

ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto *in vitro* de extractos acuosos de *Moringa oleifera* y *Gliricida sepium* en el desarrollo de las fases exógenas de estrogilidos gastrointestinales de ovinos

Mileydy Puerto Abreu^I, Javier Arece García^{II*}, Yoel López Leyva^{II}, Yaima Roche^{II}, Michael Molina^{II}, Argemiro Sanavria^{III}, Adivaldo H. da Fonseca^{III}

^IEmpresa de Ganado Menor. Establecimiento Colón. Matanzas. Cuba. ^{II}Estación Experimental de Pastos y Forrajes «Indio Hatuey» de la Universidad de Matanzas «Camilo Cienfuegos». Central España Republicana. CP. 44280. Matanzas. Cuba. *Email: arece@ihatuey.cu. ^{III}Laboratório de Doenças Parasitárias. Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública. Instituto de Veterinária. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica. RJ. Brasil.

RESUMEN: Con el objetivo de determinar el efecto antiparasitario, *in vitro*, de extractos acuosos de *Moringa oleifera* y *Gliricidia sepium* en las fases exógenas del ciclo biológico de estrogilidos gastrointestinales de ovinos, se prepararon extractos acuosos, para cada planta, en tres concentraciones (50, 25 y 12,5 mg/ml) y se evaluó su actividad sobre la eclosión de huevos y la migración de las larvas del tercer estadio, comparado con controles positivos (Albendazol o Levamisol) y negativos (PBS y DMSO). En el primer ensayo se realizaron once tratamientos que corresponden a las tres concentraciones de *M. oleifera* (MOR-50, MOR-25 y MOR-12,5), *G. sepium* (GLR-50, GLR-25 y GLR-12,5), PBS (control negativo, solvente de los extractos), Albendazol (control positivo) (ABZ-5, ABZ-2,5, ABZ-1,25) y DMSO (control negativo, solvente del ABZ). En la migración larvaria se utilizaron las mismas concentraciones del extracto acuoso de cada planta, un control negativo (PBS) y uno positivo en tres concentraciones (Levamisol, LEV-5, LEV-2,5, LEV-1,25). Las dos plantas inhibieron la capacidad de eclosión de huevos, con mayor tasa de inhibición ($p < 0,05$), para *M. oleifera*. El análisis *Probit* demostró que la concentración efectiva media fue de 60,92 y 30,70 mg/ml para *M. oleifera* y *G. sepium*, respectivamente. Las dos plantas mostraron efectos ($p < 0,05$) sobre la migración larvaria, comparadas con los controles, con tasas de inhibición de la migración por encima de 97%. Los resultados *in vitro* sugieren que las dos plantas poseen propiedades antiparasitarias que pudieran ser valoradas en posteriores estudios *in vivo*.

Palabras clave: *Moringa oleifera*, *Gliricidia sepium*, Antihelmíntico, ovinos, Strongylida.

In vitro effect of *Moringa oleifera* and *Gliricidia sepium* aqueous extracts in the development of non- parasitic stages of sheep gastrointestinal strongyles

ABSTRACT: A research was carried out aimed at determining the *in vitro* anthelmintic effects of aqueous extracts of *Moringa oleifera* and *Gliricidia sepium* on the non-parasitic stages of sheep gastrointestinal strongyles. The activity of three concentrations were evaluated (50, 25 and 12,5 mg/ml) on egg hatching and larval migration, compared with negative (PBS or DMSO) and positive controls (Albendazole or Levamisole). The egg hatching assay was carried out with eleven treatments corresponding to the three concentrations: (*M. oleifera*: MOR-50, MOR-25 and MOR-12,5 mg/ml and *G. sepium*: GLR-50, GLR-25 and GLR-12,5 mg/ml), PBS and DMSO (negative controls) and three Albendazole concentrations (ABZ-5, ABZ-2,5, ABZ-1,25 mg/ml). For the larval migration test, the same plant extract concentrations were used, and also PBS as negative control and three Levamisole concentrations (LEV-5, LEV-2,5, LEV-1,25 mg/ml). The results showed that the two plants interfered on egg hatching with higher inhibition rates ($p < 0,05$) for *M. oleifera*. A *Probit* analysis showed an effective concentration of 60,92 and 30,70 mg/ml for *M. oleifera* and *G. sepium*, respectively. Both plants affected ($p < 0,05$) the larval migration ability, as compared to the controls, showing migration inhibition over 97%. This *in vitro* screening suggests that these plants have anthelmintic properties, and further *in vivo* studies are needed.

