



SHORT NOTE [NOTA CORTA]

EFFECTO ANTIHELMÍNTICO *IN VITRO* DEL EXTRACTO METANOLICO DE HOJAS DE *Gliricidia sepium* CONTRA NEMATODOS GASTROINTESTINALES DE OVINOS

IN VITRO ANTHELMINTIC EFFECT OF METHANOLIC LEAF EXTRACT OF *Gliricidia sepium* AGAINST GASTROINTESTINALE NEMATODES OF SHEEP

Claudia Pérez-Pérez¹, Manuel Mateo Hernández-Villegas^{1*},
Patricia de la Cruz-Burelo¹, Gloria Ivonne Hernández-Bolio²
and Gloria Ivette Bolio-López¹.

¹Universidad Popular de la Chontalpa. División de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias.

² Centro de Investigación Científica de Yucatán. Unidad de Biotecnología
E-mail: manuelmateo.hernandezv@upch.edu.mx; mahervi57@gmail.com

*Corresponding author

RESUMEN

El uso de recursos locales para la alimentación y el cuidado de la salud del ganado es una estrategia altamente rentable y sostenible. Entre tales recursos se encuentran los árboles y arbustos forrajeros nativos, que además de aportar nutrientes de buena calidad, producen metabolitos secundarios que muestran efecto sobre los nematodos gastrointestinales (NGI). El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antihelmíntico *in vitro* del extracto metanólico de hojas de *Gliricidia sepium* (EMHGS), a través de la prueba de eclosión de huevos. Se probaron tres concentraciones del extracto: 125, 250 y 500 µg/mL; un control negativo (agua destilada) y un control positivo (levamisol 2 mg/mL). El EMHGS mostró efectos significativos $P < 0.05$ comparado con el control positivo; además mostró también un efecto dosis-dependiente de la inhibición de la eclosión de huevos. Los porcentajes de eficacia encontrados fueron: 27.7%, 46.2%, 49.7% de inhibición a 125, 250 y 500 µg/mL respectivamente. La dosis media (DE_{50}) obtenida a través del análisis Probit para el EMHGS fue de: 394.96 µg/mL. Estos resultados sugieren que el EMHGS posee actividad antihelmíntica contra huevos de nematodos gastrointestinales.

Palabras clave: Nematodos gastrointestinales; *Gliricidia sepium*; plantas antihelmínticas; eclosión de huevos; pequeños rumiantes.

INTRODUCCIÓN

El tratamiento antihelmíntico de las infecciones por nematodos gastrointestinales (NGI), sigue siendo la

SUMMARY

The use of local resources for food and health care of animals is a highly profitable and sustainable strategy. Among these resources are native trees and shrubs which in addition to providing good quality nutrients, produce secondary metabolites with anthelmintic (AH) effect. Therefore the aim of this study was to evaluate the *in vitro* AH effect of *Gliricidia sepium* leaves methanol extract (GSME), through the egg hatch inhibition assay (EHA). Three concentrations of the extracts were tested: 125, 250 and 500 µg/mL. Also a negative control (distilled water) and a positive control (levamisole 2 mg/mL) were included. The GSME showed significant differences $P < 0.05$ when compared with the positive control. The GSME also showed a dose-dependent response in inhibition of eggs hatching. Effectiveness percentages found were: 27.7%, 46.2%, 49.7% of inhibition at 125, 250, and 500 µg/mL respectively. The average dose (ED_{50}) obtained through probit analysis was 394.96 µg/mL. These results suggest that the ME of leaves of *G. sepium* has anthelmintic activity against eggs of gastrointestinal nematodes.

Key words: Gastrointestinal nematode; *Gliricidia sepium*; anthelmintic plants; egg hatch assay; small ruminants.

principal vía de control de parásitos en los sistemas de producción de ovinos. Sin embargo, este método de control se encuentra limitado debido al desarrollo de resistencia de algunas poblaciones de NGI a la

mayoría de los antihelmínticos (AHs) comerciales, en las principales regiones productoras de ovinos y caprinos del mundo (Epe y Kaminsky, 2013; Besier, 2007; Bartley *et al.*, 2004). El incremento de la prevalencia y la severidad de la resistencia antihelmíntica (Wolstenholme *et al.*, 2004), amenazan la rentabilidad de los sistemas de producción de ovinos. Esta situación, junto con el incremento de la demanda del mercado de productos animales “verdes” o ecológicos (Waller y Thamsborg, 2004), ha llevado a la búsqueda de métodos alternativos de control de parásitos.

