

- LIFSCHITZ, A.; VIRKEL, G.; SALLOVITZ, J.; IMPERIALE, F.; PIS, A.; LANUSSE, C. Loperamide-induced enhancement of moxidectin availability in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 25, p. 111-120, 2002.
- LIFSCHITZ, A., VIRKEL, G., SALLOVITZ, J., IMPERIALE, F., PIS, A., LANUSSE, C. Loperamide modifies the tissue disposition kinetics of ivermectin in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 56, p. 61-67, 2004.
- LIFSCHITZ, A.; SALLOVITZ, J.; IMPERIALE, F.; SUAREZ, V.; CRISTEL, S.; AHOUSSOU, S.; LANUSSE, C. Modulation of P-glycoprotein enhances ivermectin and moxidectin systemic availabilities and their efficacy against resistant nematodes in cattle. In: Proceedings of the 21th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 2007, p. 141.
- LIN, J.H. Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein. *Advanced in Drug Delivery Reviews*, v. 55, p. 53-81, 2003.
- MEALEY, K.L. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v. 27, p. 257-264, 2004.
- MOLENTO, M.B.; PRICHARD, R. Effects of the multidrug-resistance-reversing agents verapamil and CL 347,099 on the efficacy of ivermectin or moxidectin against unselected and drug-selected strains of *Haemonchus contortus* in jirds (*Meriones unguiculatus*). *Parasitology Research*, v. 85, p. 1007-1011, 1999.
- MOLENTO, M.B.; LIFSCHITZ, A.; SALLOVITZ, J.; LANUSSE, C.; PRICHARD, R. Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep. *Parasitology Research*, v. 2, p. 121-127, 2004.
- MOTTIER, L.; ALVAREZ, L.; FAIRWEATHER, I.; LANUSSE, C. Resistance-induced changes in triclabendazole transport in *Fasciola hepatica*: ivermectin reversal effect. *The Journal of Parasitology*, v. 92, p. 1355-1360, 2006.
- PRICHARD, R.; ROULET, A. ABC transporters and beta-tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. *Parasitology*, v. 134, p. 1123-1132.
- POULLIOT, J.F.; L'HEUREUX, F.; LIU, Z.; PRICHARD, R.; GEORGES, E. Reversal of P-glycoprotein-associated multidrug resistance by ivermectin. *Biochemical Pharmacology*, v. 53, p. 17-25, 1997.
- REED, M.B.; PANACCIO, M.; STRUGNELL, R.A.; SPITHILL, T.W. Developmental expression of a *Fasciola hepatica* sequence homologous to ABC transporters. *International Journal of Parasitology*, v. 28, p. 1375-1381, 1998.
- SCHINKEL, A.H.; WAGENAAR, E.; VAN DEEMTER, L.; MOL, C.; BORST, P. Absence of the mdr-1aP-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin and cyclosporin. *American Journal of Clinical Investigation*, v. 96, p. 1698-1705, 1995.
- SCHINKEL, A.H. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Seminars in Cancer Biology*, v. 8, p. 161-170, 1997.
- SANGSTER, N.C.; GILL, J. Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitology Today*, v. 15, p. 141-146, 1999.

ATIVIDADE ANTI-HELMÍNTICA DE *Cocos nucifera* L

COSTA, C. T. C.¹, OLIVEIRA, L. M. B.², CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.³, VIEIRA, L. S.⁴ & BEVILAQUA, C.M. L.
¹Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, ²Universidade Estadual do Ceará/PPGCV, ³Faculdades do Nordeste, ⁴EMBRAPA/Caprinos *UECE/PPGCV Av. Paranjana, 1700 CEP 60740-000 Fortaleza, Ceará, Brasil

RESUMO

O controle de nematóides gastrintestinais é realizado com anti-helmínticos, mas o desenvolvimento de populações resistentes exigiu a pesquisa de novas alternativas tais como as plantas medicinais. Existem relatos populares da atividade antiparasitária do fruto de *Cocos nucifera* L. Desta forma a avaliação da atividade anti-helmíntica do Líquido da Casca do Coco Verde (LCCV) e dos extratos butanólico e acetato de etila do LCCV foi realizada inicialmente através de testes de atividade ovicida e larvicida sobre *Haemonchus contortus*; a toxicidade aguda em camundongos foi calculada para estabelecer a dose dos testes *in vivo*; também foram realizados estudo fitoquímico e quantificação de taninos dos extratos e finalmente a eficácia anti-helmíntica dos extratos foi realizada através do teste controlado com o extrato acetato de etila do LCCV e para o extrato butanólico foi utilizado o teste de redução na contagem de ovos nas fezes. Foi constatada a presença de triterpenos, saponinas e taninos condensados no LCCV e nos extratos. Os teores de taninos totais no LCCV, extratos acetato de etila e butanólico foram de 19,65, 25,87 e 18,08%, respectivamente. Os resultados dos testes *in vitro* foram promissores, no entanto os testes *in vivo* não demonstraram atividade anti-helmíntica contra nematóides gastrintestinais de ovinos.