Key words: *Moringa oleifera*, *Gliricidia sepium*, Anthelmintic, sheep, Strongylida.

*Correspondencia: Javier Arece García. Estación Experimental de Pastos y Forrajes «Indio Hatuey» de la Universidad de Matanzas «Camilo Cienfuegos». Central España Republicana. CP. 44280. Matanzas. Cuba. Email: arece@ihatuey.cu.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de alternativas que minimicen el uso de los antihelmínticos en pequeños rumiantes constituye una de los principales retos en el contexto actual, donde la resistencia a los principales medicamentos antiparasitarios se acentúa, como resultado de su uso indiscriminado (1). Esta situación se agudiza por el lento desarrollo, a corto plazo, de moléculas antiparasitarias.

Diferentes estrategias se han estudiado con el objetivo de encontrar soluciones a la problemática del parasitismo gastrointestinal en ovinos. Entre ellos se destacan los relacionados con el uso de plantas con potencialidades antiparasitarias (2, 3).

Los estudios *in vitro* constituyen una herramienta de mucha utilidad para discriminar plantas con propiedades antiparasitarias (4,5,6,7). Estos poseen como principio su corta duración y bajo costo para su realización, además de fiabilidad con los modelos actuales para la evaluación de fármacos antiparasitarios.

En Cuba existen experiencias en el uso de fitofármacos en el control parasitario. El resultado de mayor impacto se desarrolló en *Bromelia pinguin* (Piña de ratón), la cual mostró ser efectiva ante *Haemonchus* spp. en terneros (8) y posteriormente se evaluó en México en infestaciones por *Oesophagostomum columbianum* en ovinos (9).

En la actualidad, muchos de los productores de pequeños rumiantes usan en la alimentación de sus rebaños árboles y arbustos forrajeros proteicos. Resultaría interesante demostrar en la práctica social que estos, además de contribuir a la mejora de la dieta de los animales, tuvieran propiedades antiparasitarias. En tal sentido, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antiparasitario *in vitro* de extractos acuosos de *Moringa oleifera* y *Gliricidia sepium* sobre las fases exógenas de strongílidos gastrointestinales de ovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Parasitología de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes «Indio Hatuey», situada en la provincia de Matanzas. Las hojas de *M. oleifera* y *G. sepium* se cosecharon en horario de la mañana (8:00-8:30 am) de áreas experimentales pertenecientes a la Institución. Posteriormente, se realizó una extracción acuosa con PBS en fresco (10) con el empleo de nitrógeno líquido. A partir de ello, se preparó una solución madre de 500 mg/ml. Para los ensayos se utilizaron tres concentraciones: 50, 25 y 12,5 mg/ml.

Prueba de eclosión de huevos (PEH). Estos ensayos se realizaron a partir de modificaciones de las técnicas descritas por Hubert y Kerboeuf (11) y Marie-Magdeleine *et al.* (3). Para ello se conformaron once tratamientos que corresponden a las tres concentraciones de *M. oleifera* (**MOR-50, MOR-25 y MOR-12,5**), *G. sepium* (**GLR-50, GLR-25 y GLR-12,5**), **PBS** (control negativo, solvente de los extractos), Albendazol (control positivo) (**ABZ-5, ABZ-2,5, ABZ-1,25**), y Dimetil sulfóxido, **DMSO** (control negativo, solvente del ABZ). Se colectaron huevos de strongílidos de animales infestados según lo descrito por Hubert y Kerboeuf (12) y se depositaron en placas de cultivo celular de 24 pocillos, para ser enfrentados con las diferentes soluciones o tratamientos experimentales, sobre la base de un diseño completamente aleatorizado con seis réplicas por tratamiento. Se incubaron por 48 h y, transcurrido ese tiempo, se detuvo la eclosión con 100 µL de solución de Lugol. Se contaron larvas y huevos en 20 alícuotas de 10 µL, y se determinó el porcentaje de eclosión.