El uso de plantas bioactivas ricas en metabolitos secundarios y especialmente aquellas que contienen taninos, han recibido gran atención últimamente y han sido propuestas como método de control de NGI en rumiantes (Burke *et al.*, 2011; Hoste *et al.*, 2006). El efecto AH de los taninos ha sido asociado con su capacidad para formar complejos con la proteína de los parásitos (Alonso-Díaz *et al.*, 2010; 2011), de esta manera, los taninos podrían afectar la biología de los nematodos interfiriendo con su motilidad, proceso de desovación, desarrollo larval y eclosión de huevos (Brunet *et al.*, 2011; Alonso-Díaz *et al.*, 2008; Molan *et al.*, 2002).

Gliricidia sepium, pertenece a la familia Fabaceae, comúnmente se le conoce como “madre de cacao” o “matarratón”; es usada en México, Centroamérica y regiones tropicales de Sudamérica y Asia, tanto para la alimentación del ganado como con propósitos medicinales. Esta planta forrajera tiene un alto valor nutritivo en términos de proteína cruda (20-33%) y una digestibilidad de la materia seca *in vitro* (60-64%) (Lister *et al.*, 2000; Palma *et al.*, 1995). El extracto de *G. sepium* ha mostrado previamente propiedades AH contra algunos procesos biológicos de *Haemonchus contortus* (Von Son-de Fernex *et al.*, 2012; Wabo *et al.*, 2011); contra huevos y larvas del mosquito *Anopheles stephensi* (Krishnappa *et al.*, 2012), y actividad nematocida contra el nematodo *Meloidogyne incognita* (Nazli *et al.*, 2008); sin embargo, el efecto AH no ha sido evaluado contra huevos de NGI. Por lo que, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad ovicida *in vitro* del extracto metanólico de hojas de *G. sepium* (EMHGS) contra huevos de NGI.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La investigación fue realizada en el laboratorio de Parasitología de la Universidad Popular de la Chontalpa (UPCH), ubicada en Cárdenas, Tabasco, México. El municipio de Cárdenas, se encuentra situado en la región de la Chontalpa en el estado de

Tabasco, y se localiza entre las coordenadas 18° 0' de latitud norte y 93° 23' de longitud oeste, a una altitud de 10 msnm. Tiene un clima cálido húmedo con abundantes lluvias en verano y un rango de temperatura 26 – 28°C. El tipo de suelo predominante es vertisol (INEGI, 2011).

Colecta de la planta

Las hojas de *G. sepium* fueron colectadas en el municipio de Huimanguillo, Tabasco, en el Campo Experimental del Instituto Nacional de Investigación Forestal Agrícola y Pecuaria (INIFAP), en el mes de febrero del año 2013. Las hojas jóvenes y sanas fueron colectadas de un solo árbol a una altura de aproximadamente 2.0 a 3.0 m. El sitio se encuentra ubicado entre las coordenadas 17°50' latitud norte y 93°23' longitud oeste, a una altitud de 20 msnm. El clima es cálido con lluvia todo el año (Af), (García, 1973) y una temperatura media anual de 27.8 °C. El tipo de suelo donde se obtuvieron las hojas de la planta corresponde al denominado fluvisol (INEGI, 2007).

Obtención del extracto

El material vegetal fue secado en una estufa ECOSHEL® modelo 9023A durante 48 horas a una temperatura de 40 °C; el material se removió dos veces al día para obtener un secado uniforme. Una vez seco el material, se procedió a la molienda y posteriormente se pesó en una balanza granataria, para luego colocarlo en un frasco de cristal con capacidad de cinco litros; enseguida se le adicionó el disolvente metanol 100% (MeOH), (5.465 mL por 1.0 g del material molido), para dejarlo en maceración por 48 horas. Pasado este tiempo se procedió a filtrar toda la solución. El material filtrado se concentró en un rota-evaporador marca BÜCHI® modelo R3; este proceso se repitió cuatro veces hasta la completa extracción del material vegetal.

