

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

**LORENA MAYANA BESERRA DE OLIVEIRA**

**ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE *Cocos nucifera* L. SOBRE  
NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS**

**FORTALEZA-CE  
2008**

**LORENA MAYANA BESERRA DE OLIVEIRA**

**ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE *Cocos nucifera* L. SOBRE  
NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS**

Dissertação 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 Mestre 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**

LORENA MAYANA BESERRA DE OLIVEIRA

ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE *Cocos nucifera* L. SOBRE NEMATÓIDES  
GASTRINTESTINAIS DE OVINOS

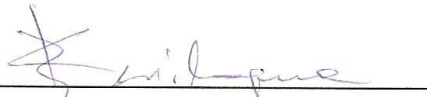
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

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

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

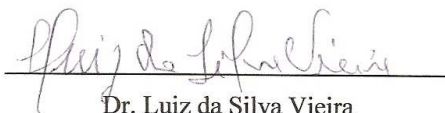
Aprovada em: 21 / 08 / 2008

**BANCA EXAMINADORA**



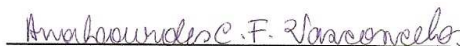
Prof. Dra. Cláudia Maria Leal Bevilaqua - UECE

**Orientadora**



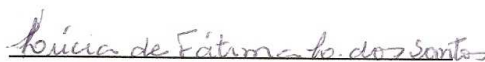
Dr. Luiz da Silva Vieira

**Examinador**



Dra. Ana Lourdes C. F. Vasconcelos

**Examinadora**



Dra. Lúcia de Fátima Lopes dos Santos

**Examinadora**

## AGRADECIMENTOS

A Deus merecedor de toda a minha gratidão por esta conquista. Ao amigo fiel, conselheiro verdadeiro e companheiro presente não só em sucessos como este, mas em momentos de insegurança e aflição. Ao mais sábio dos mestres, que permite provações para o meu amadurecimento e lições para o meu crescimento. Àquele que me presenteou com esta vitória, meu eterno agradecimento;

À Profa. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua que dedicou seu tempo e compartilhou comigo suas experiências para que minha formação fosse também um aprendizado de vida. Minha eterna gratidão pelo incentivo nos momentos de desânimo, pela palavra amiga nas horas de tristeza, pelo olhar de admiração até mesmo nas pequenas conquistas e, principalmente, por ter me tornado confiante de que sou capaz de continuar esta jornada;

Aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias (LABODOPAR) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Ana Lourdes Camurça Fernandes Vasconcelos, Cícero Temístocles Coutinho Costa, Michelline do Vale Maciel, Sthenia Santos Albano Amóra, Fernanda Cristina Macedo Rondon, Maria Vivina Barros Monteiro, Iara Tersia Freitas Macedo, Marina Parissi Accioly, Vitor Luz Carvalho, Rafaella Albuquerque e Silva, Roberta da Rocha Braga, Renata Simões Barros, Fabrício Rebouças de Oliveira, Ana Carolina Moura Rodrigues, Eudson Maia de Queiroz Júnior, Camila de Albuquerque Almeida, Aline Aragão e Bruno Grangeiro, pelos momentos que passamos juntos que foram uns dos maiores presentes que o mestrado me deu, pois o tempo passará e cada um seguirá seu caminho, mas a amizade de vocês ficará guardada para sempre. Destes quero realçar a importância de algumas pessoas: Ana Lourdes, por ter prontamente aceitado participar das bancas da minha qualificação e dissertação; Cícero, por sempre ter ajudado na execução do experimento, por ter me mostrado que a vida tem vários “tentáculos” e principalmente, por ter sido um verdadeiro amigo, me mostrando que as coisas mais simples que para mim pareciam impossíveis eram apenas pedras no meu caminho que deviam ser transpassadas; Sthenia, por todas as palavras de incentivo e gestos de compreensão, além dos incontáveis favores que um dia quero retribuir; Iara, por toda ajuda durante a realização do experimento, por todas as conversas jogadas fora, descobertas e sonhos que tivemos, risadas e momentos que compartilhamos, e acima de tudo, por ter sido e por ser uma grande amiga; Renata e Carol,

pela oportunidade de ter sido por alguns meses a “sub-chefe” de vocês durante a contagem e identificação da carga parasitária dos animais do experimento. Acho que "amigos da família LABODOPAR" é o termo mais apropriado para definir o sentimento que vai ficar;

À Profa. Dra. Selene Maia de Moraes que compartilhou comigo seus conhecimentos e colocou à minha disposição o Laboratório de Produtos Naturais da UECE para que eu preparasse o extrato e aos estagiários desse laboratório, em especial à Ynayara Colares de Lima, Mariano George Sousa e Davi Varela Magalhães, que muito colaboram na preparação e na análise química do extrato;

Ao Dr. Luiz da Silva Vieira que me acolheu muito bem no Laboratório de Parasitologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) para a execução de uma parte do experimento e que gentilmente contribuiu para o meu aprendizado participando nas bancas da minha qualificação e dissertação e à equipe desse laboratório, Helena Araújo da Ponte, Felipe Cavalcante Machado e Andrine Maria do Carmo Navarro, que com dedicação e amizade me auxiliaram a realizar uma parte do experimento e tornaram o período em que estive em Sobral uma agradável viagem;

À Morsyleide de Freitas Rosa e aos funcionários da Unidade de Beneficiamento da Casca do Coco Verde pelo fornecimento do meu objeto de estudo: o líquido da casca do coco verde;

Aos funcionários do Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC), em especial ao Prof. Icaro Gusmão Pinto Vieira, Olga e Francisco, por terem disponibilizado seus equipamentos para acelerar a preparação do extrato;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), em especial à Profa. Dra. Maria de Fátima da Silva Teixeira e ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, que coordenaram o Programa durante o mestrado e à Profa. Dra. Lúcia de Fátima Lopes dos Santos por ter gentilmente aceitado participar da banca da minha dissertação;

Aos colegas do PPGCV, que fizeram parte dessa caminhada, passando juntos por mais essa etapa no caminho da nossa realização profissional;

Aos funcionários do PPGCV, Adriana Maria Sales Albuquerque, Ana Cristina Sabóia Nascimento, Frederico Rocha Cavalcanti, André, César e Selmar, que, pela dedicação ao trabalho, me auxiliaram a percorrer esse caminho;

À minha família, em especial aos meus pais, Sueli Beserra de Oliveira e Afonso Barros de Oliveira, que compartilharam os meus ideais e os alimentaram, incentivando-me a prosseguir na jornada, me mostrando que o caminho deveria ser seguido sem medo, fossem quais fossem os obstáculos; ao meu irmão, Afonso Barros de Oliveira Filho, que com sua ingenuidade de criança fez as coisas ficarem menos “complicadas”; às minhas avós Maria Vilany Barros de Oliveira, Maria Zeneida Pereira Beserra e Giseuda Antônia de Medeiros (avó de coração), por estarem sempre presentes com seus cuidados e carinhos;

Ao meu noivo, Geraldo Cavalcante Neto, que foi cúmplice, companheiro e amigo. Por mais que eu agradeça, nunca poderei retribuir todo o amor, carinho e dedicação que me doou, nem a lição de vida, esperança e força que me deu. Obrigado por entender a minha ausência, acreditar nos meus sonhos, e por se fazer presente em todos os momentos, sendo estes de alegria ou tristeza;

Às demais pessoas que não foram citadas, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e profissional.

À UECE, ao PPGCV, à EMBRAPA, ao PADETEC e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“É um paradoxo a Terra se mover ao redor do Sol e a água ser constituída por dois gases altamente infláveis. A verdade científica é sempre um paradoxo, se julgada pela experiência cotidiana que se agarra à aparência efêmera das coisas.”

*Karl Marx*

## RESUMO

O controle de nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes é realizado com anti-helmínticos sintéticos. Contudo, o desenvolvimento da resistência exigiu a busca por alternativas de controle. Dentre estas, destaca-se o uso de plantas medicinais ricas em taninos condensados. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficácia do fruto de *Cocos nucifera* sobre nematóides gastrintestinais de ovinos. O extrato acetato de etila obtido do líquido da casca do coco verde (LCCV) foi submetido à análise química, testes de toxicidade e de eficácia anti-helmíntica. A análise química foi baseada em testes fitoquímicos e na quantificação de taninos. A eficácia *in vitro* foi determinada pelos testes de eclosão de ovos e desenvolvimento larvar com *Haemonchus contortus* utilizando concentrações do extrato que variaram de 0,31 a 5 mg ml<sup>-1</sup> e de 5 a 80 mg ml<sup>-1</sup>, respectivamente. A toxicidade aguda foi verificada após administração do extrato em camundongos. O teste controlado foi utilizado para avaliar a eficácia *in vivo*. Nesse experimento, ovinos infectados com nematóides gastrintestinais foram divididos em grupos (n=6): G1 - 400 mg kg<sup>-1</sup> de extrato, G2 - 0,2 mg kg<sup>-1</sup> de Cydectin<sup>®</sup> e G3 - DMSO a 3%. Os resultados dos ensaios *in vitro* e *in vivo* foram submetidos ao ANOVA e aos testes Tukey e Kruskal-Wallis, respectivamente (p<0,05). A análise fitoquímica do extrato revelou catequinas, taninos condensados, flavonóides e esteróides. A quantificação de taninos foi de 25,87%. Nas maiores concentrações, o extrato apresentou 100% de eficácia sobre a eclosão de ovos e 99,77% sobre o desenvolvimento larvar. Não foi demonstrada toxicidade por via oral, mas intraperitonealmente as DL<sub>10</sub> e DL<sub>50</sub> do extrato foram 650 e 1.233,99 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. No teste controlado, a eficácia do extrato não diferiu significativamente do DMSO a 3%. Apesar dos promissores resultados *in vitro*, no protocolo utilizado, o extrato acetato de etila do LCCV não apresentou atividade sobre nematóides gastrintestinais de ovinos.

Palavras-chave: pequenos ruminantes, nematóides gastrintestinais, atividade anti-helmíntica, plantas medicinais, taninos condensados.

## ABSTRACT

The gastrointestinal nematodes control of small ruminants has been realized by synthetic anthelmintics. However, the development of resistance required research of control alternatives. Among these alternatives is the use of medicinal plants rich in condensed tannins. The objective of this work was to evaluate the efficacy of *Cocos nucifera* fruit against gastrointestinal nematodes of sheep. The ethyl acetate extract obtained from the liquid of green coconut husk fiber (LGCHF) was submitted to chemistry analysis, toxicological and anthelmintic efficacy tests. The chemistry analysis was realized by phytochemical tests and tannin quantification. The *in vitro* efficacy was determined through egg hatching and larval development tests with *Haemonchus contortus* using extract concentrations that ranged from 0.31 to 5 mg ml<sup>-1</sup> and from 5 to 80 mg ml<sup>-1</sup>, respectively. The acute toxicity was determined after administration on mice. The controlled test was used to evaluate *in vivo* efficacy. In this experiment, sheep infected with gastrointestinal nematodes were divided into groups (n = 6): G1 - 400 mg kg<sup>-1</sup> extract, G2 - 0.2 mg kg<sup>-1</sup> Cydectin<sup>®</sup> and G3 - 3% DMSO. The results of *in vitro* and *in vivo* tests were analyzed by ANOVA and submitted to Tukey and Kruskal-Wallis tests, respectively (P<0.05). The phytochemical analysis revealed catechins, condensed tannins, flavonoids and steroids. The quantification of tannins was 25.87%. At the highest concentrations, the extract efficacy was 100% on egg hatching and 99.77% on larval development. No oral toxicity was demonstrated, but intraperitoneally the extract LD<sub>10</sub> and LD<sub>50</sub> were 650 and 1.233,99 mg kg<sup>-1</sup>, respectively. In controlled test, the extract efficacy did not differ from 3% DMSO. In spite of the significant results *in vitro*, the ethyl acetate extract obtained from the LGCHF showed no activity against sheep gastrointestinal nematodes.