Prueba de migración larvaria (PML). El principio de esta prueba consistió en enfrentar larvas del tercer estadio (L₃) obtenidas mediante coprocultivos (13) a las tres concentraciones del extracto acuoso de cada planta, un control negativo (**PBS**) y uno positivo (Levamisol) en tres concentraciones (**LEV-5, LEV-2,5, LEV-1,25**). Los ensayos consistieron en enfrentar las larvas L₃ a las soluciones por 2 horas en un tubo de ensayo Falcon® cónico y, después de sucesivos lavados con PBS se pusieron a migrar a través de un tamiz de 20 µm en un dispositivo preparado para este fin. Posteriormente, se determinó la cantidad de larvas migradas y se calculó el porcentaje de migración (14).

Análisis estadístico. Los datos se procesaron con el paquete estadístico SPSS®. Los valores porcentuales (X) de cada prueba se transformaron ($\arccos \sqrt{x}$) para la realización de un análisis de varianza de clasificación simple. Se comprobó la homogeneidad de las varianzas y la distribución normal de los datos. Las diferencias entre las medias se realizaron mediante la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan (15). Los porcentajes de eclosión y migración larvaria se corrigieron mediante la fórmula de Abbott:

$$M(\%) = \frac{M_{\text{ext}} - M_{\text{control}}}{1 - M_{\text{control}}}$$

Donde:

M (%) - Eclosión o Migración, según corresponda

M ext.- Eclosión o Migración de los extractos o grupo control positivo.

M control- Eclosión o Migración del grupo control negativo con PBS.

Se realizó un análisis de regresión *Probit* para la determinación de la concentración efectiva (CE_{50}) de cada planta, en la eclosión de los huevecillos (16).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La principal ventaja del empleo de ensayos *in vitro* para discriminar plantas con propiedades antihelmínticas incluye el bajo costo relativo y su rápida respuesta, lo que permite trabajar a gran escala, con una cantidad considerable de plantas. Adicionalmente, los ensayos *in vitro* poseen la ventaja de que se puede trabajar al mismo tiempo en diferentes fases del desarrollo de los parásitos, ya sea en la validación de la eclosión de huevecillos, el desarrollo, desenvainamiento y la migración de las larvas, hasta incluso con parásitos adultos, sin interferir en las funciones fisiológicas de los hospederos (2, 17, 18).

En la Tabla 1 se muestra el porcentaje de eclosión de cada tratamiento.

TABLA 1. Porcentaje de eclosión de huevecillos de estrombilidos gastrointestinales de ovinos frente a extractos acuosos de *M. oleifera* y *G. sepium*. / *Appearance percentage of sheep gastrointestinal strongyle eggs against M. oleifera and G. sepium aqueous extracts.*

Tratamiento	Eclosión ^Ω	
PBS	81,87	a
DMSO	63,93	bc
ABZ-5	28,27	h
ABZ-2,5	33,78	gh
ABZ-1,25	33,29	gh
MOR-50	51,99	def
MOR-25	44,93	defg
MOR-12,5	42,96	efg
GLR-50	55,96	bcde
GLR-25	67,86	b
GLR-12,5	41,40	gh
ES ±	2.22***	

Ω Corregida según fórmula de Abbott con el PBS como control negativo.

Medias con diferente letra difieren significativamente para $p < 0,001$

Se aprecia que los extractos en las concentraciones utilizadas, interfirieron en la eclosión de los huevecillos de estrombilidos gastrointestinales en las concentraciones utilizadas. Los grupos control negati-

vo (DMSO y PBS) presentaron los porcentajes de eclosión más altos ($p < 0,05$), en relación con todos los extractos de plantas. Esta situación indica la inocuidad de la solución tampón (PBS) y del DMSO. Por su parte, la tasa de eclosión obtenida con el grupo control positivo (ABZ) fue la más baja ($p < 0,001$), lo cual ratifica el efecto ovicida de este fármaco (19).