Obtención de los huevos

Los huevos fueron recuperados de acuerdo a la metodología descrita por Coles *et al.* (1992). Brevemente, 50 g de heces fueron colectadas directamente del recto de una oveja infectada naturalmente con NGI (300 huevos por gramo de heces); después fueron mezclados con agua destilada y filtrados a través de un tamiz de malla número 100 (0.15 mm apertura). Posteriormente el filtrado fue colocado en tubos de 50 mL y centrifugados en un equipo marca Rolco® a 325g por dos minutos. Pasado este tiempo, los tubos fueron retirados de la centrífuga y el sobrenadante fue desechado; después, los tubos fueron agitados manualmente para aflojar el sedimento y añadir la solución saturada de cloruro de

sodio y se procedió nuevamente a centrifugarlos a 130g por dos minutos. Los huevos flotantes fueron extraídos mediante el vertido del sobrenadante en un tamiz DUVESA® malla 400 con apertura de 0.0038 mm y luego fueron lavados con agua de la llave y colectados.

Prueba de eclosión de huevos de NGI

Esta prueba fue realizada de acuerdo a la guía de la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria (WAAVP por sus siglas en inglés) (Coles *et al.*, 1992). 150µL de la suspensión de huevos que contenían aproximadamente 150 huevos frescos y 100µL del extracto de hojas de *G. sepium* a las concentraciones de 125, 250 y 500µg/mL, fueron incubados por 48 horas a una temperatura de 28 °C. Posteriormente se añadió una gota de yodo para detener la eclosión y se procedió al conteo del número de huevos y larvas L1, usando un microscopio marca VELAB®. Además, se utilizó un control negativo que contenía agua destilada y como control positivo levamisol 2 mg/mL. Se realizaron cuatro repeticiones de cada concentración y controles respectivamente.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando un análisis de varianza (ANOVA), y para la comparación de medias de los porcentajes de inhibición de la eclosión de huevos, se utilizó la prueba de Tukey (5%), con la ayuda del programa SPSS versión 15.0. Para la determinación de la concentración media (DE₅₀) se utilizó la metodología Probit, con la ayuda del programa Polo-Plus (2003)®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención del extracto

El rendimiento del material vegetal de *G. sepium* después de la extracción con el metanol, fue de 81.78 g (22.34%).

Prueba de eclosión de huevos

La prueba *in vitro* para evaluar la inhibición de la eclosión de huevos (Coles *et al.*, 1992) es ampliamente usada en parasitología veterinaria para la búsqueda de nuevos agentes AH (Vasconcelos *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2002). La ventaja de esta prueba es que los compuestos o materiales a ser probados están en contacto directo con los huevos del parásito. La selección *in vitro* de posibles agentes AH antes de probarlos *in vivo* ha demostrado ser una estrategia racional, ya que se ahorra tiempo, dinero y también se minimiza el número de animales

necesarios para el desarrollo de nuevos agentes AH. Sin embargo, los compuestos o sustancias que son eficaces *in vitro*, no necesariamente tendrán la misma actividad *in vivo*. Este tipo de discrepancia en los resultados podría atribuirse a factores clave, tales como: la biodisponibilidad, la farmacología de los compuestos o sustancias en el organismo del huésped, la destrucción de los compuestos activos por la flora intestinal, el metabolismo del rumen y diferentes condiciones observadas *in vitro* versus *in vivo* (Chagas y Vieira, 2007).