Keywords: Small ruminants, gastrointestinal nematodes, anthelmintic activity, medicinal plants, condensed tannins.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CE <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub>	Concentração Efetiva p/ inibir 50% de eclosão dos ovos e desenvolvimento das larvas/Effective concentration to inhibit 50% of egg hatching and larval development
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DL <sub>10</sub> /LD <sub>10</sub>	Dose Letal para 10% dos camundongos/Letal dose to kill 50% of the mice
DL <sub>50</sub> /LD <sub>50</sub>	Dose Letal para 50% dos camundongos/Letal dose to kill 50% of the mice
DMSO	Dimetilsulfóxido/Dimethylsulfoxide
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
Kg/g/mg	Kilograma/Grama/Miligrama
l/ml/μl	Litro/Mililitro/Microlitro
L1	Larvas de primeiro estágio
L3	Larvas de terceiro estágio
LABODOPAR	Laboratório de Doenças Parasitárias
LCCV/LGCHF	Líquido da Casca do Coco Verde/Liquid of Green Coconut Husk Fiber
m/cm/mm/μl/nm	Metro/Centímetro/Milímetro/Micrômetro/Nanômetro
mg l <sup>-1</sup> /mg ml <sup>-1</sup>	Miligrama por litro/Miligrama por mililitro
g kg <sup>-1</sup> /mg kg <sup>-1</sup>	Grama por quilograma/Miligrama por quilograma
MS	Matéria Seca
OPG/EPG	Ovos por Grama de Fezes/Egg counts per gram of feces
PADETEC	Parque de Desenvolvimento Tecnológico
PPGCV	Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
R <sup>2</sup>	R squared
TEO/EHT	Teste de Eclosão de Ovos/Egg hatching test
TDL/LDT	Teste de Desenvolvimento Larvar/Larval development test
sd	Standart Deviation
UECE	Universidade Estadual do Ceará

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Flores de <i>Cocos nucifera</i> -----	23
Figura 2. Frutos de <i>Cocos nucifera</i> em diferentes estágios de desenvolvimento-----	23
Figura 3. Tanino hidrolisável-----	24
Figura 4. Tanino condensado -----	25

**LISTA DE TABELAS**

Table 1. Mean efficacy percentage $\pm$ sd of ethyl acetate extract obtained from the liquid of green coconut husk fiber (LGCHF) on <i>Haemonchus contortus</i> egg hatching.-----	40
Table 2. Mean efficacy percentage $\pm$ sd of ethyl acetate extract obtained from the liquid of of green coconut husk fiber (LGCHF) on <i>Haemonchus contortus</i> larval development.-----	40
Table 3. Mean efficacy percentage ethyl acetate extract obtained from the liquid of green coconut husk fiber (LGCHF) and mean adult nematodes $\pm$ sd recuperated from sheep treated.-----	41

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> -----	10
<b>LISTA DE FIGURAS</b> -----	11
<b>LISTA DE TABELAS</b> -----	12
<b>1 INTRODUÇÃO</b> -----	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> -----	15
2.1 Plantas medicinais-----	15
2.2 Plantas medicinais com atividade anti-helmíntica-----	16
2.3 Validação científica de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica-----	18
2.4 <i>Cocos nucifera</i> -----	22
2.5 Taninos-----	24
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> -----	30
<b>4 HIPÓTESE CIENTÍFICA</b> -----	31
<b>5 OBJETIVOS</b> -----	32
5.1 Objetivo geral-----	32
5.2 Objetivos específicos-----	32
<b>6 CAPÍTULO</b> -----	33
<b>7 CONCLUSÕES GERAIS</b> -----	48
<b>8 PERSPECTIVAS</b> -----	49
<b>REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	50

## 1 INTRODUÇÃO

A ovinocaprinocultura é uma atividade sócio-econômica bastante explorada no Brasil, inclusive no nordeste, região na qual a produção de pequenos ruminantes representa importante fonte de renda para a população (PINHEIRO et al., 2000). Entretanto, o parasitismo por nematóides gastrintestinais limita sua produtividade, além de provocar altas taxas de mortalidade no rebanho durante o período chuvoso (AROSEMENA et al., 1999). Levantamentos epidemiológicos realizados no nordeste brasileiro indicaram que a maioria dos pequenos ruminantes está infectada por esses parasitos, sendo *Haemonchus contortus* a espécie mais prevalente (SILVA et al., 2003). Animais com hemoncose apresentam anemia, edema submandibular, ascite, letargia, fezes com coloração escura, queda de lã e perda progressiva de peso. Nos casos hiperagudos, pode ocorrer morte súbita por gastrite hemorrágica (URQUHART et al., 1998).

O controle do parasitismo gastrintestinal tem sido baseado na administração intensiva e ininterrupta de anti-helmínticos sintéticos. Contudo, o alto custo, o desenvolvimento de populações de nematóides resistentes (MELO et al., 2003; MATTOS et al., 2004; RODRIGUES et al., 2007) e o risco de contaminação de produtos de origem animal e do meio ambiente por resíduos dessas drogas (HÖRDEGEN et al., 2003; ATHANASIADOU & KYRIAZAKIS, 2004) estimularam a busca por alternativas de controle. Dentre estas, o uso de plantas medicinais ocupa lugar de destaque (VIEIRA, 2008) por serem ricas em compostos com potencial anti-helmíntico (AKTAR et al., 2000), serem biodegradáveis e apresentarem suprimento auto-sustentável devido à diversidade da flora medicinal (HAMMOND et al., 1997).

Embora diversas plantas sejam tradicionalmente utilizadas como anti-helmínticos, suas propriedades medicinais não são tão conhecidas como frequentemente declarado. Portanto, é imprescindível que ocorra a validação científica para comprovar a segurança de administração aos animais e eficácia sobre os parasitos (ATHANASIADOU & KYRIAZAKIS, 2004) para, dessa forma, serem consideradas alternativas efetivas no controle do parasitismo gastrintestinal de pequenos ruminantes e, conseqüentemente, aumentarem a produtividade da ovinocaprinocultura.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Plantas medicinais

A utilização de produtos naturais derivados de plantas com finalidade medicinal tem sido relatada desde a Antiguidade, sendo considerada tão antiga quanto à civilização humana. Entretanto, a Revolução Industrial e o avanço da química orgânica estimularam o desenvolvimento de medicamentos sintéticos promovendo, desta forma, a diminuição no uso das plantas medicinais. Na última década, os efeitos colaterais, o alto custo e a ineficácia de algumas dessas drogas promoveram a revalorização da fitoterapia sendo esta considerada novamente uma alternativa para a cura de doenças (MAKKAR et al, 2007). 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.

As plantas sintetizam substâncias químicas que podem ser utilizadas no tratamento de uma grande variedade de doenças que acometem homens e animais (McGAW & ELOFF, 2008). Tais substâncias podem ser classificadas em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários estão amplamente distribuídos na natureza, ocorrendo em praticamente todos os vegetais. Nas plantas superiores, esses compostos se concentram em sementes e órgãos de armazenamento e são necessários para o desenvolvimento fisiológico, pois possuem papel importante no metabolismo celular básico. Eles são usados principalmente como matéria prima industrial, alimento ou aditivo alimentar e incluem produtos tais como proteínas, lipídios e carboidratos. Os metabólitos secundários são compostos derivados biologicamente dos metabólitos primários. Essas substâncias são armazenadas pelas plantas em quantidades menores, sendo às vezes sintetizadas em estágios de desenvolvimento distintos da planta, o que muitas vezes dificulta sua extração e purificação. Essas moléculas são formadas por vários caminhos biossintéticos e são dotadas de grande diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais. Não possuem uma função aparente no metabolismo primário da planta, mas funcionam como agentes defensivos na luta contra predadores, como microorganismos patogênicos, insetos e herbívoros, e contra diversas situações de estresses abióticos. Compreendem substâncias como alcalóides, aldeídos, cetonas, compostos fenólicos e cumarinas (ALVES, 2001; CHAGAS, 2004).

A extensa e diversificada flora do Brasil é um recurso natural de imenso potencial para a obtenção de metabólitos secundários, muitos dos quais podem ser utilizados com finalidade terapêutica (OMENA et al., 2007). De acordo com GURIB-FAKIM (2006), as

atividades biológicas das plantas são atribuídas a esses metabólitos. As propriedades antifúngica, antibacteriana, antineoplásica, imunomoduladora e antiparasitária das plantas têm sido bastante exploradas (OMENA et al., 2007), mas a busca por novos compostos naturais com atividade anti-helmíntica sobre nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes deve ser intensificada, pois o rápido desenvolvimento da resistência anti-helmíntica está comprometendo a produtividade da ovinocaprinocultura. Ademais, a utilização de plantas como uma alternativa de controle das nematodeoses gastrintestinais promove redução de custos e prolonga a vida útil dos fármacos disponíveis no mercado (VIEIRA, 2008).

## 2.2 Plantas medicinais com atividade anti-helmíntica

Durante séculos, as plantas medicinais têm sido utilizadas no controle do parasitismo e, em muitas partes do mundo, ainda estão sendo utilizadas com essa finalidade. Uma grande variedade de plantas é utilizada tradicionalmente para tratar doenças parasitárias que acometem os animais de produção. Embora a maioria das evidências dessa propriedade terapêutica tenha sido baseada em relatos populares, atualmente um número crescente de estudos tem sido realizado para verificar, validar e quantificar a eficácia dessas plantas (ATHANASIADOU et al., 2007).

PESSOA et al. (2002) demonstraram que na concentração de 0,5% tanto o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* como o seu principal constituinte, o eugenol, foram 100% eficazes sobre a eclosão de ovos de *H. contortus*.

COSTA et al. (2002) testaram o efeito anti-helmíntico de *Mangifera indica* e constataram que 10 mg ml<sup>-1</sup> da fração etanólica do extrato hexânico da semente dessa planta inibiram 91% da eclosão de ovos de *H. contortus*.

ALAWA et al. (2003) avaliaram a atividade ovicida de *Annona senegalensis* sobre *H. contortus*. Esses autores observaram que, na concentração de 7,1 mg ml<sup>-1</sup>, o extrato aquoso da casca dessa planta apresentou eficácia significativa sobre a eclosão de ovos quando comparado com o controle negativo.

ASSIS et al. (2003) relataram que 50 mg ml<sup>-1</sup> do extrato acetato de etila das folhas de *Spigelia anthelmia* apresentaram um percentual médio de inibição de eclosão de ovos *H. contortus* de 100%, enquanto que, na mesma concentração, o extrato metanólico inibiu 81,2% do desenvolvimento larvar.

ADEMOLA et al. (2004) testaram o efeito anti-helmíntico do extrato aquoso e do extrato etanólico de *Khaya senegalensis* e concluíram que as concentrações efetivas desses

extratos necessárias para inibir 50% (CE<sub>50</sub>) do desenvolvimento das larvas de estrogilídeos foram de 0,69 e 0,51 mg ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses autores relataram ainda que 500 mg kg<sup>-1</sup> do extrato etanólico de *Khaya senegalensis* reduziram em 88,82% o número de ovos por grama de fezes (OPG) de ovinos infectados naturalmente com nematóides gastrintestinais.

GATHUMA et al. (2004) avaliaram a eficácia de extratos de *Myrsine africana*, *Albizia antihelmintica* e *Hilderbrandia sepulosa* e observaram redução de 77, 89,8 e 90% no OPG de ovinos naturalmente infectados com nematóides gastrintestinais, respectivamente.

BIZIMENYERA et al. (2006) constataram que nas concentrações de 0,2 a 1 mg ml<sup>-1</sup> os extratos da folha, casca, raiz e caule de *Peltophorum africanum* inibiram 100% da eclosão dos ovos e do desenvolvimento das larvas de *Trichostrongylus colubriformis*.

IQBAL et al. (2006) administraram 3 g kg<sup>-1</sup> do pó das sementes de *Butea monosperma* em ovinos infectados naturalmente com nematóides gastrintestinais e observaram que 10 dias após o tratamento ocorreu redução de 78,4% no OPG.

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*.

CAMURÇA-VASCONCELOS et al (2007) observaram que 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* na concentração de 1,25 mg ml<sup>-1</sup> e mais de 90% do desenvolvimento larvar desse nematóide na concentração de 10 mg ml<sup>-1</sup>.

EQUALE et al. (2007) verificaram que em concentrações menores que 0,5 mg ml<sup>-1</sup> o extrato aquoso e o extrato hidro-alcoólico das sementes de *Coriandrum sativum* causaram inibição completa na eclosão de ovos de *H. contortus*. Esses autores demonstraram ainda que 8 mg ml<sup>-1</sup> do extrato hidro-alcoólico causou 85% de mortalidade sobre adultos desse nematóide, enquanto que, na mesma dose, a eficácia do extrato aquoso foi de apenas 45%.

JABBAR et al (2007) avaliaram a eficácia ovicida de *Chenopodium album* e *Caesalpinia crista* sobre *H. contortus* a fim de justificar o seu uso tradicional na medicina veterinária e constataram que as CE<sub>50</sub> do extrato metanólico dessas duas plantas foram de 0,134 e 0,449 mg ml<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses autores relataram ainda que a administração do pó e do extrato metanólico dessas plantas causam redução significativa do OPG de ovinos, pois animais tratados com 3g kg<sup>-1</sup> do extrato metanólico de *C. crista* apresentaram 13 dias após o tratamento redução de 93,9% no OPG, enquanto animais tratados com essa mesma dose do extrato metanólico de *C. album* apresentaram 5 dias após o tratamento redução de 82,2%.

COSTA et al. (2008) avaliaram a atividade de *Azadirachta indica* 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) testaram o potencial anti-helmíntico de *Iris hookeriana*. O extrato aquoso dessa planta apresentou eficácia de 54% sobre a motilidade de adultos de *Trichuris ovis*, enquanto o extrato etanólico apresentou 84,6% de atividade. Foi demonstrado ainda que, 10 dias após o tratamento, 1 g kg<sup>-1</sup> do extrato aquoso e do extrato etanólico de *I. hookeriana* reduziram em 31,53 e 43,54% o OPG de ovinos naturalmente infectados com nematóides gastrintestinais, respectivamente.

### 2.3 Validação científica de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica

Atualmente a validação científica de plantas medicinais está recebendo muita atenção da comunidade acadêmica, das indústrias farmacêuticas e do governo de países da América Latina. A idéia básica é a utilização de plantas e extratos vegetais para o desenvolvimento de fitoterápicos eficazes e seguros. Ao contrário dos milhões de dólares e diversos anos de pesquisa necessários para o desenvolvimento de drogas sintéticas, o desenvolvimento de fitoterápicos demanda consideravelmente menos investimento econômico podendo ser perfeitamente praticável em países em desenvolvimento (CALIXTO, 2000).