Palavras-chave: *in vivo*, *in vitro*, ovinos, *H. contortus*, taninos

ABSTRACT

The control of gastrointestinal nematodes is carried out with anthelmintics, but the development of resistant populations have required the search for new alternatives such as medicinal plants. There are popular reports of antiparasitic activity of *Cocos nucifera* fruit. The evaluation of anthelmintic activity of the liquid extracted from the bark of the green coconut (LBGC), butanol and ethyl acetate extracts obtained from LBGC was realized initially through the ovicidal and larvicidal activity on *Haemonchus contortus*; acute toxicity in mice was evaluated to establish the dosage for *in vivo* tests; phytochemical study and quantitative determination of total tannins levels of LBGC and its extracts were done; anthelmintic efficacy was realized using controlled test for ethyl acetate extract and for the butanolic extract the fecal egg count reduction test. Total tannins percentage found in LBGC, ethyl acetate and butanol extract was 19.65, 25.87 and 18.08% respectively. The results of *in vitro* tests were promising, although *in vivo* assays did not show anthelmintic activity against sheep gastrointestinal nematodes.

Key-words: *in vivo*, *in vitro*, sheep, *H. contortus*, tannins

O parasitismo por nematóides gastrintestinais é uma das principais causas de mortalidade de ovinos e caprinos no nordeste brasileiro (Vieira et al., 1999). O nematóide de maior intensidade e prevalência nesta região é *Haemonchus contortus* (Arosemena et al., 1999). Infecções por este parasito podem resultar em acentuadas perdas na rentabilidade econômica visto que este nematóide leva a uma depressão do apetite, alterações no metabolismo protéico, energético e mineral, sendo a anemia, o principal sintoma da infecção (Soulsby, 1987).

O controle de nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos tem sido realizado quase exclusivamente pela utilização de anti-helmínticos (Charles, 1995). O desenvolvimento de populações de nematóides gastrintestinais resistentes a anti-helmínticos é uma realidade no Brasil e no mundo (Melo et al., 2003; Sissay et al. 2006), sendo um dos mais importantes e atuais problemas no controle de parasitos. Os anti-helmínticos disponíveis no comércio possuem algumas limitações, tais como, altos custos, resíduos nos alimentos, risco de poluição ambiental e redução da eficiência na produção de ovinos e caprinos devido à baixa eficácia (Waller et al., 1995). Considerando esses problemas, alternativas como a fitoterapia podem ser utilizadas para reduzir o uso desses fármacos (Camurça-Vasconcelos et al., 2007).

Cocos nucifera L. é uma planta largamente encontrada no litoral do nordeste brasileiro. Existem também vários relatos a cerca do uso popular de extratos aquosos da fibra do coco, sob a forma de chá, para o tratamento de enfermidades como a artrite, a diarreia (Esquenazi et al., 2002) e hemorragias (Franco e Barros, 2006). Na medicina popular também se utiliza a polpa do coco verde para o tratamento de teníase, esquistossomose e ancilostomose (Blini e Lira, 2005). A atividade antiparasitária do leite do coco foi avaliada em camundongos, sendo constatada eficácia contra *Syphacia obvelata*, *Aspiculuris tetraptera* (Amorim & Borba, 1994) e *Vampirelepis 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 principalmente 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 seu processamento é realizado no seu estágio final de maturação para a produção de óleo e outros produtos, no país esse fruto é consumido também imaturo para o aproveitamento da água acumulada no seu interior (Rosa et al., 2001). Consequentemente, cerca de 6,7 milhões de toneladas de casca do coco verde são descartadas por ano em lixões e às margens das estradas (Rodrigues & Pinto, 2007). Esse material leva mais de oito anos para desaparecer. Portanto, além de ter importância econômica e social, a utilização desse subproduto é também importante do ponto de vista ambiental (Carrizo et al., 2002), haja vista que 80% a 85% do peso bruto do coco verde representam lixo (Rosa et al., 2001). Nesse sentido, a EMBRAPA/Agroindústria Tropical está propondo a utilização desse material para o enchimento de colchões e almofadas. Todavia, durante esse processo de aproveitamento, uma grande quantidade de extrato aquoso, denominado de líquido da casca do coco verde (LCCV), é gerada na etapa de prensagem. Nos últimos anos, alguns ensaios foram conduzidos para investigar as propriedades farmacológicas e biológicas do LCCV, tendo sido constatada atividade antiproliferativa de linfócitos (Kiszberg 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 (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). Estas características estimularam a validação do efeito anti-helmíntico do líquido obtido da casca do coco verde e dos extratos acetato de etila e butanólico obtidos a partir do LCCV sobre nematóides gastrintestinais de ovinos. Este trabalho foi executado em 5 etapas. A primeira foi constituída pela extração e preparação das substâncias a serem testadas. O LCCV foi fornecido pela EMBRAPA/Agroindústria Tropical, localizada em Fortaleza, Ceará, Brasil. Para tanto, a casca do coco verde, subproduto de indústrias de processamento de frutos, foi triturada e prensada para retirada do líquido, que foi filtrado e conservado a -20°C até ser utilizado. O líquido da casca foi submetido a três lavagens, por solventes. Inicialmente utilizou-se o solvente acetato de etila e a seguir o álcool butílico (butanol). Posteriormente os solventes orgânicos foram evaporados em um evaporador rotatório obtendo-se no final os extratos acetato de etila e butanólico.