En el presente trabajo, la prueba de eclosión de huevos fue utilizada para evaluar la actividad AH del EMHGS. Los resultados obtenidos muestran que las concentraciones evaluadas (500, 250 y 125 µg/mL) inhibieron la eclosión de huevos en 49.7%, 46.2% y 27.7% respectivamente, observándose además, un efecto Dosis-Respuesta (figura 1). El mayor porcentaje de inhibición (97%) fue observado en el control positivo levamisol (2 mg/mL). Se encontraron diferencias significativas ($P<0.05$) entre las tres concentraciones probadas y el control positivo (levamisol) (figura 2). La DE₅₀ obtenida a través del análisis probit fue DE₅₀= 394.96 µg/ mL. Comparado con la eficacia de otros extractos vegetales, el extracto metanólico de hojas de *G. sepium*, fue más efectivo en la prueba de eclosión de huevos, la DE₅₀ fue menor que la reportada por el extracto metanólico de *Manihot esculenta* (50 mg/mL) (Rofaai *et al.*, 2012); el extracto de acetato de etilo de *Cocos nucifera* (2.20 mg/mL) (Oliveira *et al.*, 2009), del extracto etanólico y el extracto hexánico de las semillas de mango (50 mg/mL), (Costa *et al.*, 2002). Von Son-de Fernex *et al.* (2012), estudiando leguminosas tropicales, entre ellas *G. sepium*, encontraron a través de la prueba de desenvaine y de migración larval de *H. contortus* una inhibición del 71.3% y 35.9% respectivamente a 1200 µg/mL, esta dosis fue superior a la utilizada en este trabajo.

El mecanismo de acción de los extractos de plantas sobre huevos de NGI no está totalmente dilucidado (Hoste *et al.*, 2006; Min y Hart, 2003). Sin embargo, de acuerdo a estudios realizados y los compuestos químicos previamente reportados en *G. sepium*, la actividad AH podría ser atribuida a las saponinas y/o taninos condensados (TC) presentes en las hojas (Santacoloma y Granados, 2012; Von Son-de Fernes *et al.*, 2012; Martín *et al.*, 2003; Ching *et al.*, 2001; Rastrelli *et al.*, 1999; Kojima *et al.*, 1998). Los efectos biológicos de las saponinas, normalmente se atribuyen a su interacción específica con las células de membrana, causando cambios en la pared celular (Sparg *et al.*, 2004). Los extractos de plantas que contienen saponinas, pueden disminuir la tensión superficial del huevo y por lo tanto inhibir la eclosión (Hernández-Villegas *et al.*, 2011; Marie-Magdeleine

et al., 2009; Camurca-Vasconcelos *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha demostrado que los TC reducen el conteo de huevos y la carga parasitaria de *T. colubriformis* en ovejas y cabras infectadas (Paolini *et al.*, 2003; Athanasiadou *et al.*, 2001, 2000). Las plantas que contienen taninos han exhibido actividad antihelmíntica *in vitro* e *in vivo* contra NGI, sugiriendo que los taninos son los responsables de esa actividad (Minho *et al.*, 2008; Iqbal *et al.*, 2007; Hoste *et al.*, 2006).

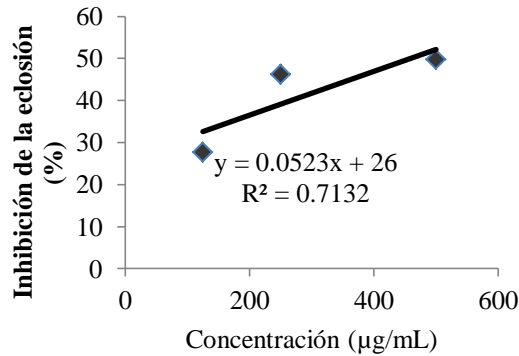


Figura 1. Efecto dosis-respuesta del extracto metanólico de *G. sepium* sobre la inhibición de la eclosión de huevos de NGI.

La actividad ovicida del extracto de *G. sepium* sobre huevos de NGI, no implica que el extracto tenga una acción similar sobre parásitos adultos. Respecto a la actividad AH, esta puede ser influenciada por las diferencias en la fisiología y la biodisponibilidad del extracto dentro del huésped. Por lo tanto se puede confirmar una respuesta definitiva sólo después de un estudio apropiado *in vivo*. Sin embargo, si los efectos mostrados *in vitro* pueden aplicarse *in vivo*, la administración del extracto a los animales infectados con NGI, podría reducir el conteo de huevos en heces y por lo tanto disminuir la contaminación de las pasturas.