A primeira etapa do estudo de plantas medicinais é a realização de levantamentos etnofarmacológicos sobre as espécies usadas nas práticas caseiras da medicina popular regional. Aquelas que são mais utilizadas popularmente e apresentam maior eficácia devem ser coletadas, identificadas botanicamente e introduzidas em hortos medicinais especializadas. Amostras das plantas são usadas para fazer exsiccatas necessárias ao trabalho de identificação botânica. Cada exsicata deve ser acompanhada da ficha de coleta, na qual deve conter além da data e local, o nome vulgar da planta, sua condição natural, seu hábito, a cor da flor e do fruto, o interesse da coleta, o ambiente onde ocorre e outras informações julgadas pertinentes. A etapa seguinte começa com a verificação da existência, nas plantas selecionadas, da propriedade terapêutica que lhe é atribuída, bem como de seu grau de toxicidade nas doses compatíveis com seu emprego medicinal. Isto pode ser deduzido experimentalmente por meio de ensaios farmacológicos e avaliação da toxicidade ou através da análise dos dados de um levantamento bibliográfico (MATOS, 2007).

A validação científica da atividade anti-helmíntica de plantas medicinais sobre nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes é baseada na realização de testes *in vitro* e *in vivo*. Para facilitar esse processo de validação, existe atualmente uma tendência de utilização de extratos vegetais com a finalidade de retirar os compostos ativos presentes nas plantas (ATHANASIADOU et al., 2007). O protocolo utilizado na preparação desses extratos varia desde metodologias simples onde o solvente utilizado é água até metodologias complexas onde uma série de solventes orgânicos é usada (WATHERMAN & MOLE, 1994).

Os testes *in vitro* utilizados na avaliação da atividade anti-helmíntica de plantas medicinais servem como uma indicação inicial da atividade que está sendo pesquisada, e quando utilizados no início de uma triagem, permitem selecionar as plantas e os extratos vegetais que apresentam melhores resultados, diminuindo gastos, evitando perda de tempo e uso indiscriminado de animais de experimentação (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005). Uma vantagem adicional desses ensaios é a possibilidade de avaliar a eficácia de substâncias químicas isoladas sem a interferência de outros compostos das plantas (ATHANASIADOU & KYRIAZAKIS, 2004; GITHIORI et al., 2006). Esses testes foram inicialmente desenvolvidos para detectar a resistência de nematóides a anti-helmínticos sintéticos (CRAVEN et al., 1999) que exercem seus efeitos através da interferência sobre os processos de metabolismo energético, coordenação neuromuscular e dinâmica microtubular (LANUSSE, 1996). Entretanto, como esses parasitos não podem ser cultivados desde ovo até adulto, os ensaios *in vitro* são realizados principalmente com ovos e larvas (GEARY et al., 1999).

O teste de eclosão de ovos foi descrito por LE JAMBRE (1976) para a detecção da resistência aos benzimidazóis que impedem o embrionamento, a eclosão e conseqüentemente a produção de estágios de vida livre dos nematóides. Atualmente esse ensaio é bastante utilizado para a avaliação do potencial ovicida de plantas. Para a realização desse teste, ovos de nematóides são recuperados de acordo com HUBERT & KERBOEUF (1992). Para tanto, aproximadamente 10g de fezes são coletadas diretamente da ampola retal de um animal, misturados com água destilada e filtrados através de tamises com diferentes aberturas entre malhas. Os ovos retidos na malha de 30 µm são coletados. Os ovos recuperados são colocados em tubos de ensaio para incubação. Adicionam-se diferentes concentrações da substância a ser testada e após 48 horas a temperatura ambiente é feita a contagem de ovos e de larvas de primeiro estágio (L1). Os resultados são comparados com um grupo controle negativo. É recomendada também a utilização de um grupo controle positivo, com uma droga padrão,

para comparar a eficácia da substância testada com o composto sintético (COLES et al., 1992).

A interferência dos anti-helmínticos sobre a coordenação neuromuscular dos nematóides é avaliada sobre larvas, pois a inibição de seus movimentos impede a ingestão de alimentos e conseqüentemente seu desenvolvimento. Entretanto, a maioria dos ensaios utilizados nessa avaliação apresenta problemas de reprodutibilidade, sensibilidade e interpretação, além de alto custo e de morosidade para a verificação dos resultados devido ao período mínimo de seis dias necessários para a L1 se desenvolver até larva de terceiro estágio (L3) (VÁRADY et al., 2007).

O teste de desenvolvimento microlarvar foi desenvolvido por HUBERT & KERBOEUF (1992) para detectar resistência à ivermectina e ao levamisol. Neste ensaio ovos de nematóides são incubados com *Escherichia coli*, anfotericina B e meio nutritivo. Após 48 horas, adiciona-se a substância a ser testada. Decorridos cinco dias, as larvas são identificadas e contadas de acordo com o estágio de desenvolvimento. Outra técnica que pode ser utilizada nesse tipo de avaliação é o teste de paralisia larvar descrito por RODRIGUES et al. (1991). Neste ensaio L1 são incubadas com a substância-teste e após 24, 48 e 72 horas o percentual de larvas imóveis é determinado. O teste de inibição de ingestão de alimento foi desenvolvido por JACKSON & COOP (2000) para detectar nematóides resistentes às lactonas macrocíclicas e aos imidotiazóis. Nessa técnica L1 são incubadas com a substância-teste. Após 2 horas, uma solução de *E. coli* marcada com fluoresceína-5-isotiocianato é adicionada para novo período de incubação. Em seguida, é determinado o percentual de larvas alimentadas em microscópio de fluorescência invertido (ÁLVAREZ-SÁNCHEZ et al., 2005). Um outro ensaio que vem sendo empregado pela facilidade de execução e pelo baixo custo é o teste de desenvolvimento larvar baseado na metodologia de ROBERTS & O'SULLIVAN (1950). Para a realização desse ensaio, ovos de nematóides gastrintestinais são incubados durante 24 horas a 37°C para a obtenção de L1. Decorrido esse período é realizada a adição de diferentes concentrações da substância a ser testada e 2 g fezes de ovinos livres de nematóides gastrintestinais. Após 6 dias a temperatura ambiente é feita a recuperação e contagem de L3 (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007; COSTA et al., 2008).

Os testes *in vivo* de avaliação de atividade anti-helmíntica de plantas medicinais inicialmente devem ser realizados em animais de laboratório, nos quais são executados os testes toxicológicos e pré-clínicos de eficácia e posteriormente em animais da espécie alvo, nos quais são executados os testes clínicos de eficácia (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005). Nos ensaios clínicos de eficácia, plantas ou extratos vegetais são administrados a

pequenos ruminantes natural ou experimentalmente infectados com nematóides gastrintestinais (GITHIORI et al., 2006). Devido à laboriosidade, ao alto custo e à necessidade de utilização de um grande número de animais, esses ensaios devem ser realizados somente após a obtenção de resultados promissores nos testes *in vitro* (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

O teste de redução da contagem de ovos nas fezes foi desenvolvido por COLES et al. (1992). Pode ser utilizado em ruminantes, eqüinos e suínos para avaliar todos os tipos de anti-helmínticos e todas as espécies de nematóides que eliminam seus ovos nas fezes. Esse ensaio fornece uma estimativa da eficácia anti-helmíntica através da comparação do OPG antes e após o tratamento. Recomenda-se que a coleta das amostras de fezes seja realizada 10 a 14 dias após o tratamento. Um grupo controle não tratado deve ser utilizado para monitorar alterações que possam ocorrer durante o período do teste. Embora esse ensaio seja rotineiramente utilizado, os resultados podem não estimar precisamente a eficácia da substância testada, porque o OPG nem sempre está correlacionado com a carga parasitária, já que somente os parasitos adultos eliminam ovos (TAYLOR et al., 2002).

O teste controlado foi descrito por WOOD et al. (1995). Nesse ensaio a eficácia anti-helmíntica é determinada pela comparação entre a carga parasitária dos animais do grupo tratado e do grupo controle. 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 titulação ou 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. Conseqüentemente, poucos são os autores que utilizaram esta técnica (CAMURÇA-VASCONCELOS, 2005).

Embora os testes *in vitro* utilizados para avaliar a eficácia anti-helmíntica de plantas apresentem muitas vantagens, seus resultados nem sempre são reproduzidos *in vivo* (ATHANASIADOU & KYRIAZAKIS, 2004). A grande variedade de ensaios disponíveis e a falta de padronização dos mesmos contribuem para aumentar a divergência entre resultados de testes *in vitro* e *in vivo*. Outros fatores, como a biodisponibilidade dos compostos ativos em diferentes partes do trato gastrintestinal do animal, a espécie do parasito e espécie do hospedeiro, também podem contribuir para as divergências dos resultados (ATHANASIADOU et al., 2007).

## 2.4 *Cocos nucifera*

*C. nucifera* L., 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. Acredita-se que dessa região o fruto do coqueiro tenha sido levado para a Índia e, em seguida, para o leste da África. Depois do descobrimento do Cabo de Boa Esperança, essa planta foi introduzida no oeste africano seguindo, posteriormente, para as Américas e demais regiões tropicais do mundo (ANDRADE et al., 2004). No Brasil, essa espécie vegetal está amplamente distribuída na costa do nordeste (ESQUENAZI et al., 2002).

O clima quente e úmido durante todo o ano favorece o crescimento do coqueiro. A temperatura média anual de 21 a 30°C é ideal para o desenvolvimento dessa árvore. Períodos com temperatura média abaixo de 21°C afetam adversamente o seu crescimento e a sua produtividade. Tolera muito bem índices pluviométricos anuais de 1500 a 2500 mm. O excesso de chuvas pode resultar em doenças em seus frutos e folhas. Essa árvore se adapta a diferentes tipos de solos. Embora, terrenos arenosos seja o seu habitat natural, um bom crescimento é obtido em solos profundos. O crescimento e a produtividade máximos são obtidos em regiões ensolaradas. Quando a região é sombreada, a árvore cresce, mas sua produtividade é afetada negativamente (CHAN & ELEVICHTH, 2006).

O coqueiro é uma palmeira que pode medir até 30 m de altura por 20 a 40 cm de diâmetro coroada por um penacho de grandes folhas pinadas que medem de 2 até 5 m de comprimento. A inflorescência, formada por um conjunto ramificado, contém numerosas flores pequenas, estando as masculinas na parte superior e as femininas nas ramificações inferiores, defendido por uma espata lenhosa, em forma de canoa virada (Figura 1). Seu fruto, o coco, é uma grande drupa ovóide ou elipsóide, atingindo até 30 cm de diâmetro com cinco camadas distintas, por fora o epicarpo liso, fino e impermeável à água, seguido do mesocarpo fibroso com 2 a 4 cm de espessura. Depois está o endocarpo lenhoso e duro com cerca de 5 mm de espessura e cor parda. Mais internamente está uma camada fina e pardacenta denominada de tegumento que está aderido à amêndoa oca com 1 a 3 cm de espessura, branca, de sabor agradável que guarda em seu interior 10 a 250 ml de água de coco, um líquido claro e levemente adocicado no fruto verde e um pouco ácido no coco maduro (Figura 2) (MATOS, 2007).



Figura 1. Flores de *Cocos nucifera*



Figura 2. Frutos de *Cocos nucifera* em diferentes estágios de desenvolvimento

O coco tem sido utilizado na medicina popular do nordeste brasileiro para o tratamento de diferentes patologias (ESQUENAZI et al., 2002), incluindo o parasitismo gastrointestinal (BLINI & LIRA, 2005). A atividade antiparasitária do leite do coco foi avaliada em camundongos, sendo constatada eficácia contra *Syphacia obvelata*, *Aspicularis tetraptera* (AMORIM & BORBA, 1994) e *Vampirolepis nana* (AMORIM & BORBA, 1995).

A cultura de *C. nucifera* é importante para alimentação e geração de renda pela possibilidade de utilização de suas diversas partes, como raiz, estirpe, inflorescência, folhas e fruto, razão pela qual também tem sido denominada de “árvore da vida” (WADT, 1997). Entretanto, o Brasil apresenta uma peculiaridade com relação ao coco. Enquanto mundialmente esse fruto é processado no estágio final de maturação para produção de óleo e outros produtos, no país o coco é consumido também imaturo para o aproveitamento da água acumulada no seu interior (ROSA et al., 2001). Conseqüentemente, cerca de 6,7 milhões de toneladas de casca do coco verde são descartadas por ano em lixões e margens de estradas do Brasil (RODRIGUES & PINTO, 2007). É importante ressaltar ainda que esse material apresenta difícil decomposição, pois leva mais de oito anos para desaparecer. Portanto, além da importância econômica e social, a utilização desse subproduto é também importante do ponto de vista ambiental (CARRIJO et al., 2002), haja vista que 80 a 85% do peso bruto do coco verde representam lixo. A EMBRAPA/Agroindústria Tropical está propondo a utilização desse material para a confecção de produtos que podem ser utilizados na agricultura, indústria e construção civil, em substituição a outras fibras naturais e sintéticas. 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 (ROSA et al., 2001).

Nos últimos anos, alguns ensaios foram conduzidos para investigar as propriedades farmacológicas e biológicas do LCCV, tendo sido constatada atividade antiproliferativa 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).

## 2.5 Taninos

Taninos são compostos polifenólicos derivados do metabolismo secundário das plantas. Possuem elevado peso molecular e são classificados de acordo com sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e condensados (LI & MAPLESDEN, 1998).

Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central cujas funções hidroxilas são esterificadas pelo ácido gálico ou ácido hexadiidroxifênico (Figura 3) (SIMÕES et al., 2000). Podem ser divididos, de acordo com o produto obtido após sua hidrólise, em galotaninos, que originam ácido gálico, ou em elagitaninos, que originam ácido elágico (GALVEZ et al., 1997). São encontrados nas folhas, frutas e vagens de dicotiledôneas, mas não têm sido detectados em monocotiledôneas (LEWIS & YAMAMOTO, 1989).

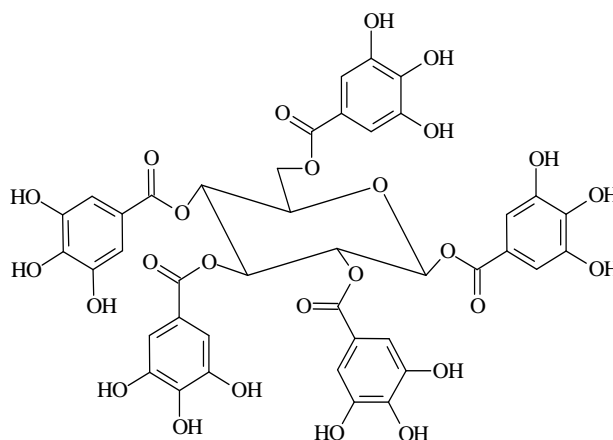


Figura 3. Tanino hidrolisável

Os taninos condensados ou proantocianidinas são oligômeros ou polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (Figura 4) (SIMÕES et al., 2000). Quando esses metabólitos são despolimerizados produzem principalmente cianidinas ou delfinidinas, sendo conseqüentemente classificados como procianidinas ou prodelfinidinas (BRUNETON, 1999). As diferentes estruturas químicas desses metabólitos podem alterar suas atividades biológicas (MIN & HART, 2003). Essa classe de compostos está presente em gimnospermas e angiospermas, principalmente em plantas lenhosas e em outras classes de vegetais utilizados para a alimentação humana e animal (SALUNKHE et al., 1990).

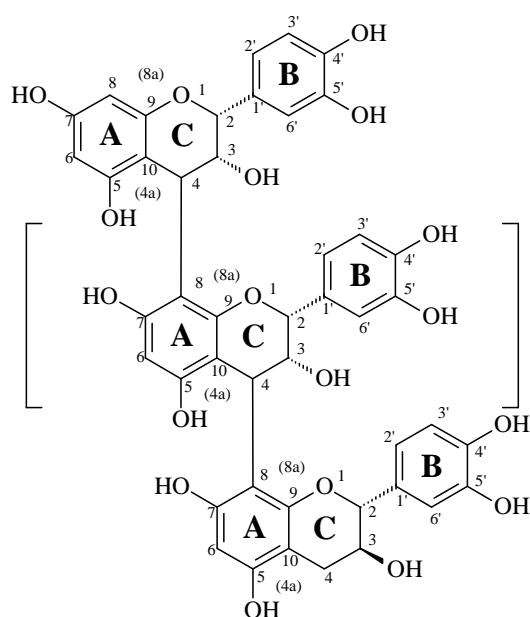


Figura 4. Tanino condensado

O papel biológico dos taninos nas plantas está relacionado com sua defesa contra fungos patogênicos, bactérias, vírus (TAKECHI et al., 1985), insetos e herbívoros (TEMMINK et al., 1989). A quantidade e o tipo de taninos sintetizados variam consideravelmente de acordo com espécie, cultivo, tecido e estado de desenvolvimento das plantas e 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), e nas partes dos vegetais expostas ao sol (HEIL et al., 2002). Segundo GETACHEW (1999), os taninos parecem ter um papel importante contra estresses ambientais, como baixa fertilidade do solo e seca.

A habilidade de formar complexos com diferentes moléculas, como proteínas, carboidratos, íons metálicos, células das membranas bacterianas e enzimas, torna os taninos

capazes de exercer atividades biológicas e farmacológicas de grande interesse medicinal (OTERO & HIDALDO, 2004; OKUDA, 2005). Entretanto, as diferenças estruturais existentes entre taninos hidrolisáveis e condensados afetam a atividade desses compostos. Os principais efeitos estão relacionados com a capacidade de interação com proteínas. Os taninos condensados apresentam alta afinidade por essas macromoléculas, ocorrendo conseqüentemente baixa degradação e absorção desses metabólitos pela corrente sanguínea (TERRILL et al., 1994), ao contrário do que acontece com os taninos hidrolisáveis, que são incapazes de reagir com as proteínas, sendo rapidamente degradados em grupos fenólicos menores (OTERO & HIDALDO, 2004). De acordo com BRUNETON (1999), quando os taninos hidrolisáveis são consumidos por ruminantes, esse compostos são rapidamente transformados em ácido gálico e absorvidos pelo trato digestivo, sendo considerados tóxicos a esses animais. Entretanto, a formação do complexo tanino condensado-proteína depende de vários fatores como pH, peso molecular e estrutura dos taninos condensados e das proteínas (MIN & HART, 2003).

Nos últimos anos, diversos autores têm investigado as atividades biológicas dos taninos condensados. Dentre essas, destaca-se a atividade anti-helmíntica sobre nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes. A maioria dos experimentos envolveu plantas da família Fabacea, como *Schinopsis* spp. (ATHANASIADOU et al., 2001), *Hedysarum coronarium* (NIEZEN et al., 2002), *Lotus corniculatus* (RAMÍREZ-RESTREPO et al., 2004), *Lotus pedunculatus* (ATHANASIADOU et al., 2005), *Onobrychis viciifolia* (HOSTE et al., 2005) e *Lespedeza cuneata* (SHAIK et al., 2006). Os efeitos desses metabólitos estão relacionados com a redução do OPG e da carga parasitária dos animais.

Duas hipóteses têm sido propostas para explicar a atividade anti-helmíntica dos taninos condensados. De acordo com uma delas, tais metabólitos podem atuar indiretamente aumentando a resposta imune do hospedeiro contra os parasitos. Devido à capacidade de complexação com proteínas, os taninos protegem essas macromoléculas da degradação ruminal aumentando, assim, a sua disponibilidade no intestino delgado (WAGHORN & McNABB, 2003). Tal fato pode ser justificado pela diferença de pH entre os compartimentos do tubo digestivo do ruminante, pois no rúmen, com pH entre 5,0 e 7,5, a proteína permanece unida aos taninos condensados, enquanto no intestino delgado, com pH menor que 3,5, a proteína é liberada (OTERO & HIDALGO, 2004). COOP & KYRIAZAKIS (2001) relataram que uma maior concentração de proteínas no intestino delgado de ruminantes causa uma melhora na resposta imune do hospedeiro contra nematóides. Entretanto, poucos estudos têm abordado esta hipótese através da avaliação dos parâmetros relacionados com o aumento

da imunidade (ATHANASIADOU et al., 2001; NIEZEN et al., 2002; ATHANASIADOU et al., 2005). Apesar disso, a possibilidade dos taninos condensados atuarem indiretamente para exercer sua atividade anti-helmíntica não deve ser descartada (HOSTE et al., 2006).

A outra hipótese que tem sido proposta para explicar a atividade anti-helmíntica dos taninos condensados é o efeito direto devido à habilidade de ligação dos taninos condensados com proteínas da cutícula, cavidade bucal, esôfago, cloaca e vulva dos nematóides alterando, dessa forma, suas propriedades químicas e físicas (THOMPSON & GEARY, 1995). Esse mecanismo de ação tem sido objeto de diversos experimentos. ATHANASIADOU et al. (2001), BUTTER et al. (2001) e MOLAN et al. (2002) demonstraram *in vitro* que a incubação de extratos vegetais ricos em taninos condensados resultou na redução de desenvolvimento, viabilidade, motilidade e migração das larvas. Esse efeito direto também foi demonstrado quando o curto período experimental não permitiu o desenvolvimento e a expressão da resposta imune de pequenos ruminantes (HOSTE et al., 2006). PAOLINI et al. (2003a) observaram que caprinos infectados com *T. colubriformis* e *Teladorsagia circumcincta* tratados com um extrato rico em taninos condensados proveniente da casca de *Schinopsis* spp., espécie vegetal conhecida popularmente como quebracho, não apresentaram aumento significativo no número de eosinófilos, mastócitos e leucócitos do abomaso. Porém, no intestino delgado do grupo tratado foi observado um maior número de mastócitos ( $p < 0,05$ ).

Embora a maioria dos experimentos tenha comprovado que os taninos condensados possuem eficácia sobre nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes, alguns fatores relacionados com as plantas, os parasitos e os hospedeiros podem influenciar sua atividade (MIN & HART, 2003; HOSTE et al., 2006; ATHANASIADOU et al., 2007).

A concentração e a estrutura dos taninos condensados presentes nas diferentes espécies de plantas provavelmente são os principais fatores moduladores da eficácia desses compostos contra os nematóides (HOSTE et al., 2006). Com relação à concentração, foi demonstrado que plantas com 3 a 4% de taninos condensados por kg de matéria seca (MS), como *H. coronarium*, *O. viciifoliae* e *L. cuneata*, foram eficazes contra nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes (NIEZEN et al., 2002; PAOLINI et al., 2003a; MIN et al., 2004). MIN & HART (2003) e WAGHORN & MCNABB (2003) relataram ainda que o consumo de plantas com baixas a moderadas concentrações desses metabólitos (3 a 6% MS) podem afetar positivamente a fisiologia e o crescimento do hospedeiro, além de aumentar a produção de leite e lã. Entretanto, a ingestão de plantas com altas concentrações de taninos condensados (7 a 8% MS) pode diminuir o apetite, alterar a fisiologia digestiva, diminuir a

digestibilidade de nutrientes e a produtividade. ATHANASIADOU et al. (2001) relataram que em ovinos que receberam extrato de quebracho, os efeitos sobre a redução do apetite foram mais evidentes do que a atividade antiparasitária. Outros autores também constataram perda de peso em animais que receberam plantas com altas concentrações de taninos condensados como *Acacia nilotica* e *Acacia karoo* (KAHIYA et al., 2003). Esse efeito antinutricional tem sido atribuído à ligação dos taninos condensados com proteínas e/ou enzimas (BECKER & MAKKAR, 1999). Altos teores desses metabólitos nas plantas atuam diminuindo a palatabilidade do alimento por meio da formação de complexos com proteínas salivares promovendo, dessa forma, uma sensação de adstringência com aumento da salivação e diminuição do consumo alimentar (WAGHORN et al., 1994) causando redução da produção de leite, carne e lã. Consequentemente é importante que os possíveis efeitos anti-nutricionais decorrentes do consumo de taninos sejam considerados simultaneamente com sua atividade anti-helmíntica.

Além da concentração de taninos condensados nas plantas, a estrutura e as características químicas desses metabólitos também podem ser importantes na regulação da sua atividade antiparasitária (HOSTE et al., 2006). MIN & HART (2003) sugeriram que uma maior proporção de prodelfinidinas do que de procianidinas nas plantas pode influenciar positivamente a eficácia dos taninos condensados sobre nematóides. MOLAN et al. (2003) relataram que as unidades básicas das prodelfinidinas foram mais eficazes *in vitro* contra diferentes estágios de vida de *T. colubriformis* do que as unidades básicas das procianidinas.

A atividade anti-helmíntica dos taninos condensados também pode ser influenciada pela espécie do parasito (HOSTE et al., 2006; ATHANASIADOU et al., 2007). ATHANASIADOU et al. (2000a), ATHANASIADOU et al. (2000b) e ATHANASIADOU et al. (2001) verificaram a administração de extrato de quebracho em ovinos causou redução na fecundidade e na carga parasitária dos nematóides intestinais *Nematodirus battus* e *T. colubriformis*, enquanto que não foram registradas alterações nas espécies abomasais *T. circumcincta* e *H. contortus*. Em caprinos, esse mesmo extrato causou redução da fecundidade de *H. contortus* e *T. colubriformis* (PAOLINI et al., 2003a; PAOLINI et al., 2003b), mas não de *T. circumcincta* (PAOLINI et al., 2003a). Essas diferenças podem ser explicadas pela biodisponibilidade de taninos condensados no trato gastrointestinal do hospedeiro. Como citado anteriormente, no abomaso, esses metabólitos permanecem unidos às proteínas, enquanto no intestino delgado, os taninos condensados são liberados (OTERO & HIDALGO, 2004). Consequentemente as espécies de nematóides que parasitam o intestino delgado dos ruminantes são mais afetadas por esses compostos.

Além da espécie do parasito, o seu estágio de desenvolvimento também pode influenciar na eficácia anti-helmíntica desses metabólitos. De acordo com HOSTE et al. (2006), quando as L3 encontram no trato digestivo um ambiente rico em taninos condensados, o principal efeito é provavelmente sobre o estabelecimento larvar. Quando ocorre a administração desses compostos após o estabelecimento dos parasitos, a atividade é somente sobre a fecundidade das fêmeas. PAOLINI et al. (2003a) e PAOLINI et al. (2003b) relataram que só foi registrada diferença significativa na carga parasitária de caprinos quando esses animais foram tratados com extrato de quebracho antes de serem infectados com L3 de *H. contortus*, *T. circumcincta* e *T. colubriformis*.