A segunda etapa foi a triagem dos extratos através de testes *in vitro*. Estes testes servem como uma indicação inicial da atividade que está sendo pesquisada, e permitem selecionar os extratos com melhor desempenho, diminuindo gastos, evitando perda de tempo e uso indiscriminado de animais de experimentação. A fim de determinar o potencial anti-helmíntico do LCCV e seus extratos foram realizados os testes de inibição de eclosão de ovos e de desenvolvimento larvar de *H. contortus*. O teste de eclosão de ovos consistiu em colocar ovos recém eliminados das fezes em contato com o LCCV e os extratos acetato de etila e butanólico em cinco concentrações. O LCCV inibiu 100% da eclosão dos ovos de *H. contortus* na concentração de 2,5 mg kg⁻¹, enquanto que foram necessários 5 mg kg⁻¹ do extrato acetato de etila e 10 mg kg⁻¹ do extrato butanólico para obtenção do mesmo efeito.

O outro teste *in vitro* utilizado foi inibição do desenvolvimento larvar (Costa et al., 2008). A eficácia mais elevada obtida neste teste foi de 99,80% com 80 mg ml⁻¹ do extrato butanólico, 99,77% com 80 mg ml⁻¹ do extrato acetato de etila e 81,3 % com 65 mg ml⁻¹ do LCCV.

O LCCV e os extratos acetato de etila e butanólico apresentaram atividade ovicida e larvicida, evidenciando a existência de constituintes químicos com atividade sobre *H. contortus*. Destaca-se o efeito ovicida de 100% do LCCV em uma baixa concentração (2,5 mg ml⁻¹), resultado superior a outros extratos de plantas possuidoras de efeito anti-helmíntico como *Mangifera indica* (Costa et al., 2002), *Spigelia anthelmia* (Assis et al., 2003), *Acacia mearnsii* (Minho 2006), *Melia azedarach* (Maciel et al. 2006), *Azadirachta indica* (Costa et al., 2008). Este resultado pode ser atribuído à combinação de compostos ativos resultando em um efeito sinérgico (Rates, 2001). Porém o mecanismo de ação envolvido no efeito ovicida é desconhecido. O efeito produzido pelo LCCV comparado ao tiabendazol foi inferior, já que o anti-helmíntico comercial inibiu 100% da eclosão de ovos na concentração de 0,025 mg ml⁻¹. O tiabendazol é o princípio ativo isolado, enquanto que o LCCV possui vários constituintes químicos, dentre eles o princípio ativo com ação ovicida, porém em pequenas quantidades. Em geral o extrato de uma planta possui pequenas concentrações de princípio ativo e um grande número de propriedades promissoras (Rates, 2001).

O próximo passo foi a avaliação do efeito anti-helmíntico sobre nematóides do intestino grosso de camundongos. O LCCV nas doses utilizadas não apresentou atividade contra *Syphacia obvelata* e *Aspiculuris*

tetraptera. Porém 1.000 mg/kg do extrato butanólico apresentou eficácia média de 90,70%, que não diferiu estatisticamente ($p>0,05$) do controle positivo (0,56 mg/kg de febendazol).

