem ser utilizados para testar plantas com propriedades medicinais. Camundongos e ratos albergando parasitos intestinais podem ser usados em ensaios preliminares para determinar atividade anti-helmíntica de produtos naturais. Os resultados dos grupos tratados são comparados, percentualmente, com os resultados obtidos em grupos não tratados e em grupos tratados com drogas sintéticas. Os nematóides de maior ocorrência em infecções de camundongos mantidos em laboratórios no Brasil são *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetraptera* (BAZZANO et al., 2002; SCAINI et al., 2003; SILVA et al., 2005). O uso de camundongos para a avaliação da ação anti-helmíntica de extratos de plantas é válido, pois leva em conta o metabolismo do animal que por sua vez pode interferir na eficácia da droga (HENNESSY, 1997). O mesmo não acontece nos testes *in vitro* que ao colocar a substância a ser testada em contato direto com o parasito não leva em consideração o metabolismo podendo resultar na falta de correlação entre os resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* (PESSOA et al., 2002; COSTA et al., 2006; CHAGAS et al., 2008; COSTA et al. 2008). Outra vantagem de utilizar animais de laboratório antes da espécie alvo seria evitar o uso desnecessário de animais de produção na pesquisa de efeito anti-helmíntico, além da redução de custos e tempo de validação de plantas quanto à atividade anti-helmíntica. (KIRKWOOD, 2004). Além disso, as doses eficazes obtidas em camundongos e ratos poderiam ser transformadas através do cálculo alométrico para obter uma estimativa da dose efetiva para animais de produção (KIRKWOOD, 2004). CAMURÇA-VASCONCELOS et al. (2008) ao avaliarem *L. sidoides* na dose de 1.600 mg/kg e *C.*

*zehntneri* na dose de 800 mg/kg, sobre a carga parasitária de camundongos, observaram eficácia média de 68,94 e de 11,64% respectivamente. Ao extrapolar a dose de 1.600 mg/kg de *L. sidoides*, eficaz em camundongos, para ovinos, utilizando o cálculo alométrico, a planta reduziu a carga parasitária e a eliminação de ovos nas fezes de nematóides de ovinos em 43,7% e 54% respectivamente (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2008).

Dentre testes anti-helmínticos realizados com camundongos AMORIM et al (1987) testaram o efeito de nove plantas em camundongos infectados com os nematóides do intestino grosso, *S. obvelata* e *A. tetraptera*, e o melhor resultado foi obtido com a planta *Tynnanthus fasciculatus* (cipó-cravo) que apresentou eficácia de 57,2%. Por outro lado, *Ficus insipida* (figueira-do-brejo, mata-pau) e *Ficus carica* (figueira) não demonstraram eficácia na redução da carga parasitária sobre os mesmos nematóides (AMORIM et al., 1999). O suco e o infuso de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) apresentaram eficácia abaixo de 20% na eliminação de *A. tetraptera* e *S. obvelata* em camundongos (BORBA & AMORIM, 2004). Da mesma forma o extrato aquoso de *Albizia anthelmintica* (albizia alto) administrado a camundongos infectados com *Heligmosomoides polygyrus*, parasito do intestino delgado, não produziu efeitos significantes na contagem de ovos ou na carga parasitária dos animais (GITHIORI et al., 2003).

Uma vez obtido resultados satisfatórios em animais de laboratórios, podem ser realizados os testes com animais que representem a espécie alvo para a indicação terapêutica. No caso da validação de plantas com atividade anti-helmíntica em ruminantes, os testes de redução da contagem de ovos nas fezes (FECRT) e o teste controlado são os experimentos finais para a avaliação da atividade anti-helmíntica de plantas (CAMURÇA-VASCONCELOS, 2005).

O FECRT envolve o tratamento de animais naturalmente ou artificialmente infectados e pode ser utilizado em ruminantes, eqüinos e suínos, avaliando todos os tipos de anti-helmínticos e com todas as espécies de nematóides em que os ovos são expelidos pelas fezes. O teste fornece uma estimativa da eficácia anti-helmíntica através da comparação da contagem de ovos dos nematóides adultos antes e após o tratamento. A contagem de ovos nas fezes de animais do grupo não tratado fornece uma medida de mudança que pode ocorrer durante o período do teste (COLES et al., 1992).

No teste controlado a eficácia anti-helmíntica é determinada pela comparação entre a carga parasitária dos animais do grupo tratado e do grupo controle (WOOD et al., 1995). A necropsia dos animais é feita 4 a 7 dias após o tratamento para possibilitar a identificação e contagem da carga parasitária. Esse é o ensaio mais confiável para determinação da

atividade anti-helmíntica, sendo recomendado para confirmação de doses (TAYLOR et al., 2002). Tendo em vista a sua laboriosidade e a necessidade de sacrificar muitos animais, em geral esse teste é a última etapa realizada na avaliação de plantas com atividade anti-helmíntica e, conseqüentemente, poucos são os autores que empregaram esta técnica (CAMURÇA-VASCONCELOS, 2005).

#### **2.4. Plantas Medicinais com Atividade Anti-helmíntica em Medicina Veterinária**

Várias plantas foram descritas como possuidoras de atividade anti-helmíntica. ASUZU & ONU (1993) verificaram atividade anti-helmíntica do extrato etanólico da casca de *Piliostigma thonningii* sobre L3 de *Haemonchus* spp., *Oesophagostomum* spp., *Bunostomum* spp. e *Trichostrongylus* spp. de bovinos. O extrato promoveu 100% de mortalidade entre 2 e 15 horas nas espécies estudadas.

VIEIRA & CAVALCANTE (1991) verificaram redução de 30% na eliminação de ovos nas fezes de caprinos tratados com *Chenopodium ambrosioides*. AMORIM et al. (1996) testaram extratos aquosos de folhas de *Annona squamosa* (ata, pinha) e de epicarpo de *Punica granatum* (romã) sobre L1 de nematóides gastrintestinais de bovinos obtendo mortalidade de 19,5% e 84%, respectivamente. BATISTA et al. (1999) testaram extratos aquosos de *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* (melão de são caetano) sobre a eclosão de ovos de *H. contortus* concluindo que a dose inibitória da eclosão de 50% dos ovos foi de 0,17 mg ml<sup>-1</sup> para *S. anthelmia* e de 0,1 mg ml<sup>-1</sup> para *M. charantia*. ASSIS et al. (2003) demonstraram que o extrato acetato de etila de folhas de *S. anthelmia* obteve um percentual médio de inibição de eclosão de ovos de 100% na concentração de 50 mg ml<sup>-1</sup>, enquanto o extrato metanólico inibiu na mesma concentração, 84,4% do desenvolvimento larvar de *H. contortus*.

PESSOA et al. (2002), demonstraram, por sua vez, que tanto o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (alfavaca) como o seu principal constituinte, o eugenol, foram 100% eficazes contra ovos de *H. contortus* a 0,5%.

BRAGA et al. (2001) avaliaram a ação anti-helmíntica das folhas de bananeira frescas dadas *ad libitum* a bezerros mestiços de ambos os sexos, infectados naturalmente por *Haemonchus* spp, *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp. e *Oesophagostomum* spp. observando uma redução significativa na média de OPG por coleta e na quantidade de L3 de *Haemonchus* spp.

MACIEL et al. (2006) relataram 98,24 e 67,57% de eficácia sobre a inibição da eclosão de ovos e do desenvolvimento larvar de *H. contortus*, respectivamente, utilizando 12,5 mg ml<sup>-1</sup> do extrato etanólico das folhas de *Melia azedarach* (cinamomo).

CAMURÇA-VASCONCELOS et al (2007) relataram que na concentração de 1,25 mg ml<sup>-1</sup>, os óleos essenciais de *Croton zehntneri* e *Lippia sidoides* e os seus principais constituintes, anetol e timol, inibiram mais de 98% da eclosão de ovos de *H. contortus* e mais de 90% do desenvolvimento larvar desse nematóide na concentração de 10 mg ml<sup>-1</sup>.

EQUALE et al. (2007) demonstraram que as concentrações do extrato aquoso e hidro-alcoólico de *Coriandrum sativum* (coentro) necessárias para inibir 50% da eclosão dos ovos de *H. contortus* foram de 0,12 e 0,18 mg ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Além disso, os autores observaram, *in vitro*, que o extrato hidro-alcoólico e aquoso da mesma planta foram responsáveis por uma mortalidade de 85% e 45%, respectivamente, em parasitos adultos de *H. contortus* na concentração de 8 mg ml<sup>-1</sup>. Com relação ao OPG, não existiu redução significativa nos animais tratados com o extrato aquoso de *C. sativum*. Porém, foi observada redução da contagem da carga parasitária entre os animais do grupo tratado e do grupo controle negativo (p<0,05).

JABBAR et al (2007) avaliaram a eficácia anti-helmíntica de *Chenopodium álbum* (açarinhá-branca) e *Caesalpinia crista* a fim de justificar o seu uso tradicional na medicina veterinária e constataram que as concentrações do extrato metanólico dessas duas plantas necessárias para inibir 50% da eclosão dos ovos de *H. contortus* foram de 0,134 e 0,449 mg ml<sup>-1</sup>. A administração do pó e do extrato metanólico de *C. album* e *C. crista* causaram redução significativa do OPG de ovinos. Animais tratados com 3g/kg do extrato metanólico de *C. crista* apresentaram redução de 93,9% no OPG 13 dias após o tratamento, enquanto animais tratados com essa mesma dose do extrato metanólico de *C. album* apresentaram redução de 82,2% no OPG cinco dias após o tratamento.

COSTA et al. (2008) avaliaram a eficácia de *Azadirachta indica* (nim) sobre *H. contortus*. Foi constatado que 50 mg ml<sup>-1</sup> do extrato acetato de etila das folhas dessa planta inibiram 51,31% da eclosão dos ovos e 68,10% do desenvolvimento larvar. Já o extrato etanólico apresentou maior eficácia, pois inibiu 99,77% da eclosão dos ovos na concentração de 3,12 mg ml<sup>-1</sup> e 87,11% do desenvolvimento larvar na concentração de 50 mg ml<sup>-1</sup>.

TARIQ et al. (2008) observaram que os extratos aquoso e etanólico de *Artemisia absinthium* (absinto) foram responsáveis pela paralisação larvar de *H. contortus* de 93 e 97%, respectivamente (p<0,05). Esses autores demonstraram ainda que 2 g/kg do extrato

aquoso e do extrato etanólico da planta causaram redução significativa de 80,49 e de 90,46% do OPG de ovinos, respectivamente, 15 dias após o tratamento.

A atividade antiparasitária do coco foi avaliada em parasito de camundongos. Eficácia de 73,3% na eliminação de proglótides foi constatada quando camundongos naturalmente infectados com *Vampirolepis nana*, foram tratados com leite de coco obtido por procesamento natural. (AMORIM & BORBA, 1995).

Desta forma, observa-se que há várias plantas com potencial efeito antiparasitário. Muitos desses trabalhos atribuem à presença de taninos condensados como o responsável pelo efeito anti-helmíntico observado. Porém alguns autores têm levantado a hipótese de que tal efeito poderia ser atribuído a estimulação dos taninos condensados sobre o sistema imune do hospedeiro o que contribuiria com a resiliência e/ou resistência do animal frente aos desafios do parasitismo gastrointestinal. Desta forma levanta-se a dúvida se o efeito anti-helmíntico observado em testes *in vivo* é devido a um efeito direto dos taninos condensados sobre o parasitismo ou através de um efeito indireto através do sistema imune.

## **2.5. Atividade Imunomoduladora**

Imunomodulação é o processo que pode alterar o sistema imune de um organismo através da interferência de suas funções. O resultado pode ser um aumento ou redução das reações imunes denominadas de imunoestimulação e imunossupressão, respectivamente. A imunoestimulação implica na estimulação de sistemas não específicos, como granulócitos, macrófagos, complemento, dentre outros. A imunossupressão implica principalmente na redução da resistência contra infecções (MAKARE et al., 2001).

A descoberta da imunomodulação ocorreu durante a campanha mundial de erradicação da varíola através da vacinação com vírus atenuado, descoberto por Edward Jenner, no século XVIII. Após as vacinações em massa da população, observou-se os efeitos benéficos e colaterais que esta vacina exercia sobre os indivíduos. Desde então, vários estudos têm sido conduzidos na busca de substâncias capazes de auxiliar o sistema imune no combate a microorganismos patogênicos, ou a problemas internos, tais como câncer e doenças autoimunes (LABRO, 1998).

As substâncias responsáveis pela imunomodulação são os imunomoduladores. A origem dos imunomoduladores é muito variada, podendo incluir endógena, produtos microbianos, substâncias farmacológicas sintéticas e plantas medicinais (BLECHA, 2001).

### 2.5.1. Imunomoduladores de Origem endógena

As células do sistema imune secretam uma variedade de proteínas que regulam as respostas através de uma sinalização entre as células e que são conhecidas por serem reguladoras e são chamadas de citocinas (TIZARD, 1998).

As citocinas são peptídeos semelhantes a hormônios e estão intimamente envolvidos com a resposta imune. Certas citocinas estimulam a produção de outras citocinas e interagem em complexo sinérgico. Efeitos locais ou sistêmicos das citocinas produzidas pelas células em resposta ao processo inflamatório parecem exercer um importante papel no controle de infecções (MASIHI, 2000).

As interleucinas são citocinas que regulam as interações entre os linfócitos e outros leucócitos. Como a sua definição é muito ampla, as interleucinas são uma mistura de proteínas muito heterogêneas, com pouco em comum exceto o nome (TIZARD, 1998).

### 2.5.2. Produtos microbianos com atividade imunomoduladora

*Propionibacterium acnes* é uma bactéria Gram positiva, residente natural das glândulas sebáceas do folículo piloso da pele humana, vive em ambiente de anaerobiose, crescendo de maneira mais eficaz neste, no entanto, algumas cepas são aerotolerantes. Também é conhecido como *Corynebacterium parvum*, devida a sua semelhança morfológica e organizacional (BRANNAN, 2005). Essa bactéria ao ser administrada como uma suspensão inativada, promove a formação de anticorpos além de estimular a síntese de citocinas, já que é rapidamente fagocitada pelos macrófagos. Vale ressaltar que *P. acnes* estimula os macrófagos e a resposta de anticorpos aos antígenos timo-dependentes, mas possui efeito variado na resposta aos antígenos timo-independentes. A ação imunoestimulante se dá através do estímulo da produção de linfócitos T e B, aumentando, portanto, a imunidade mediada por células o que facilita a função de macrófagos e células NK (SPINOSA, 1999). O resultado é uma potencialização da atividade antibacteriana e antitumoral (TIZARD, 2002).

Vários trabalhos demonstraram a atividade imunoestimulatória de *P. acnes*. Gatos portadores de infecção experimental do vírus da peritonite infecciosa felina (PIF) e que foram tratados com interferons (IFN) isolados ou associados com *P. acnes* apresentaram tempo de sobrevivência maior do que dos gatos não-tratados, mesmo todos os grupos recebendo altas doses letais da cepa virulenta do vírus PIF (WEISS & COX, 1990)

Imunoestimulação também foi observada quando *P. acnes* foi administrado em equinos com inflamações pulmonares agudas (DAVIS et al., 2003). Os autores relataram aumento de IFN, NK e células mononucleares da circulação periférica.

FLAMINIO et al (1998) avaliaram a atividade fagocítica, a expressão fenotípica das subpopulações de linfócitos e a resposta mediada por linfocinas induzidas por *P. acnes*, no tratamento de doenças pulmonares em cavalos. A utilização de uma série de três injeções de *P. acnes* demonstrou a propriedade imunoestimulatória e imunomoduladora, caracterizadas por um aumento da expressão de CD4, concentração de linfócitos no sangue e no fluido da lavagem broncoalveolar, aumento da atividade não fagocítica dos leucócitos e decréscimo celular no pulmão.

PANANGALA et al. (1986) testaram a eficácia da imunomodulação do *P. acnes* associada à vacina para *Brucella abortus* B-19, em cobaias. Os animais foram desafiados com *B. abortus*, sacrificados após o desafio e necropsiados. Os animais vacinados e que receberam o imunomodulador, apresentaram menor quantidade de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) da sementeira de baço em comparação aos animais que apenas foram vacinados. Isto indica que o *P. acnes* administrado simultaneamente a vacina foi capaz de aumentar a resposta imune nestes animais, devido à maior ativação de macrófagos, ao aumento dos mecanismos citolíticos mediados por células-T ou devido ao aumento de ambos os mecanismos.

Trabalhos realizados por MEGID et al. (1998) com *P. acnes* e outros imunomoduladores (Avridina e BCG) associados à vacina Fuenzalida & Palácios em camundongos infectados e tratados pós-exposição, demonstraram taxa de sobrevivência superior em animais que receberam *P. acnes* associado à vacina Fuenzalida & Palacios, quando comparada aos grupos de animais que receberam outros imunomoduladores como Avridina e BCG.

MEGID et al. (2001) obtiveram sucesso no tratamento de Papiloma oral em cães de diferentes idades, através de aplicações semanais de *P. acnes*. Após a quinta aplicação observou-se completa regressão dos papilomas. HALL et al. (1994), também apresentaram resultados positivos no uso do *P. acnes* no tratamento de Papiloma bovino, com aplicações intralesionais. Os animais apresentaram regressão completa das lesões em 15 semanas.

*P. acnes* foi utilizado com sucesso na terapia de endometrites, osteomielite em equinos e no tratamento de feridas. (VAN KAMPEN, 1997).

Outro produto antimicrobiano com atividade imunomoduladora é o Bacilo de Calmette-Guerrin (BCG). O BCG constitui-se de uma cepa vacinal atenuada do

*Mycobacterium bovis*. É um dos mais potentes potencializadores da síntese de citocinas, devido à ativação de macrófagos, mas também exerce uma potencialização generalizada da fagocitose, das respostas mediadas por células B e células T (TIZARD, 2002). O BCG tem sido utilizado com sucesso no tratamento de diarreias causadas por *Escherichia coli* em bezerros. Os animais tratados apresentam melhora nos sintomas clínicos, além de haver diminuição na taxa de mortalidade (VAN KAMPEN, 1997). COMACK et al. (1991) utilizaram BCG em cavalos que apresentavam Complexo Respiratório Equino. Extrato super-purificado da parede do BCG foram aplicadas de forma intravenosa; o resultado foi o completo restabelecimento, em 7 dias, do quadro clínico de 82% dos animais tratados, enquanto no grupo não tratado, apenas 33% se restabeleceram. KNOTTENBELT et al. (2000) utilizaram o BCG comparativamente a outros protocolos terapêuticos no tratamento de sarcóide periorbital em cavalos. Neste estudo de 445 casos de sarcóide periorbital, utilizou-se diferentes recursos terapêuticos como a excisão cirúrgica da massa, criocirurgia, imunomodulação com Bacilo de Calmette-Guerrin (BCG), aplicação tópica de agente citotóxico e radiação. O tratamento com radiação mostrou-se o mais eficaz com 100% de resolução dos casos, mas apresenta desvantagens, como aplicação difícil e custo elevado. Em contrapartida, o tratamento com infiltração intranodular de BCG demonstrou bons resultados (69% de resolução dos casos) e deve ser considerado como uma opção de tratamento para esta enfermidade que quando não tratada adequadamente tem alto índice de recorrência, geralmente de forma mais agressiva, de crescimento rápido e de infiltração extensa.

### **2.5.3. Imunomoduladores sintéticos**

PIND-ORF, comercialmente conhecido como Baypamun® é um imunomodulador constituído da estirpe viral D1701 do *Parapoxvírus* que acomete os ovinos, e como outros imunomoduladores, ativa os mecanismos imunes antígeno-independentes tais como a produção de interferon pelas células mononucleares infectadas por vírus; diferenciação de células imaturas em células maduras e proliferação dos linfócitos. Em estudos realizados por HARTMANN et al. (1998), o Baypamun® foi utilizado no tratamento da Leucemia Viral Felina (FeLV), doença de caráter letal, em gatos naturalmente infectados. Nestes estudos, os animais diagnosticados como FeLV positivos através do método sorológico de ELISA, foram separados em dois grupos distintos, sendo um grupo tratado por um período de sete semanas com imunomodulador, segundo as instruções do fabricante, e o outro

grupo tratado com placebo. Embora não estatisticamente significativa, os animais que receberam Baypamun® apresentaram uma concentração de antígenos menor do que o grupo placebo, além de apresentarem melhora no quadro clínico geral.

Em trabalhos realizados por CASTRUCCI et al. (2000) verificou-se a efetividade do Baypamun® em limitar a disseminação do *Herpesvírus Bovino tipo-1* (HVB-1). Bovinos infectados experimentalmente com o HVB-1 foram divididos em grupos de animais tratados e não-tratados com imunomodulador. Os animais infectados e que receberam Baypamun® apresentaram sinais clínicos clássicos constituídos de hipertermia, tosse, secreção nasal e ocular, perda de peso e apatia menos severos em comparação ao grupo não-tratado. No mesmo experimento animais saudáveis coabitaram com um animal infectado, sendo que apenas metade dos animais saudáveis recebeu Baypamun®; como resultado, os animais não-tratados desenvolveram a sintomatologia clássica e severa da enfermidade, enquanto os animais que receberam imunomodulador foram apenas parcialmente afetados (CASTRUCCI et al., 1994).

WINNICKA et al. (2000), utilizaram o Baypamun® em cabras, antes e após a indução de imunossupressão através do uso de dexametasona. A aplicação de Baypamun® antes ou após a imunossupressão ocasionou um aumento significativo nas células T do tipo CD2+, CD4+ e CD8+. Os resultados demonstraram que a aplicação de Baypamun® a fim de aumentar a resposta imune inespecífica, é recomendada em casos de imunossupressão.