CONCLUSIÓN

El extracto metanólico de hojas de *G. sepium* mostró un efecto ovicida a las concentraciones evaluadas. Esta actividad podría estar relacionada con los compuestos reportados previamente en las hojas, como son: saponinas y taninos, los cuales han mostrado eficacia contra huevos de NGI.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo del Dr. Jorge Oliva Hernández en la colecta del material vegetal y la colaboración del Dr. Roberto González Garduño por facilitar el material biológico para la realización del presente trabajo.

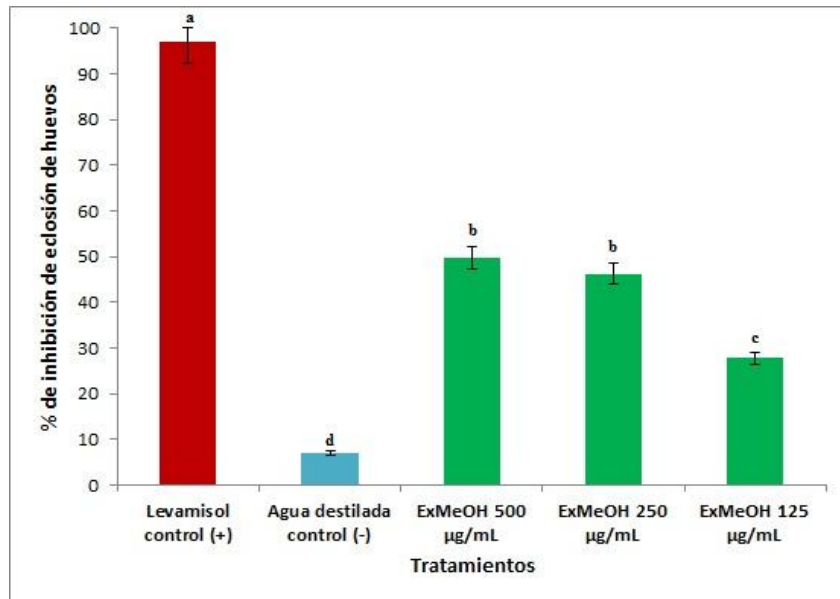


Figura 2. Medias de inhibición de las diferentes concentraciones del extracto de hojas de *G. sepium* sobre huevos de nematodos gastrointestinales de ovinos ($p < 0.05$).

REFERENCIAS

- Alonso-Díaz, M.A., Torres Acosta, J.F.J., Sandoval Castro, C.A., Capetillo-Leal, C.M., 2010. Polyphenolic compounds of nutraceutical trees and the variability of their biological activity measured by two methods. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12, 649–656.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar Caballero, A.J., Hoste, H., 2008. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* exposed to four tropical tanniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology*. 153, 313–319.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., 2011. Comparing the sensitivity of two *in vitro* assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 181, 360–364.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology*. 99, 205-219.
- Athanasiadou, S., y Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L., 2000. Effects of short-term exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Record*. 146, 728-732.
- Barrau, E., Fabre, N., Fouraste, I., Hoste, H., 2005. Effect of bioactive compounds from sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the *in vitro* larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology*. 131, 531–538.
- Bartley, D.J., Jackson, F., Jackson, E., Sargison, N., 2004. Characterisation of two triple resistant field isolates of *Teladorsagia* from Scottish lowland sheep farms. *Veterinary Parasitology*. 123, 189–199.
- Besier, B., 2007. New anthelmintics for livestock: the time is right. *Trends in Parasitology*. 23, 21–24.
- Brunet, S., Fourquaux, I., Hoste, H., 2011. Ultrastructural changes in the third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. *Parasitology International*. 60, 419–424.
- Burke, J.M., Whitley, N.C., Pollard, D.A., Miller, J.E., Terrill T.H. Moulton, K.E., Mosjidise, J.A., 2011. Dose titration of *Sericea lespedeza* leaf meal on *Haemonchus contortus* infection in lambs and kids. *Veterinary Parasitology*. 181, 345-349.
- Cala, A.C., Chagas, A.C.S., Oliveira, M.C.S., Matos, A.P., Borges, L.M.F., Sousa, L.A.D., Souza, F.A., Oliveira, G.P., 2012. *In vitro* anthelmintic effect of *Melia azedarach* L. and *Triclinia clausenii* C. against sheep gastrointestinal nematodes. *Experimental Parasitology*. 130, 98–102.
- Camurca-Vasconcelos, A.L.F., Bevilaqua, C.M.L., Morais, S.M., Maciel, M.V., Costa, C.T.C., Macedo, I.T.F., Oliveira, L.M.B., Braga, R.R., Silva, R.A., Vieira, L.S., 2007. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology*. 148, 288-294.
- Costa, C.T.C., Morais, S.M., Bevilaqua, C.M.L., Souza, M.M.C., Leite, F.K.A., 2002. Ovicidal effect of *Mangifera indica* L. seeds extracts on *Haemonchus contortus*. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 11, 57-60.
- Chagas, A.C.S., Vieira, L.S., 2007. *Azadirachta indica* (Neem) action in goats gastrointestinal nematodes. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 44, 49-55.
- Ching, L.J., Sáez, M.S., García, Y., Pérez, F.N., Rodríguez, A.I., 2001. Determinación de factores antinutricionales en plantas de interés pecuario. *Revista de Producción Animal*. 13, 57-58.
- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H., 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. *Veterinary Parasitology*. 44, 35–44.