Os estudos toxicológicos, aplicados em animais de laboratório e sob condições previamente estabelecidas são uma exigência para determinar a segurança de uso dos fitoterápicos. Desta forma foi determinada a toxicidade aguda em camundongos após administração oral e intraperitoneal das substâncias extraídas do coco. O LCCV e os extratos não apresentaram toxicidade por via oral (até 3g/kg). Pela via intraperitoneal a DL50 para o LCCV foi de 305,02 mg kg e a DL10 de 199,63 mg kg, para o extrato butanólico a DL50 foi de 321,3 mg kg e a DL10 de 247,32 mg kg, enquanto para o extrato acetato de etila as DL10 e DL50 foram de 650 (0,44-1038,5) mg kg⁻¹ e 1.233,99 (237,68-2.089,14) mg kg⁻¹, respectivamente. A via de administração de anti-helmínticos em geral é a oral sendo que o LCCV e os respectivos extratos não apresentaram toxicidade. A baixa toxicidade desses extratos também foi comprovada por Alviano et al. (2004).

Os estudos químicos são indispensáveis para verificar os componentes dos extratos e os possíveis bioativos. Desta forma foram realizados inicialmente testes fitoquímicos com o LCCV e os extratos. Estes testes baseiam-se na alteração da coloração do extrato após a adição de determinados reagentes (Matos, 1997). Os testes fitoquímicos revelaram tanto no LCCV como no extrato butanólico a presença de triterpenos, saponinas e taninos condensados. Enquanto que no extrato acetato de etila encontrou-se além dos constituintes já citados, catequinas, flavonóides e esteróides. A quantificação dos teores de taninos totais encontrados no LCCV, extratos acetato de etila e butanólico foi de 19,65, 25,87% e 18,08%, respectivamente.

Os testes fitoquímicos revelaram a presença de constituintes químicos que podem ser responsáveis pela atividade anti-helmíntica encontrada nos testes *in vitro*. Dentre estes, detectou-se a presença de compostos triterpenóides que apresentam atividade inseticida (Mulla & Tianyun, 1999), não tendo sido atribuída anteriormente efeito anti-helmíntico relevante. Pessoa et al. (2002) avaliaram a azadiractina, um limonóide, pertencente à classe dos triterpenos, extraído da *A. indica* verificando efeito ovicida de 68% na concentração de 10 mg ml⁻¹ sobre *H. contortus* porém no presente estudo 2,5 mg ml⁻¹ LCCV e 5 mg ml⁻¹ do extrato butanólico apresentaram eficácia de 100 e de 81,43%, respectivamente.

Outro constituinte químico detectado foram as saponinas que são compostos naturais encontrados nos vegetais com propriedades detergente, surfactante e hemolítica (Barraca, 1999; Hauptli e Lovatto, 2006). Extratos ricos em saponinas oriundo de plantas como a *Yucca schidigera* e *Quillaja saponaria*, têm sido investigadas quanto ao aumento na produtividade de ruminantes (Wang et al., 2000) e de monogástricos (Hauptli e Lovatto, 2006). Além disso, foi observado que essas saponinas apresentaram atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* e *Culex pipiens* (Pelah et al. 2002), sendo também responsáveis pela inibição, *in vitro*, do crescimento de *Escherichia coli* (Sen et al., 1998) e de bactérias ruminais como *Streptococcus bovis*, *Prevotella bryanti* e *Ruminobacter amylophilus* (Singh et al., 2003). Com relação à atividade anti-helmíntica não foram encontrados trabalhos que associam efeito antiparasitário a esse composto químico.

Finalmente os taninos condensados detectados no LCCV e nos extratos estão associados à defesa natural de plantas contra insetos, sendo classificados, de acordo com suas propriedades e estrutura química, em hidrolisáveis e condensados (Athanasiadou et al., 2001). Vários resultados sugerem que os taninos condensados, dentre os vários metabólicos secundários presentes em plantas e forragens, são compostos com potencial atividade anti-helmíntica. A utilização do extrato de quebracho (*Schinops*), contendo 73% de taninos condensados (Athanasiadou et al., 2001) e do extrato de *Acacia mearnsii* (acácia-negra) com 15% de taninos condensados (Minho, 2006) inibiu, *in vitro*, a viabilidade das larvas de *H. contortus*, *Teladorsagia circumcincta* e *Trichostrongylus vitrinus*. Ademais observou-se que monômeros de taninos condensados foram responsáveis pela inibição da eclosão de ovos, desenvolvimento e paralisia larvar de *T. colubriformis* (Molan et al., 2003). Vale ressaltar que a atividade anti-helmíntica dos taninos está na dependência da espécie de parasita. Brunet & Hoste (2006) ao testarem *in vitro* monômeros de taninos condensados, prodelfinidinas e procianidinas, sobre o desembainhamento de L3 de *H. contortus* e *T. colubriformis* observaram atividade apenas sobre *T. colubriformis*. Estes achados confirmam resultados prévios, *in vivo*, de que plantas ricas em taninos apresentam ação anti-helmíntica dependendo da espécie de parasito e localização anatômica. Este fato foi verificado em ovinos (Athanasiadou et al., 2001) e caprinos (Paolini et al., 2003) que receberam quebracho, obtendo resultados sobre as populações de nematóides do intestino delgado, *T. colubriformis* e *Nematodirus battus*, porém sem efeito anti-helmíntico sobre o parasito abomasal, *H. contortus*.