O levamisol é um fármaco anti-helmíntico utilizado no tratamento de parasitose intestinal. Concomitantemente à ação anti-helmíntica, este fármaco atua no sistema imunológico de maneira semelhante ao hormônio timopoiétina, produzido no timo. Estimula a ação de células T e a resposta aos antígenos, potencializa a produção de interferons e aumenta a atividade fagocitária de macrófagos e neutrófilos, estimula a citotoxicidade mediada por células, a produção de linfocinas e a função das células supressoras. Os efeitos do levamisol são mais efetivos em animais com depressão da função de células T, sendo que possui pouco ou nenhum efeito em animais com função normal destas células (TIZARD, 2002).

Na prática veterinária, o uso de levamisol pode ser útil no tratamento de infecções crônicas, como a demodicose canina e no tratamento de doenças neoplásicas. (TIZARD, 2002).

Os esteróides, incluindo os glicocorticosteróides, os hormônios corticosteróides (cortisona, desidro cortisona e similares) e os esteróides sintéticos, como a dexametasona, possuem numerosos efeitos imunossupressores e antiinflamatórios. Os macrófagos são as células particularmente sensíveis a estes agentes (DE JONG *et al.*, 1999). Os esteróides inibem a liberação do ácido araquidônico e, portanto, reduzem a produção de eicosanóides bem como a secreção de proteases neutras e de IL-1. Os esteróides interferem na apresentação de antígenos, inibem a resposta primária por anticorpos e reduzem o número de células T circulantes (VASCONCELOS, 2006).

A ciclofosfamida constitui um agente alquilante que danifica o DNA e impede sua replicação. Estes agentes atuam primariamente sobre os linfócitos B induzindo a depressão da síntese de anticorpos. Não altera a proliferação de linfócitos T, quando administrada no segundo dia após a administração do antígeno (BEL, 2000).

A ciclosporina A (CsA) é um potente agente imunossupressor utilizado para prevenir a rejeição em transplantes de órgãos, sendo efetiva em doses relativamente baixas em várias doenças "auto-imunes" como artrite reumatóide, psoríase e doença de Crohn. É um metabólito polipeptídico cíclico extraído do fungo *Tolypocladium inflatum*, originalmente isolado na Noruega, agindo principalmente na inibição da ativação de linfócitos T, com a supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias (BEL, 2000). A CsA impede a transcrição gênica de várias citocinas como IL-2, IL-4, IL-13 e em especial a IL-5. A IL-2 era anteriormente conhecida como TCGF (*T Cell Growth Factor*) e tem como principal ação assegurar a expansão clonal dos linfócitos T ativados (BARNES & ADOCK, 1995). A CsA apresenta outras funções em várias células: determina a redução da liberação de histamina pelos basófilos, reduz a síntese de IL-1 do fator de necrose tumoral (TNF), do superóxido, do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos, assim como reduz a quimiotaxia de neutrófilos e as concentrações do receptor solúvel IL-2 (LEADFORD, 1996).

#### **2.5.4. Plantas medicinais com atividade imunomoduladora**

O uso de plantas como fonte de substâncias imunomoduladoras ainda é incipiente nos tratamentos da medicina moderna. Porém os estudos para a avaliação sobre o sistema imune são crescentes (DAVIS & KUTTAN, 2000).

Têm-se observado que plantas utilizadas na medicina popular possuem a capacidade de estimular ou inibir as respostas imunes. Isso se deve a presença de substâncias ativas com efeito sobre o sistema imune (AGARWAL & SINGH, 1999).

Acemanana é um carboidrato complexo, derivado da planta *Aloe vera*. É um potencializador da síntese de citocinas com atividades antivirais, antitumorais, ativador de macrófagos e da imunidade celular. Este imunomodulador é utilizado no tratamento de FeLV e nos casos de fibrossarcomas em cães e gatos. Tem sido utilizado, também, de forma efetiva na cicatrização de feridas (VAN KAMPEN, 1997; TIZARD, 2002).

Saponinas da raiz de planta *Panax ginseng* foram responsáveis pelo aumento da produção de citocinas pelos linfócitos, melhoraram a atividade fagocítica de macrófagos humanos (KIM et al., 1990) e estimularam a produção de IgG, mais especificamente de IgG1 e IgG2a (SUN et al., 2007). Além disso, as saponinas isoladas do extrato etanólico de *Astragalus peregrinus* estimularam a proliferação de esplenócitos de camundongos (VEROTTA et al., 2001).

Vários trabalhos demonstraram que substâncias fenólicas de várias plantas influenciam estimulando ou inibindo o sistema imune. Compostos fenólicos de *Tilia cordata* induzem aumento da produção de linfócitos (ANESINI et al., 1999), enquanto os oriundos do extrato etanólico de *Mangifera indica* estimulam ambas as respostas imune humoral e retardada (MAKARE et al., 2001). No caso da *M. indica*, o composto fenólico suspeito de ser o responsável por tal atividade é o mangiferin, possuidora de atividade antiviral e antitumoral (GUHA et al., 1996).

Flavonóides do extrato metanólico de *Epimedium alpinum*, planta encontrada em países da Ásia, foram responsáveis, em testes *in vitro*, por aumentar a proliferação de esplenócitos e timócitos nas concentrações de 0,1 e 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Porém os mesmos compostos em maiores concentrações (50 e 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) apresentaram atividade inibitória (KOVACEVIC, et al., 2006).

A papaína, uma enzima de origem vegetal, vem sendo bastante utilizada por profissionais de saúde como alternativa para o tratamento de feridas, principalmente por seus efeitos antiinflamatórios e cicatrizantes. Em um estudo realizado por ROCHA *et al* (2005) foram verificados os efeitos cicatrizantes benéficos da ação da papaína sobre lesões ulcerativas principalmente por facilitar a organização do tecido de granulação.

Outro exemplo de planta com atividade sobre o sistema imune é o óleo da casca de *Cedrus deodora* que foi responsável pela diminuição da produção de anticorpos e redução na formação e precipitação do complexo imune. Seu efeito inibitório também foi observado nas reações de hipersensibilidade retardada, na redução da atividade fagocítica de neutrófilos e na diminuição da liberação de enzimas e mediadores envolvidos na inflamação (SHINDE et al., 1999). Porém o extrato etanólico da raiz de *Withania*

*sominifera* foi responsável pela proliferação dos leucócitos, elevação da produção de anticorpos e aumento da atividade fagocítica dos macrófagos peritoneais (DAVIS & KUTAN, 2000). Vale ressaltar que os mesmos autores observaram que esse extrato inibiu a resposta imune retardada. Por sua vez o extrato metanólico do caule de *Tinospora cordifolia*, foi responsável pela proliferação dos leucócitos, elevação da produção de anticorpos além da ativação da atividade citotóxica dos macrófagos contra células carcinômicas ascíticas de Erlich (MATHEW, et al., 1999).

Estudos prévios demonstraram que *C. nucifera* apresenta atividade antiproliferativa sobre células tumorais e linfócitos (KIRSZBERG et al., 2003). MENDONÇA-FILHO et al. (2004) observaram que o extrato acetato de etila desta planta, rico em catequinas e taninos condensados, foi responsável pelo aumento, dose dependente, da produção de óxido nítrico em macrófagos portadores ou não da infecção por *Leishmania amazonensis*. Além disso, observaram que a resposta imune celular permanecia inalterada em coelhos que foram desafiados com o extrato aplicado sobre a pele. O modo como o extrato acetato de etila aumenta a produção do óxido nítrico pelos macrófagos é desconhecido. Segundo MENDONÇA-FILHO et al. (2004), os compostos presentes no extrato acetato de etila devem desencadear uma cascata sinalizadora que culmina com a expressão de óxido nítrico.

Ao final, o que deve ser observado é que *C. nucifera* exerce influência sobre o sistema imune o que abre a possibilidade de mais uma substância natural ser incorporada no arsenal de substâncias que auxiliam na manipulação do sistema imune. Porém devem-se fazer mais estudos para melhor o conhecimento de como se dá a influência de *C. nucifera*.

## **2.6. *Cocos nucifera***

*C. nucifera* conhecida popularmente como coqueiro, é uma monocotiledônea pertencente à família Palmae que tem sua origem no sudeste asiático, nas ilhas entre os oceanos Índico e Pacífico (ANDRADE et al., 2004). No Brasil a cultura do coqueiro foi introduzida em 1553, proveniente de Cabo Verde, na África. Sua introdução se deu na Bahia, de onde veio sua denominação de coqueiro-da-baía. Atualmente em grande parte do país é conhecido como coqueiro da praia ou simplesmente coqueiro (GOMES, 1992).

O coqueiro se enquadra na seguinte sistemática botânica:

Reino: Vegetal

Ramo: Phanerogamos

Sub-ramo: Angiosperma

Classe: Monocotiledônea

Ordem: Príncipe

Família: Palmae

Gênero: *Cocos*

Espécie: *Cocos nucifera*

A denominação científica é *Cocos nucifera* L (BRITO, 2004).

O gênero *Cocos* é constituído apenas pela espécie *C. nucifera*. Essa espécie é constituída de duas principais variedades: Típica (variedade gigante) e Nana (variedade anã). Atualmente os híbridos mais utilizados são os resultantes do cruzamento dessas duas variedades (ARAGÃO, 2002).

O fruto do coqueiro, o coco (Figura 18), é formado de fora para dentro, por uma epiderme lisa ou epicarpo, que é uma película fina que envolve o interior da fruta e o mesocarpo, que por sua vez é espesso, fibroso e acastanhado quando seco, de grande aproveitamento industrial. No interior fica uma camada dura de coloração escura, o endocarpo (ANDRADE et al., 2004).

A semente envolvida pelo endocarpo é constituída por uma fina camada de cor marrom (tegumento) que fica entre o endocarpo e o albúmen sólido. Este último é uma camada carnosa, branca, mais ou menos espessa e dura, conforme a idade do coco. Além disso, o albúmen sólido é muito oleoso, principalmente no fruto seco, e forma uma grande cavidade onde se encontra o albúmen líquido, uma água doce, levemente acidulada e muito rica em fósforo e potássio (ARAGÃO, 2002; ANDRADE et al., 2004).

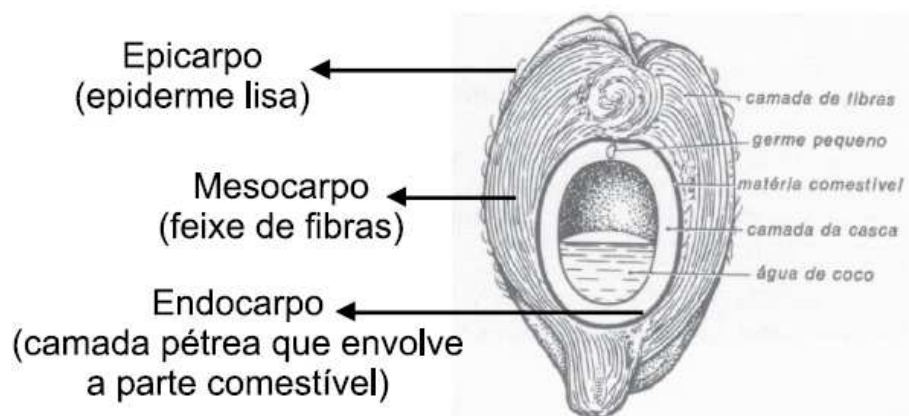


Figura 18. Corte longitudinal do coco com suas partes.

Fonte: ANDRADE et al., 2004.

No Brasil o coqueiro constitui uma das mais importantes culturas permanentes, principalmente na região nordeste, onde o cultivo se localiza predominantemente no litoral (ARAGÃO, 2002).

Com relação a sua utilização, do coco praticamente tudo se aproveita. Todas as partes como raiz, caule, folha, inflorescência e fruto, são empregadas para fins artesanais, alimentícios, agroindustriais, medicinais e biotecnológicos. Dentre os produtos podem-se citar os fibrosos, que são utilizados na indústria têxtil; o endocarpo, utilizado na produção de carvão; e os utilizados para a alimentação pelo aproveitamento do fruto, especificamente do albúmen sólido (BRITO, 2004).

As cascas são geralmente utilizadas como combustível de caldeiras ou ainda processadas para o beneficiamento das fibras. Nesse caso “coir” é o nome dado às fibras que constituem o mesocarpo grosso ou casca do coco (BRITO 2004). Na indústria, a fibra é utilizada na fabricação de esteiras, cordas, estofamentos de carros e almofadas, dentre outros. Na agricultura é utilizado no controle da erosão na drenagem de áreas inundadas e na revitalização de áreas degradadas (BRITO, 2004).

No Brasil, 65% da produção do coqueiro são destinados ao uso do fruto *in natura* como coco verde para a extração da água e 35% nas agroindústrias de água de coco e de albúmen sólido e seus derivados: leite de coco, coco ralado e farinha de coco. Atualmente a demanda por fibra e pó de coco está aumentando, e a tendência mundial é transformá-los, de subprodutos, em principais produtos do coco (ARAGÃO, 2002). Porém, no Brasil, cerca de 6,7 milhões de toneladas de casca dos coco verde ainda são descartadas por ano em lixões e às margens de estradas do Brasil. (ANDRADE et al., 2004). Esse material é de difícil decomposição, pois leva mais de oito anos para desaparecer. Portanto, além de ter importância econômica e social, a utilização desse subproduto é também importante do ponto de vista ambiental, haja vista que 80% a 85% do peso bruto do coco verde representam lixo (CARRIJO et al., 2002). Nesse sentido, a EMBRAPA/Agroindústria Tropical está propondo a utilização desse material para o enchimento de colchões e almofadas. Todavia, durante esse processo de aproveitamento, uma grande quantidade de extrato aquoso, denominado de líquido da casca do coco verde (LCCV), é gerada na etapa de prensagem. Esse líquido, por sua vez é bastante poluente por sua elevada demanda bioquímica de oxigênio, o que lhe atribui um valor econômico negativo, devido aos investimentos para o tratamento. O problema de poluição, com o conseqüente impacto ecológico tem aumentado o interesse por este produto, e motivado pesquisadores a procurarem meios para a sua utilização (CARRIJO et al., 2002). Esse líquido torna-se um

problema ao ser lançado nos rios, causando grande poluição, pois os sólidos dissolvidos servem de substrato para vários microrganismos, além de afetarem o solo de maneira negativa, prejudicando as plantas nele cultivadas (ARAGÃO et al., 2001).

Nos últimos anos, alguns ensaios foram conduzidos para investigar as propriedades farmacológicas e biológicas do LCCV, tendo sido constatada atividade anti-proliferativa de linfócitos (KISRZBERG et al., 2003), analgésica e antioxidante (ALVIANO et al., 2004). Frações desse líquido obtidas com o solvente acetato de etila apresentaram atividade contra a bactéria *Staphylococcus aureus*, o vírus tipo 1 da herpes simplex (ESQUENAZI et al., 2002) e o protozoário *Leishmania amazonensis* (MENDONÇA-FILHO et al., 2004). A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a espectrometria de massa indicaram que o extrato acetato de etila obtido desse líquido é composto principalmente por catequina, epicatequina e taninos condensados (ESQUENAZI et al., 2002).

### 3. JUSTIFICATIVA

O parasitismo gastrointestinal é um dos maiores obstáculos na produtividade do setor da ovinocaprinocultura. No controle dessas nematodeoses vem sendo utilizados anti-helmínticos de alto custo e algumas vezes pouco eficazes por desenvolverem parasitos resistentes. Substâncias produzidas a partir de plantas podem oferecer uma oportunidade para superar esses problemas, pois apresenta como vantagens o suprimento sustentável, além de permitir a produção de animais utilizando produtos naturais, qualidade cada vez mais valorizada.

Na literatura a atividade anti-helmíntica de plantas é atribuída, principalmente, a presença de taninos condensados. Estes por sua vez atuam diretamente sobre o parasito ou indiretamente através do estímulo sobre o sistema imune do hospedeiro resultando em uma resposta imune efetiva sobre os parasitos gastrintestinais. Para se conhecer o possível modo de ação assim como a eficácia dos taninos há modelos experimentais como os testes de atividade anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo* bem como testes para avaliar a atividade imunomoduladora.

LCCV é um subproduto das indústrias de frutos locais que é rico em taninos condensados. Porém esse material é bastante poluente ao ser lançado em rios e canais. Ao utilizar esse material que é rico em taninos condensados busca-se promover o aproveitamento de um subproduto que é descartado das indústrias de frutos assim como fornecer uma alternativa de controle do parasitismo gastrointestinal.

#### **4. HIPÓTESE CIENTÍFICA**

O LCCV e o extrato butanólico possuem atividade anti-helmíntica sobre nematóides gastrintestinais de ovinos e de camundongos, devido ao efeito direto ou indireto (atividade imunomoduladora) dos taninos sobre o parasitismo gastrintestinal.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo Geral

Avaliar um fitoterápico para controlar os nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes através da utilização de produtos naturais que venham a contribuir com a eficiência produtiva destes animais.

### 5.2. Objetivos Específicos

- Analisar fitoquimicamente e quantificar os taninos totais do LCCV e do extrato butanólico do LCCV;
- Avaliar *in vitro* a atividade anti-helmíntica do LCCV e do extrato butanólico do LCCV sobre ovos e larvas de *H. contortus*;
- Avaliar a toxicidade aguda, subcrônica e crônica do LCCV e do extrato butanólico em animais de laboratório;
- Determinar *in vivo* a eficácia do LCCV e do extrato butanólico do LCCV sobre nematóides intestinais de camundongos.
- Avaliar a atividade imunomoduladora do extrato butanólico em camundongos.

## 6. CAPÍTULO I

### **Atividade anti-helmíntica de *Cocos nucifera* L. sobre *Haemonchus contortus***

#### ***Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. on *Haemonchus contortus****

#### **Resumo**

O controle de nematóides é realizado com anti-helmínticos, porém o desenvolvimento da resistência tem exigido a pesquisa de novas alternativas como as plantas medicinais. Existem relatos populares sobre a atividade antiparasitária do fruto de *Cocos nucifera*. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade ovicida e larvicida do líquido da casca do coco verde (LCCV) e do extrato butanólico da LCCV sobre *Haemonchus contortus*. No teste de eclosão de ovos (TEO) o LCCV foi avaliado utilizando as concentrações de 0,15; 0,31; 0,62; 1,25 e 2,5 mg ml<sup>-1</sup>, enquanto o extrato butanólico as concentrações finais foram 2,5; 5; 10; 20 e 40 mg ml<sup>-1</sup>. No teste de desenvolvimento larvar (TDL) as concentrações utilizadas para o LCCV foram de 4,06; 8,12; 16,25; 32,5 e 65 mg ml<sup>-1</sup> e do extrato butanólico 5; 10; 20; 40 e 80 mg ml<sup>-1</sup>. Ao final do experimento observou-se que o LCCV e o extrato butanólico apresentaram atividade ovicida de 100% nas concentrações de 2,5 e 10 mg ml<sup>-1</sup>, respectivamente. O efeito larvicida do LCCV e do extrato butanólico foi de 81,30 e de 99,80%, respectivamente, nas maiores concentrações. Estes resultados sugerem que extratos do coco podem ser úteis no controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes.

Periódico: Smal Ruminant Research (Submetido em Julho de 2008).

## **Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. on *Haemonchus contortus***

C.T.C. Costa, C.M.L. Bevilaqua\*, S.M. Morais, A.L.F. Camurça-Vasconcelos, M.V.

Maciel, L.M.B. Oliveira, K.S.B. Lima

Universidade Estadual do Ceará/Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias

\*Corresponding author:

Universidade Estadual do Ceará/ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias

Av. Paranjana 1700

CEP 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil

Tel. and fax: +55 85 31019840

E-mail address: [claudiamlb@yahoo.com.br](mailto:claudiamlb@yahoo.com.br)

### **Abstract**

The control of nematodes is carried out with anthelmintics, but the development of resistance has required the search for new alternatives such as medicinal plants. There are popular reports of antiparasitic activity of *Cocos nucifera* fruit. The purpose of this study was to evaluate the ovicidal and larvicidal activity of the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) and butanol extract obtained from LBGC on *Haemonchus contortus*. LBGC was evaluated through egg hatching test (EHT) using the concentrations 0.15, 0.31, 0.62, 1.25 and 2.5 mg ml<sup>-1</sup>, while the butanol extract the concentrations used were 2.5, 5, 10, 20 and 40 mg ml<sup>-1</sup>. In the larval development test (LDT) the concentrations used for the LBGC were 4.06, 8.12, 16.25, 32.5 and 65 mg ml<sup>-1</sup> and butanol extract 5, 10, 20, 40 and 80 mg ml<sup>-1</sup>. The LBGC and butanol extract showed 100% ovicidal activity at 2.5 and 10 mg ml<sup>-1</sup>, respectively. The larvicidal effect of LBGC and butanol extract was 81.30 and 99.80%, respectively, in higher concentrations. These results suggest the extracts of coconut can be useful in gastrointestinal nematodes control of small ruminants.

**Keywords:** coconut, butanol extract, *in vitro*, gastrointestinal nematodes, sheep, goats

### **1. Introduction**

Gastrointestinal nematode parasites are the main cause of mortality in sheep and goats in northeastern Brazil (Vieira et al., 1999). The nematode of greater intensity and prevalence in this region is *Haemonchus contortus* (Arosemena et al., 1999). This parasite

infection may result in high losses in yielding profit because this nematode leads to a depression of appetite, changes in protein, energy and mineral metabolism. However, the main symptom of *H. contortus* infection is anemia due to hematophagy. It is estimated that the average blood loss by this parasite is 0.05 ml a day (Soulsby, 1987).