- Eguale, T., Tadesse, D., Giday, M., 2011. *In vitro* anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 137, 108-113.
- Epe, C., and Kaminsky, R., 2013. New advancement in anthelmintic drugs in veterinary medicine. *Trends in Parasitology*. 29, 129-134.
- García, E., 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Universidad Nacional Autónoma de México. 243 p.
- Hernández-Villegas, M.M., Borges-Argáez, R., Rodríguez-Vivas, R.I., Torres-Acosta, J.F.J., Méndez-Gonzalez, M., Cáceres-Farfan, M., 2011. Ovicidal and larvicidal activity of the extracts from *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 179, 100-106.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*. 22, 253–261.
- Hussain, A., Khan, M.N., Iqbal, Z., Sajid, M.S., Khan, M.K., 2011. Anthelmintic activity of *Trianthema portulacastrum* L. and *Musa paradisiaca* L. against gastrointestinal nematodes of sheep. *Veterinary Parasitology*. 179, 92–99.
- INEGI. 2007. Anuario Estadístico Tabasco. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Gobierno del Estado de Tabasco, México. p. 574.
- INEGI. 2011. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. Cárdenas, Tabasco. p. 2-3.
- Iqbal, Z., Sarwar, M., Jabbar, A., Ahmed, S., Nisa, M., Sajid, M.S., Khan, M.N., Mufti, K.A., Yaseen, M., 2007. Direct and indirect anthelmintic effects of condensed tannins in sheep. *Veterinary Parasitology*. 144, 125-131.
- Jackson, F.S., Barry, T.N., Lascano, C.E. and Palmer, B., 1996. The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forage legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71, 103-110.
- Kamaraj, C., Rahuman, A. A., 2011. Efficacy of anthelmintic properties of medicinal plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science*. 91, 400–404.
- Katiki, L.M., Chagas, A.C.S., Bizzo, H.R., Ferreira, J.F.S., Amarante, A.F.T., 2011. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. *Veterinary Parasitology*. 183, 103–108.
- Kojima, K., Xiao-Bing, Z., Ogihara., 1998. Saponins from *Gliricidia sepium*. *Phytochemistry*. 48, 885-888.
- Krishnappa, K., Dhanasekaran, S., Elumalai, K., 2012. Larvicidal, ovicidal and pupicidal activities of *Gliricidia sepium* (Jacq.) (Leguminosae) against the malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Culicidae: Diptera). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 598-604.
- Lister, S.J., Dhanoa, M.S., Stewart, J.L., Gill, M., 2000. Classification and comparison of *Gliricidia* provenances using near infrared reflectance spectroscopy. *Animal Feed Science and Technology*. 86, 221-238.
- Manolaraki, F., Sotiraki, S., Stefanakis, A., Skampardonis, V., Volanis, M., Hoste, H., 2010. Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology* 137, 685–696.
- Marie-Magdeleine, C., Hoste, H., Mahieu, M., Varo, H., Archimede, H., 2009. *In vitro* effects of *Cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 161, 99-105.
- Martín, G.A., González, M.T.A., Marrero, T.A.A., Milián, H.V., Campañá, C.H., Rodríguez, I.G., 2003. Obtención de un extracto plaguicida de *Gliricidia sepium* (Jaq) Steud bajo la irradiación con microondas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 8 (3). http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962003000300010&script=sci_arttext