Controvérsias relacionadas com a eficácia anti-helmíntica dos taninos condensados podem também ser associadas com a espécie do hospedeiro (HOSTE et al., 2006). PAOLINI et al. (2003b) relataram que a administração de extrato de quebracho causou redução na carga parasitária de caprinos infectados experimentalmente com *H. contortus*. ATHANASIADOU et al. (2001) administraram esse mesmo extrato em ovinos infectados com *H. contortus*, mas não observaram redução na carga parasitária desses animais. Segundo ATHANASIADOU et al. (2007), ao contrário dos ovinos, os caprinos apresentam adaptações fisiológicas para neutralizar os metabólitos secundários das plantas podendo, dessa forma, aumentar o total de taninos condensados livres disponíveis para atuar contra os nematóides.

### **3 JUSTIFICATIVA**

O parasitismo por nematóides gastrintestinais é um dos maiores obstáculos da ovinocaprinocultura. Para controlar esses parasitos são utilizados anti-helmínticos sintéticos onerosos e, algumas vezes, pouco eficazes devido ao aparecimento de populações de nematóides resistentes. A utilização de plantas medicinais surge como uma alternativa de controle das nematodeoses gastrintestinais de pequenos ruminantes. Por isso, torna-se necessária a validação científica de plantas com atividade anti-helmíntica para promover o aumento da produtividade da ovinocaprinocultura e atender a demanda do mercado consumidor por produtos orgânicos. Ademais, o aproveitamento de um subproduto da indústria de frutos, o LCCV, se revela como uma prática econômica, social e ambientalmente responsável.

#### **4 HIPÓTESE CIENTÍFICA**

O extrato acetato de etila do LCCV possui atividade anti-helmíntica sobre nematóides gastrintestinais de ovinos.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo geral

- Buscar uma alternativa de controle do parasitismo gastrointestinal de pequenos ruminantes utilizando um extrato obtido de uma planta medicinal.

### 5.2 Objetivos específicos

- Analisar fitoquimicamente e quantificar os taninos do extrato acetato de etila do LCCV;
- Avaliar a atividade ovicida e larvicida do extrato acetato de etila do LCCV sobre *H. contortus*;
- Avaliar a toxicidade aguda do extrato acetato de etila do LCCV em camundongos;
- Determinar *in vivo* a eficácia do extrato acetato de etila do LCCV sobre nematóides gastrintestinais de ovinos.

## 6 CAPÍTULO

Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes  
(Atividade anti-helmíntica de *Cocos nucifera* L. sobre nematóides gastrintestinais de ovinos)

Artigo científico aceito para publicação na revista Veterinary Parasitology

### View Letter

**Date:** 02 Oct 2008  
**To:** "Claudia Maria Leal Bevilaqua" claudiam@fortalnet.com.br  
**From:** mansfie4@cvm.msu.edu  
**Subject:** Vetpar-D-08-2130R1 Decision

Ms. No. Vetpar-D-08-2130R1

Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes

Dear Dr Bevilaqua,

I am pleased to be able to inform you that your manuscript has been accepted as Research Paper for publication in Veterinary Parasitology.

The manuscript will be transferred to our Production Department. Proofs will be sent to you in due course.

With kind regards

Linda S. Mansfield  
Editor US  
Veterinary Parasitology

---

## Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes

L. M. B. Oliveira<sup>a</sup>, C. M. L. Bevilaqua<sup>a,\*</sup>, C. T. C. Costa<sup>a</sup>, I. T. F. Macedo<sup>a</sup>, R. S. Barros<sup>a</sup>, A. C. M. Rodrigues<sup>a</sup>, A. L. F. Camurça-Vasconcelos<sup>a</sup>, S. M. Morais<sup>a</sup>, Y. C. Lima<sup>a</sup>, L. S. Vieira<sup>b</sup>; A. M. C. Navarro<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Brazil; <sup>b</sup>EMBRAPA/CNPC, Brazil.

\* Corresponding author:

Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi

Fortaleza, Ceará, Brazil

CEP 60740-000

Phone: (85) 3101.9860 - Fax: (85) 3101.9840

E-mail: claudia.bevilaqua@pesquisador.cnpq.br

### Abstract

The development of anthelmintic resistance has made the search for alternatives to control gastrointestinal nematodes of small ruminants imperative. Among these alternatives are several medicinal plants traditionally used as anthelmintics. This work evaluated the efficacy of *Cocos nucifera* fruit on sheep gastrointestinal parasites. The ethyl acetate extract obtained from the liquid of green coconut husk fiber (LGCHF) was submitted to *in vitro* and *in vivo* tests. The *in vitro* assay was based on egg hatching (EHT) and larval development tests (LDT) with *Haemonchus contortus*. The concentrations tested in the EHT were 0.31, 0.62, 1.25, 2.5 and 5 mg ml<sup>-1</sup>, while in the LDT they were 5, 10, 20, 40 and 80 mg ml<sup>-1</sup>. The *in vivo* assay was a controlled test. In this experiment, 18 sheep infected with gastrointestinal nematodes were divided into three groups (n = 6), with the following doses administered: G1 - 400 mg kg<sup>-1</sup> LGCHF ethyl acetate extract, G2 - 0.2 mg kg<sup>-1</sup> moxidectin (Cydectin<sup>®</sup>) and G3 - 3% DMSO. The worm burden was analyzed. The results of the *in vitro* and *in vivo* tests were submitted to ANOVA and analyzed by the Tukey and Kruskal-Wallis tests, respectively. The extract efficacy in the EHT and LDT, at the highest concentrations tested, was 100% on egg hatching and 99.77% on larval development. The parameters evaluated in the controlled test

were not statistically different, showing that despite the significant results of the *in vitro* tests, the LGCHF ethyl acetate extract showed no activity against sheep gastrointestinal nematodes.

Keywords: Small ruminants, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, anthelmintic activity, medicinal plants, condensed tannins.

## Resumo

O desenvolvimento da resistência anti-helmíntica tornou imperativa a busca por alternativas de controle do parasitismo gastrintestinal de pequenos ruminantes. Dentre estas alternativas existem diversas plantas medicinais tradicionalmente utilizadas como anti-helmínticos. Esse trabalho avaliou a eficácia do fruto de *Cocos nucifera* sobre nematóides gastrintestinais de ovinos. O extrato acetato de etila obtido do líquido da casca do coco verde (LCCV) foi submetido a testes *in vitro* e *in vivo*. A avaliação *in vitro* foi baseada nos testes de eclosão de ovos (TEO) e desenvolvimento larvar (TDL) com *Haemonchus contortus*. As concentrações testadas no TEO foram 0,31; 0,625; 1,25; 2,5 e 5 mg ml<sup>-1</sup>, enquanto no TDL foram 5; 10; 20; 40 e 80 mg ml<sup>-1</sup>. A avaliação *in vivo* foi baseada no teste controlado. Nesse experimento, 18 ovinos infectados com nematóides gastrintestinais foram divididos em três grupos (n=6) e submetidos à administração dos seguintes tratamentos: G1 - 400 mg kg<sup>-1</sup> de extrato acetato de etila do LCCV, G2 - 0,2 mg kg<sup>-1</sup> de moxidectina (Cydectin<sup>®</sup>) e G3 - DMSO a 3%. A carga parasitária foi analisada. Os resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* foram submetidos ao ANOVA e analisados pelos testes Tukey e Kruskal-Wallis, respectivamente (p<0,05). A eficácia do extrato no TEO e TDL, nas maiores concentrações testadas, foi de 100% sobre a eclosão de ovos e de 99,77% sobre o desenvolvimento larvar. Os parâmetros avaliados no teste controlado não foram estatisticamente diferentes, mostrando que, apesar dos significativos resultados dos testes *in vitro*, o extrato acetato de etila do LCCV não apresentou atividade contra nematóides gastrintestinais de ovinos.

Palavras-chave: pequenos ruminantes, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, atividade anti-helmíntica, plantas medicinais, taninos condensados.

## Introduction

Breeding of small ruminants is a widespread economic activity in northeastern Brazil. However, gastrointestinal nematodes limit the productivity, besides causing high mortality rates in herds during the rainy season (Pinheiro et al., 2000). Epidemiological

investigations carried out in this region have shown that sheep and goats are infected by nematodes and that *Haemonchus contortus* is the most prevalent species (Silva et al, 2003).

In recent decades, gastrointestinal nematode control has generally been based on continuous and intensive use of synthetic anthelmintics. However, the high cost of these drugs and the development of nematode-resistant populations (Melo et al., 2003), along with the risk of contamination of the animal products (Herd, 1995) and environment (Hammond et al., 1997) have spurred the search for control alternatives. Among these is the use of medicinal plants, since they have the advantage of sustainable supply and are ecologically acceptable.

*Cocos nucifera* L. is a monocotyledone plant belonging to the Palmae family, which is widely distributed in northeastern Brazil. The products from the fruit have been used in popular medicine in this region for the treatment of various diseases (Esquenazi et al., 2002), including gastrointestinal parasitism (Blini and Lira, 2005). The antiparasitic activity of coconut milk was tested in mice and showed efficacy against *Syphacia obvelata*, *Aspicularis tetraptera* (Amorim and Borba, 1994) and *Vampirolepis nana* (Amorim and Borba, 1995). The liquid extracted from the coconut husk fiber has antiproliferative activity against lymphocytes (Kirszberg et al., 2003). Analgesic and antioxidant activity was also found (Alviano et al., 2004). Fractions of this liquid obtained with the ethyl acetate solvent demonstrated activity against *Staphylococcus aureus*, herpes simplex virus type 1 (Esquenazi et al., 2002) and *Leishmania amazonensis* (Mendonça-Filho et al., 2004). High performance liquid chromatography and mass spectrometry showed this extract is composed of catechin, epicatechin and condensed tannins (Esquenazi et al., 2002). The objective of this work was to evaluate *in vitro* and *in vivo* the anthelmintic activity of the ethyl acetate extract obtained from the liquid of green coconut husk fiber (LGCHF) against sheep gastrointestinal nematodes.

## Materials and methods

All proceedings were approved by the Ethical Committee of Ceará State University (number: 07227499-9).

### *Preparation of the extract*

The LGCHF was supplied by EMBRAPA/Agroindústria Tropical, located in Fortaleza, Ceará, Brazil. For this, the green coconut husk fiber, a byproduct of food processing industries, was crushed and pressed to obtain the liquid, which was filtered and

stored at -20 ° C until use. 300 l of LGCHF were placed in a decanting funnel and submitted to three washes with ethyl acetate in 10:1 proportion. The solvent was eliminated in a rotary evaporator to produce LGCHF ethyl acetate extract. To increase the solubility in aqueous medium, the extract was diluted in 3% dimethylsulfoxide (DMSO).

#### *Phytochemical analysis and total tannin quantification of the extract*

The phytochemical tests to detect the presence of phenols, tannins, catechins, leucoantocyanidins, flavonoids, steroids, triterpens, saponnins and alkaloids were performed following the method described by Matos (1997). These tests are based on visual observation of color modification or precipitate formation after addition of specific reagents.

The total tannin quantification was performed by the Folin-Denis spectrophotometric method according to Pansera (2003). For this test, 5 mg LGCHF ethyl acetate extract was diluted in 100 ml distilled water and 2 ml of this solution was added to 2 ml of Folin-Denis reagent. Subsequently, the mixture was vigorously shaken and left at rest for 3 min. Then, 2 ml of 8% sodium carbonate aqueous solution was added to the mixture, which was shaken again and left at rest for 2 h. Solutions ranging from 2 to 24 mg l<sup>-1</sup> tannic acid diluted in water were prepared to quantify total tannins. The absorbance was measured at 725 nm and a negative control was performed at each reading. The readings with three replicates per sample were performed in a spectrophotometer. An analytical calibration curve was plotted from the results.

#### *In vitro anthelmintic activity of the extract: egg hatching and larval development tests on H. contortus*

*H. contortus* eggs were recovered as described by Hubert and Kerboeuf (1992). About 10 g of feces were collected directly from an experimentally infected sheep, mixed with distilled water and filtered through sieves with 590, 149, 101 and 30 µm mesh apertures. An aliquot of egg suspension was incubated for 24 h at 37 ° C to obtain first-stage larvae (L1).

The extract was diluted in distilled water solution with 3% DMSO. The anthelmintics thiabendazole and ivermectin used as positive control in the egg hatching and larval development tests were prepared in distilled water solution with 3% DMSO and distilled water respectively.

The egg hatching test (EHT) was based on the methodology described by Coles et al. (1992). 250 µl of egg suspension, containing approximately 100 fresh eggs, and 250 µl of LGCHF ethyl acetate extract at concentrations of 0.31, 0.62, 1.25, 2.5 and 5 mg ml<sup>-1</sup> were incubated for 48 h at room temperature. Then drops of Lugol were added. The eggs and L1 were counted under a microscope. This test had two controls: a negative with 3% DMSO and a positive with 0.025 mg ml<sup>-1</sup> thiabendazole. Three repetitions with five replicates for each extract concentration and for each control were performed.

For the larval development test (LDT), 1 ml of larval suspension, containing approximately 500 L1, and 1 ml of LGCHF ethyl acetate extract at concentrations of 5, 10, 20, 40 and 80 mg ml<sup>-1</sup> were incubated with 2 g of feces from a nematode-free sheep for 6 days at room temperature. Then the third-stage larvae (L3) were recovered according to Roberts and O'Sullivan (1950) and counted under a microscope. This test had two controls: a negative with 3% DMSO and a positive with 0.008 mg ml<sup>-1</sup> ivermectin. Three repetitions with five replicates for each extract concentration and for each control were performed.