Sheep and goats gastrointestinal nematodes control is usually accomplished with anthelmintic treatment (Charles, 1989). However the development of resistant gastrointestinal nematode populations to anthelmintics is a reality in Brazil (Melo et al., 2003; Mattos et al., 2004), worldwide (Sangster, 1999; Kaplan, 2004) and it is one of the most important and current problem in animal husbandry. The anthelmintics available in the trade have some limitations, such as high costs, residues in food (Herd, 1995), risk of environmental pollution and reduced efficacy in the production of sheep and goats due to low effectiveness. Considering these problems, alternatives such as phytotherapy can be used to decrease the use of synthetic products. (Vieira et al., 1999).

*Cocos nucifera* L. is a plant commonly found along the northeastern coast of Brazil, whose fruit is the coconut. The main use of coconut is the extraction of water that is well appreciated by the flavor and nutritional qualities (Senhoras, 2003). Medicinal uses for aqueous extracts of coconut fiber in the form of tea have been reported (Esquenazi et al., 2002; Mendonça-Filho et al., 2004). Aqueous coconut fiber extracts are used in northeastern Brazil as a traditional medicine to treat diarrhea, arthritis, bleeding and hemorrhages (Duke, 1992). Popular medicine also employs the flesh of the green coconut to treat teniasis, schistosomiasis, and ancylostomiasis (Blini and Lira, 2005).

The objective of this study was to evaluate the ovicidal and larvicidal activity of the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) and butanol extract obtained from LBGC on *H. contortus*.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Plant material and extract preparation*

The LBGC provided by EMBRAPA/Agroindústria Tropical was obtained from green coconuts collected by fruit industry in Fortaleza, Ceará, Brazil. The coconuts were crushed and pressed to obtain a liquid, which was filtered and subjected to three washes with solvents using a decantation funnel. Initially, we used ethyl acetate and then butyl alcohol (butanol). The butanolic solvent was evaporated using a rotary evaporator to obtain the butanol extract. The extract was stored at room temperature until utilization.

To increase solubility, the LBGC and butanol extract were dissolved in distilled water and 3% dimethylsulfoxide (DMSO), respectively.

### 2.2. Recovery of *H. contortus* eggs and larvae

One sheep was maintained in a metabolic cage and treated with three anthelmintics of different active ingredients on alternate days. After complete natural infection elimination, 5,000 *H. contortus* third-stage larvae (L3) were orally administered. This animal was used as a source of fresh *H. contortus* eggs and larvae. Approximately 10 g of feces were collected directly from the rectum of animal experimentally infected with *H. contortus* and were processed according to the technique described by Hubert and Kerboeuf (1992) for egg recovery. The recovered eggs were dispersed in distilled water. To obtain the first-stage larvae (L1), an aliquot of feces was incubated during 24 h at 37°C.

### 2.3. Egg hatching test (EHT)

The egg hatching test was based on the method described by Coles et al. (1992). A 0.25 ml suspension containing eggs (approximately 100 fresh eggs/well) was distributed in 5 ml tubes and mixed with the same volume of LBGC or butanol extract, or diluent in the control. The mixture of eggs and materials to be tested was incubated for 48 h at room temperature. After 48 h, Lugol drops were added to stop the egg hatching. All eggs and L1 were counted. The final concentrations of LBGC were 0.25, 0.5, 1, 2 and 4% which represented in terms of mass/volume concentrations 0.15, 0.31, 0.62, 1.25 and 2.5 mg ml<sup>-1</sup>. The concentrations of butanol extract were 2.5, 5, 10, 20 and 40 mg ml<sup>-1</sup>. Each concentration of LBGC and butanol extract was accompanied by a negative control, containing the diluent and 0.025 mg ml<sup>-1</sup> thiabendazole. Five replicates were performed for each extract concentration.

### 2.4. Larval development test (LDT)

A suspension containing 350 *H. contortus* eggs was incubated for 24 hours at room temperature. Then coprocultures were prepared by mixing 250 µl, containing 300 L1, 2 g of feces from a sheep free gastrointestinal nematodes and the same volume of LBGC or butanol extract. The final concentrations of LBGC were 4.06, 8.12, 16.25, 32.5 and 65 mg ml<sup>-1</sup>, while the butanol extract were 5, 10, 20, 40 and 80 mg ml<sup>-1</sup>. After an incubation period of 6 days at room temperature third stage larvae (L3) were recovered and counted (Roberts and O'Sullivan, 1950).

## 2.6. *Phytochemical study of LBGC and butanol extract*

Phytochemical tests to detect the presence of phenols, tannins, leucoantocyanidins, flavonoids, steroids, triterpens and alkaloids were performed with the ethanol extract according to Matos (1997). These tests are based on visual observation of color modification or formation of precipitates after specific reagents addition.

The yield of butanol extract was estimated after solvent evaporation.

The total solids of LBGC were determined by its evaporation in a stove at 100 °C for one hour.

## 2.7. *Quantitative determination of total tannins levels in LBGC and butanol extract*

The levels of total tannins were conducted according to Pansera et al. (2003). We used 5 mg of LBGC and butanol extract diluted in 50 ml of distilled water. At a rate of 2 ml was added 2 ml of the Folin-Denis reagent and the resulting solution was shaken vigorously, left at rest for 3 minutes. After, 2 ml 8% sodium carbonate was added to the solution, agitated and left at rest for 2 hours, followed by centrifugation at 2000 rpm for 10 minutes. Quantifying total tannins was performed using as standard the tannic acid. Thus prepared to be a pattern curve of tannic acid using 4, 6, 8, 10, 12 and 14 ppm of tannic acid diluted with water. The absorbance was measured at 720 nm, and a blank was used for each reading. From the results the calibration curve was built and used for calculating total tannins. The readings were made in a spectrophotometer Spekoll100. Three replicates were performed for each sample.

The determination of total tannins in LBGC and butanol extract has used up the equation of the calibration curve:  $y = 0.0334 + 0.0714x$ , obtained from different concentrations of tannic acid standard.

The percentage of total tannins was calculated by the formula:  $TTT (\%) = TTT (g) / M_i \times 100$ , where  $TTT (\%)$  = percentage of total tannins in the extract;  $TTT (g)$  = total tannins in grams;  $M_i$  = Initial mass of the sample (5 mg/100 ml).

## 2.8. *Statistical analysis*

The results of egg hatching and larval development tests were compared among the concentrations of the same extract applying ANOVA and Tukey's test ( $p < 0.05$ ) using the Graph Pad Prism 3.0. program. The mean effective concentration ( $EC_{50}$ ) to inhibit the egg hatching and larval development was calculated by probit method (SPSS 8.0 for Windows).

### 3. Results

Comparing LBGC and butanol extract ovicidal activity LBGC had superior performance in a lower concentration, 1.25 mg ml<sup>-1</sup> (Tables 1 and 2). The butanol extract showed ovicidal effect using 5 mg mL<sup>-1</sup> (p<0.05). The best larvicidal effectiveness of extracts was obtained only in higher concentrations (p <0.05). Except for 40 mg ml<sup>-1</sup> butanol extract, the other concentrations of both extracts showed negligible efficiency (Tables 3 and 4). The mean effective concentration (EC<sub>50</sub>) of LBGC for egg hatch inhibition and larval development was 1.02 (0.94-1.09) and 49.04 (45.73-52.63) mg ml<sup>-1</sup>, respectively. EC<sub>50</sub> butanol extract was 3.65 (3.39-3.92) and 32.52 (18.94-60.20) mg ml<sup>-1</sup> for eggs and larvae inhibition test respectively.

Phytochemical tests revealed in LBGC and butanol extract the presence of triterpenes, saponins and condensed tannins.

The yield of butanol extract was 1.89 mg ml<sup>-1</sup>. The LBGC presented 65.7 mg ml<sup>-1</sup> of total solids.

Total tannins percentage found in LBGC and butanol extract was 19.65 and 18.08% respectively.

Table 1. Mean efficacy (percentage ± S.D.) of the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) on *H. contortus* egg hatching.

Concentração (mg ml <sup>-1</sup> )	LBGC
2.5	100 ± 0.0 <sup>a</sup>
1.25	86.22 ± 10.5 <sup>a</sup>
0.62	19.30 ± 4.46 <sup>b</sup>
0.31	11.24 ± 4.12 <sup>b</sup>
0.15	10.87 ± 5.39 <sup>b</sup>
Água	11.95 ± 6.00 <sup>b</sup>
TBZ (0.025)	99.71 ± 0.88 <sup>a</sup>

Small letters compare means between lines (p<0.05).

TBZ = thiabendazole

Table 2. Mean efficacy (percentage  $\pm$  S.D.) of butanol extract obtained of liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) on *H. contortus* egg hatching.

Concentração (mg ml <sup>-1</sup> )	Butanol Extract
40	100 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>
20	100 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>
10	100 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>
5	81.43 $\pm$ 7.90 <sup>b</sup>
2.5	13.93 $\pm$ 4.49 <sup>c</sup>
DMSO 3%	4.63 $\pm$ 1.73 <sup>d</sup>
TBZ (0.025)	99.48 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>

Small letters compare means between lines (p<0.05).

DMSO = dimethylsulfoxide, TBZ = thiabendazole

Table 3. Mean efficacy (percentage  $\pm$  S.D.) of liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) on *H. contortus* larval development.

Concentração (mg ml <sup>-1</sup> )	LBGC
65	81.30 $\pm$ 5.56 <sup>a</sup>
32.5	9.68 $\pm$ 5.35 <sup>b</sup>
16.25	0.04 $\pm$ 0.13 <sup>c</sup>
8.12	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>
4.06	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>c</sup>
IVM (0.64 $\mu$ l mL <sup>-1</sup> )	99.98 $\pm$ 0.06 <sup>d</sup>
Água	0.0 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>

Small letters compare means between lines (p<0.05).

IVM = ivermectin

Table 4. Mean efficacy (percentage  $\pm$  S.D.) of butanol extract obtained of the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) on *H. contortus* larval development.

Concentração (mg ml <sup>-1</sup> )	Butanol Extract
80	99.80 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>
40	62.33 $\pm$ 10.64 <sup>b</sup>
20	13.19 $\pm$ 2.97 <sup>c</sup>
10	2.39 $\pm$ 2.42 <sup>d</sup>
5	0.95 $\pm$ 1.30 <sup>d</sup>
IVM (0.64 $\mu$ l mL <sup>-1</sup> )	99.98 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
DMSO 3%	1.10 $\pm$ 1.20 <sup>d</sup>

Small letters compare means between lines (p<0.05).

DMSO = dimethylsulfoxide, IVM = ivermectin

#### 4. Discussion

This work evaluated the *in vitro* anthelmintic activity of the liquid extracted from the bark of the green coconut trying to select a substance to be used not only in gastrointestinal parasites control, but also minimize the environmental impact caused by disposal of the bark of the coconut by local trade and the fruit industries by removing the water from coconut despising the rest of the fruit causing rivers and canals pollution.

LBGC and butanol extract presented ovicidal and larvicidal activity, demonstrating the existence of chemical constituents with activity on *H. contortus*. The 100% ovicidal effect of LBGC in a low concentration (2.5 mg ml<sup>-1</sup>), was better than other plants extracts with anthelmintic effect as *Mangifera indica* (Costa et al., 2002), *Spigelia anthelmia* (Assis et al., 2003), *Acacia mearnsii* (Minho, 2006), *Melia azedarach* (Maciel et al., 2006), *Azadirachta indica* (Costa et al. 2008) and also higher than the butanol extract which in the same concentration was only 13.93% effectiveness. This result can be attributed to the combination of active compounds resulting in a synergistic effect (Rates, 2001). But the action mechanism involved in ovicidal effect is unknown. LBGC and butanol extract compared to thiabendazole, had lower results since the commercial anthelmintic inhibited 100% egg hatching at 0.025 mg ml<sup>-1</sup>. This is justified because the thiabendazole is the unique active principle, while the LBGC and butanol extract have various chemical

constituents, among them the active principle with ovicidal action, but in small quantities. In general the extract of a plant has small concentrations of an active principle and a big number of promising properties (Rates, 2001).

The phytochemical tests revealed the presence of chemical constituents that may be responsible for anthelmintic activity found. Among those constituents, it was detected the presence of triterpenoids compounds. The triterpenoids have insecticidal activity (Mulla and Tianyun, 1999) and no relevant anthelmintic effect was reported. Pessoa (2001) evaluated the azadiractin, a limonoid belonging to the class of triterpenes, extracted from *A. indica*, and observed ovicidal effect of 68% at 10 mg ml<sup>-1</sup> concentration on *H. contortus*. LBGC at 2.5 mg ml<sup>-1</sup> and butanol extract at 5 mg ml<sup>-1</sup> showed effectiveness of 100 and 81.43% respectively.

Another constituent chemical detected were the saponins, natural compounds found in vegetables with detergent activity, surfactant and hemolytic properties (Hauptli and Lovatto, 2006). Extracts rich in saponins come from plants such as *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* investigated to increase the productivity of ruminants (Wang et al., 2000) and monogastric animals (Hauptli and Lovatto, 2006). Moreover, it was observed that these saponins showed larvicidal activity on *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* (Pelah et al., 2002) and is also responsible for *in vitro* inhibition of *Escherichia coli* growth (Sen et al., 1998) and rumen bacteria as *Streptococcus bovis*, *Prevotella bryanti* and *Ruminobacter amylophilus* (Singh et al., 2003). However, we found no report in the literature of the anthelmintic activity of these compounds.

Finally the condensed tannins found in LBGC and butanol extract are associated with natural defense of plants against insects, and classified according to their properties and chemical structure, in hydrolysable and condensed tannins (Athanasiadou et al., 2001). Several results suggest that condensed tannins, among the various secondary metabolic present in plants and fodder, are compounds with potential anthelmintic activity. The use of extract of quebracho (*Schinops* sp), containing 73% of condensed tannins (Athanasiadou et al., 2001) and the extract of *Acacia mearnsii* (acacia-negra) with 15% of condensed tannins (Minho, 2006) inhibited, *in vitro*, the viability of larvae of *H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus vitrinus*. Moreover, it was observed that monomers of condensed tannins were responsible for eggs hatching inhibition, larval development and *T. colubriformis* paralysis (Molan et al., 2003). The anthelmintic activity of tannins depend on the kind of parasite. Brunet and Hoste (2006) tested *in vitro* monomers of condensed tannins, prodelphinidins and procyanidins, on the exsheathment of *H. contortus* and *T.*

*colubriiformis* L3 observing antiparasitic activity only on *T. colubriiformis*. These findings confirm previous *in vivo* results that plants rich in tannins present anthelmintic action depending on the kind of parasite and anatomical location. This fact was noted in sheep (Athanasiadou et al., 2001) and goats (Paolini et al., 2003) who received quebracho, obtaining results on nematode populations of the small intestine, *T. colubriiformis* and *Nematodirus battus*, but without anthelmintic effect on the abomasal parasite *H. contortus*.

The antiparasitic activity of condensed tannins is attributed to its ability to bind to the protein, causing a decrease in the amount of protein available for the larvae, causing a state of starvation and death (Athanasiadou et al., 2001). Schultz (1989) reported that insects and their larvae eat the condensed tannins, they linked to the intestinal mucosa causing autolysis, leading to an inability to use nutrients by the larva. This mechanism could be condensed tannins mode of action on nematodes larvae. Furthermore, condensed tannins has the ability to link protein, as proline and hydroxyproline, in the cuticle, oral cavity, esophagus, cloaca and vulva of the parasite would result in a structural parasite change causing its death (Hoste et al., 2006). Therefore, tannins found in butanol extract could be responsible for the anthelmintic activity, as other chemical constituents present in the extract has not been associated with anthelmintic activity.

In conclusion, the results found in this study demonstrate the possibility of using coconut extracts against gastrointestinal parasites of small ruminants.

### **Acknowledgments**

This study received financial support from the National Research Council (CNPq). Dr. Bevilaqua has a CNPq research grant. We would like to thank to Dr. Morsyleide of EMBRAPA/Agroindústria Tropical for providing of the liquid extracted from the bark of the green coconut.

### **References**

- Arosemena, N.A.E., Bevilaqua, C.M.L., Girão, M.D., Melo, A.C.F.L., 1999. Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid area in Brazil. *Rev. Med. Vet.* (150) 873-876.
- Assis, L.M., Bevilaqua, C.M.L., Morais, S.M., Vieira, L.S., Costa, C.T.C., Souza, J.A.L., 2003. Ovicidal and larvicidal activity in vitro of *Spigelia anthelmia* Linn extracts on *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* (117) 43-49.

- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Vet. Parasitol.* (99) 205-219.
- Blini, W., Lira, C.M., 2005. *Salvando vidas com a medicina natural*, (Ed), Unier, São Paulo, 479 pp.
- Brunet, S., Hoste, H., 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *J. Agric. Food Chem.* (54) 7481-7487.
- Charles, T.P., Pompeu, J., Miranda, D.B., 1989. Efficacy of three broad-spectrum anthelmintics against gastrointestinal nematode infections of goats. *Vet. Parasitol.* (34) 71-75.
- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.). Methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* (44) 35-44.
- Costa, C.T.C., Bevilaqua, C.M.L., Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Maciel, M.V., Morais, S.M., Castro, C.M.S., Braga, R.R., Oliveira, L.M.B., 2008. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on *Haemonchus contortus*. *Small Rumin. Res.* (74) 284-287.
- Costa, C.T.C., Morais, S.M., Bevilaqua, C.M.L., Souza, M.M.C., Leite, F.K.A., 2002. Efeito ovidica de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus contortus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* (11) 57-60.
- Duke, J.A., 1992. *Handbook of Phytochemical Constituents of Grass and Other Economic Plants*, CRC Press, Boca Raton, FL, 654 pp.
- Esquenazi, D., Wigg, M.D., Miranda, M.M.F.S., Rodrigues, H.M., Tostes, J.B.F., Rozental, S., Silva, A.J.R., Alviano, C.S., 2002. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Res. Microbiol.* (153) 647-652.
- Hauptli, L., Lovatto, P.A., 2006. Alimentação de porcas gestantes e lactantes com dietas contendo saponinas. *Cienc. Rural* (36) 610-616.
- Herd, P.R., 1995. Impactos ambientais associados aos compostos endectocidas. In: Padilha, T. (Ed.), *Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes*, Juiz de Fora, pp. 95-111.

- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* (22) 253-261.
- Hubert, J., Kerboeuf, D., 1992. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet. Rec.* (130) 442-446.
- Kaplan, R., 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol.* (20) 477-481.
- Maciel, M.V., Morais, S.M., Bevilaqua, C.M.L., Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Costa, C.T.C., Castro, C.M.S., 2006. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* (140) 98-104
- Matos, S.G.A., 1997. Introdução à fitoquímica Experimental, Edições UFC, Fortaleza, 141 pp.
- Mattos, M.J.T., Oliveira, C.M.B., Gouvea, A.S., Andrade, C.B., 2004. *Haemonchus* resistente à lactona macrocíclica em caprinos naturalmente infectados. *Cienc. Rural* (34) 879-883.
- Melo, A.C.F.L., Reis, I.F., Bevilaqua, C.M.L., Vieira, L.S., Echevarria, F.A.M., Melo, L.M., 2003. Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. *Cienc. Rural* (33) 339-344.
- Mendonça-Filho, R.R., Rodrigues, I.A., Alviano, D.S., Santos, A.L.S., Soares, R.M.A., Alviano, C.S., Lopes, A.H.C.S., Rosa, M.S.S., 2004. Leishmanicidal activity of polyphenolics-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Res. Microbiol.* (155) 136-143.
- Minho, A.P., 2006. Efeito anti-helmíntico de taninos condensados sobre nematódeos gastrintestinais em ovinos. P.h.D Thesis. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba 168pp.
- Molan, A.L., Meagher, L.P., Spencer, P.A., Sivakumaran., S., 2003. Effect of flavan-3-ols on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.* (33) 1691-1698.
- Mulla, S.E., Tianyun, Su., 1999. Activity and biology effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* (15) 133-152.
- Pansera, M.R., Santos, A.C.A., Paese, K., Wasum, R., Rossato, M., Rota, L.D., Pauletti, G.F., Serafini, L.A., 2003. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Farmacogn.* (13) 17-22.

Paolini, V., Bergeaud, J.P., Grisez, C., Prevot, F., Dorchies, Ph., Hoste, H., 2003. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* (113) 253-261.

Pelah, D.; Abramovich, Z.; Markus, A.; Wiesman, Z., 2002. The use of commercial saponin from *Quillaja saponaria* bark as a natural larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *J. Ethnopharmacol.* (81) 407-409.

Pessoa, 2001. Atividade ovicida in vitro de plantas medicinais contra *Haemonchus contortus*. Master Thesis. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 57pp.

Rates, S.M.K., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* (39) 603-613.

Roberts, F.H.S., O'Sullivan, P.J., 1950. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle. *Aust. J. Agric. Res.* (1) 99-102.

Sangster, N.C., 1999. Anthelmintic resistance: past, present and future. *Int. J. Parasitol.* (29) 115-124.

Schultz, J.C., 1989. Tannin insect interactions. In: Hemingway, R.W., Karchesy, J.J. (Eds.), *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*. Plenum Press, New York, pp. 417-433.

Sen S; Makkar, HPS; Muetzel, S; Becker, K., 1998. Effect of *Quillaja saponaria* and *Yucca schidigera* plant extract on growth of *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* (27) 35-38.

Senhoras, E.M., 2003. Estratégia de uma agenda para a cadeia agroindustrial do coco: transformando a ameaça dos resíduos em oportunidades eco-eficientes. Monografia. São Paulo Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Economia, Campinas, 36 pp.

Singh, B.; Bhat, T. K.; Singh, B., 2003. Potencial Therapeutic Applications of some antinutritional plant secondary metabolites. *J. Agric. Food Chem.* (51) 5579-5597.

Soulsby, E.J.L., 1987. *Parasitologia y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*, (7°Ed.), Nueva Editorial Interamericana, Mexico, 823pp.