Os testes de eficácia na espécie alvo são os últimos testes a serem realizados numa pesquisa sobre efeitos de plantas medicinais. Os testes mais empregados com a finalidade de determinar a eficácia de fitoterápicos contra nematóides gastrintestinais em pequenos ruminantes são os testes de redução da contagem de ovos nas fezes (FECRT) e o controlado. Os experimentos *in vivo* foram realizados na EMBRAPA/Caprinos. Os ovinos utilizados nos experimentos eram portadores de infecção natural. Porém foram inoculados com 3.000 a 4.500 larvas de terceiro estágio de *H. contortus* pois o opg inicial estava abaixo de 1.000. No FECRT foram utilizados 3 grupos de ovinos (n=10), tratado (500 mg kg⁻¹ de extrato butanólico durante 3 dias), controle positivo (10 mg kg⁻¹ de closantel), controle negativo (não tratado). Os resultados obtidos encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Contagem de ovos nas fezes (média ± dp) de ovinos infectados com nematóides gastrintestinais nos dias 7 e 14 dias pós-tratamento com extrato butanólico do líquido da casca do coco verde.

Tratamentos	opg ± dp		
	0 dia	7 dias	14 dias
Extrato butanólico (0,5 g kg ⁻¹)	1.120 (± 722)	3.028 (± 1.222)	1.100 (± 490)
Closantel (10 mg kg ⁻¹)	1.095 (± 720)	270 (± 343)	350 (± 354)
Controle negativo	1.125 (± 761)	700 (± 619)	1.178 (± 1.255)

A tabela 2 apresenta resultados de larvaculturas realizadas 7 dias após o tratamento com o extrato butanólico. Pode-se observar que apesar da inoculação com larvas de *H. contortus* antes do tratamento, o maior percentual de larvas recuperadas foi de *Trichostrongylus* spp.

Tabela 2. Média de larvas identificadas em larvaculturas realizadas com fezes de ovinos 7 dias após tratamento com o extrato butanólico do líquido da casca do coco verde.

Tratamentos	Larvas (%)	
	<i>H. contortus</i>	<i>T. colubriformis</i>
Extrato butanólico (0,5 g kg ⁻¹)	38	62
Closantel (10 mg kg ⁻¹)	14	67
Controle negativo	34	66

O teste controlado consistiu de contagem da carga parasitária após tratamento com o extrato acetato de etila do LCCV. Os ovinos neste experimento eram portadores de infecção natural ocorrendo também antes do tratamento uma inoculação de L3 de *H. contortus*. Os grupos foram constituídos por 6 ovinos cada, sendo o grupo tratado com 400 mg kg⁻¹ de extrato acetato de etila durante três dias consecutivos, controle positivo recebeu 0,2 mg kg⁻¹ de moxidectina (Cydectin[®]) em dose única e o controle negativo foi tratado com DMSO a 3% durante três dias consecutivos, (dilúente utilizado nos testes *in vitro*). A administração dos tratamentos foi realizada por via oral. Sete dias após o final do tratamento, os ovinos foram necropsiados para contagem da carga parasitária (Wood et al., 1995). A tabela 3 mostra a eficácia média do extrato acetato de etila sobre a carga parasitária dos ovinos. Foram encontrados no abomaso e intestino delgado somente *H. contortus* e *T. colubriformis*, respectivamente. No intestino grosso, estavam presentes *Oesophagostomum venulosum* e *Trichuris ovis*, entretanto, devido ao reduzido número de espécimes, a carga parasitária desse órgão não foi utilizada para a análise estatística. O efeito do extrato não diferiu significativamente ($p > 0,05$) do controle negativo (DMSO 3%). O efeito sobre *H. contortus* também não foi estatisticamente diferente ($p > 0,05$) entre os controles positivo e negativo. Todavia, a moxidectina apresentou significativa eficácia anti-helmíntica sobre *T. colubriformis* e a carga parasitária total ($p < 0,05$).

Tabela 3. Eficácia média \pm dp do extrato acetato de etila do líquido extraído da casca do coco verde sobre a carga parasitária de ovinos infectados com nematóides gastrintestinais.