#### *Acute toxicity of the extract on mice*

Swiss albino mice (n=96) of both sexes, with average weight of 27.5 g, were kept in polypropylene boxes and fed with commercial feed (Fri-Ribe<sup>®</sup>) and water *ad libitum*. The mice were randomly divided into 12 groups (n = 8): G1 to G5 - received 1000, 1500, 2000, 2500 and 3000 mg kg<sup>-1</sup> LGCHF ethyl acetate extract by oral administration; G6 - 3% DMSO by oral administration; G7 to G11 - 500, 1000, 1500, 2000 and 2500 mg kg<sup>-1</sup> LGCHF ethyl acetate extract by intraperitoneal administration; G12 - 3% DMSO by intraperitoneal administration. After 24 h, the number of dead animals was verified.

#### *In vivo anthelmintic activity of the extract: Controlled test in sheep*

Sheep (n=18) of undefined breed, of both sexes, aged from 6 to 12 months and with average weight of 21 kg, were kept in paddocks and fed with fresh grass, mineral salt and water *ad libitum*. Individual fecal samples were collected to determine the level of gastrointestinal nematode infection by using a modified McMaster technique (Ueno and Gonçalves, 1998). The animals with egg counts per gram of feces (epg) less than 1000 were inoculated three times with 1500 *H. contortus* L3 on alternate days. The sheep with epg higher than 1000 were inoculated with a single dose of 1500 *H. contortus* L3. After 21 days,

another egg was carried out and the sheep were divided into three homogeneous (mean egg of the group 6000) groups (n = 6): G1 - received 400 mg kg<sup>-1</sup> LGCHF ethyl acetate extract for three consecutive days; G2 - a single dose of 0.2 mg kg<sup>-1</sup> moxidectin (Cydectin<sup>®</sup>); G3 - 3% DMSO for three consecutive days. The protocol was by oral administration. Seven days after the end of treatment, the sheep were euthanized and submitted to necropsy to count the worm burden of the abomasum, small and large intestines (Gaba et al., 2006).

### *Statistical analysis*

The efficacy of each treatment in the egg hatching test was determined by the formula:  $L1 / (L1 + \text{eggs}) \times 100$ , while in the larval development test the formula was:  $(L3 \text{ in the negative control group} - L3 \text{ in the treated group}) / L3 \text{ in the negative control group} \times 100$ . The results of the *in vitro* tests were expressed as mean efficacy percentage of egg hatching or larval development inhibition  $\pm$  standard deviation. Data were analyzed by ANOVA and compared by the Tukey test ( $P < 0.05$ ), the effective concentration to inhibit 50% (EC<sub>50</sub>) of egg hatching and larval development, values the 95% confidence limits, R<sup>2</sup> and hill slope were determined using the Prism 3.0 program.

The lethal doses to kill 50% (LD<sub>50</sub>) and 10% (LD<sub>10</sub>) of the mice were calculated for each administration route from the acute toxicity test by SPSS 8.0 for Windows.

In the controlled test, the efficacy of each treatment was determined by the formula:  $(\text{worm burden of negative control group} - \text{worm burden of treated group}) / \text{worm burden of negative control group} \times 100$ . The results of the *in vivo* test were expressed as mean efficacy percentage of worm burden reduction  $\pm$  standard deviation. They were analyzed by ANOVA and compared by the Kruskal-Wallis test ( $P < 0.05$ ) using the Prism 3.0 program.

### Results

The yield of ethyl acetate extract from the 300 l of LGCHF, after solvent evaporation, was approximately 210 g. The phytochemical analysis revealed the presence of catechins, condensed tannins, flavonoids and steroids. The quantification of total tannins was 25.87%.

Table 1 shows the mean efficacy of LGCHF ethyl acetate extract on *H. contortus* egg hatching. The  $EC_{50}$  in the egg hatching test was  $2.20 \text{ mg ml}^{-1}$ , 95% confidence limits ranged from  $2.08$  to  $2.32 \text{ mg ml}^{-1}$ . The  $R^2$  and hill slope were  $0.96$  and  $4.23$ , respectively.

Table 1. Mean efficacy percentage  $\pm$  sd of ethyl acetate extract obtained from the liquid of green coconut husk fiber (LGCHF) on *Haemonchus contortus* egg hatching.

Treatment	Concentration	Mean efficacy $\pm$ sd
Ethyl acetate extract	$5 \text{ mg ml}^{-1}$	$100.00 \pm 0.0^a$
Ethyl acetate extract	$2.5 \text{ mg ml}^{-1}$	$68.45 \pm 15.38^b$
Ethyl acetate extract	$1.25 \text{ mg ml}^{-1}$	$17.12 \pm 4.87^c$
Ethyl acetate extract	$0.62 \text{ mg ml}^{-1}$	$10.53 \pm 4.05^d$
Ethyl acetate extract	$0.31 \text{ mg ml}^{-1}$	$8.75 \pm 2.45^d$
Thiabendazole	$0.025 \text{ mg ml}^{-1}$	$99.36 \pm 0.96^a$
Dimethylsulfoxide	3%	$9.02 \pm 2.16^d$

Different letters indicate significantly difference ( $P < 0.05$ ).

Table 2 presents the mean efficacy of LGCHF ethyl acetate extract on *H. contortus* larval development. The  $EC_{50}$  in the larval development test was  $40.56 \text{ mg ml}^{-1}$ , 95% confidence limits ranged from  $35.46$  to  $46.40 \text{ mg ml}^{-1}$ . The  $R^2$  and hill slope were  $0.97$  and  $2.37$ , respectively.

Table 2. Mean efficacy percentage  $\pm$  sd of ethyl acetate extract obtained from the liquid of green coconut husk fiber (LGCHF) on *Haemonchus contortus* larval development.

Treatment	Concentration	Mean efficacy $\pm$ sd
Ethyl acetate extract	$80 \text{ mg ml}^{-1}$	$99.77 \pm 0.35^a$
Ethyl acetate extract	$40 \text{ mg ml}^{-1}$	$58.90 \pm 10.12^b$
Ethyl acetate extract	$20 \text{ mg ml}^{-1}$	$20.71 \pm 6.86^c$
Ethyl acetate extract	$10 \text{ mg ml}^{-1}$	$2.49 \pm 3.81^d$
Ethyl acetate extract	$5 \text{ mg ml}^{-1}$	$3.48 \pm 4.73^d$
Ivermectin	$0.008 \text{ mg ml}^{-1}$	$99.68 \pm 0.40^a$
Dimethylsulfoxide	3%	$2.23 \pm 3.32^d$

Different letters indicate significantly difference ( $P < 0.05$ ).

At all concentrations tested, LGCHF ethyl acetate extract presented no acute oral toxicity in mice. The LD<sub>10</sub> and LD<sub>50</sub> calculated after intraperitoneal administration of the extract were 650 (0.44-1038.5) mg kg<sup>-1</sup> and 1233.9 (237.68-2089.14 mg kg<sup>-1</sup>), respectively.

Table 3 demonstrates the mean efficacy of LGCHF ethyl acetate extract on sheep worm burden. In the abomasum and small intestine only *H. contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* were found, respectively. In the large intestine, *Oesophagostomum columbianum* and *Trichuris ovis* were present. However, due to the small number of specimens, the worm burden of this organ was not statistically analyzed. The extract's effect did not differ significantly from that of 3% DMSO (P>0.05). The effect on *H. contortus* also was not statistically different between positive and negative control groups (P>0.05). However, moxidectin showed anthelmintic efficacy on *T. colubriformis* and total worm burden (P<0.05).

Table 3. Mean efficacy percentage ethyl acetate extract obtained from the liquid of green coconut husk fiber (LGCHF) and mean adult nematodes  $\pm$  sd recuperated from sheep treated.

Treatment		<i>Haemonchus contortus</i>	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Worm burden
400 mg kg <sup>-1</sup> ethyl acetate extract	Adult $\pm$ sd	261.5 $\pm$ 121.5 <sup>A</sup>	271.5 $\pm$ 136.0 <sup>A</sup>	537.3 $\pm$ 239.8 <sup>A</sup>
	Efficacy $\pm$ sd	4.77 $\pm$ 11.69 <sup>a</sup>	18.69 $\pm$ 30.28 <sup>a</sup>	8.95 $\pm$ 21.92 <sup>a</sup>
0.2 mg kg <sup>-1</sup> moxidectina	Adult $\pm$ sd	107.0 $\pm$ 67.39 <sup>A</sup>	17.83 $\pm$ 22.27 <sup>B</sup>	125.0 $\pm$ 61.36 <sup>B</sup>
	Efficacy $\pm$ sd	28.77 $\pm$ 40.26 <sup>a</sup>	93.44 $\pm$ 8.18 <sup>b</sup>	66.73 $\pm$ 16.33 <sup>b</sup>
3% dimethylsulfoxide	Adult $\pm$ sd	192.0 $\pm$ 147.3 <sup>A</sup>	333.5 $\pm$ 222.9 <sup>A</sup>	527.2 $\pm$ 377.6 <sup>A</sup>
	Efficacy $\pm$ sd	24.41 $\pm$ 37.84 <sup>a</sup>	23.04 $\pm$ 25.55 <sup>a</sup>	13.57 $\pm$ 33.23 <sup>a</sup>

Capital letters compare adult means and small letters mean efficacy. Different letters indicate significantly different values (P<0.05).

## Discussion

This work was carried out in order to find a phytotherapeutic to help control gastrointestinal nematodes in small ruminants and to provide an alternative use of a food processing byproduct. Moreover, the use of LGCHF is important from an economic, social and environmental standpoint, because about 80% to 85% of the gross weight of green coconut is typically thrown out as garbage (Carrijo et al., 2002).

The LGCHF ethyl acetate extract showed ovicidal efficacy on *H. contortus* higher than other plant extracts. 50 mg ml<sup>-1</sup> of the ethyl acetate extract of *Spigelia anthelmia* inhibited 100% egg hatching (Assis et al., 2003). The aqueous extract of the *Annona senegalensis* leaves inhibited 11.5% egg hatching at a concentration of 7.1 mg ml<sup>-1</sup> (Alawa et al., 2003). Maciel et al. (2006) reported 16.92% efficiency on egg hatch inhibition using 50 mg ml<sup>-1</sup> of hexane extract from *Melia azedarach* leaves. 50 mg ml<sup>-1</sup> of ethyl acetate extract from *Azadirachta indica* inhibited 51.31% of egg hatching (Costa et al., 2008). However, the larvicidal effectiveness of LGCHF ethyl acetate extract was lower than that of other plant extracts.

Although the LGCHF ethyl acetate extract showed 100% efficiency on egg hatching and 99.77% on larval development of *H. contortus*, the concentrations used to obtain these results were high, 5 and 80 mg ml<sup>-1</sup>, respectively, compared with thiabendazole (0.025 mg ml<sup>-1</sup>) and ivermectin (0.008 mg ml<sup>-1</sup>) used as positive control. This fact can be explained by the presence of small concentrations of the active ingredient in the plant extracts (Rates, 2001), among these the compound with ovicidal and larvicidal activity, unlike synthetic anthelmintics, where the chemical compounds are isolated in pure form.

The phytochemical analysis of LGCHF ethyl acetate extract showed the presence of different chemical compounds, among them condensed tannins. This finding is consistent with the results of Esquenazi et al. (2002) in an experiment conducted to verify the antibacterial and antiviral activity of the ethyl acetate extract obtained from coconut husk fiber. Condensed tannins are polyphenolic compounds derived from plants' secondary metabolism. Several experiments have demonstrated their anthelmintic activity (Molan et al., 2000; Athanasiadou et al., 2001; Niezen et al., 2002; Paolini et al., 2003). Two hypotheses put forward to explain the antiparasitic action of these compounds. First, the direct hypothesis, that is the ability of condensed tannins to interact with proteins of the cuticle, oral cavity, esophagus, cloaca and vulva of nematodes, changing their chemical and physical properties. Second, the indirect hypothesis, that is capacity of condensed tannins to bind of dietary protein and protect them from rumen degradation and increase protein flow to and amino acid absorption by the small intestine improving immune response host against worms. However the role of these metabolites for immunity in sheep against nematodes needs to be better established (Hoste et al., 2006). Although the high percentage of total tannins could be responsible for the *in vitro* anthelmintic effect observed, the activity of catechins, flavonoids and steroids should not be discarded. In addition, the synergistic action of the constituents present in the extract should also be considered (Rates, 2001).

After obtaining promising results in *in vitro* tests, a next step to assess the anthelmintic activity of medicinal plants is toxicology studies in laboratory animals, which will enable defining the dose to be tested in producing animals. Orally LGCHF ethyl acetate extract did not cause acute toxicity. This may be justified by poor absorption of the extract, detoxification by the liver (Loolis and Hayes, 1996) or degradation by the digestive enzymes of the stomach and gut (Spinosa et al., 2002) during oral administration, while with intraperitoneal administration systemic absorption occurs and the toxic effects are stronger and appear earlier (Loolis and Hayes, 1996). The low oral toxicity of the extract obtained from coconut husk fiber was also proven by Alviano et al. (2004).