- Min, B.R., Hart, S.P., 2003. Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science*. 81, 102-109.
- Minho, A.P., Bueno, I.C., Gennari, S.M., Jackson, F., Abdalla, A.L., 2008. *In vitro* effect of condensed tannin extract from acacia (*Acacia mearnsii*) on gastrointestinal nematodes of sheep. *Veterinary Parasitology*. 17, 144-148.
- Molan, A.L., Warghorn, G.C., McNabb, W.C., 2002. Effect of condensed tannins on egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis in vitro*. *Veterinary Record*. 150, 65-69.
- Nazli, R., Akhter, M., Ambreen, S., Solangi, A. H., 2008. Insecticidal, nematicidal and antibacterial activities of *Gliricidia sepium*. *Pakistan Journal of Botany*. 40, 2625-2629.
- Oliveira, L.M.B., Bevilaqua, C.M.L., Costa, C.T.C., Macedo, I.T.F., Barros, R.S., Rodrigues, A.C.M., Camurca-Vasconcelos, A.L.F., Morais, S.M., Lima, Y.C., Vieira, L.S., Navarro, A.M.C., 2009. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*. 159, 55-59.
- Palma, J.M., Delgado, C., Moya, A., Aguirre, M., 1995. Composición química y digestibilidad de tres leguminosas arbóreas. *Memorias, Primer Simposium Estatal de Ciencia y Tecnología*. Universidad de Colima. Colima, México. pp 6.
- Paolini, V., Fouraste, I., Hoste, H., 2004. *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin extracts on two parasitic stages of three parasitic nematode species. *Parasitology*. 129, 69-77.
- Paolini, V., Frayssines, A., De La Farge, F., Dorchies, P., Hoste, H., 2003. Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Veterinary Research*. 34, 331-339.
- Rastrelli, L., Caceres, A., De Simone, F., Aquino, R., 1999. Studies on the constituents of *Gliricidia sepium* (Leguminosae) leaves and roots: isolation and structure elucidation of new triterpenoid saponins and aromatic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 1537-1540.
- Rofaai, A.A.I., Rahman, W.A., Sulaiman, F.S., Yahaya, S.Z., 2012. *In vitro* ovicidal and larvicidal of methanolic leaf extract of *Manihot esculenta* (cassava) on susceptible and resistant strains of *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*. 190, 127-135.
- Santacoloma, V.L.E., Granados, J.E., 2012. Interrelación entre el contenido de metabolitos secundarios de las especies *Gliricidia sepium* y *Tithonia diversifolia* y algunas propiedades físicoquímicas del suelo. *Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD)*. pp. 53-62.
- Sparg, S.G., Light, M.E., Staden, V., 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. 94, 219-243.
- Vasconcelos, A.L.C., Bevilaqua, C.M., Morais, S.M., Maciel, M.V., Costa, C.T., Macedo, I.T., Oliveira, L.M., Braga, R.R., Silva, R.A., Vieira, L.S., 2007. Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology*. 148, 288-294.
- Von Son-de Fernes, E., Alonso- Díaz, M.A., Valles-de la Mora, B., Capetillo-Leal, C.M., 2012. *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Experimental Parasitology*. 131, 413-418.
- Wabo, P. J., Kenne, T. F., Mpoame, M., Pamo, T. E., Bilong, B. C. F., 2011. *In vitro* activities of acetonic extracts from leaves of three forage legumes (*Calliandra calothyrsus*, *Gliricidia sepium* and *Leucaena diversifolia*) on *Haemonchus contortus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 125-128.
- Waller, P.J., Thamsborg, S.M., 2004. Nematode control in 'green' ruminant production systems. *Trends in Parasitology*. 20, 493-497.
- Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., von Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N.C., 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*. 20, 469-476.

Revised received April 03, 2014