Vieira, L.S., Cavalcante, A.C.R., Pereira, M.F., Dantas, L.B., Ximenes, L.J.F., 1999. Evaluation of anthelmintic efficacy of plants available in Ceara State, North-east Brazil, for the control of goat gastrointestinal nematodes. *Rev. Med. Vet.* (150) 447-452.

Wang, Y.; McAllister, T.A.; Yanke, L.J.; Cheeke, P.R., 2000. Effect of steroidal saponin from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes. *J. Appl. Microbiol.* (88) 887-896.

## CAPÍTULO II

### Atividade toxicológica de *Cocos nucifera* L em modelos experimentais

#### Toxicological activity of *Cocos nucifera* L in experimental models

##### Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade aguda, subcrônica e crônica do Líquido da Casca do Coco Verde (LCCV) e do extrato butanólico obtido do LCCV em camundongos e ratos. Na toxicidade aguda, v.o., não foi observado efeito letal nos camundongos na dose de 3000 mg/kg em ambos os extratos. Porém pela via intraperitoneal, LCCV e extrato butanólico foram responsáveis pela mortalidade de todos os animais nas doses de 500 e 700 mg/kg, respectivamente. Na toxicidade subcrônica, os animais tratados com LCCV apresentaram contagem total de leucócitos (CTL), neutrófilos, contagem total de hemácias (CTH), hematócrito (Ht) e plaquetas significativamente maiores. Na toxicidade crônica, neutrófilo, CTL, basófilo e plaquetas foram maiores no grupo tratado com LCCV ( $P < 0,05$ ). Porém, nenhum parâmetro hematológico na toxicidade subcrônica e crônica variou no grupo administrado com extrato butanólico ( $P > 0,05$ ). Na análise bioquímica, o único parâmetro que apresentou diferença foi os triglicerídeos com resultados maiores ( $P < 0,05$ ) no grupo tratado com LCCV, na toxicidade crônica. A análise histopatológica demonstrou que os animais tratados com ambos os extratos não apresentaram alterações relacionados com toxicidade. O ganho de peso não diferiu entre os grupos tratados e controles ( $P > 0,05$ ). Em conclusão, ambos os extratos apresentaram, dentro dos parâmetros analisados, baixa toxicidade.

Periódico: Journal of Ethnopharmacology (A ser submetido em novembro de 2008).

## Toxicological activity of *Cocos nucifera* L in experimental models

<sup>1</sup>C.T.C. Costa, <sup>2</sup>C.M.L. Bevilaqua, <sup>2</sup>N. R. F. Nascimento, <sup>2</sup>D.C. S. Nunes-Pinheiro, <sup>2</sup>A. Tomé<sup>3</sup>; <sup>2</sup>A.L.F. Camurça-Vasconcelos, <sup>2</sup>L.M.B. Oliveira

<sup>1</sup>*Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento/Laboratório Nacional Agropecuário,*

<sup>2</sup>*Universidade Estadual do Ceará/Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias,*

<sup>3</sup>*Faculdade do Nordeste*

\*Corresponding author:

*Universidade Estadual do Ceará,*

*Av. Paranjana 1700*

*CEP 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil.*

*Tel. +55 85 31019853*

*fax: +55 85 31019840*

*E-mail address: claudiamlb@yahoo.com.br*

### Abstract

*In vitro* anthelmintic activity of the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) and butanol extract obtained from LBGC had promising results in our laboratory, then we decided to evaluate its acute, subchronic and chronic toxicity. In acute toxicity, p.o., non-lethal effects were observed in mice at a 3,000 mg/kg dose in both extracts. But by intraperitoneal route, LBGC and butanol extract were responsible for the deaths of all animals at doses of 500 and 700 mg/kg, respectively. In subchronic toxicity tests, the rats treated with LBGC showed white blood cell (WBC) count, neutrophils, red blood cell (RBC) count, hematocrit (Ht) and platelets significantly higher. The group

treated with LBGC, in the chronic toxicity test, showed higher values for neutrophils, WBC, basophils and platelets ( $p < 0.05$ ). However, in subchronic and chronic toxicity any hematological parameters varied in the group treated with butanol extract ( $p > 0.05$ ). The biochemical analysis, only triglycerides were higher ( $p < 0.05$ ) in the group treated with LBGC, during the chronic toxicity test. Rats treated with both extracts had no changes in histopathological analysis related to toxicity. Weight gain did not differ between treated and control groups ( $P > 0.05$ ). In conclusion, both extracts showed, for those parameters, low toxicity.

Keywords: mice, rats, acute, subchronic, chronic

## Introduction

*Cocos nucifera* L. is a plant commonly found along the northeastern coast of Brazil. Most commonly, it is sought for the flavor and nutritional qualities of its water obtained from fruit. Medicinal uses for aqueous extracts of coconut fiber as tea have been reported (Esquenazi et al., 2002; Mendonça-Filho et al., 2004). Aqueous coconut fiber extracts are used in northeastern Brazil as a traditional medicine to treat diarrhea, arthritis, bleeding and hemorrhages (Duke, 1992). Popular medicine also uses the flesh of the green coconut to treat teniasis, schistosomiasis, and ancylostomiasis (Blini and Lira, 2005).

In recent years, it has been shown that aqueous coconut fiber extracts have antibacterial (Esquenazi et al., 2002), antiviral (Esquenazi et al., 2002) and antiprotozoal activities (Calzada et al., 2007). In our laboratory, *in vitro* tests on *Haemonchus contortus*, showed LBGC and butanol extract had ovicidal effectiveness of 100% at concentrations of 2.5 and 10 mg/ml, respectively (personal communication). But there are no published studies in scientific literature on the toxicological profile of *C. nucifera* extracts.

Therefore, the purpose of this study was to evaluate the acute, subchronic and chronic toxicity of the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) and butanol extract obtained from LBGC in mice and rats.

## Material and Methods

### *Plant material and extract preparation*

The LBGC provided by EMBRAPA/Agroindústria Tropical was obtained from green coconuts collected in the fruit industry in the city of Fortaleza, Ceara state, Brazil. Coconuts were crushed, pressed and filtered to obtain a liquid called the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC). LBGC was subjected to three washes with solvents using a decantation funnel. Initially, we used ethyl acetate (10:1) and then butyl alcohol (10:1). The butanolic solvent was evaporated using a rotary evaporator to obtain the butanol extract.

The LBGC and butanolic extracts were dissolved with distilled water and 3% dimethylsulfoxide (DMSO), respectively.

### *Animals*

Swiss albino mice, female, weighing 25-30g were used in acute toxicity tests. The subchronic and chronic toxicity tests were performed in rats, female weighing 150-200g. Animals were housed in polyethylene cage with sterile wooden scraps. Mice and rats were kept at 25C° and fed standard pellets (Purina®) and water *ad libitum*. All procedures were approved by the Ethical Committee of Ceará State University (Process Number: 07227499-9).

### *Acute Toxicity*

110 Swiss albino mice were used to evaluate acute toxicity of LBGC. Mice were divided into 11 groups (n = 10): G1 - vehicle (distilled water) orally; G2 - vehicle intraperitoneally; G3 to G6 - 500, 1000, 2000 and 3000 mg/kg, respectively, orally; G7 to G11 - 100, 200, 300, 400 and 500 mg/kg respectively by intraperitoneal route.

The acute toxicity evaluation of butanol extract used 110 Swiss albino mice divided into 11 groups (n = 10): G12 – vehicle, 3% DMSO, orally; G13 - vehicle intraperitoneally; G14 to G17 - 500 , 1000, 2000 and 3000 mg/kg, respectively, orally; G18 to G22 - 300, 400, 500, 600 and 700 mg/kg respectively by the intraperitoneal route.

After each administration, the animals were observed for a period of 6 hours and the effects observed were recorded in the appropriate table for Hippocrates testing (Malone, 1948). After a period of 24 hours total of dead was computed and lethal dose (LD<sub>50</sub> and LD<sub>10</sub>) were calculated.

### *Subchronic Toxicity*

LD<sub>10</sub> was estimated from the results obtained in acute toxicity, to be used in the study of subchronic toxicity. In this study, rats were divided into the following groups (n = 8): G1 – vehicle, 3% DMSO, G2 – vehicle, distilled water; G3 LD<sub>10</sub> of LBGC; G4 - LD<sub>10</sub> of butanol extract. Mice were treated for 30 consecutive days orally. For hematological and biochemical analysis, blood samples in beginning (day 0) and at the end of the experiment (30th day) were collected through retro-orbital plexus puncture, after inhalation anesthesia with ether. At the end of this period, animals were sacrificed and organs (kidney, heart, liver, spleen and lung) collected and processed for histological analysis.

### *Chronic Toxicity*

In this study, rats were divided into the following groups (n = 8): G1 – vehicle, 3% DMSO, G2 – vehicle, distilled water; G3 - LD<sub>10</sub> of LBGC; G4 - LD<sub>10</sub> of butanol extract. Animals were treated for 60 consecutive days orally. Blood samples at the beginning (day 0) and at the end of the experiment (60th day) were collected through retro-orbital plexus puncture, after inhalation anesthesia with ether for hematological and biochemical analysis. Rats were sacrificed and organs, kidney, heart, liver, spleen and lung, collected and processed for histological analysis.

### *Hematological and biochemical analysis*

For hematological tests, blood samples were collected through retro-orbital plexus puncture and then added into tubes with EDTA.

Hematological analysis was performed using an automatic hematological analyzer (CELL-DYN3700, Abbott Laboratories, Santa Clara, CA, USA). The parameters evaluated were: red blood cell (RBC) count, hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelets count and white blood cell (WBC) count and differential leukocyte.

For biochemical analysis, blood was collected without anticoagulant with tab gel. The tubes were centrifuged at 3000 rpm for 5 min to obtain serum, which was stored at -20°C until determination of the following parameters: aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), creatinine, triglycerides and electrolytes (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>).

### *Histopathological analysis*

The organs selected were removed, analyzed macroscopically and preserved in formalin to 10% for histological analysis. Tissues were embedded in paraffin, sectioned, stained with hematoxylin-eosin and examined microscopically.

### *Statistical analysis*

Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical comparisons between data for the control and treated groups were performed using Tukey test. P-values less than 0.05 were set as the level of significance. The statistical program used for the analysis was the Graph Pad Prism 3.0.

## **Results**

### *Acute Toxicity*

Both extracts showed no clinical symptoms and mortality by oral route. Thus it was not possible to calculate lethal dose for this route of administration. To intraperitoneal route the LBGC and butanol extract were responsible for deaths of all animals at doses of 500 and 700 mg/kg, respectively. DL<sub>10</sub> and LD<sub>50</sub> for LBGC was 199.63 (101.71 - 249.52) and 305.02 (240.79 - 368.20) mg/kg, respectively. DL<sub>10</sub> to butanol extract was 247.32 (108.6 - 295.1) mg/kg and LD<sub>50</sub> of 321.3 (243.8 - 381.2) mg/kg. Both extracts were responsible for an increase in respiratory rate soon after the intraperitoneal administration. This change disappeared in minutes.

### *Subchronic Toxicity*

#### *Hematological Parameters*

Hematological tests in animals treated with LBGC are presented in Table 1. The parameters with values significantly higher were: WBC, RBC, neutrophils, platelets and Hct.

Animals treated with butanol extract showed no significant changes in the hematological parameters evaluated when compared with animals that received the vehicle (Table 2).

Table 1. Effect of the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) on the hematological parameters of rats treated for 30 days.

Parameters	Control Group		Treaty Group	
	Day 0	Day 30	Day 0	Day 30
WBC (x 10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ L)	4.64 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	4.33 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	3.64 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	5.73 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>
Neutrophils (x 10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ L)	1.41 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	1.08 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.93 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	2.01 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>
Lymphocytes (x10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ L)	3.08 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	2.90 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	2.59 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	3.28 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>
Monocytes (x 10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ L)	0.01 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.02 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>	0.01 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
Eosinophils (x 10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ L)	0.10 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.29 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.36 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
Basophils (x 10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ L)	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.05 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
RBC (x 10 <sup>6</sup> cels/ $\mu$ L)	6.66 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	6.42 $\pm$ 1.00 <sup>a</sup>	6.69 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	7.61 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
Hb (g/dL)	13.38 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	14.86 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	13.26 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	15.35 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>
HCt (%)	36.01 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>	38.24 $\pm$ 5.99 <sup>a</sup>	36.14 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	44.72 $\pm$ 0.58 <sup>b</sup>
MCV (fL)	54.13 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	59.14 $\pm$ 0.62 <sup>b</sup>	54.03 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	58.87 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>
MCHC (g/dL)	37.14 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	34.10 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	36.69 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	34.10 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>
Platelets (x10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ L)	835.13 $\pm$ 36.68 <sup>a</sup>	715.75 $\pm$ 91.77 <sup>a</sup>	819.63 $\pm$ 22.12 <sup>a</sup>	920.67 $\pm$ 44.47 <sup>b</sup>

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. RBC: red blood cell count, Hb: hemoglobin, HCt: hematocrit, MCV: mean corpuscular volume, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, WBC: white blood cell count. Small letters compare means between columns (P <0.05).

Table 2. . Effect of butanol extract obtained from the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) on the hematological parameters of rats treated for 30 days.

Parameters	Control Group		Treaty Group	
	Day 0	Day 30	Day 0	Day 30
WBC (x 10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ l)	5.42 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>	2.41 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	5.07 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	2.43 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>
Neutrophils (x 10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ l)	1.48 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	1.20 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	1.13 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	0.95 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
Lymphocytes (x10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ l)	3.68 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>	1.06 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	3.70 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	1.15 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup>
Monocytes (x 10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ l)	0.08 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.03 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
Eosinophils (x 0 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ l)	0.12 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
Basophils (x 10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ l)	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
RBC (x 10 <sup>6</sup> cels/ $\mu$ l)	7.10 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	6.74 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	7.05 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	6.49 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
Hb (g/dl)	14.60 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	14.25 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	14.39 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	13.84 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>
HCt (%)	39.62 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>	37.53 $\pm$ 0.39 <sup>ab</sup>	38.96 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	36.47 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>
MCV (fl)	54.58 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>	55.76 $\pm$ 0.85 <sup>a</sup>	55.29 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>	56.26 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>
MCHC (g/dl)	36.52 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	38.00 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	36.96 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	37.94 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>
Platelets (x10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ l)	805.9 $\pm$ 79.57 <sup>a</sup>	755.6 $\pm$ 41.72 <sup>a</sup>	837.6 $\pm$ 33.72 <sup>a</sup>	877.1 $\pm$ 35.73 <sup>a</sup>

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. RBC: red blood cell count, Hb: hemoglobin, HCt: hematocrit, MCV: mean corpuscular volume, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, WBC: white blood cell count. Small letters compare means between columns (P <0.05).

### Biochemical parameters

Tables 3 and 4 show, respectively, the results of biochemical parameters examined for animals treated with LBGC and butanol extract. The parameters showed no significant changes in relation to control post-administration of extracts.

Table 3 Effect of the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) on the biochemical parameters of rats treated for 30 days.

Parameters	Control Group		Treaty Group	
	Day 0	Day 30	Day 0	Day 30
AST (UI/L)	89.63 ± 5.17 <sup>a</sup>	67.38 ± 3.80 <sup>b</sup>	103.75 ± 9.92 <sup>a</sup>	78.17 ± 8.50 <sup>ab</sup>
ALT (UI/L)	69.75 ± 3.49 <sup>a</sup>	23.88 ± 1.82 <sup>b</sup>	57.88 ± 3.82 <sup>a</sup>	27.50 ± 2.59 <sup>b</sup>
Creatinina (mg/dL)	0.71 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.89 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.73 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.04 <sup>b</sup>
FA (UI/L)	12.25 ± 3.76 <sup>a</sup>	17.63 ± 1.19 <sup>b</sup>	11.75 ± 5.97 <sup>a</sup>	17.17 ± 2.12 <sup>b</sup>
Triglycerides (mg/dL)	-	141.25 ± 22.86 <sup>a</sup>	-	151.0 ± 26.50 <sup>a</sup>

Values are expressed as mean ± SEM. AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase; FA: alkaline phosphatase. Small letters compare means between columns (P <0.05).

Table 4. Effect of butanol extract obtained from liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) on biochemical parameters of rats treated for 30 days.

Parameters	Control Group		Treaty Group	
	Day 0	Day 30	Day 0	Day 30
AST (UI/L)	84,29 ± 18,65 <sup>a</sup>	62,29 ± 4,90 <sup>a</sup>	56,43 ± 4,62 <sup>a</sup>	49,43 ± 2,04 <sup>a</sup>
ALT (UI/L)	30,57 ± 11,58 <sup>a</sup>	28,00 ± 3,93 <sup>a</sup>	17,71 ± 1,15 <sup>a</sup>	20,00 ± 0,65 <sup>a</sup>
Creatinine (mg/dL)	0,43 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,48 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,02 <sup>b</sup>
FA (UI/L)	15,14 ± 1,56 <sup>a</sup>	17,57 ± 1,84 <sup>a</sup>	19,43 ± 2,30 <sup>a</sup>	19,57 ± 3,24 <sup>a</sup>
Na+ (mg/dL)	142,60 ± 0,97 <sup>a</sup>	144,70 ± 0,52 <sup>a</sup>	144,10 ± 0,40 <sup>a</sup>	144,40 ± 1,31 <sup>a</sup>
K+ (mg/dL)	4,43 ± 0,20 <sup>a</sup>	4,29 ± 0,18 <sup>a</sup>	4,14 ± 0,14 <sup>a</sup>	4,14 ± 0,14 <sup>a</sup>
Cl- (mg/dL)	106,30 ± 2,48 <sup>a</sup>	112,70 ± 3,44 <sup>a</sup>	109,10 ± 0,51 <sup>a</sup>	112,00 ± 3,28 <sup>a</sup>
Triglycerides (mg/dL)	128,90 ± 38,80 <sup>a</sup>	156,60 ± 20,39 <sup>a</sup>	69,71 ± 11,42 <sup>a</sup>	85,57 ± 4,73 <sup>a</sup>

Values are expressed as mean ± SEM. AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase; FA: alkaline phosphatase, Na+: sodium, K+: potassium Cl-: chlorine. Small letters compare means between columns (P <0.05).

### Histopathological analysis and weight of animals

The analyzed organs in animals treated with extracts and their controls showed no morphological changes and structural related toxicity.

There was no significant difference in weight gain comparing to treated and control groups (Tables 5 and 6).

Table 5. Effect of the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) on rats weight treated for 30 days.

Weight (g)	Control Group		Treaty Group	
	Day 0	Day 30	Day 0	Day 30
	183.13 ± 9.73 <sup>a</sup>	201.25 ± 5.32 <sup>ab</sup>	185.0 ± 5.09 <sup>a</sup>	213.33 ± 5.58 <sup>b</sup>

Values are expressed as mean ± SEM. Small letters compare means between columns (P <0.05).

Table 6. Effect of the butanol extract obtained from liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) on rats weight treated for 30 days.

Weight (g)	Control group		Treated group	
	Day 0	Day 30	Day 0	Day 30
	217.40 ± 5.59 <sup>a</sup>	222.50 ± 5.59 <sup>a</sup>	204.80 ± 4.41 <sup>a</sup>	211.30 ± 4.28 <sup>a</sup>

Values are expressed as mean ± SEM. Small letters compare means between columns (P <0.05).

Table 7 shows hematological analysis of rats treated with LBGC for 60 days. WBC, neutrophils, basophils and platelets of treated group had higher results (P <0.05). But the MCV was minor compared with the control (P <0.05). The other parameters did not differ statistically between the groups.

The butanol extract did not significantly change any hematological parameter (Table 8).

Table 7. Effect of the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) on the hematological parameters of rats treated for 60 days.

Parameters	Control Group		Treated Group	
	Day 0	Day 60	Day 0	Day 60
WBC (x 10 <sup>3</sup> cels/μl)	3.80 ± 0.38 <sup>a</sup>	4.92 ± 0.37 <sup>a</sup>	3.70 ± 0.44 <sup>a</sup>	6.08 ± 0.79 <sup>b</sup>
Neutrophils (x 10 <sup>3</sup> cels/μl)	1.65 ± 0.23 <sup>ab</sup>	0.91 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.48 ± 0.16 <sup>ab</sup>	2.03 ± 0.45 <sup>b</sup>
Lymphocytes (x10 <sup>3</sup> cels/μl)	1.99 ± 0.33 <sup>a</sup>	3.78 ± 0.38 <sup>b</sup>	2.06 ± 0.35 <sup>a</sup>	3.56 ± 0.31 <sup>b</sup>
Monocytes (x 10 <sup>3</sup> cels/μl)	0.01 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.02 ± 0.00 <sup>b</sup>
Eosinophils (x 10 <sup>3</sup> cels/μl)	0.11 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.38 ± 0.19 <sup>a</sup>
Basophils (x 10 <sup>3</sup> cels/μl)	0.05 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.09 ± 0.01 <sup>b</sup>
RBC (x 10 <sup>6</sup> cels/μl)	5.94 ± 0.18 <sup>a</sup>	7.09 ± 0.07 <sup>b</sup>	5.75 ± 0.16 <sup>a</sup>	6.96 ± 0.08 <sup>b</sup>
Hb (g/dl)	12.83 ± 0.52 <sup>a</sup>	15.71 ± 0.16 <sup>b</sup>	12.36 ± 0.52 <sup>a</sup>	15.34 ± 0.12 <sup>b</sup>
HCt (%)	33.18 ± 1.26 <sup>a</sup>	41.25 ± 0.50 <sup>b</sup>	32.10 ± 1.10 <sup>a</sup>	40.0 ± 0.26 <sup>b</sup>
MCV (fl)	55.79 ± 0.65 <sup>a</sup>	58.15 ± 0.61 <sup>b</sup>	55.79 ± 0.57 <sup>a</sup>	57.47 ± 0.47 <sup>a</sup>
MCHC (g/dl)	38.66 ± 0.24 <sup>a</sup>	38.10 ± 0.19 <sup>a</sup>	38.40 ± 0.30 <sup>a</sup>	38.37 ± 0.20 <sup>a</sup>
Platelets (x10 <sup>3</sup> cels/μl)	947.63 ± 49.07 <sup>a</sup>	731.50 ± 43.29 <sup>b</sup>	922.88 ± 50.74 <sup>a</sup>	811.86 ± 25.13 <sup>a</sup>

Values are expressed as mean ± SEM. RBC: red blood cell count, Hb: hemoglobin, HCt: hematocrit, MCV: mean corpuscular volume, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, WBC: white blood cell count. Small letters compare means between columns (P <0.05).