Tratamento	Eficácia média (%) \pm dp		
	<i>H. contortus</i>	<i>T. colubriformis</i>	Carga parasitária
Extrato acetato de etila (400 mg kg ⁻¹)	4,77 \pm 11,69 ^a	18,69 \pm 30,28 ^a	13,57 \pm 33,23 ^a
Cydectin [®] (0,2 mg kg ⁻¹)	28,77 \pm 40,26 ^a	93,44 \pm 8,18 ^b	66,73 \pm 16,33 ^b
DMSO (3%)	24,41 \pm 37,84 ^a	23,04 \pm 25,55 ^a	8,95 \pm 21,92 ^a

Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes entre linhas ($p < 0,05$).

A utilização tradicional de *C. Nucifera* contra o parasitismo gastrintestinal, a presença de taninos condensados nos extratos e LCCV, o elevado percentual de teores de taninos totais, os resultados promissores obtidos nos testes *in vitro* e a baixa toxicidade aguda em animais de laboratório justificaram a avaliação *in vivo* da atividade anti-helmíntica dos extratos. O teste controlado e o FECRT são métodos utilizados para avaliação da eficácia antihelmíntica em ruminantes que são indispensáveis para a demonstração da atividade anti-helmíntica tendo em vista que nem sempre o desempenho é similar nos testes *in vivo* e *in vitro*. Este fato também foi observado nos extratos de *Myrsine africana* e *Rapanea melanophloeos*, utilizados tradicionalmente no Quênia para reduzir o parasitismo de pequenos ruminantes, não causaram diminuição do opg de ovinos infectados experimentalmente com *H. contortus* (Githiori et al., 2002). O óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides*, utilizado durante muitos anos no controle de parasitos de monogástricos, cães, gatos e humanos, não reduziu o opg e a carga parasitária de caprinos infectados natural e experimentalmente com *H. contortus* (Ketzi et al., 2002). As folhas de *A.indica*, conhecidas por diversas aplicações medicinais, não apresentaram efeito anti-helmíntico quando foram fornecidas a ovinos naturalmente infectados com nematóides gastrintestinais (Costa et al., 2006).

Diferentes hipóteses podem justificar a ausência de atividade anti-helmíntica do LCCV e seus extratos acetato de etila e butanólico: biotransformação das substâncias ativas, dose utilizada ou duração do tratamento (Hennessy, 1997). Portanto, de acordo com o protocolo utilizado nesses experimentos, o LCCV e os extratos acetato de etila e butanólico não apresentaram atividade anti-helmíntica contra nematóides gastrintestinais de ovinos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo CNPq. Dra. Bevilacqua é Bolsista em Produtividade do CNPq