The traditional use of *C. nucifera* against gastrointestinal parasites, the presence of condensed tannins in LGCHF ethyl acetate extract, the high levels of total tannins, the promising *in vitro* results and the low acute toxicity in laboratory animals justifies the assessment of *in vivo* anthelmintic activity of the extract. The controlled test is the most reliable method for evaluation of anthelmintic effectiveness in ruminants, with a recommendation for dose confirmation or titration (Wood et al., 1995). Extracts from *Myrsine africana* and *Rapanea melanophloeos*, traditionally used in Kenya to reduce the parasitism of small ruminants, did not decrease the epg of sheep experimentally infected with *H. contortus* (Githiori et al., 2002). The essential oil of *Chenopodium ambrosioides*, used for many years to control parasites in dogs, cats and humans, did not reduce the epg and worm burden of goats naturally and experimentally infected with *H. contortus* (Ketzis et al., 2002). The leaves of *Azadirachta indica*, known for their various medical applications, showed no anthelmintic effect in sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes (Costa et al., 2006).

Different hypotheses can explain the lack of *in vivo* anthelmintic activity of LGCHF ethyl acetate extract: biotransformation of active substances of the extract, the extract dose or duration of treatment (Hennessy, 1997). Therefore, in accordance with the protocol used in this experiment, the ethyl acetate extract obtained from the liquid of green coconut husk fiber presented no anthelmintic activity against sheep gastrointestinal nematodes.

#### Acknowledgements

We would like to thank Morsyleide de Freitas Rosa of EMBRAPA/Agroindústria Tropical, Helena Araújo da Ponte and Felipe Cavalcante Machado of EMBRAPA/CNPC for their assistance and CAPES for a scholarship. Dr. Bevilaqua has a grant from the National Research Council (CNPq).

## References

- Alawa, C.B.I., Adamu, A.M., Gefu, J.O., Ajanusi, O. J.; Abdu, P.A., Chiezey, N.P., Alawa, J.N.; Bowman, D.D., 2003. *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants (*Vermonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. *Vet. Parasitol.* 113, 73-81.
- Alviano, D.S.; Rodrigues, K.F.; Leitão, S.G.; Rodrigues, M.L.; Matheus, M.E.; Fernandes, P.D.; Antonioli, A.R.; Alviano, C.S., 2004. Antinociceptive and free radical scavenging activities of *Cocos nucifera* L. (Palmae) husk fiber aqueous extract. *J. Ethnopharmacol.* 92, 269–273.
- Amorim A.; Borba, H.R., 1994. Ação anti-helmíntica de plantas X. Testes “in vivo” com extratos brutos de *Cocos nucifera* L. (Palmae). *Rev. Bras. Farm.* 75, 91-92.
- Amorim, A.; Borba, H.R., 1995. Ação anti-helmíntica de plantas XI. Influência de extratos brutos de *Cocos nucifera* L. (Palmae) na eliminação de *Vampirolepis nana* em camundongos. *Rev. Bras. Farm.* 76, 98-99.
- Assis, L. M., Bevilaqua, C.M.L., Morais, S.M., Vieira, L.S., Costa, C.T.C, Sousa, J.A., 2003. Atividade anti-helmíntica *in vitro* de *Spigelia anthelmia* sobre *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. (Ed.), 2005. Salvando vidas com a medicina natural. Unier, São Paulo, 479 pp.
- Carrijo, O.A., Liz, R.S.; Makishima, N., 2002. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. *Hortic. Bras.* 20, 533-535.
- 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., Maciel, M.V., Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Morais, S.M., Monteiro, M.V.B., Farias, V.M., Silva, M.V., Souza, M.M.C., 2006. Anthelmintic activity of *Azadirachta indica* A. Juss against sheep gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 137, 306-310.
- 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.

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.

Gaba, S., Chadoeuf, J., Monestiez, P., Sauve, C., Cortet, J., Cabaret, J., 2006. Estimation of abomasum strongyle nematode infections in sheep at necropsy: Tentative proposals for a simplified technique. Vet Parasitol. 140, 105-113.

Githiori, J.B., Höglund, J., Waller, P.J., Baker, R.L., 2002. Anthelmintic activity of preparations derived from *Myrsine Africana* and *Rapanea melanophloeos* against the nematode parasite, *Haemonchus contortus*, of sheep. J. Ethnopharmacol. 80, 187-191.

Hammond, J.A., Fielding, D., Bishop, S.C., 1997. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. Vet. Res. Commun. 21, 213-228.

Hennessy, D.R., 1997. Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of anthelmintic compounds. Vet. Parasitol. 72, 367-390.

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.

Ketzis, J.K., Taylor, A., Bowman, D.D., Brown, D.L., Warnick, L.D., Erb, H.N., 2002. *Chenopodium ambrosioides* and its essential oil as treatments for *Haemonchus contortus* and mixed adult-nematode infections in goats. Small Rumin. Res. 44, 193-200.

Kirszberg, C., Esquenazi, D., Alviano, C.S., Rumjaneka, V.M., 2003. The effect of a catechin-rich extract of *Cocos nucifera* on lymphocytes proliferation. Phytother. Res. 17, 1054-1058.

Loomis, T.A., Hayes, A.W., 1996. Loomis's Essentials of Toxicology. 4<sup>a</sup> ed., Academic Press, San Diego, 282 pp.

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, F.J.A., 1997. Introdução à fitoquímica experimental. 2<sup>a</sup> ed., Edições UFC, Fortaleza, 141pp.

- 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-helmínticos em rebanhos de ovinos e caprinos no 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 polyphenol-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn (Palmae). *Res. Microbiol.* 155, 136-143.
- Molan, A.L., Hoskin, S.O., Barry, T.N., McNabb, W.C., 2000. Effect of condensed tannins extracted from four forages on the viability of the larvae of deer lungworms and gastrointestinal nematodes. *Vet. Rec.* 147, 44-48.
- Niezen, J.H., Charleston, W.A.G.; Robertson, H.A.; Shelton, D.; Waghorn, G.C.; Green, R., 2002. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 105, 229-245.
- 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.
- Pinheiro, R.R., Gouveia, A.M.G., Alves, F.S.F., Haddad, J.P.A., 2000. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 52, 534-543.
- 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.
- Silva, W.W., Bevilaqua, C.M.L., Rodrigues, M.L.A., 2003. Variação sazonal de nematóides gastrintestinais em caprinos traçadores no Semi-árido Paraibano-Brasil. *Rev. Bras. Parasit. Vet.* 12, 71-75.
- Spinosa, H.S., Górnaiak, S.L., Bernardi, M.M., 2002. *Farmacologia aplicada à medicina veterinária.* 3ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 752 pp.
- Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1998. *Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes.* 4ª ed., JIICA, Tokyo, 143 pp.
- Wood, I.B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan, J. L., Kassai, T., Malone, J.B., Pankavich, J. A., Reinecke, R.K., Slocombe, O., Taylor, S. M., Vercruyse, J., 1995. *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). *Vet.Parasitol.* 58, 181-213.

## **7 CONCLUSÕES GERAIS**

De acordo com o protocolo utilizado nesse trabalho, o extrato acetato de etila obtido do LCCV não apresentou atividade anti-helmíntica sobre nematóides gastrintestinais de ovinos.

## **8 PERSPECTIVAS**

Embora o extrato acetato de etila obtido do LCCV não tenha sido eficaz contra nematóides gastrintestinais de ovinos, a validação científica de plantas medicinais não deve ser desmotivada, pois a utilização da fitoterapia como alternativa de controle do parasitismo gastrintestinal de pequenos ruminantes pode promover aumento na produtividade da ovinocaprinocultura e atender a demanda do mercado consumidor por produtos orgânicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEMOLA, I. O.; FAGBEMI, B. O.; IDOWU, S. O. Evaluation of the anthelmintic activity of *Khaya senegalensis* extract against gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* e *in vivo* studies. *Vet. Parasitol.*, v. 122, p. 151-164, 2004.
- AKHTAR, M. S.; IQBAL, Z.; KHAN, M. N.; LATEEF, M. Anthelmintic activity of medicinal plants with particular reference to their use in animals in the Indo – Pakistan subcontinent. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 38, p. 99-107, 2000.
- ALAWA, C. B. I.; ADAMU, A. M.; GEFU, J. O.; AJANUSI, O. J.; ABDU, P. A.; CHIEZEY, N. P.; ALAWA, J. N.; BOWMAN, D. D. *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plants (*Vermonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. *Vet. Parasitol.*, v. 113, p. 73-81, 2003.
- ÁLVAREZ-SANCHÉZ, M. A.; GARCÍA, J. P.; BARTLEY, D.; JACKSON, F.; ROJO-VÁZQUEZ, F. A. The larval feeding inhibition assay for diagnosis of nematode anthelmintic resistance. *Exp. Parasitology.*, v.110, p.56-61, 2005.
- ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Cad. Tem. Quim. Nova Escola.*, n. 3, p. 10- 15, 2001.
- ALVIANO, D. S.; 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. *J. Ethnopharmacol.*, v. 92, p. 269–273, 2004.
- AMORIM A.; BORBA, H. R. Ação anti-helmíntica de plantas X. Testes “*in vivo*” com extratos brutos de *Cocos nucifera* L. (Palmae). *Rev. Bras. Farm.*, v. 75, p. 91-92, 1994.
- 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. *Rev. Bras. Farm.*, v. 76, p. 98-99, 1995.
- 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. *Rev. Árvore.*, v. 28, n. 5, p.7 07-714, 2004.
- AROSEMENA, N. A. E.; BEVILAQUA, C. M. L.; MELO, A. C. F. L.; GIRÃO, M. D. Variations saisonnières de la prévalence des nématodes gastro-intestinaux des ovins et caprins d'une zone semi-aride du Brésil. *Rev. Med. Vet.*, v. 150, p. 873-876, 1999.

- 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*. *Vet. Parasitol.*, v. 117, p. 43-49, 2003.
- 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. *Vet Parasitol.*, v. 99, p. 205-219, 2001.
- ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; COOP, R. L. Effects of short-term exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Rec.*, v. 146, p. 728-732, 2000a.
- ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R. L. Consequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasited with *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.*, v. 30, p. 1025-1033, 2000b.
- ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 63, p. 631-639, 2004.
- ATHANASIADOU, S.; TZAMALOUKAS, O.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R. L. Testing for direct anthelmintic effects of bioactive forages against *Trichostrongylus colubriformis* in grazing sheep. *Vet. Parasitol.*, v. 127, p. 233-243, 2005.
- ATHANASIADOU, S.; GITHIORI, J.; KYRIAZAKIS, I. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Animal.*, v. 1, n. 9, p. 1392-1400, 2007.
- BIZIMENYERA, E. S.; GITHIORI, J. B.; ELOFF, J.N.; SWAN, G.E. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.*, v. 142, p. 336-343, 2006.
- BECKER, K.; MAKKAR, H. P. S. Effects of dietary tannic acid and quebracho tannin on growth performance and metabolic rates of common carp (*Cyprinus carpio* L.) *Aquaculture.*, v. 175, p. 327-335, 1999.
- BUTTER, N. L.; DAWSON, J.M.; WAKELIN, D.; BUTTERY, P. J. Effect of dietary condensed tannins on gastrointestinal nematodes. *J. Agri. Sci.*, v. 137, p. 461-469, 2001.
- BLINI, W.; LIRA, C.M. *Salvando vidas com a medicina natural*. São Paulo: UNIER, p. 479, 2005.
- BRUNETON, J. Tannins. In: *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*. 3. ed., Tec and Doc, p. 370-404, 1999.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 33, p. 179-189, 2000.