Table 8. Effect of butanol extract obtained from the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) on hematological parameters of rats treated for 60 days.

Parameters	Control group		Treated group	
	Day 0	Day 60	Day 0	Day 60
WBC (x 10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ l)	4.91 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	3.10 $\pm$ 0.20 <sup>b</sup>	5.20 $\pm$ 0.76 <sup>ab</sup>	3.87 $\pm$ 0.71 <sup>ab</sup>
Neutrophils (x 10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ l)	1.07 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	1.19 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	1.10 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	1.73 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>
Lymphocytes (x10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ l)	3.56 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	1.49 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	3.78 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	1.76 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>
Monocytes (x 10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ l)	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.19 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.05 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.15 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>
Eosinophils (x 10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ l)	0.20 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.13 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.20 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.17 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
Basophils (x 10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ l)	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.06 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
RBC (x 10 <sup>6</sup> cels/ $\mu$ l)	7.02 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	6.62 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	7.33 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	7.00 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>
Hb (g/dl)	14.40 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	14.38 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	14.58 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	14.65 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>
HCt (%)	39.28 $\pm$ 0.90 <sup>a</sup>	37.98 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	40.50 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>	38.95 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup>
MCV (fl)	56.05 $\pm$ 0.57 <sup>a</sup>	57.39 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	55.28 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>	55.68 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>
MCHC (g/dl)	36.68 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	37.84 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	36.00 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	37.68 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>
Platelets (x10 <sup>3</sup> cels/ $\mu$ l)	715.9 $\pm$ 75.94 <sup>a</sup>	813.4 $\pm$ 28.51 <sup>a</sup>	857.3 $\pm$ 62.32 <sup>a</sup>	797.8 $\pm$ 22.72 <sup>a</sup>

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. RBC: red blood cell count, Hb: hemoglobin, HCt: hematocrit, MCV: mean corpuscular volume, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, WBC: white blood cell count. Small letters compare means between columns (P <0.05).

### Biochemical parameters

Tables 9 and 10 show, respectively, the results of biochemical parameters examined for animals treated with LBGC and butanol extract. The results with higher triglycerides (P <0.05) in the group treated with LBGC was the only parameter that differed statistically when compared with control. The treated animals with butanol extract showed no change in the parameters examined in relation control (P > 0.05).

Table 9. Effect of the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) on the biochemical parameters in rats treated for 60 days.

Parameters	Control group		Treated group	
	Day 0	Day 60	Day 0	Day 60
AST (UI/l)	106.12 $\pm$ 7.03 <sup>a</sup>	145.80 $\pm$ 15.32 <sup>b</sup>	105.25 $\pm$ 6.40 <sup>a</sup>	166.73 $\pm$ 19.16 <sup>b</sup>
ALT (UI/l)	50.75 $\pm$ 4.33 <sup>a</sup>	55.84 $\pm$ 4.44 <sup>a</sup>	52.00 $\pm$ 2.42 <sup>a</sup>	62.57 $\pm$ 7.96 <sup>a</sup>
Creatinine (mg/dl)	0.85 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.80 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.79 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.76 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
FA (UI/l)	18.38 $\pm$ 6.62 <sup>a</sup>	16.00 $\pm$ 0.84 <sup>b</sup>	17.88 $\pm$ 9.63 <sup>a</sup>	21.43 $\pm$ 1.56 <sup>b</sup>
Na+ (mg/dl)	143.3 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	143.58 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	143.94 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	143.43 $\pm$ 1.98 <sup>a</sup>
K+ (mg/dl)	4.28 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	4.08 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	4.20 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	4.32 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>
Cl- (mg/dl)	106.54 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup>	104.74 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>	107.56 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	105.8 $\pm$ 1.74 <sup>a</sup>
Triglycerides (mg/dl)	-	93.89 $\pm$ 17.38 <sup>a</sup>	-	161.36 $\pm$ 26.49 <sup>b</sup>

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase; FA: alkaline phosphatase, Na+: sodium, K+: potassium Cl-: chlorine. Small letters compare means between columns (P <0.05).

Table 10. Effect of butanol extract obtained form liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) on the biochemical parameters in rats treated for 60 days.

Parameters	Control group		Treated group	
	Day 0	Day 60	Day 0	Day 60
AST (UI/l)	59.80 ± 4.68 <sup>a</sup>	56.30 ± 3.40 <sup>a</sup>	57.40 ± 10.31 <sup>a</sup>	53.00 ± 2.85 <sup>a</sup>
ALT (UI/l)	17.30 ± 1.05 <sup>a</sup>	21.30 ± 2.14 <sup>a</sup>	17.20 ± 1.53 <sup>a</sup>	20.00 ± 1.18 <sup>a</sup>
Creatinine (mg/dl)	0.46 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.46 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.04 <sup>a</sup>
FA (UI/l)	28.7 ± 5.59 <sup>a</sup>	20.80 ± 3.43 <sup>a</sup>	20.80 ± 2.60 <sup>a</sup>	23.60 ± 4.20 <sup>a</sup>
Na+ (mg/dl)	145.30 ± 0.94 <sup>a</sup>	143.10 ± 2.08 <sup>a</sup>	144.60 ± 0.87 <sup>a</sup>	143.20 ± 0.73 <sup>a</sup>
K+ (mg/dl)	4.20 ± 0.16 <sup>a</sup>	4.16 ± 0.15 <sup>a</sup>	4.20 ± 0.20 <sup>a</sup>	4.32 ± 0.09 <sup>a</sup>
Cl- (mg/dl)	112.00 ± 3.44 <sup>a</sup>	104.40 ± 1.40 <sup>a</sup>	108.20 ± 0.80 <sup>a</sup>	104.80 ± 0.86 <sup>a</sup>
Triglycerides (mg/dl)	76.70 ± 18.99 <sup>ab</sup>	123.10 ± 19.91 <sup>a</sup>	48.40 ± 6.89 <sup>b</sup>	67.00 ± 6.86 <sup>ab</sup>

Values are expressed as mean ± SEM. AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase; FA: alkaline phosphatase, Na+: sodium, K+: potassium Cl-: chlorine. Small letters compare means between columns (P <0.05).

#### *Histopathological analysis and weight of animals*

All the organs examined of rats treated with the extracts showed no morphological and structural changes that would indicate toxicity of extracts.

Tables 11 and 12, show rat weight gains in groups treated with LBGC and butanol extract respectively. Rats treated with both extracts showed no significant change in weight gain (P > 0.05).

Table 11. Effect of the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) on the weight of rats treated for 60 days.

Weight (g)	Control group		Treated group	
	Day 0	Day 60	Day 0	Day 60
	189.38 ± 2.74 <sup>a</sup>	245.63 ± 5.64 <sup>b</sup>	180.0 ± 5.43 <sup>a</sup>	229.71 ± 2.93 <sup>b</sup>

Values are expressed as mean ± SEM. Small letters compare means between columns (P <0.05).

Table 12. Effect of the butanol extract obtained from the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) on the weight of rats treated for 60 days.

Weight (g)	Control group		Treated group	
	Day 0	Day 60	Day 0	Day 60
	213.80 ± 3.03 <sup>ab</sup>	225.30 ± 5.74 <sup>a</sup>	192.80 ± 4.14 <sup>b</sup>	205.50 ± 8.04 <sup>ab</sup>

Values are expressed as mean ± SEM. Small letters compare means between columns (P <0.05).

## Discussion

In popular culture Brazilian says that "what is natural it does not matter", which leads many people to use the plants as drugs of choice, replacing the conventional medicines or as adjuvants, in a complementary therapy without the guidance adequate (Tavares, 2005). However we must not forget that the plants have active molecules that may have therapeutic efficacy, but also many adverse effects (Pereira, 1992). Moreover, it is not known due to dosage. So when the plants used in the wrong order may aggravate the state of health of the patient, or by not showing effectiveness in the light of adverse effects have not yet explained (Petrovick et al., 1997).

The importance of evaluating the toxicological activity of *C. nucifera* was due to the good results obtained in our laboratory relationship with the anthelmintic activity *in vitro* and in immunomodulatory activity in mice (data not shown).

In acute toxicity, the extracts administered by the oral route were not toxic at the doses used, indicating low toxicity. Substances are considered of low toxicity and safe when the LD<sub>50</sub>, orally, is 1,000 mg/kg. (Clarke and Clarke, 1977). In this work the LD<sub>50</sub> can not be calculated for the oral route, as the largest dose, 3000 mg/kg, no deaths occurred from any animal, indicating that the LD<sub>50</sub> is greater than 1,000 mg/kg. The same did not happen when the extracts were administered by the intraperitoneal route, which had LD<sub>50</sub> less than the oral, therefore representing greater toxicity. This is because the oral administration of a substance is less toxic than its administration by i.p., since orally may occur a poor absorption or detoxication through of passage by liver, whereas by i.p. there is the systemic absorption and thus the toxic effects appear to be more intense and early (Loomis, 1996; Obici et al., 2008).

Subchronic and chronic toxicity in the extracts induced no serious changes in the blood cells counting. Rather, the values of WBC, neutrophils, RBC, Hct and platelets had higher values in the group treated with LBGC. These results are important because the blood is an important parameter of the toxicology studies, as the hematopoietic system is extremely sensitive to activities of toxic agents, particularly those with potential mutagenic or cytotoxic, resulting in qualitative or quantitative changes, ie, leukopenia , leukocytos temporary or permanent and can limit the use of drugs (Leão et al., 2005). Hematological changes may reflect, too, in immune activity by lymphopenia and neutropenia, for example (Oliveira Lima, 2001). The results demonstrated that there is a possible immunomodulatory activity since the animals treated with the extracts showed count of

neutrophils and lymphocytes higher than the control group, but the why of the changes, is still unknown

Biochemical parameters in subchronic toxicity have not changed with the administration of the extracts, indicating absence of toxicity during the period of administration. The lack of significant changes in liver parameters (AST, ALT) indicates that the liver function was preserved. The same happened with normal levels of creatinine indicate that the extracts did not affect the renal function and integrity (Kaneco, 1989).

The changed amount of triglycerides indicates the interference of LBGC in lipid metabolism or transport. The possible mechanisms involved can be the change in the composition of lipoproteins, changes in the capture of LDL, change in the rate of liver production of HDL/VLDL, or changes in the conversion of VLDL/LDL (Rodrigues et al., 2006).

The monitoring of the animal's body mass is an important indicator for assessing the toxicity of a substance (Jahn and Günzel, 1997; Teo et al., 2002). The lack of statistical difference between the weight of the groups is another parameter that indicates low toxicity of the two extracts studied.

In conclusion, the extracts were, within the parameters, low toxicity and can be used in experiments with the aim of finding potential clinical and medical applications.

## **Referências**

Blini, W., Lira, C.M., 2005. Salvando vidas com a medicina natural. 1° ed. Unier, São Paulo, 479.

Clarke, E.G.C., Clarke, M.L., 1977. Veterinary Toxicology. Cassel and Collier Macmillan Publishers, London, pp. 268–277.

Duke, J.A., 1992. Handbook of Phytochemical Constituents of Grass and Other Economic Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 654.

Esquenazi, D., Wigg, M.D., Miranda, M.M.F.S., Rodrigues, H.M., Tostes, J.B.F., Rozental, S., Silva, A.J.R., Alviano, C.S., 2002. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. Research in Microbiology 153, 647–652.

Jahn AI, Günzel, PKH 1997. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? *Reprod Toxicol* 11: 171-178.

Kaneko JJ (1989) *Clinical Biochemistry of Domestic animals*. Academic Press, San Diego.

Leão, A.R., Cunha, L.C., Parente, L.M.L., Castro, L.C.M., Chaul, A., Carvalho, H.E., Rodrigues, V.B., Bastos, M.A. avaliação clínica toxicológica preliminar do Viticromin® em pacientes com vitiligo. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.2, 15-23, 2005.

Loomis, T. A.; Hayes, A.W. *Loomis's Essentials of Toxicology*. 4<sup>a</sup>ed. San Diego. 1996.

Mendonça-Filho, R.R., Rodrigues, I.A., Alviano, D.S., Santos, A.L.S., Soares, R.M.A., Alviano, C.S., Lopes, A.H.C.S., Rosa, M.S.S., 2004. Leishmanicidal activity of polyphenolics-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Research in Microbiology* 155, 136-143.

Obici, S., Otobone, F.J., Sela, V.R.S., Ishida, K., Silva, J.C., Nakamura, C.V., Cortez, D.A.G., Audi, E.A. Preliminary toxicity study of dichloromethane extract of *Kielmeyera coriacea* stems in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 115 (2008) 131–139.

Oliveira L. et al, *Métodos de Laboratório Aplicados a Clínica*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 126 – 129, 1985.

Pereira, S.M.N. Ocorrência de acidentes tóxicos com plantas. *Infarma*, p.16-19, 1992.

Petrovick, P.R., Ortega, G.G., Bassani, V.L. From a medicinal plant to a pharmaceutical dosage form. A (still) long way for the Brazilian medicinal plants. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of science*, v. 49, p. 364-369, 1997.

Rodrigues, E.R., Moreti, D.L.C., Martins, C.H.G, Kasai, A., Stoppa, M.A., Alves, E.G., Paz, K., Lopes, R.A., Sala, M.A., Petenusci, S.O. Estudos de parâmetros bioquímicos em ratos sob ação de planta medicinal [XI. *Chiococca alba* (L.) Hitchc]. *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*, v. 8, p. 169-172, 2006.

Senhoras, E.M., 2003. *Estratégia de uma agenda para a cadeia agroindustrial do coco: transformando a ameaça dos resíduos em oportunidades eco-eficientes* (Monografia, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Economia, Campinas, São Paulo), p. 36.

Tavares, J.P. Estudo de toxicologia clínica de três fitoterápicos à base de associações de plantas, mel e própolis em voluntários sadios. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza, 106p., 2005.

Teo, S., Stirling, D., Thomas, S., Hoberman, A., Kiorpes, A., Khetani, V., 2002. A 90-day oral gavage toxicity study of Dmethylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. *Toxicology* 179, 183–196.

### CAPÍTULO III

#### **Atividade anti-helmíntica de *Cocos nucifera* L sobre nematóides intestinais de camundongos**

#### **Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L on intestinal nematodes of mice**

#### **Resumo**

No presente estudo a atividade anti-helmíntica do líquido da casca do coco verde (LCCV) e do extrato butanólico da LCCV sobre *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetraptera*, parasitos intestinais de camundongos, foi avaliada. Trinta e seis camundongos com infecção natural foram divididos em seis grupos com os seguintes tratamentos: G I - 1.000 mg/kg de LCCV; G II - 2.000 mg/kg de LCCV; G III - 500 mg/kg do extrato butanólico; G IV - 1.000 mg/kg do extrato butanólico; G V - 0,56 mg/kg de febendazole e VI - DMSO a 3%. Os grupos I, II, V e VI foram tratados durante cinco dias consecutivos, enquanto G III e G IV foram tratados por três dias consecutivos. A composição química da LCCV e de seu extrato butanólico foi determinada por testes fitoquímicos. Ao final do experimento observou-se que o extrato butanólico na dose de 1.000 mg/kg apresentou eficácia de 90,70% ( $p < 0,05$ ). Os testes fitoquímicos revelaram a presença de triterpenos, saponinas e taninos condensados no LCCV e extrato butanólico. Os resultados encontrados sobre os nematóides de camundongos abrem a possibilidade de utilizar *C. nucifera* como anti-helmíntico.

Periódico: Research in Veterinary Science (Aceite com alterações em setembro de 2008).

## **Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L on intestinal nematodes of mice**

C.T.C. Costa, C.M.L. Bevilaqua\*, S.M. Morais, A.L.F. Camurça-Vasconcelos, M.V. Maciel, R.R. Braga, L.M.B. Oliveira

Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana 1700, Campus do Itaperi,  
CEP 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil.

\*Corresponding author:

Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana 1700, Campus do Itaperi,  
CEP 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil.

Tel.: +55 85 31019853; fax: +55 85 31019840.

E-mail address: [claudiamlb@yahoo.com.br](mailto:claudiamlb@yahoo.com.br)

### **Abstract**

In the present study, we evaluated the anthelmintic activity of the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC), as well as butanol extract obtained from LBGC, on mouse intestinal nematodes. Thirty-six naturally infected mice were distributed into six groups receiving the following treatments: Group I: 1,000 mg/kg of LBGC; Group II: 2,000 mg/kg of LBGC; Group III: 500 mg/kg of butanol extract; Group IV: 1,000 mg/kg of butanol extract; Group V: 0.56 mg/kg febendazole; and Group VI: 3% dimethylsulfoxide. The chemical composition of the LBGC and its butanol extract was determined by phytochemical tests. A dose of 1,000 mg/kg of butanol extract had 90.70% efficacy in reducing the mouse worm burden ( $p < 0.05$ ). Phytochemical tests revealed the presence of triterpens, saponnins and condensed tannins in the LBGC and butanol extracts. These results suggest that *C. nucifera* extracts may be useful in the control of intestinal nematodes.

Keywords: Medicinal plants; *in vivo*; *Cocos nucifera*; *Syphacia obvelata*; *Aspiculuris tetraptera*; Anti-parasitic; phytochemical tests

Control of gastrointestinal nematodes is usually accomplished with anthelmintic treatment. Anthelmintics have high costs, leave residues in food, and may cause

environmental pollution. Furthermore, the development of resistant nematode populations has stimulated the search for alternatives such as phytotherapy that may reduce the use of synthetic products (Vieira et al., 1999).

Both *in vitro* and *in vivo* tests are used to evaluate the anthelmintic activity of plants. *In vitro* tests do not take animal metabolism into account, resulting in a lack of correlation between the results of *in vitro* and *in vivo* tests (Pessoa, 2001; Costa et al., 2006). The use of nematodes that parasitize mouse to evaluate the anthelmintic action of plant extracts is a valid approach because it takes into account the animal metabolism, which may interfere with drug effectiveness (Hennessy, 1997). Moreover, the effective dose in mice can be extrapolated to production animals by allometric calculation (Kirkwood, 2004). Camurça-Vasconcelos et al. (2007) used a dose of 283 mg/kg of *Lippia sidoides* in sheep. This dose was obtained by extrapolation from a 1600 mg/kg dose in mouse, that had a medium efficiency of 68.94% ( $P < 0.05$ ) for treating intestinal nematodes. The dose extrapolated to sheep, 283 mg/kg, showed efficacy of 43.7% ( $P > 0.05$ ). Despite the absence of a significant statistical difference, extrapolation from the calculated allometric can indicate the appropriate dose in production animals and thus prevent unnecessary use of animals and reduce the costs of study (Kirkwood, 2004).

*Cocos nucifera* L. is a plant commonly found along the northeastern coast of Brazil. Aqueous *C. nucifera* fiber extracts are used in northeastern Brazilian traditional medicine to treat diarrhea, arthritis and bleeding (Duke, 1992). Popular medicine also uses the flesh of the green coconut to treat teniasis, schistosomiasis and ancylostomiasis (Blini and Lira, 2005). In recent years, it has been shown that aqueous *C. nucifera* fiber extracts have antibacterial and antiviral activities (Esquenazi et al., 2002).

In the present study, we evaluated the anthelmintic activity of the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) and LBGC's butanol extract on reduction of the intestinal worm burden of mice naturally infected with *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera*.

The LBGC extracted from EMBRAPA/Agroindústria Tropical was obtained from green coconuts collected by the fruit industry in the city of Fortaleza, Ceará, Brazil. After collection, the coconuts were crushed, pressed and filtered to obtain LBGC, or liquid extracted from the bark of the green coconut. LBGC was subjected to three washes with solvents using a decantation funnel. Initially ethyl acetate (10:1) was used, and then butyl alcohol (10:1). The butanolic solvent was evaporated using a rotary evaporator to obtain the butanol extract. Only LBGC and butanol extract were used in the experiment because the

material obtained with ethyl acetate extract was not sufficient to perform the anthelmintic tests. The extracts were dissolved with 3% dimethylsulfoxide.

Male Swiss albino mice weighing 38 g at seven months of age were used in the experiment. The animals were kept in standard polyethylene cages (42.5 x 27.5 x 17 cm). Cage cleaning was suspended to favor the development of natural intestinal nematode infection. Every week, feces were collected from the cages to determinate establishment of infection by *S. obvelata* and *A. tetraptera*, according to Willis (1927). The mice were kept at room temperature (25°C), fed with standard pellets (Purina®) and given water *ad libitum*. All procedures were approved by the Ethical Committee of Ceará State University (Process Number: 07227499-9).

Thirty-six mice were allocated into six groups, receiving the following treatments, administered by the intragastric route: Group I: 1,000 mg/kg of LBGC; Group II: 2,000 mg/kg of LBGC; Group III: 500 mg/kg of butanol extract; Group IV: 1,000 mg/kg of butanol extract; Group V: 0.56 mg/kg febendazole (positive control); and Group VI: 3% dimethylsulfoxide (negative control). The mice in groups I, II, V and VI were treated for five consecutive days, while those in groups III and IV were treated for three days. As this was first test performed using this extract, we tested a group treated for three days and another group according to the anthelmintic manufacturer's recommendation, for five days. Five days after treatment, all mice were euthanatized and the worm burden was counted. The large intestine was harvested and opened. The contents were collected and the surface was washed with saline solution. Recovered nematodes were fixed with hot AFA (20 parts alcohol 95% + 6 parts formol 40% + 1 part glacial acetic acid), counted and identified.