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alviano, D.S.; Rodrigues, K. F.; Leitão, S. G.; Rodrigues, M. L.; Matheus, M. E.; Fernandes, P.D.; Antonioli, A.R.; Alviano, C.S., Antinociceptive and free radical scavenging activities of *Cocos nucifera* L. (Palmae) husk fiber aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 92, p. 269-273. 2004.
- Amorim A., Borba, H.R. Ação anti-helmíntica de plantas X. Testes *in vivo* com extratos brutos de *Cocos nucifera* L. (Palmae). *Revista Brasileira de Farmácia*, 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. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 76, p.98-99, 1995.
- Arosemena, N.A.E., Bevilaqua, C.M.L., Girão, M.D., Melo, A.C.F.L., Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid area in Brazil. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 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*. *Veterinary Parasitology*, 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. *Veterinary Parasitology*, v. 99, p. 205–219, 2001.
- Barraca, S. A. **Manejo e Produção de Plantas Medicinais e Aromáticas**. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Departamento de Produção Vegetal. 50p, 1999.
- Blini, W., Lira, C. M., 2005. Salvando vidas com a medicina natural. 1° ed. Unier, São Paulo, 479.
- Brunet, S., Hoste, H. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 54, p.7481-7, 2006.**
- Camurça-Vasconcelos, A. L. F., Bevilaqua, C. M. L., Morais, S. M., Maciel, M. V., Costa, C.T.C., Macedo, I.T.F., Oliveira, L.M.B., Braga, R.R., Silva, R. A., Vieira, L.S., Navarro, A.M.C. Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, v.154, v. 167–170, 2008
- Carrijo, O.A., Liz, R.S.; Makishima, N., Fibra da casca do coco verde como substrato Agrícola. *Horticultura Brasileira*, v.20, p. 533-535, 2002.
- Charles, T.P. Disponibilidade de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais parasitos de ovinos deslançados no semi-árido pernambucano. *Ciência Rural*, v. 24, p. 437-442, 1995.
- Costa, C.T.C., Morais, S.M., Bevilaqua, C.M.L., Souza, M.M.C., Leite, F.K.A., Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus contortus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.11, p. 57-60, 2002.
- 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. da, Souza, M.M.C. Anthelmintic activity of *Azadirachta indica* A. Juss against sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, v. 137, p. 306–310, 2006.
- Costa, C. T. C., Macedo, I. T. F., Oliveira, L. M. B., Braga, R. R., Silva, R. A., Vieira, L. S., Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology*, v.148, p. 288–294, 2007.
- Costa, C. T. C., Bevilaqua, C. M. L., Camurça-Vasconcelos, A. L. F., Maciel, M. V., Morais, S.M., Castro, C.M.S., Braga, R.R., Oliveira, L. M. B. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research*, v. 74, p. 284–287, 2008.
- Esquenazi, D., Wigg, M.D., Miranda, M.M.F.S., Rodrigues, H.M., Tostes, J.B.F., Rozental, S., Silva, A.J.R., Alviano, C.S., Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology*, v. 153, p. 647-65, 2002.
- Githiori, J.B., Höglund, J., Waller, P.J., Baker, R.L., Anthelmintic activity of preparations derived from *Myrsine Africana* and *Rapanea melanophloeos* against the nematode parasite, *Haemonchus contortus*, of sheep. *Journal of Ethnopharmacology* v.80, p.187-191, 2002.
- Hauptli, L.; Lovatto, P. A. Alimentação de porcas gestantes e lactantes com dietas contendo saponinas. *Ciência Rural*, v.36, n.2, p. 610-616, 2006.**
- Hennessy, D.R. Modifying the formulation or delivery mechanism to increase the activity of anthelmintic compounds. *Veterinary Parasitology*, v.72, p. 367–390, 1999.
- Ketzis, J.K., Taylor, A., Bowman, D.D., Brown, D.L., Warnick, L.D., Erb, H.N., *Chenopodium ambrosioides* and its essential oil as treatments for *Haemonchus contortus* and mixed adult-nematode infections in goats. *Small Ruminant Research*, v.44, p.193-200, 2002.
- Kirszberg, C., Esquenazi, D., Alviano, C.S., Rumjaneka, V.M., The effect of a catechin rich extract of *Cocos nucifera* on lymphocytes proliferation. *Phytotherapy Research*, v.17, p.1054-1058, 2003.
- Maciel, M.V., Morais, S.M., Bevilaqua, C.M.L., Camurça-Vasconcelos, A.L.F., Costa, C.T.C., Castro, C.M.S., Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v.140, p.98-104, 2006.
- Matos, S. G. A. **Introdução à fitoquímica Experimental**. 2ª ed., Ceará: Editora da Universidade Estadual do Ceará, 1997
- Melo, A.C.F.L.; Reis, I.F.; Bevilaqua, C.M.L.; Vieira, L.S., Echevarria, F.A.M.; Melo, L.M., Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. *Ciência Rural*, v.33, p. 339-344, 2003.**
- Mendonça-Filho, R.R., Rodrigues, I.A., Alviano, D.S., Santos, A.L.S., Soares, R.M.A., Alviano, C.S., Lopes, A.H.C.S., Rosa, M. S. S. Leishmanicidal activity of polyphenolics-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Research in Microbiology*, v. 155, p.136-143, 2004.
- Minho, A.P. Efeito anti-helmíntico de taninos condensados sobre nematódeos gastrintestinais em ovinos. 2006. 168p. Tese (Doutorado) Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- 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*, *International Journal for Parasitology*, v.33, n.14, p.1691-8, 2003.
- Mulla, S.E., Tianyun, Su. Activity and biology effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *Journal of American Mosquito Control Association*, v15, p.133–152. 1999.
- Paolini, V., Bergeaud, J.P., Grisez, C., Prevot, F., Dorchie, Ph., Hoste, H. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v.113, n.3, p.253-61, 2003.**
- Pelah, D., Abramovich, Z.; Markus, A.; Wiesman, Z. The use of commercial saponin from *Quillaja saponaria* bark as a natural larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.81, p. 407-409, 2002.**