- 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 anti-helmíntica. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v. 7, n. 3, p. 97-106, 2005.
- 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. *Vet. Parasitol.*, v. 148, p. 288-294, 2007.
- CARRIJO, O.A.; LIZ, R.S.; MAKISHIMA, N. Fibra da casca do coco verde como substrato agrícola. *Hortic. Bras.*, v. 20, n. 4, p. 533-535, 2002.
- CHAGAS, A. C. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. *Rev. Brasil. Parasitol. Vet.*, v. 13, p. 156-160, 2004.
- CHAN, E.; ELEVITCH, C. R. Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. *Cocos nucifera* (coconut) [on line]. Disponível no site [www.traditionaltree.org](http://www.traditionaltree.org). Acesso em 03/2006.
- COLES, G. C.; BAUER, F. H. M.; BORGSTEEDE, S.; GREERTS, S.; KLEI, M. A.; WALLER, P. J. 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.*, v. 44, p. 35-44, 1992.
- COOP, R. L.; KYRIAZAKIS, I. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends Parasitol.*, v. 17, n. 7, p. 325-330, 2001.
- 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*. *Rev. Brasil. Parasitol. Vet.*, v. 11, p. 57-60, 2002.
- 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 Rumin. Res.*, v. 74, p. 284-287, 2008.
- CRAVEN, J.; BJORN, H.; BARNES, E. H.; HENRIKSEN, S. A.; NANSEN, P. A comparison of *in vitro* tests and faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles. *Vet. Parasitol.*, v. 85, p. 49-59, 1999.
- 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*. *J. Ethnopharmacol.*, 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. *Res. Microbiol.*, v. 153, p. 647-652, 2002.
- GALVEZ, J. M. G.; RIEDL, B.; CONNER, A. H. Analytical studies on tara tannins. *Holzforschung.*, v. 51, n. 3, p.2 35-243, 1997.
- GETACHEW, G. *Tannins in tropical multipurpose tropical species: localization and quantification of tannins using histochemical approaches and the effect of tannins on in vitro rumen fermentation.*, Stuttgart: Verlag Ulrich E. Grauer, p. 186, 1999.
- GATHUMA, J. M.; MBARIA, J. M.; WANYAMA, J.; KABURIA, H. F. A.; MPOKE, L.; MWANGI, J. N.; SAMBURU; HEALERS, T. Efficacy of *Myrsine africana*, *Albizia anthelmintica* and *Hilderbrandtia sepalosa* herbal remedies against mixed natural sheep helminthosis in Samburu district, Kenya. *J. Ethnopharmacol.*, v. 91, p. 7-12, 2004.
- GEARY, T. G.; SANGSTER, N. C.; THOMPSON, D. P. Frontier in anthelmintic pharmacology. *Vet. Parasitol.*, v. 84, p. 275-295, 1999.
- GITHIORI, J. B.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet. Parasitol.*, v. 139, p. 308-320, 2006.
- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Aspects Med.*, v. 27, p. 1-93, 2006.
- HAMMOND, J. A.; FIELDING, D.; BISHOP, S. C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Vet. Res. Commun.*, v. 21, p. 213-228, 1997.
- HEIL, M.; BAUMANN, B.; ANDARY, C.; LINSENMAIR, K. E.; McKEY, D. Extraction and quantification of “condensed tannins” as a measure of plant anti-herbivore defence? Revisiting an old problem. *Naturwissenschaften.*, v. 89, p. 519–524, 2002.
- HÖRDEGEN, P.; HERTZBERG, H.; HEILMANN, J.; LANGHANS, W. The anthelmintic efficacy of five plant products against gastrointestinal trichostrongylids in artificially infected lambs. *Vet. Parasitol.*, v. 117, p. 51-60, 2003.
- HOSTE, H.; GAILLARD, L.; FRILEUX, Y. Consequences of the regular distribution of sainfoin hay on gastrointestinal parasitism with nematodes and milk production in dairy goats dairy goats. *Small Rumin. Res.*, v. 59, p. 265-271, 2005.
- HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M.; HOSKIN S. O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants *Trends Parasitol.*, v. 22, p. 253-261, 2006.

- HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet. Record.*, v. 130, p. 442-446, 1992.
- IQBAL, Z.; LATEEF, M.; JABBAR, A.; GHAYUR, M. N.; GILANI, A. H. *In vivo* anthelmintic activity of *Butea monosperma* against Trichostrongylid nematodes in sheep. *Fitoterapia.*, v. 77, p. 137-140, 2006.
- JABBAR, A.; ZAMANA, M. A.; IQBAL, Z.; YASEEN, M.; SHAMIM, A. Anthelmintic activity of *Chenopodium album* (L.) and *Caesalpinia crista* (L.) against trichostrongylid nematodes of sheep. *J. Ethnopharmacol.*, v. 114, p. 86-91, 2007.
- JACKSON, F.; COOP, R. L. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitol.*, v.120, p.95-107, 2000.
- KAHIYA, C.; MUKARATIRWA, S.; THAMSBORG, S. M. Effects of *Acacia nictitica* and *Acacia karoo* diets on *Haemonchus contortus* infection in goats. *Vet. Parasitol.*, v. 115, p. 265-274, 2003.
- KIRSZBERG, C.; ESQUENAZI, D.; ALVIANO, C. S.; RUMJANEKA, V. M. The effect of a catechin-rich extract of *Cocos nucifera* on lymphocytes proliferation. *Phytother. Res.*, v. 17, p. 1054-1058, 2003.
- LANUSSE, C. E. Farmacologia dos compostos anti-helmínticos. In: PADILHA, T. (ed). *Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes*. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, p. 4, 1996.
- LE JAMBRE, L. F. Egg hatch as an *in vitro* assay of thiabendazole resistance in nematodes. *Vet. Parasitol.*, v. 2, p.385-391, 1976.
- LEWIS, N. G.; YAMAMOTO, E. Tannins: their place in plant metabolism. In: HEMINGWAY, R. W; KARCHESY, J. J. *Chemistry and significance of condensed tannins*. New York: Plenum Press, p. 23-46, 1989.
- LI, J.; MAPLESDEN, F. Commercial production of tannins from radiata pine bark for wood adhesives. *IPENZ Transactions.*, v. 25, p. 46-52, 1998.
- MATOS, F. J. A. Plantas medicinais: *guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil*. 3. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, p. 41-182, 2007.
- 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*. *Vet. Parasitol.*, v. 140, p. 98-104, 2006.
- MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS G.; BECKER, K. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *Animal.*, v. 1, n. 9, p. 1371-1391, 2007.

- MATTOS, M. J. T.; OLIVEIRA, C. M. B.; GOUVEA, A. S.; ANDRADE, C. B. *Haemochus resistente* à lactona macrocíclica em caprinos naturalmente infectados. *Cienc. Rural.*, v. 34, p. 879-883, 2004.
- McGAW, L. J.; ELOFF, J. N. Ethnoveterinary use of southern African plants and scientific evaluation of their medicinal properties. *J. Ethnopharmacol.*, *in press*, 2008.
- MELO, A. C. F. L.; REIS, I. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; VIEIRA, L. S.; ECHEVARRIA, F. A. M.; MELO, L. M. Nematóides resistentes a anti-helmínticos em rebanhos de ovinos e caprinos no Estado do Ceará, Brasil. *Cienc. 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 polyphenol-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn (Palmae). *Res. Microbiol.*, v. 155, p. 136-143, 2004.
- MIN, B. R.; HART, S. P. Tannins for suppression of internal parasites. *J. Anim. Sci.*, v. 81, p. 102-109, 2003.
- MIN, B. R.; POMROY, W. E.; HART, S. P.; SAHLU, T. The effect of short-term consumption of a forage containing condensed tannins on gastro-intestinal nematode parasite infections in grazing wether goats. *Small Rumin. Res.*, v. 51, p. 279-283, 2004.
- MOLAN, A. L.; WAGHORN, G. C.; McNABB, W. C. Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis* *in vitro*. *Vet Rec.*, v. 150, p. 65-69, 2002.
- MOLAN, A. L.; MEAGHER, L. P.; SPENCER, P. A.; SIVAKUMARAN, S. Effect of flavan-3-ols on *in vitro* egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *Int. J. Parasitol.*, v. 33, p. 1691-1698, 2003.
- NIEZEN, J. H.; CHARLESTON, W. A. G.; ROBERTSON, H. A.; SHELTON, D.; WAGHORN, G. C.; GREEN, R. The effect of feeding sulla (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lamb parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.*, v. 105, p. 229-24, 2002.
- OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, v. 66, p. 2012-2031, 2005.
- OMENA, M. C.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAULA, J. E.; LUNA, J. S.; LIMA, M. R. F.; SANT'ANA, A. E. G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. *Bioresour. Technol.*, v. 98, p. 2549-2556, 2007.

- 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). *Livest. Res. Rural Dev.*, v. 16, n. 2, 2004.
- PAOLINI, V.; FRAYSSINES, A.; FARGE, F.; DORCHIES, P.; HOSTE, H. Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Vet. Res.*, v. 34, p. 331–339, 2003a.
- PAOLINI, V.; BERGEAUD, C.; GRISEZ, F.; DORCHIES, P.; HOSTE, H. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.*, v. 113, p. 253-261, 2003b.
- PESSOA, L. M.; MORAIS, S. M.; BEVILAQUA, C. M.; LUCIANO, J. H. S. Anthelmintic activity essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.*, v. 109, p. 59-63, 2002.
- PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; IIADDAD, J. P. Aspectos epidemiológicos na caprinocultura cearense. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 52, n. 5, p. 534-543, 2000.
- RAMIREZ-RESTREPO, C. A.; BARRY, T. N.; LÓPEZ-VILLALOBOS, P. D.; KEMP, P. D.; McNABB, W. C. Use of *Lotus corniculatus* containing condensed tannins to increase lamb and wool production under commercial dryland farming conditions without the use of anthelmintics. *An. Feed Sci Techn.*, v. 117, p. 85-105, 2004.
- ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, P. J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastrointestinal tract of cattle. *Aust. J. Agric. Res.*, v. 1, p. 99-102, 1950.
- RODRIGUES, M. L. A., AMORIM, A., BORBA, H. R. Ação anti-helmíntica de plantas. V. Ação do cipó-cravo (*Tynanthus fasciculatus* Miers, Bignonaceae) *in vitro* sobre larvas de primeiro e terceiro estágio de estrogilídeos intestinais de equino. *Rev. Bras. Farm.*, v. 72, p. 53 - 55, 1991.
- RODRIGUES, A. B.; ATHAYDE, A. C. R.; RODRIGUES, O. G.; SILVA, W. W.; FARIA, E. B. Sensibilidade dos nematóides gastrintestinais de caprinos a anti-helmínticos na mesorregião do Sertão Paraibano. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 27, n. 4, p. 162-166, 2007.
- RODRIGUES, S.; PINTO, G. A. S. Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder. *J. Food Engineering.*, v. 80, p. 869-872, 2007.
- ROSA, M. F.; SANTOS, F. J. S.; MONTENEGRO, A. A. T.; ABREU, F. A. P.; CORREIA, D.; ARAUJO, F. B. S.; NORÔES, E. R. V. *Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001.

- SALUNKHE, D. K.; CHAVAN, J. K.; KADAM, S. S. Dietary tannins: *Consequences and remedies*. Boca Raton: CRC, p. 1-310, 1990.
- SHAIK, S. A.; TERRILL, T. H.; MILLER, J. E.; KOUAKOU, B.; KANNAN, G.; KAPLAN, R. M.; BURKE, J. M.; MOSJIDIS, J. A. *Sericea lespedeza* hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Vet. Parasitol.*, v. 139, p. 150-157, 2006.
- SILVA, W. W.; BEVILAQUA, C. M. L.; RODRIGUES, M. L. A. Variação sazonal de nematóides gastrintestinais em caprinos traçadores no Semi-árido Paraibano-Brasil. *Rev. Brasil. Parasitol. Vet.*, v. 12, n. 2, p. 71-75, 2003.
- 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. 1050, 2000.
- 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.; AHMAD, F.; SHAWL, A. S.; TANTRAY, M. A. Evaluation of anthelmintic activity of *Iris hookeriana* against gastrointestinal nematodes of sheep. *J. Helminthol.*, v. 82, p. 135-141, 2008.
- TEMMINK, J.H. M.; FIELD, J. A.; VANHAASTRECHT, J. C.; MERKELBACH, R. C. M. acute and sub-acute toxicity of bark tannins in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Water Res.*, v. 23, p. 341-344, 1989.
- TAYLOR, M.A., HUNT, K. R., GOODYEAR, K. L. Anthelmintic resistance detection methods. *Vet. Parasitol.*, v. 103, p. 183-194, 2002.
- TERRILL, T.H.; WAGHORN, G.C.; WOOLLEY, D.J.; McNABB, W.C.; BARRY, T.N. Assay and digestion of <sup>14</sup>C-labelled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep. *Br. J. Nutr.*, v. 72, p. 467-477, 1994.
- THOMPSON, D. P.; GEARY, T. G. The Structure and Function of Helminth Surfaces. *Biochem. Mol. Biol. Parasites.*, p. 203-232, 1995.
- URQUHART, G. M.; JARMOUR; DUNCAN, J. L; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. *Parasitologia Veterinária*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 18, 1998.
- VÁRADY, M.; CUDEKOVÁ, P.; CORBA, J. *In vitro* detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*: Egg hatch test versus larval development test. *Vet. Parasitol.*, v. 149, p. 104-110, 2007.
- VIEIRA, L. S. Métodos alternativos de controle de nematóides gastrintestinais em caprinos e ovinos. *Tecnol. & Ciên. Agropec.*, v. 2, n. 2, p. 49-56, 2008.

WADT, L. H. O. Avaliação de divergência genética em coqueiro (*Cocos nucifera* L.) usando marcadores RAPD em amostras de plantas individuais ou compostas. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 1997.

WAGHORN, G. C.; SHELTON, I. D.; MCNABB, W. C.; MCCUTCHEON, S. N. Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. 2. Nitrogenous aspects. *J. Agric. Sci.*, v. 123, p. 109-119. 1994.

WAGHORN, G. C.; McNABB, W. C. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 62, p. 383–392, 2003.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. Extraction and chemical quantification. In: Lawton, J. H.; Likens, G. E. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Oxford: Blackwell Scientific Publication, p. 66-103, 1994.

WOOD, I. B.; AMARAL, N. K.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J. L.; KASSAI, T.; MALONE, J.B.; 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). *Vet. Parasitol.*, v. 58, p. 181-213, 1995.

- 048a Oliveira, Lorena Mayana Beserra de  
Avaliação da atividade anti-helmíntica de *Cocos nucifera* L.  
sobre nematóides gastrintestinais de ovinos / Lorena Mayana  
Beserra de Oliveira-----Fortaleza, 2008.  
58p.; il  
Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Leal Bevilaqua  
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências  
Veterinárias)-Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de  
Veterinária.  
1. Pequenos ruminantes. 2. Nematóides gastrintestinais 3.  
Atividade anti-helmíntica. 4. Plantas medicinais. 5. Taninos  
condensados. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de  
Veterinária.

CDD: 636.3