Phytochemical tests to detect phenols, tannins, leucoantocianidins, flavonoids, steroids, triterpens and alkaloids were performed with LBGC and butanol extract according to Matos (1997).

The efficacy of each treatment was calculated based on the percentage of worm burden reduction using the formula: (negative control worm burden - treated group worm burden) / (negative control worm burden) x 100. The worm burden reduction percentages were analyzed by the Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ) using the GraphPad Prism 3.0 software.

The LBGC did not show anthelmintic activity against the mouse nematodes when compared to the negative control group ( $p > 0.05$ ). However, the butanol extract at 1,000 mg/kg had a mean efficacy of 90.70%, which was statistically different from the negative control (Table 1).

The phytochemical tests revealed the presence of triterpens, saponnins and condensed tannins in the LBGC and butanol extract.

Table 1. Mean efficacy (percentage  $\pm$  S.D.) of the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC) and butanol extract (ExBut) obtained from LBGC in reducing mouse intestinal worm burden.

Treatment	Efficacy ( $\pm$ S.D.)
ExBut 0.5g/kg	76.74 $\pm$ 8.45 <sup>ab</sup>
ExBut 1g/kg	90.70 $\pm$ 9.53 <sup>b</sup>
LBGC 1g/kg	28.29 $\pm$ 33.33 <sup>a</sup>
LBGC 2g/kg	30.61 $\pm$ 35.92 <sup>a</sup>
Febendazole (0.56 mg/kg)	100.0 $\pm$ 0.0 <sup>b</sup>
Dimethylsulfoxide (3%)	39.53 $\pm$ 44.85 <sup>a</sup>

Small letters compare means in the lines. Different letters indicate significantly different values ( $p < 0.05$ ).

Triterpenoid compounds and saponnins have insecticidal activity, but no relevant anthelmintic effect. Pessoa (2001) noted that azadiractin, a triterpen obtained from *Azadirachta indica*, inhibited 68% of *Haemonchus contortus* egg hatching at a concentration of 1%. However, *A. indica* leaves had no anthelmintic activity *in vivo* (Costa et al., 2006). Saponins are reported to have insecticidal activity, for example 100% larvicidal activity toward *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* was observed (Pelah et al., 2002). However, we found no report in the literature of the anthelmintic activity of these compounds.

Condensed tannins are reported to possess anthelmintic activity. Inhibition of *H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus vitrinus* larval viability was observed when these species were subjected to the action of the *Schinopsis* sp extract containing 73% condensed tannins (Hoste et al., 2006). The same extract reduced the egg and worm load of sheep harboring *H. contortus* monospecific infection (Max et al., 2005). The anthelmintic activity of condensed tannins is attributed to their ability to bind to proteins. In adult parasites, condensed tannins bind to proteins present in the nematode cuticle, bucal cavity, esophagus, and cloaca causing changes in their physical and chemical

properties (Hoste et al., 2006). Thus, the tannins found in butanol extract could be responsible for the anthelmintic activity, since other chemical constituents present in the extract are not associated with anthelmintic activity.

In conclusion, this work demonstrated the potential use of butanol extract from LBGC against intestinal nematodes.

### **Acknowledgments**

This study received financial support from the National Research Council (CNPq). Dr. Bevilaqua has a CNPq research grant. We would like to thank to Dr. Morsyleide of EMBRAPA/Agroindústria Tropical for providing the LBGC.

### **References**

- Blini, W., Lira, C.M., 2005. Salvando vidas com a medicina natural. 1° ed. Unier, São Paulo, 479p.
- Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Bevilaqua, C.M.L., Morais, S.M., Maciel, M.V., Costa, C.T.C., Macedo, I.T.F., Oliveira, L.M.B., Braga, R.R., Silva, R.A., Vieira, L.S., 2007. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology* 148, 288-294.
- Costa, C.T.C., Bevilaqua, C.M.L., Maciel, M.V., Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Morais, S.M., Monteiro, M.V.B., Farias, V.M., Silva, M.V., Souza, M.MC., 2006. Anthelmintic activity of *Azadirachta indica* A. Juss against sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 137, 306-310.
- Duke, J.A. , 1992. Handbook of phytochemical constituents of gras herbs and other economic plants. Boca Raton, FL, p.654.
- Esquenazi, D., Wigg, M.D., Miranda, M.M.F.S., Rodrigues, H.M., Tostes, J.B.F., Rozental, S., Silva, A.J.R., Alviano, C.S. 2002. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology* 153, 647-652.
- Hennessy, D.R., 1997. Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of anthelmintic compounds. *Veterinary Parasitology* 72, 367-390.

- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology* 22, 253-261.
- Kirkwood, J.K., 2004. Use and pitfalls of allometry: A valuable tool in comparisons and extrapolations between species and in ethical considerations concerning the use of one species to model another. *Atla* 32, 209-213
- Matos, S.G.A., 1997. Introdução à fitoquímica Experimental. 2º ed. Edições UFC, Fortaleza, 141p.
- Max, R.A., Wakelin, D., Dawson, J.M., Kimambo, A.E., Kassuku, A.A., Mtenga, L.A., Craigon, J., Buttery, P.J., 2005. Effect of quebracho tannin on faecal egg counts and worm burdens of temperate sheep with challenge nematode infections. *Journal of Agricultural Science* 143, 519- 527.
- Pessoa, 2001. Atividade ovicida in vitro de plantas medicinais contra *Haemonchus contortus*. Master thesis. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, p.57.
- Pelah, D., Abramovich, Z., Markus, A., Wiesman, Z., 2002. The use of commercial saponin from *Quillaja saponaria* bark as a natural larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 407-409.
- Vieira, L.S., Cavalcante, A.C.R., Pereira, M.F., Dantas, L.B., Ximenes, L.J.F., 1999. Evaluation of anthelmintic efficacy of plants available in Ceara´ State, North-east Brazil, for the control of goat gastrointestinal nematodes. *Revue de Médecine Vétérinaire* 150, 447-452.
- Willis, H.H., 1927. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. *Medical Journal of Australia* 8, 375-376.

## CAPÍTULO IV

### **Atividade imunomodulatória de *Cocos nucifera* L. sobre camundongos**

#### **Immunomodulatory activity of *Cocos nucifera* L. in mice**

##### **Resumo**

O presente trabalho avaliou a atividade imunomodulatória do extrato butanólico obtido do líquido da casca do coco verde. Para tanto camundongos foram imunizados com 0,1 ml de hemácias de carneiro a 20% (HC; i.p.) e tratados com o extrato butanólico (50 e 250 mg/kg; v.o.) diluído em DMSO a 3%, durante sete dias consecutivos. Um reforço de HC foi dado de mesmo volume e concentração no 7º dia após a imunização inicial. O título de anticorpos séricos foi avaliado nos dias 7, 14 e 21 após o reforço; enquanto a resposta imune celular (RIC) foi avaliada através do edema de pata provocada no 22º dia após o reforço com HC (1%; s.c.) nos tempos 24, 48 e 72 h. A migração celular (MC) foi medida 6 h após a administração do extrato butanólico (10, 50 e 250 mg/ml; s.c.) em bolsa de ar estéril. Com relação ao título de anticorpos, ambas as doses do extrato aumentaram significativamente a produção de anticorpos comparada ao Levamisol e superior aos grupos controles no 14º e no 21º dia. Na RIC não se observou aumento do edema em relação aos controles. O extrato butanólico reduziu significativamente a migração de leucócitos totais em relação ao controle, principalmente quanto aos neutrófilos. Conclui-se que o extrato butanólico de *C. nucifera* tem ação imunomoduladora, pois estimulou a produção de anticorpos, não modificou a RIC e modificou a migração de neutrófilos.

## **Immunomodulatory activity of *Cocos nucifera* L. in mice**

**C.T.C. Costa, C.M.L. Bevilaqua\*, D.C.S. Nunes-Pinheiro, S.M. Moraes, V.M. Farias,  
L.M.B. Oliveira, R.R. Braga**

*Universidade Estadual do Ceará/Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias*

\*Corresponding author:

*Universidade Estadual do Ceará,*

*Av. Paranjana 1700*

*CEP 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil.*

*Tel. and fax: +55 85 31019840*

*E-mail address: claudiamlb@yahoo.com.br*

### **Abstract**

Coconut is popularly used in northeastern Brazil to treat diarrhea, arthritis, and hemorrhages. This study evaluated the immunomodulatory activity of a butanol extract obtained from the liquid of the bark of the green coconut. Mice were immunized with sheep red blood cells (SRBC; i.p.) and treated with the butanolic extract (50 and 250 mg/kg, p.o.) for seven consecutive days. A SRBC boost was administered 7 days after the initial immunization. Antibody levels were determined 7, 14, and 21 days after the boost, while the cellular immune response was evaluated by measuring foot thickness 24, 48, and 72 h after a challenge dose of SRBC in the left hind paw 29 days after initial immunization. Cell migration was measured 6 h after administration of butanolic extract (10, 50, and 250 mg/ml) in air pouches. Treatment with both doses of extract significantly increased humoral antibody titres from day 14, similar to levamisole. There was no increase in mean paw thickness compared to controls. Butanolic extract significantly reduced leukocyte, especially neutrophil, migration compared to controls. We conclude that the butanolic extract of coconut has immunomodulatory activities because it stimulated antibody production, but cellular responses were not changed and neutrophil migration was inhibited.

**Keywords:** Coconut; Cell mediated immunity; Humoral immunity; Cell migration

## 1. Introduction

Phytotherapy is the oldest natural medical treatment. Many cultures, including the Chinese, Babylonians, and Egyptians, cultivated various herbs that were used as laxatives, anthelmintics, diuretics, antiseptics, and cosmetics. In addition, the Egyptians used various natural products to embalm mummies (Rates, 2001). The 20<sup>th</sup> century saw the proliferation of synthetic drugs. However, because of the side effects of these drugs and a growing desire to return to nature, people turned to plants for alternative cures to various diseases. Renewed scientific interest focused on plants with activity against viruses, bacteria, fungi, and parasites, both in human and veterinary medicine, to ameliorate medical problems (Niezen et al., 1996). However, the properties of medicinal plants are not as widely understood as often declared. Thus, it is necessary to research and validate the correct use of medicinal plants and their derivatives (Matos, 1997).

*Cocos nucifera* L. is a plant commonly found along the northeastern coast of Brazil. Most commonly, it is sought for the flavor and nutritional qualities of its water obtained from fruit. Moreover, the coconut palm is popular for aesthetic appeal in littoral landscapes as well as its edible fruit and applications in cooking, including the production of coconut milk and scraped coconut (Senhora, 2003). Medicinal uses for aqueous extracts of coconut fiber in the form of tea have been reported (Esquenazi et al., 2002; Mendonça-Filho et al., 2004). Aqueous coconut fiber extracts are used in northeastern Brazil as a traditional medicine to treat diarrhea, arthritis, bleeding and hemorrhages (Duke, 1992). Popular medicine also uses the flesh of the green coconut to treat teniasis, schistosomiasis, and ancylostomiasis (Blini and Lira, 2005). In recent years, it has been shown that aqueous coconut fiber extracts have antibacterial (Esquenazi et al., 2002), antiviral (Esquenazi et al., 2002) and antiprotozoal activities (Calzada et al., 2007; Medonça-Filho et al., 2004). The use of catechins obtained from coconut fiber inhibited in a dose dependent manner the proliferation of peripheral blood lymphocytes and human tumor cells, especially the erythroleukemia cell line K562 (Kirszberg et al., 2003). Moreover, Wang and Ng (2005) demonstrated a peptide extracted from coconut had an inhibitory effect on HIV-1 reverse transcriptase as well as antifungal activity.

The objective of this study was to evaluate the immunomodulatory effect of a butanolic extract obtained from the liquid of the bark of the green coconut bark (LBGC) in experimental models in mice.

## 2. Materials and Methods

### *2.1. Plant material and extract preparation*

The LBGC provided by EMBRAPA/Agroindústria Tropical was obtained from green coconuts collected in the fruit industry in Fortaleza, Ceará, Brazil. After collection, the coconuts were crushed and pressed to obtain a liquid, which was filtered and subjected to three washes with solvents using a decantation funnel. Initially, we used ethyl acetate and then butyl alcohol (butanol). The butanolic solvent was evaporated using a rotary evaporator to obtain the butanol extract (11/1.89g). The extract was stored at room temperature until utilization.

To increase solubility, the extract was dissolved in 3% dimethylsulfoxide (DMSO).

### *2.2. Phytochemical analysis of butanol extract*

The butanol extract was analyzed with phytochemical tests to detect the presence of phenols, tannins, leucoantocianidins, flavonoids, steroids, triterpens, and alkaloids according to Matos (1997). These tests were based on visual observations of color changes or the formation of precipitates after the addition of specific reagents.

### *2.3. Animals*

Female Swiss albino mice, weighing between 25 and 30 g, were used in all immunomodulatory experiments. Animals were housed in polyethylene cage with sterile wooden scraps. Mice were kept at 25C° and fed standard pellets (Purina®) and water *ad libitum*. All procedures were approved by the Ethical Committee of Ceará State University (Process Number: 07227499-9).

### *2.4. Antigen*

Fresh sheep red blood cells (SRBC) were collected aseptically from the jugular vein of sheep, washed three times with normal sterile saline (NaCl, 0.9%), and adjusted to a concentration of 20% for immunization of mice.

### *2.5. Effect of butanol extract on circulating antibody titre and delayed type hypersensitivity response (DTH) in mice*

On day 0, five groups of ten animals were intraperitoneally (i.p.) immunized with 0.2 ml of 20% fresh sheep red blood cell (SRBC) suspension (i.p.). These animals received a boost of the same volume of SRBC 7 days after initial immunization. Mice received the following treatments daily orally (p.o.) for 7 days after the initial immunization: Group I –

untreated control; Group II – vehicle, 3% DMSO; Group III - 2mg/kg Levamisole over three alternating days (reference drug); Group IV – 250 mg/kg butanol extract; Group V - 50 mg/kg butanol extract.

Blood samples were collected by retro-orbital puncture on days 7, 14, and 21 after boosting with SRBC. The blood samples were centrifuged and serum was stored at -20C° until use. Antibody levels were determined by the hemagglutination technique (Moudgil et al., 1993). Briefly, 50 µl serum from each animal was serially diluted with normal sterile saline in 96-well round bottom microplates. Equal volumes of 1% SRBC suspension (antigen) were added. The microplates were mixed gently for 5 minutes and incubated at room temperature for 4 h and examined under a microscope. The antibody titre of each mouse was determined as the inverse of the highest dilution exhibiting agglutination.

To assess delayed type hypersensitivity (DTH) responses, 29 days after initial SRBC immunization, the animals were injected with a challenge dose of SRBC ( $1 \times 10^8/20 \mu\text{L}$ ) in the left hind paw. Normal sterile saline (20 µL) was injected into the right hind paw as a control. DTH was determined by the difference between the thickness of the right and left paws after 24, 48, and 72 h, according to the method of Langrange et al. (1974).

At the end of the experiment, mice were weighed, euthanized, and the liver and spleen weights were obtained and expressed as relative organ weights.

#### *2.6. Determination of pro-inflammatory effects of butanol extract*

Six-day-old air pouches were produced in the dorsal skin of mice as described previously (Edwards et al., 1981). Briefly, the back of each mouse was shaved and 5 mL sterile air was injected subcutaneously (s.c.). Three days later, the pouch was re-injected with 3 mL sterile air. Six days after the initial injection, the mice were divided into four groups (n=10), and the pouches were injected with 1 ml butanol extract (10, 50, or 250 mg/mL) or vehicle (aqueous suspension 3% DMSO). Six hours after treatment, mice were euthanized and 1 mL saline containing 5 U/mL heparin was injected into the air pouch to wash and recover the cellular infiltrate. The cells were counted using a hemocytometer. The cellular suspension was centrifuged at 2500 rpm for 10 minutes. The pellet was used to make differential leukocyte counts (DLC) by microscopic examination of Hema-stained smears. The results are expressed as the number of neutrophils or lymphocytes per  $\text{mm}^3$ .

#### *2.7. Statistical analysis*

Data are expressed as the mean standard error of the means (S.E.) and statistical

analysis was carried out employing Student's *t*-test. The statistical program used was Graph Pad Prism 3.0.

### **3. Results**

#### *3.1. Effect of butanol extract on circulating antibody titre of mice*

Administration of butanol extract increased the circulating antibody titre as determined by hemagglutination reaction (Table 1). There was an increase in circulating antibody 14 days after the SRBC boost ( $P < 0.05$ ) in mice treated with both doses of the extract and with Levamisole. Antibody levels rose in all groups 21 days after boost ( $P < 0.05$ ).

#### *3.2. Effect of butanol extract on delayed type hypersensitivity response (DTH)*

DTH responses were assessed by paw thickness. There were no significant increases in the groups treated with Levamisole or butanol extract compared to untreated controls and DMSO (Table 2).

#### *3.3. Effect of butanol extract on relative organ weights*

Organ weights were not affected by treatment with Levamisole or either dose of butanol extract (Table 3). A reduction was observed in the spleen with increasing dose of extract, but the change was not statistically significant. Mouse weight on the day of sacrifice is also shown in Table 3. The group treated with Levamisole exhibited significant weight gain ( $P < 0.05$ ). The butanol extract did not affect the weight of mice.

#### *3.4. Determination of cellular migration induced by butanol extract in air pouches*

Table 4 shows the cellular migration induced by butanol extract in air pouches. Butanol extract induced leukocyte migration. However, reductions in leukocyte migration were observed with increased doses of butanol extract, but the reduction was not statistically significant. There was a significant reduction in lymphocyte migration and a drastic decrease in neutrophil counts, both dependent on the dose of extract ( $P > 0.05$ ). It should be noted the extract induced the recruitment of eosinophils ( $P > 0.05$ ).

#### *3.5. Phytochemical study*

Phytochemical tests of butanol extract revealed the presence of triterpens, saponnins, and condensed tannins.

Table 1. Effect of butanol extract obtained from the liquid extract of the bark of green coconut (LBGC) on antibody titre induced by sheep red blood cells in mice<sup>d</sup>.

Treatment	Dose mg/kg	7 days*	14 days *	21 days *
Untreated control	-	755.2 ± 229.3 <sup>Aa</sup>	1126.4 ± 167.2 <sup>Aa</sup>	10956.8 ± 1967 <sup>Ba</sup>
DMSO	-	550.4 ± 89.6 <sup>Aa</sup>	1056 ± 239.7 <sup>Aa</sup>	11417.6 ± 3220 <sup>Ba</sup>
Levamisole	2	819.2 ± 169.8 <sup>Aa</sup>	1843.2 ± 136.5 <sup>Bb</sup>	25486.2 ± 6021 <sup>Cb</sup>
ButExt	50	881.9 ± 241.8 <sup>Aa</sup>	1820.4 ± 150.5 <sup>Bb</sup>	19114.7 ± 3801 <sup>Cab</sup>
ButExt	250	640 ± 87.4 <sup>Aa</sup>	1843.2 ± 136.5 <sup>Bb</sup>	22118.4 ± 3674 <sup>Cb</sup>

<sup>d</sup>Data are expressed as mean ± standard error (n = 10)

\* 7, 14, and 21 days after sheep red blood cell boost.

DMSO = Dimethylsulphoxide, ButExt = butanol extract. Capital letters compare means between columns and small letters between lines. Different letters indicate significant differences (p<0.05).

Table 2. Effect of butanol extract obtained from the liquid extract of the bark of green coconut (LBGC) on delayed hypersensitivity reaction in mice 24, 48, and 72 hours after challenge with sheep red blood cells<sup>A</sup>.

Treatment	Dose mg/kg	Paw thickness (mm)		
		24 h	48 h	72 h
Untreated Control	-	0.45 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.08 <sup>a</sup>
DMSO	-	0.40 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.08 <sup>ab</sup>	0.25 ± 0.08 <sup>a</sup>
Levamisole	2	0.35 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.40 ± 0.07 <sup>a</sup>
ButExt	50	0.50 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.09 <sup>ab</sup>	0.33 ± 0.08 <sup>a</sup>
ButExt	250	0.30 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.08 <sup>a</sup>

<sup>A</sup>Data are expressed as mean ± standard error (n = 10)

DMSO = Dimethylsulphoxide, ButExt = butanol extract. Small letters compare means between lines. Different letters indicate significant differences (p<0.05).

Table 3. Effect of butanol extract obtained from the liquid extract of the bark of green coconut (LBGC) on the relative weights of organs and mice 25 days after treatment<sup>A</sup>.

Treatment	Dose mg/kg	Relative organ weight (g/100g body wt)		Mice weight (g)
		Liver	Spleen	
Untreated control	-	4.20 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>ac</sup>	28.66 ± 0.56 <sup>a</sup>
DMSO	-	4.22 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.01 <sup>a</sup>	28.34 ± 0.56 <sup>a</sup>
Levamisole	2	3.84 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>be</sup>	30.23 ± 0.47 <sup>b</sup>
ExtBut	50	4.12 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.30 ± 0.01 <sup>ace</sup>	28.32 ± 0.78 <sup>a</sup>
ExtBut	250	4.05 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>bde</sup>	28.19 ± 0.60 <sup>a</sup>

<sup>A</sup>Data represent mean ± standard error (n = 10)

DMSO = Dimethylsulphoxide, ExtBut = butanol extract. Small letters compare means between lines. Different letters indicate significant differences (p<0.05).

Table 4. Effect of butanol extract obtained from the liquid extract of the bark of green coconut (LBGC) on cell migration in mice 6 h after extract administration<sup>A</sup>.