- Pessoa, L.M., Morais, S.M. Bevilaqua, C.M.L., Luciano, J.H.S. Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus* *Veterinary Parasitology*, v. 109, p.59-63, 200.
- Rates, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.
- Sen S; Makkar, H.P.S.; Muetzel, S; Becker, K. Effect of *Quillaja saponaria* and *Yucca schidigera* plant extract on growth of *Escherichia coli*. *Letters of Applied Microbiology*, v.27, p. 35-38, 1998.
- Rosa, M. F.; Santos, F. J. S.; Montenegro, A. A. T.; Abreu, F. A. P.; Correia, D; Araujo, F. B. S.; Norões, E. R. V. *Caracterização do pó da casca de coco verde usado como substrato agrícola*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001.
- Singh, B.; Bhat, T. K.; Singh, B. Potencial Therapeutic Applications of some antinutritional plant secondary metabolites. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, v. 51, p. 5579-5597, 2003.
- Sissay, M. M., Asefa, A., Uggla, A., Waller, P. J., Anthelmintic resistance of nematode parasites of small ruminants in eastern Ethiopia: exploration of refugia to restore anthelmintic efficacy. *Veterinary Parasitology*, v.135, p. 337-346, 2006.
- Soulsby, E.J.L. *Parasitologia y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7.ed. México: Nueva Editorial Interamericana, 1987. 823p.
- Vieira, L.S., Cavalcante, A.C.R., Pereira, M.F., Dantas, L.B., Ximenes, L.J.F., Evaluation of anthelmintic efficacy of plants available in Ceará State, Northeast Brazil, for the control of goat gastrointestinal nematodes. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v.150, p.447-452, 1999.
- 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.
- Waller, P. J.; Dash, K. M.; Barger, I. A.; Le Jambre, L. F.; Plant, J. Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep: learning from the Australian experience. *Veterinary Record*, v. 136, p. 411-413, 1995.
- Wang, Y.; McAllister, T.A.; Yanke, L.J.; Cheeke, P.R. Effect of steroidal saponin from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes. *Journal of Applied Microbiology*, v. 88, p.887-896, 2000.

SCREENING PLANTS FOR ANTHELMINTIC ACTIVITY – A CHALLENGING SITUATION.

F. JACKSON & Y. GORDON - Moredun Research Institute, Edinburgh EH26 0PZ Scotland

INTRODUCTION

The increasing prevalence of helminth parasites that are resistant to conventional anthelmintics (Jackson and Coop, 2000) has been the spur for different research programs exploring alternative approaches to parasite control. For much of our past history forages, plant parts or extracts have been used to combat parasitism, and in many parts of the world such natural products are still in use for this purpose. Some of the potential that undoubtedly lies within these phytotherapeutics has been revealed in studies in New Zealand and Europe which have shown that some plant species, when grazed or fed as conserved material, may reduce the degree of internal parasite infestation in sheep (Niezen *et al.*, 1995; Marley *et al.*, 2003, Paolini *et al* 2003).

Given the world wide interest in exploiting the anthelmintic activity of plants or their products it is understandable that there is also a growing interest in finding the best ways of screening for bioactivity. However before embarking upon any screening program it is very important that researchers have clearly defined goals, which incorporate the needs of their end users since these will influence both the breadth and depth of their research projects. For example in a situation where there are only a small number of local forages that need investigation it might be possible to meet the anthelmintic activity needs of resource poor farmers through results generated in simple faecal egg count reduction tests using naturally infected animals. On the other hand it would be impossible to extend this *in vivo* approach to determine the efficacy of products derived from whole plants or their products to even moderate sized botanical collections containing a few hundred different species. The time and financial costs involved in all mass screening programs highlight the importance of the choice of first phase screening technique which needs to be sensitive, cheap and reproducible. Having used first phase screening to reduce the numbers of candidates then the next phases in the process of focussing in on the active compounds are inevitably more complex and expensive simply because as the degree of refinement increases so do the costs of discovery as one needs to add pharmacology, compound target and safety/toxicity data to the compound profile.

Understanding the nature of the bioactive components, their mode of action and their targets within the parasite are all important in the processes leading to practical application. Bioactive plants may contain large numbers of plant secondary metabolites that may act singly or in combination to produce direct (Athanasiadou *et al.*, 2001) and/or indirect effects on parasites in the alimentary tract, leading to reduced nematode survival, growth and fecundity. They can also provide improved protein availability in the host and/or have direct or indirect effects on mineral or trace element status. Both of these changes to host nutrition can lead to reductions in parasite establishment, burden and fecundity through improvements in host immunoregulatory capacity.

There are thought to be a number of active biochemical compounds that act against parasites including essential oils, proteolytic enzymes, lectins and polyphenolics such as the tannins (Hoste *et al* 2006). Since the focus of this paper is intended to be on the initial phases in the screening process it will not deal with the screening processes that are required to define the chemistry of the active compounds nor their pharmacology and toxicology.

Primary screening for bioactivity

Since academic researchers investigating the anthelmintic effects of plant products very rarely have the resources available to industry, most of the current primary screening activity uses simple bioassays many of which were also used in the development of our current anthelmintics. Both *in vivo* and *in vitro* bioassays can be used as primary screens but