Treatment	Dose mg/kg	Total Leukocytes (Cells/mm <sup>3</sup> )	Lymphocytes (Cells/mm <sup>3</sup> )	Neutrophils (Cells/mm <sup>3</sup> )	Eosinophils (Cells/mm <sup>3</sup> )	Monocytes (Cells/mm <sup>3</sup> )
DMSO	-	2350.0 ± 1985.1 <sup>a</sup>	2092.0 ± 1485.6 <sup>a</sup>	258.0 ± 746.3 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>
ButExt	2	1645.0 ± 561.5 <sup>a</sup>	1311.0 ± 552.1 <sup>ab</sup>	330.0 ± 284.8 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	4.0 ± 8.2 <sup>a</sup>
ButExt	50	1435.0 ± 833.7 <sup>a</sup>	1370.0 ± 809.3 <sup>ab</sup>	56.0 ± 122.6 <sup>a</sup>	8.0 ± 14.0 <sup>a</sup>	1.0 ± 2.4 <sup>a</sup>
ButExt	250	1000.0 ± 364.0 <sup>a</sup>	991.0 ± 370.9 <sup>b</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	9.0 ± 18.0 <sup>a</sup>	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup>

<sup>A</sup>Data expressed as mean ± standard error (n = 10)

DMSO = Dimethylsulphoxide, ButExt = butanol extract. Small letters compare means between lines. Different letters indicate significant differences (p<0.05).

#### 4. Discussion

The use of plants as sources of immunomodulatory substances is still in its infancy, but studies to evaluate actions on the immune system are on the rise (Davis and Kuttan, 2000). Plants used in traditional medicine have been shown to stimulate or inhibit immune responses and several active ingredients have been isolated and characterized (Agarwal and Singh, 1999).

Previous experiments in our laboratory demonstrated the anthelmintic activity of coconuts on intestinal nematodes in mice (data not shown). In addition, popular reports suggested that coconut extracts directly affect parasites (Blini and Lira, 2005). Athanasiadou et al. (2001) suggested that condensed tannins, present in butanol extracts of coconut, act directly on gastrointestinal nematodes or indirectly through the stimulation of immune system.

In an attempt to assess the immunomodulatory activities of coconut butanol extract, sheep red blood cells were used to stimulate T-dependent antibody production, especially IgG (Benacerraf, 1978). The extract increased secondary immune responses 14 and 21 days after a SRBC boost compared to untreated controls and DMSO groups. This stimulation was dose dependent ( $P < 0.05$ ). We also tested the ability of butanol extract to modulate the DTH response, however, butanol extract did not affect paw thickness caused by SRBC injection ( $P > 0.05$ ).

Several substances that affect immune responses were detected in the butanol extract, including triterpens, saponnins, and phenolic compounds such as condensed tannins. Saponins from the root of *Panax ginseng* increase cytokine production by lymphocytes, improve phagocytic activity of human macrophages (Kim et al., 1990), act against *Staphylococcus aureus* (Hu et al., 2003), and promote the production of IgG, especially IgG1 and IgG2a (Sun et al., 2007). Moreover, saponins isolated from the ethanol extract of *Astragalus peregrinus* stimulate the proliferation of mice splenocytes (Verotta et al., 2001). The phenolic compounds of *Tilia cordata* induce lymphocyte proliferation (Anesini et al., 1999), while phenolic compounds of *Mangifera indica* stimulate both humoral and delayed cellular responses (Makare et al., 2001).

Previous studies showed that coconut products have antiproliferative effects on tumor cells and T lymphocytes (Kirszberg et al., 2003). Mendonça-Filho et al. (2004) observed that the ethyl acetate extract, rich in polyphenolic compounds (catechins and condensed tannins), was responsible for dose dependent increases in nitric oxide production by macrophages in the absence and presence of *Leishmania amazonensis* infection.

Moreover, the same authors observed that the cellular immune response remained unchanged in a rabbit skin test. The way that phenolic compounds enhance nitric oxide production by macrophages is still unknown. According to Mendonça-Filho et al. (2004), these compounds must trigger a signaling cascade that culminates in the expression of nitric oxide.

Our results show that coconut butanol extract stimulates antibody production in a secondary immune response, but does not affect cellular immune responses, indicating that it triggers a signaling pathway that specifically augments antibody production. Therefore, we conclude that the butanol extract of coconut has immunomodulatory activities.

### **Acknowledgements**

This work received financial support from CNPq. Dr. Claudia Bevilaqua is a CNPq Researcher

### **References**

- Agarwal, S.S., Singh, V.K., 1999. Immunomodulatory: a review of studies on Indian medicinal plants and synthetic peptides: Part I. Medicinal plants. Proceedings Indian National Science Academy 65, 179-204.
- Anesini, C., Werner, S., Borda, E., 1999. Effect of *Tilia cordata* flower on lymphocyte proliferation: participation of peripheral type benzodiazepine bindings sites. Fitoterapia 70, 361-367.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. Veterinary Parasitology 99, 205-219.
- Benacerraf, B., 1978. A hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of I region specific Ir genes in macrophages and borrower lymphocytes. Journal of Immunology 120, 1809–1832.
- Blini, W., Lira, C.M., 2005. Salvando vidas com a medicina natural. 1° ed. Unier, São Paulo, 479.
- Calzada, F., Yé-Mulia, L., Tapia-Contreras, A., 2007. Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites. Journal of Ethnopharmacology 113, 248-251.

- Davis, L., Kuttan, G., 2000. Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. *Journal of Ethnopharmacology* 71, 193-200.
- Edwards, J.C.W., Sedgwick, A.D., Willoughby D.A., 1981. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air. An in vivo tissue culture system. *Journal Pathology* 134, 147-156.
- Duke, J.A., 1992. *Handbook of Phytochemical Constituents of Grass and Other Economic Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 654.
- Esquenazi, D., Wigg, M.D., Miranda, M.M.F.S., Rodrigues, H.M., Tostes, J.B.F., Rozental, S., Silva, A.J.R., Alviano, C.S., 2002. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology* 153, 647-652.
- Hu, S., Concha, C., Lin, F.K., Waller, P., 2003. Adjuvant effect of ginseng extracts on the immune responses to immunisation against *Staphylococcus aureus* in dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 91, 29-37.
- Langrange, P. H., Mackaness, G. B., Miller, T. E., 1974. Influence of dose and route of antigen injection on the immunological induction of T-cell. *The Journal of Experimental Medicine* 39, 528-530.
- Makare, N., Bodhankar, S., Rangari, V., 2001. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 78, 133-137.
- Matos, S.G.A., 1997. *Introdução à fitoquímica Experimental*. Edições UFC, Fortaleza, p. 141.
- Mendonça-Filho, R.R., Rodrigues, I.A., Alviano, D.S., Santos, A.L.S., Soares, R.M.A., Alviano, C.S., Lopes, A.H.C.S., Rosa, M.S.S., 2004. Leishmanicidal activity of polyphenolics-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Research in Microbiology* 155, 136-143.
- Moudgil, K.D., 1993. *A handbook of practical and clinical immunology*. CBS publishers, New Delhi, p.495.
- Niezen, J.H., Charleston, W.A.G., Hodgson, J., Mackay, A.D., Leathwick, D.M., 1996. Controlling internal parasites in grazing ruminants without recourse to anthelmintics: approaches, experiences and prospects. *International Journal for Parasitology* 26, 983-992.
- Rates, S.M.K., 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39, 603-613.

Senhoras, E.M., 2003. Estratégia de uma agenda para a cadeia agroindustrial do coco: transformando a ameaça dos resíduos em oportunidades eco-eficientes (Monografia, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Economia, Campinas, São Paulo), p. 36.

Sun, J., Hu, S., Song, X., 2007. Adjuvant effects of protopanaxadiol and protopanaxatriol saponins from ginseng roots on the immune responses to ovalbumin in mice *Vaccine* 25, 1114-1120.

Kim, J.Y.; Germolec, D.R.; Luster, M.I., 1990. *Panax ginseng* as a potencial immunomodulator: studies in mice. *Immunopharmacology Immunotoxicology* 12, 257-276.

Kirszberg, C.; Esquenazi, D., Alviano, C.S., Rumjanek, V.M., 2003. The effect of a Catechin-rich extract of *Cocos nucifera* on Lymphocytes proliferation. *Phytotherapy Research* 17, 1054-1058.

Verotta, L.; Guerrini, M.; El-Sebakhy, N.A.; Asaad, A.M.; Toaima, M.M.; Abou-sheer, M.E.; De Luo, Y.; Pezzuto, J.M., 2001. Cycloartane saponins from *Astragalus peregrinus* as modulators of lymphocyte proliferation. *Fitoterapia* 72, 894-905.

Wang, H.X. and Ng, T.B., 2005. An antifungal peptide from the coconut. *Peptides* 26, 2392-2396.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com o protocolo utilizado, o LCCV e o extrato butanólico apresentaram elevada quantidade de taninos.

Os dois extratos demonstraram atividade ovicida e larvicida sobre *H. contortus*. Porém, somente o extrato butanólico apresentou atividade anti-helmíntica sobre nematóides intestinais de camundongos.

Ambos extratos não apresentaram toxicidade no protocolo utilizado.

Com relação a imunomodulação, o extrato butanólico mostrou capacidade de influenciar o sistema imune, já que estimulou a produção de anticorpos, não alterou a resposta imune retardada e inibiu a migração de neutrófilos.

## 8. PERSPECTIVAS

A partir desse trabalho surgem perspectivas para a utilização de *C. nucifera*, principalmente com a utilização do extrato butanólico. Pesquisas são necessárias a fim de encontrar a dose compatível com atividade anti-parasitária em ovinos.

Além da atividade anti-helmíntica, o extrato butanólico também mostrou-se promissor como agente imunomodulador. Estudos adicionais precisam ser realizados para verificar se tal atividade influencia no parasitismo gastrintestinal.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, E.M.; PARKINS, J.J.; HOLMES, P.H. Influence of dietary protein on the pathophysiology of haemonchosis in lambs given continuous infections.. *Research in Veterinary Science*, v.45, n.1, p.41-49, 1988.

AGARWAL, S.S., SINGH, V.K. Immunomodulatory: a review of studies on Indian medicinal plants and synthetic peptides: Part I. Medicinal plants. Proceedings Indian National Science Academy 65, 179-204, 1999.

ALTIMARI, L.R.; MORAES, A.C.; TIRAPEGUI, J.; MOREAU, R.L.M. Cafeína e performance em exercícios anaeróbios. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 17-27, 2006.

ALVES, H.M. A diversidade química das plantas como fontes de fitofármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, n.3, p. 1-6, 2001.

ALVIANO, S.D.; RODRIGUES, K.F.; LEITÃO, S.G.; RODRIGUES, M.L.; MATHEUS, M.E., FERNANDES, P.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ALVIANO, C.S. Antinociceptive and free radical scavenging activities of *Cocos nucifera* L. (Palmae) husk fiber aqueous extract. *Journal of ethnopharmacology*, v. 92, p. 269-273, 2004.

AMORIM, A., BORBA, H. R., CARUATA, J. P. P., LOPES, D., KAPLAN, M. A. C. Anthelmintic activity of the latex of *Ficus* species. *Journal of ethnopharmacology*, v. 64, p. 255-258, 1999.

AMORIM, A; BORBA, H. R.; RODRIGUES, M. L. A; ANJOS, D. H. S.; CORREIA, D. V. A Ação anti-helmíntica de plantas, XII. Influência de extratos vegetais in vitro na viabilidade da larvas de nematódeos gastrointestinais de bovinos. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 77, p. 47-48, 1996.

AMORIM, A., BORBA, H. R. Ação anti-helmíntica de plantas XI. Influência de extratos brutos de *Cocos nucifera* L. (Palmae) na eliminação de *Vampirolepis nana* em camundongos. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.76, p. 98-99, 1995.

AMORIM, A., BORBA, H. R., SILVA, W. J. Ação anti-helmíntica de plantas. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 68, p. 64-70, 1987.

ANDRADE, A.M.; PASSOS, P.R.A.; MARQUES, L.G.C.; OLIVEIRA, L.B.; VIDAURRE, G.B.; ROCHA, J.D.S. Pirólise de resíduos do coco-da-baía (*Cocos nucifera* Linn) e análise do carvão vegetal. *Revista Árvore*, v.28, p. 707-714, 2004.

ANESINI C., WERNER S. & BORDA E. Effect of *Tília cordata* flower on lymphocyte proliferation: participation of peripheral type benzodiazepine bindings sites. *Fitoterapia*, v. 70, p. 361-367, 1999.

ARAGÃO, W.M. *Coco: pós-colheita*. Série frutas do Brasil. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, 76p., 2002

ARAGÃO, W.M.; ISBERNER, I.V.; CRUZ, E.M.O. Água de coco. Documentos 24. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 32p., 2001.

ASSIS, L. M., BEVILAQUA, C. M. L., MORAIS, S.M., VIEIRA, L. S., COSTA, C. T. C., SOUZA, J. A. L. Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of *Spigelia anthelmia* Linn extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v. 117, p. 43-9, 2003.

ASUZU, I. U.; ONU, O. U. The *in vitro* acute toxicity of *Piliostigma thonningii* bark ethanolic extract on selected strongyle larvae of cattle. *Fitoterapia*. v.LXIV, p.524-528, 1993.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R. L. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology*, v. 99 p. 205-219, 2001.

BARNES, P. J., ADOCK, I. M. Steroid resistant asthma. *Quebec Journal of Medicine*, v. 88, p. 455, 1995.

BARRACA, S.A. Manejo e Produção de Plantas Medicinais e Aromáticas. Monografia. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Departamento de Produção Vegetal, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 49p., 1999.

BARROS, S. B. de M., DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: Oga, S. Fundamentos de Toxicologia. 2ª ed. São Paulo, Atheneu Editora, p. 57-67, 2003.

BATISTA, L. M., BEVILAQUA, C. M. L., MORAIS, S. M., VIEIRA, L. S. Atividade ovicida e larvicida *in vitro* das plantas *Spigelia anthelmia* e *Momordica charantia* contra o nematódeo *Haemonchus contortus*. *Ciência Animal*, v. 9, p. 67-73, 1999.

BAZZANO, T., RESTEL, T. I., PINTO, R.M., GOMES, D. C. Patterns of infection with the nematodes *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera* in conventionally maintained laboratory mice. *Memórias do Instituto Oswald Cruz*, v. 97, p. 847-853, 2002.

BEL, N. Other pharmacotherapy *European Respiratory Review*, v. 10, p. 82, 2000.

BLECHA, F. Immunomodulators for prevention and treatment of infectious diseases in food-producing animals. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, Philadelphia, v.17, p.621-633, 2001.

BORBA, H. R., AMORIM, A. Ação anti-helmíntica de plantas XIV. Avaliação da atividade de extratos aquosos de *Chenopodium ambrosioides* L. (Erva-de-Santa-Maria) em camundongos naturalmente infectados com *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris tetraptera*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 13, p. 133-136, 2004.

BRAGA, D. B. O.; BRGA, M. M.; JUNIOR, D. G. M.; SOUZA, V. R. C. Avaliação preliminar da atividade anti-helmíntica da folha de bananeira (*Musa sp*) em bovinos. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 8, p. 127-128, 2001.

BRANNAN, Chris. *Propionibacterium acnes*. Disponível em:<[http://web.umn.edu/~microbio/BIO221\\_1998/P\\_acnes.html](http://web.umn.edu/~microbio/BIO221_1998/P_acnes.html)>. Acesso em: 25 maio 2005.

BRITO, I.P. Caracterização e aproveitamento da água de coco seco (*Cocos nucifera* L.) na produção de bebidas. Universidade Federal de Pernambuco (Dissertação de Mestrado), 118p., 2004.

BRUNET, S.; HOSTE, H. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n.20 p. 7481-7487, 2006.

BRUNETON, J. *Elementos de fitoquímica e farmacognosia*. Zaragoza, Espanha: Ed. Acribia, p.107-353, 1991.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA L.S.; NAVARRO, A.M.C. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, v. 154, p. 167-170, 2008.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.C.; MACEDO, I.T.F.; OLIVEIRA, L.M.B.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.;

VIEIRA, L.S. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology*, v. 148, p. 288-294, 2007.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* E *Croton zehntneri* sobre nematóides gastrintestinais de Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, 83p, 2006.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F., MORAIS, S. M., SANTOS, L. F. L., ROCHA, M. F. G., BEVILAQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade antihelmíntica. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 7, p. 97-106, 2005.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F., NASCIMENTO, N. R. F., SOUSA, C. M., MELO, L. M., MORAIS, S. M., BEVILAQUA, C. M. L, ROCHA, M. F. G. Neuromuscular effects and acute toxicity of an ethyl acetate extract of *Spigelia anthelmia* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 92, p. 257-261, 2004.

CARRIJO, O.A., LIZ, R.S., MAKISHIMA, N., Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. *Horticultura Brasileira* v. 20, p. 533-535, 2002.

CASTRUCCI, G.; OSBURN, B. I.; FRIGERI, F.; FERRARI, M.; SALVATORI, D.; LO DICO, M.; BARRECA, F. The use of immunomodulators in the control of infectious bovine rhinotracheitis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.23, p.91-97, 2000.

CASTRUCCI, G.; FERRARI, M.; OSBURN, B. I.; FRIGERI, F.; BARRECA, F.; TAGLIATI, S.; CUTERI, V. The use of a non-specific defence mechanism inducer in calves exposed to bovine herpesvirus-1 infection: preliminary trials. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.18, p.85-91, 1994.

CHAGAS, A.; C. S.; VIEIRA, L. S.; FREITAS, A. R.; ARAÚJO, M. R. A.; ARAÚJO-FILHO, J. A.; ARAGUÃO, W. R.; NAVARRO, A. M. C. Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) ante homeopathic product Fator Vermes in Morada Nova sheep. *Veterinary Parasitology*, v. 151, p. 68-73, 2008.

CHAGAS, A .C. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 13, p. 156-160, 2004.

CHARLES, T. P. Disponibilidade de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais parasitas de ovinos deslanados no semi-árido pernambucano. *Ciencia. Rural*. v. 25, p. 437-442, 1995.

COLES, G. C.; BAUER, F. H. M.; BORGSTEEDE, S.; GREERTS, S.; KLEI, M. A; TAYLOR; WALLER, P. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for detection of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. v. 44, p. 35-44, 1992.

COMACK, S.; ALKEMADE, S.; ROGAN, D. Clinical study evaluating a purified mycobacterial cell wall extract for the treatment of equine respiratory disease. *Equine Practice*, v.13, 1991.

COOP, R. L. & KYRIAZAKIS, I. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends in Parasitology*, v. 17, n.7, p. 325-330, 2001.

COSTA, C.T.C.; BEVILAQUA, C.M.L.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F., MACIEL, M.V.; MORAIS, S.M., CASTRO, C.M.S.; BRAGA, R.R.; OLIVEIRA, L.M.B. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research*, v. 74, p. 284-287, 2008.

COSTA, C.T.C., BEVILAQUA, C.M.L., MACIEL, M.V., CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F., MORAIS, S.M., MONTEIRO, M.V.B., FARIAS, V.M., SILVA, M.V., SOUZA, M.MC. Anthelmintic activity of *Azadirachta indica* A. Juss against sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 137, 306-310, 2006.

COSTA, C.T.C, MORAIS, S. M., BEVILAQUA, C. M. L.; SOUZA, M. M. C.; LEITE, F. K. A. Efeito Ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. Sobre *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 11, p. 57-60, 2002.

DAVIS, E.G.; RUSH, B. R.; BLECHA, F. Increases in cytokine and antimicrobial peptide gene expression in horses by immunomodulation with *Propionibacterium acnes*. *Veterinary Therapeutics*, v.4, p.5-11, 2003.

DAVIS, L., KUTTAN, G. Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 71, p. 193-200, 2000.

DE JONG, E. C., VIEIRA, P. L., KALINSKI, P. Corticosteroids inhibit the production of inflammatory mediators in immature monocyte-derived DC and induce the development of tolerogenic DC3. *Journal Leukoc Biology*, v. 66, p. 201, 1999.

ECHEVARRIA, F., BORBA, M. F. S., PINHEIRO, A. C., WALLER, P. J., HANSEN, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 62, p. 199-206, 1996.

EGUALE, T.; TILAHUN, G.; DEBELLA, A.; FELEKE, A.; MAKONNEN, E. In vitro and in vivo anthelmintic activity of crude extracts of *Coriandrum sativum* against *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.110, p. 428-433, 2007.

ESQUENAZI, D., WIGG, M.D., MIRANDA, M.M.F.S., RODRIGUES, H.M., TOSTES, J.B.F., ROZENTAL, S., SILVA, A.J.R., ALVIANO, C.S. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology*, v.153, p.647-652, 2002.

FACUNDO, V.A.; MORAIS, S.M.; BRAZ-FILHO, R. Flavonóides de *Piper Callosum* da Amazônia. [www.s bq.org.br/.../23/resumos/0765-2/index.html](http://www.s bq.org.br/.../23/resumos/0765-2/index.html). Acesso, 2008.

FLAMINIO, M. J.; RUSH, B. R.; SHUMAN, W. Immunologic function in horses after non-specific immunostimulant administration. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.63, n.4, p.303-315, 1998.

FONTENELLE, R. O. S. Avaliação do potencial antifúngico de óleos essenciais de plantas do nordeste brasileiro frente a diferentes cepas de dermatófitos e leveduras. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2005. 102 p.

FRACARO, S.N. *Potencial De Toxicidade Reprodutiva Do Extrato De Tillandsia Usneoides Linnaeus, 1762 (Barba-De-Pau) Em Coelhas Gestantes*. Dissertação, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 71p., 2004.

GALVEZ, J.M.G.; RIEDL, B.; CONNER, A.H. Analytical studies on tara tannins. *Holzforchung*, v.51, n.3, p.235-243, 1997.

GEERTS, S., BRANDT, J., BORGSTEEDE, F.H.M., VAN LOON, H., Reliability and reproducibility of the larval paralysis test as an in vitro method for the detection of anthelmintic resistance of nematodes against levamisole and morantel tartrate. *Veterinary . Parasitology*. 30, 223-232, 1989.

GITHIORI, J. B., HÖGLUND, J., WALLER, P. J., BAKER, R. L. The anthelmintic efficacy of the plant, *Albizia anthelmintica*, against the nematode parasites *Haemonchus contortus* of sheep and *Heligmosomoides polygyrus* of mice. *Veterinary Parasitology*, v. 116, p. 23-34, 2003.

GOBBO-NETO, L., LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores De Influência No Conteúdo De Metabólitos Secundários. *Quimica Nova*, v. 30, p. 374-381, 2007.

GOMES, R.P. *O coqueiro-da-baía*. Nobel.São Paulo, 111p., 1992.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal Plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, v.27, p. 1-93, 2006.

GUHA, S.; GHOSLA, S.; CHATTOPADHYAY, U. Antitumor, Immunomodulatory and anti HIV effect of mangiferin, a naturally occurring glucosyl xanthone. *Chemotherapy*, v. 42, p. 443-451, 1996.

HALL, H.; TEUSCHER, C.; URIE, P.; BODEN, B.; ROBISON, R. Induced regression of bovine papillomas by intralesional immunotherapy. *Therapeutic Immunology*, Oxford, v.1, p.319-324, 1994.

HAMMOND, J. A., FIELDING, D.; BISHOP, S. C. Prospects for plant anthelmintics in tropicalveterinary medicine. *Veterinary Research Communications*. v.21, p.213-228, 1997.

HARTMANN, K.; BLOCK, A.; FERK, G.; VOLLMAR, A.; GOLDBERG, M.; LUTZ, H. Treatment of feline leukemia virus-infected cats with paraimunity inducer. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.65, p.267-275, 1998.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, v.59, n.2, p.205-215, 1996.

HAUPTLI, L. & LOVATTO, P. A. Alimentação de porcas gestantes e lactantes com dietas contendo saponinas. *Ciência Rural*, v.36, n.2, p. 610-616, 2006.

HEIL, M.; BAUMANN, B.; ANDARY, C.; LINSENMAIR, K.; MCKEY, D. Extraction and quantification of condensed tannins as a measure of plant anti-herbivore defense? Revisiting an old problem. *Naturwissenschaften*, v. 89, p. 519-524, 2002.

HENNESSY, D. R. Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of anthelmintic compounds. *Veterinary Parasitology*, v. 72, p. 367-390, 1997.

HENRIQUES, A.T.; LIMBERGER, R.P.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*, 5<sup>o</sup> ed., Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1102p., 2004.

HERD, P.R. Equine parasite control keeping up with evolution. *Veterinary Medicine*, v. 90, p. 447-80, 1996.

HUBERT, J. & KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes, *Veterinary Record*, v. 130, p. 442-446, 1992.

JABBAR, A., ZAMAN, M. A.; IQBAL, Z.; YASEEN, M.; SHAMIM, ASSIM. Anthelmintic activity of *Chenopodium album* (L.) and *Caesalpinia crista* (L.) against trichostrongylid nematodes of sheep. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 114, p. 86-91, 2007.

KABASA, J. D.; ASIBO-OPUDA, J.; THINGGAARD, G.; MEULEN, U. The role of bioactive tannins in the postpartum energy retention and productive performance of goats browsed in a natural rangeland. *Tropical Animal Health and Production*, v. 36, p. 1-12, 2004.

KABUKI, T.; NAKAJIMA, H.; ARAI, M.; UEDE, S.; KUWABARA, Y.; DOSAKO, S. Characterization of novel antimicrobial compounds from mango (*Mangifera indica*) kernel seeds. *Food Chemistry*, v. 71, p. 61-66, 2000.

KAHIYA, C.; MUKARATIRWA, S.; THAMSBORG, S.M. Effects of *Acacia nictitica* and *Acacia karoo* diets on *Haemonchus contortus* infection in goats. *Veterinary Parasitology*, v.115, n.3, p.265-274, 2003.

KIM, J.Y.; GERMOLEC, D.R.; LUSTER, M.I. *Panax ginseng* as a potencial immunomodulator: studies in mice. *Immunopharmacology Immunotoxicology* 12, 257-276, 1990.

KIRKWOOD, J.K. Use and pitfalls of allometry: A valuable tool in comparisons and extrapolations between species and in ethical considerations concerning the use of one species to model another. *Atla*, v.32, p. 209-213, 2004.

KIRSZBERG, C.; ESQUENAZI, D., ALVIANO, C.S., RUMJANEK, V.M. The effect of a Catechin-rich extract of *Cocos nucifera* on Lymphocytes proliferation. *Phytotherapy Research*, v.17, p.1054-1058, 2003.

KNOTTENBELT, D. C.; KELLY, D. F. The diagnosis and treatment of periorbital sarcoid in the horse: 455 cases from 1947 to 1999. *Veterinary Ophthalmology*, v.3, p.169-171, 2000.

KOVACEVIC, N.; COLIC, M.; BACKOVIC, A.; DOSLOV-KOKORUS, Z. Immunomodulatory effects of the methanolic extract of *Epimedium alpinum in vitro*. *Fitoterapia*, v.77, p. 561-567, 2006.

KUSTER, R.M & ROCHA, L.M. Cumarinas, Cromonas e Xantonas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*, 5° ed., Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1102p., 2004.

LABRO, M. T. Antibacterial agents-phagocytes: new concepts for old immunomodulation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.10, p.11-21, 1998.

LACEY, E.; BRADY, R. L., PRICHARD, R. K., & WATSON, T. R. Comparison of inhibition of polymerization of mammalian tubulin and helminthic ovicidal activity by benzimidazole carbamates. *Veterinary Parasitology*. v. 23, p. 105-119, 1987.

LEADFORD, D. K. Treatment of steroid resistant asthma. *Immunology Allergy Clinic of North America*, v. 16, p. 777, 1996.

LÉON, J.O.G. Las saponinas y sapogeninas esteroidales. [www.monografias.com/.../Image10227.gif](http://www.monografias.com/.../Image10227.gif), Acesso em 26/12/2008.

LI, J.; MAPLESDEN, F. Commercial production of tannins from radiata pine bark for wood adhesives. *IPENZ Transactions*, v.25, n.1, p.46-52, 1998.

MACIEL, M. V., MORAIS, S. M., BEVILAQUA, C. M. L., CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F., COSTA, C. T. C., CASTRO, C. M. S. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v. 140, p. 98-104, 2006.

MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 78, p. 133-137, 2001.

MAKKAR, H.P.S.; BLUMMEL, M.; BECKER, K. "In vitro" rumen apparent and true digestibilities of tannin rich forages. *Animal Feed Science and Technology*, v.67, p.245-251, 1997.

MASIHI, K.N. Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 14, p. 181-191, 2000.

MATHEW S. & KUTTAN G. Immunomodulatory and antitumour activities of *Tinospora cordifolia*. *Fitoterapia*, v. 70, p. 35-43, 1999.

MATOS, F.J.A.. Uso de plantas e seus derivados para fins medicinais. In: MORAIS, S.M.; BRAZ-FILHO, R. *Produtos Naturais: estudos químicos e biológicos*, Editora da Universidade Estadual do Ceará, 240p., 2007.

MATOS, F.J.A. Introdução à fitoquímica experimental. 2ª ed., Edições UFC, Fortaleza, 141, 1997.

MATSUDA, H.; KAGERURA, T.; TOGUCHIDA, I.; UEDA, H.; MORIKAWA, T.; YOSHIKAWA, M. *Inhibitory effects of sesquiterpene from bay leaf on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: structure requirement and role on heat-shock protein induction*. In: *Life Science*, v. 66, p. 2151-2157, 2003.

MEGID, J.; DIAS JUNIOR, J. G.; AGUIAR, D. M.; NARDI JÚNIOR, G.; SILVA, W. B.; RIBEIRO, M. G. Tratamento da papilomatose canina com *Propionibacterium acnes* *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, p.574-576, 2001.

MEGID, J.; PERACOLLI, M. T. S.; CURI, P. R.; ZANETTI, C. R.; CABRERA, W. H.; VASSAO, R.; ITO, F. H. Effect of vaccination and the immunomodulators bacillus of Calmette-Guérin, Avridine and *Propionibacterium acnes* on rabies in mice. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*, v.21, p.305-318, 1998.

MELO, A. C. F. L., REIS, I. F., BEVILAQUA, C. M. L., VIEIRA, L. S., ECHEVARRIA, F.A. M., MELO, L. M. Nematódeos resistentes a anti-helmínticos em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. *Ciência Rural*, v. 33, p. 339-344, 2003.

MENDONÇA-FILHO, R.R., RODRIGUES, I.A., ALVIANO, D.S., SANTOS, A.L.S., SOARES, R.M.A., ALVIANO, C.S., LOPES, A.H.C.S., ROSA, M.S.S., Leishmanicidal activity of polyphenolics-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Research in Microbiology*, v.155, p. 136-143, 2004.

MINHO, A.P. Efeito anti-helmíntico de taninos condensados sobre nematódeos gastrintestinais em ovinos. 2006. 168p. Tese (Doutorado – Área de Concentração em Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

NASCIMENTO, E.A.; MORAIS, S.A.L. Polifenóis da madeira de *Eucalyptus grandis*. Parte 1: análise por espectroscopia e cromatografia líquida. *Ciência & Engenharia*, v.5, n.2, p.13-18, 1996.

NIEZEN, J.H., CHARLESTON, W.A.G., HODGSON, J., MACKAY, A.D., LEATHWICK, D.M. Controlling internal parasites in grazing ruminants without recourse to anthelmintics: approaches, experiences and prospects. *International Journal for Parasitology* 26, 983-992., 1996.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, v.66, n.17, p.2012-2031, 2005.

OTERO M.J.; HIDALGO L.G. Taninos condensados en especies forrajeras de clima templado: efectos sobre la productividad de rumiantes afectados por parasitosis gastrointestinales (una revisión). *Livestock Research for Rural Development*, v.16, n.2, p.1-9, 2004.

PAIS, M.P. Valor Nutritivo e Investimento em Defesas em folhas de *Didymopanax vinosum* E. March e sua Relação com a herbivoria em três fisionomias de Cerrado. 1998. 106p. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Entomologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

PANANGALA, V. S.; HAYNES, T. B.; SCHULTZ, R. D.; MITRA, A. Immunomodulation with killed *Propionibacterium acnes* in guinea pigs simultaneously vaccinated with *Brucella abortus* strain 19. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.13, p.71-84, 1986.

PAOLINI, V.; BERGEAUD, J. P.; GRISEZ, C.; PREVOT, F.; DORCHIES, PH.; HOSTE, H. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* v. 113, p. 253-261, 2003.

PELAH, D.; ABRAMOVICH, Z.; MARKUS, A.; WIESMAN, Z. The use of commercial saponin from *Quillaja saponaria* bark as a natural larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Journal of Ethnopharmacology*. v.81, p. 407-409, 2002.

PESSOA, L. M., MORAIS, S. M., BEVILAQUA, C. M. L., LUCIANO, J. H. S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v. 109, p. 59-63, 2002.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A M. G.; ALVES, F. S. F.; HADDAD, J. P. Aspectos epidemiológicos na caprinocultura cearense. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 52, n. 5, p. 534-543, 2000.

PROPPENGA, R. H. Introduction to Poisonous Plants of Veterinary Importance. . [online]. Disponível na internet via [www.url:http://cal.vet.upenn.edu/poison/ppstintro.htm](http://cal.vet.upenn.edu/poison/ppstintro.htm)., acesso, 2000.

QUEIROZ, C. R. A .A.; MORAIS, S. A .L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). *Revista Árvore*, v.26, n.4, p.485-492, 2002.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.

ROCHA R. P. A, GURJÃO W.S & JUNIOR L. C. B. Avaliação morfológica da cicatrização de lesões ulcerativas assépticas tratadas com solução de papaína. In: VII Congresso Virtual

Hispanomaericano de Anatomia Patológica e I Congresso de Preparaciones Virtuales por Internet, 2005.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*, 5° ed., Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1102p., 2004.

SCAINI, C. J., TEIXEIRA, M. F., TRAVERSI, M. DO C., RHEINGANTZ, M. G. T., SIGNORINI, V. M. Helintos de ratos wistar de diferentes faixas etárias criados em Biotério convencional. *Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo*, v. 70, p. 265-268, 2003.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G., ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*, 5° ed., Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1102p., 2004.

SERTOX. [www.sertox.com.ar/img/item\\_full/Colchicine.jpg](http://www.sertox.com.ar/img/item_full/Colchicine.jpg). Acesso em 26/12/2008.

SHINDE, U. A., PHADKE, A. S., NAIR, A. M., MUNGANTWAR, A. A., DIKSHIT, V. J., SARAF, M. N. Preliminary studies on the immunomodulatory activity of Cedrus deodora Wood oil. *Fitoterapia*, v. 70, p. 333-339, 1999.

SILVA, S. L., ALVES, C. C., BORBA, H. R., CARVALHO, M. G., BONFIM, T. C. Evaluation of the anthelmintic activity of extratcts from *Luxemburgia octandra* St. Hill. In mice naturally with *Aspiculuris tetraptera* and *Vampirolepis nana*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 14, p. 106-108, 2005.

SILVA, M.G.V. Óleos essenciais: composição química, biossíntese, técnicas de extração, atividades farmacológicas e importância econômica. In: MORAIS, S.M.; BRAZ-FILHO, R.

*Produtos Naturais: estudos químicos e biológicos*, Editora da Universidade Estadual do Ceará, 240p., 2007.

SIMAS, N.K.; LIMA, E.C.; CONCEIÇÃO, S.R.; KUSTER, R.M.; OLIVEIRA FILHO, A.M.; LAGE, C.L.S. Produtos Naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (Óleo Vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quimica Nova*, v. 27, P. 46-49, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*, 5º ed., Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1102p., 2004.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v.15, p. 71-81, 2002.

SOULSBY, E.J.L. *Parasitologia y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7.ed. México: Nueva Editorial Interamericana, 1987. 823p.

SPINOSA, H. S. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SUN, J., HU, S., SONG, X. Adjuvant effects of protopanaxadiol and protopanaxatriol saponins from ginseng roots on the immune responses to ovalbumin in mice. *Vaccine* 25, 1114-1120, 2007.

TAKECHI, M; TANAKA, Y.; TAKEHARA, M.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Structure and antiherpetic activity among tannins. *Phytochemistry*, v. 24, p. 2245-2250, 1985.

TARIQ, K.A., CHISHTI, M.Z., F.AHMAD, SHAWL, A.S., Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes, *Veterinary Parasitology*, doi:10.1016/j.vetpar.2008.10.084, 2008.

TAYLOR, M.A., HUNT, K. R., GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*, v. 103, p. 183-194, 2002.

TEMMINK, J.H.M. et al. Acute and sub-acute toxicity of bark tannis in carp (*Cyprinus carpio* L.) *Water Research*, v.23, n.3, p.341-344, 1989.

TSUZUKI, J.K.; SVIDZINSKI, T.I.E.; SHINOBU, C.S.; SILVA, L.F.A.; RODRIGUES-FILHO, E.; CORTEZ, D.A.G.; FERREIRA, I.C.P. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.79, p.577-583, 2007.

TIZARD, I. R. *Imunologia veterinária*. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002.

TIZARD, I.R. *Imunologia básica – uma introdução*. 5ed. São Paulo: Rocca Ltda, 147-159,1998.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4º ed., JIICA. Tokyo, Japan. 143p., 1998.

VAN KAMPEN, K. R. Immunotherapy and Cytokines. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*, v.12, p.186-192, 1997.

VÁRADY, M; CORBA, J. Comparasion of six in vitro tests in determining benzimidazole and levamisole resitence. *Veterinaty Parasitology*, v. 80, p. 239-249, 1999.

VASCONCELOS, A. K. P. Ação biológica dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Momordica charantia* L. sobre a resposta imune e a cicatrização em animais de experimentação. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2006. 95 p.

VEROTTA L., GUERRINI M., EL-SEBHAKY N.A., ASAAD A.M., TOAIMA MS.M., ABOU-SHEER M.E., DE LUO Y. & PEZZUTO J.M. Cycloartane saponins from *Astragalus peregrinus* as modulators of lymphocyte proliferation. *Fitoterapia*, v. 72, p. 894-905, 2001.

VIEIRA, L. S., CAVALCANTE, A. C. R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 19, p. 99-103, 1999.

VIEIRA, L. S., CAVALCANTE, A. C. R., PEREIRA, M. F., DANTAS, L. B., XIMENES, L. J. F. Evaluation of anthelmintic efficacy of plants available in Ceará State, North-east Brazil, for the control of goat gastrointestinal nematodes. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v. 150, p. 447-452, 1999.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A C. R.; XIMENES, L. J. F. Epidemiologia e controle das principais parasitoses de caprinos nas regiões semi-áridas do Nordeste. EMBRAPA-CNPC, Sobral-Ce, 50p., 1997.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A C. R. Avaliação de Plantas Mediciniais no controle de *Haemonchus contortus* de caprino. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. v. 1, p. 3-41, 1991.

WALLER, P. J., DASH, K. M., BARGER, I. A., LE JAMBRE, L. F., PLANT, J. Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep: learning from the Australian experience. *Veterinary Record*, v. 136, p. 411-413, 1995.

WANG, Y.; MCALLISTER, T.A.; YANKE, L.J.; CHEEKE, P.R. Effect of steroidal saponin from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes. *Journal of Applied Microbiology*. v. 88, p.887-896, 2000.

WEISS, R.C.; COX, N. R. Effect of interferon or *Propionibacterium acnes* on the course of experimentally induced feline infectious peritonitis in specific-pathogenfree and random-source cats. *American Journal of Veterinary Research*, v.51, p.726-733, 1990.

WINNICKA, A.; KLUCINSKI, W.; KAWIAK, J.; HOSER, G.; SIKORA, J. Effect of Baypamunã on blood leucocytes in normal and dexamethasone treated goats. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, v.47, p.385-394, 2000.

WOOD, I. B., AMARAL, N. K., BAIRDEN, K., DUNCAN, J. L., KASSAI, T., MALONE, J. B., JR., PANKAVICH, J. A., REINECKE, R. K., SLOCOMBE, O., TAYLOR, S. M., VERCRUYSSSE, J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*, v. 58, p. 181-213, 1995.

ZUANAZZI, J.A.S. & MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*, 5° ed., Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1102p., 2004.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 2.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.489-640, 2000.

## **ANEXOS**

## **Anexo I**

**Anexo I. Artigo científico intitulado “Taninos e sua utilização em pequenos ruminantes” publicado na revista Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**

## **Anexo II**

**Anexo II. Artigo científico intitulado “Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. on *Haemonchus contortus*” submetido à revista Small Ruminant Research**

De: RUMIN <rumin@elsevier.com>  
Assunto: Submission Confirmation for Small Ruminant Research  
Para: claudia.bevilaqua@pesquisador.cnpq.br  
Data: Domingo, 20 de Julho de 2008, 10:59

Title: Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. on *Haemonchus contortus*

Dear Prof Bevilaqua,

Your submission has been received by the journal  
Small Ruminant Research.

You will be able to check on the progress of your paper by logging onto  
the  
Elsevier Editorial Systems as an Author using the following information:

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been  
assigned.

Thank you for submitting your work to our journal.

Kind regards,

Gio Bakker  
Editorial Office  
Small Ruminant Research

## **Anexo III**

**Anexo III. Artigo científico intitulado “Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L on intestinal nematodes of mice” submetido e aceito com alterações pela revista *Research in Veterinary Science*.**

De: Research in Veterinary Science <resvetsci@elsevier.com>  
Assunto: RVSC-08-82 Revision Requested  
Para: claudiamlb@yahoo.com.br  
Data: Segunda-feira, 15 de Setembro de 2008, 7:33

Research in Veterinary Science

Ms. No. RVSC-08-82, "Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L on intestinal nematodes of mice"

Dear Prof Bevilaqua,

I can now inform you that the Editorial Board has evaluated your manuscript.

The Editor has advised that the manuscript will be reconsidered for publication as a Short Communication, after revision.

Please check the "Guide for Authors" on the web or in the Journal for the specific style of Short Communications (e.g., number of figures, tables, words).

The comments listed below should be taken into account when revising the manuscript. Along with your revision, you will need to supply a response letter 'Revision Note'), which is a thorough, detailed response to the comments, specifically noting each comment made by the referees and/or Editor, and describing all changes. Should you disagree with any comment(s), please explain why.

Please submit your revision online:  
Website: <http://ees.elsevier.com/rvsc/>

You will find your submission record under the menu item, 'Submissions Needing Revision'.

When submitting your revised manuscript, please ensure that you upload the source files (e.g. Word). Uploading only a PDF file at this stage will create delays should your manuscript be finally accepted for publication. If your revised submission does not include the source files, we will contact you to request them.

We are looking forward to receiving the revised submission.

Kind regards,

Carmel Mathew Maria Jude  
Journal Manager  
Research in Veterinary Science

---

## **Anexo IV**

**Anexo IV. Artigo científico intitulado “Immunomodulatory activities of *Cocos nucifera* L. in mice” submetido à revista *Journal of Ethnopharmacology*.**

De: Journal of Ethnopharmacology <jethnoph@lacdr.leidenuniv.nl>  
Assunto: Submission Confirmation for your paper  
Para: claudiamlb@yahoo.com.br  
Data: Sábado, 14 de Junho de 2008, 2:00

Dear Dr.Bevilaqua,

Your submission entitled "Immunomodulatory activities of Cocos nucifera L.in mice" has been received by journal Journal of Ethnopharmacology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jep/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Ethnopharmacology