Las dos plantas lograron inhibir de manera significativa ($p < 0,001$) la eclosión de huevos, con efecto dependiente de las dosis empleada. Estos valores estuvieron entre 41,40 y 67,86 % con los mejores resultados para la concentración más baja (41,40 % en dosis de 12,5 mg/ml) de *G. sepium*.

En estudios realizados con extractos de *Spigelia anthelmia* (14) y *Melia azedarach* (17) se obtuvieron resultados similares en la inhibición de la eclosión de huevecillos de *H. contortus*. Por su parte, en Cuba con *Azadirachta indica* (20) se encontró tasas de eclosión inferior a las del presente estudio, lo que pudo estar relacionado con los efectos directos de la azadirachtina o algunos metabolitos secundarios como los triterpenoides y los taninos condensados, a los cuales se les atribuyen efectos ovicidas (21). En una investigación desarrollada con extractos de mango (*Mangifera indica*) en Brasil (22) se apreció una tasa de inhibición de la eclosión de un 95,66 %, en concentraciones de 50 mg/ml, con efecto dependiente de la dosis empleada.

Los porcentajes de eclosión obtenidos son también similares a los hallados con extractos acuosos de semillas de *Carica papaya* y superiores a los de hojas de yuca (*M. esculenta*) (12,35 %) y plátano (*Musa paradisiaca*) (6,14%), obtenidos en Guadalupe (23).

En la Tabla 2 se aprecian las regresiones realizadas para el análisis *Probit*.

La CE_{50} más baja encontrada fue para *G. sepium* con valores 50% inferiores en relación con *M. oleifera*, lo cual está posiblemente relacionado con las diferencias en los perfiles y concentraciones de los metabolitos secundarios presentes en cada una de ellas.

La concentración efectiva media (a veces empleada la dosis letal media, DL_{50}) presenta variaciones en función de la especie de nematodo frente al extracto, lo cual se justifica por la individualidad de cada especie de helminto y el tipo de planta. En Pakistán se encontró efectos antiparasitarios en *Adhatoda vasica* con DL_{50} entre 14 y 15 mg/ml para *H. contortus*, *T. colubriformis* y *O. columbianum* (24).

La medición de la capacidad de migración de las larvas a través de un tamiz de 20 μm (Figura) demostró

TABLA 2. Concentración efectiva (CE_{50}) y ecuación de regresión de los diferentes extractos en la eclosión de huevecillos de estrongílicos gastrointestinales de ovinos./ *Effective concentration (CE_{50}) and regression equation of the different extracts in the appearance of the sheep gastrointestinal strongyle eggs.*

Planta	Ecuación	CE_{50}	Sign.
<i>M. oleifera</i>	Eclosión = $-0,65 \text{ Log}_{10} (\text{Dosis}) + 6,17$	60,92	***
<i>G. sepium</i>	Eclosión = $-0,87 \text{ Log}_{10} (\text{Dosis}) + 6,30$	30,70	***

*** $P < 0.001$

que los extractos, en sus tres concentraciones, tuvieron efectos inhibitorios en la motilidad de las mismas. Mediante este estudio, se demostró que el PBS no interfirió de manera significativa en la capacidad migratoria de los estadios infestivos, mientras que con el Levamisol solo migró del 6 al 13%. Este fármaco es un potente larvicida que produce una parálisis espástica por actuar como antagonista selectivo en los receptores nicotínicos y acetilcolínicos (sinápticos y postsinápticos) de las células musculares de los parásitos (25).

Las mayores tasas de inhibición de la migración larvaria se encontraron ($p < 0,05$) para *M. oleifera* y *G. sepium*, superiores a las del grupo control positivo (Levamisol). Estos resultados son inferiores a los reportados en extractos metanólicos de yuca (*M. esculenta*) y huevo de gallo (*Tabernaemontana citrifolia*), con valores de 57,6 % y 50,6 % para cada uno, respectivamente (3, 14). El efecto de inhibición de la capacidad de migración de las larvas se atribuye a la pre-

sencia de metabolitos secundarios con propiedades antiparasitarias, como los taninos condensados (26), las lectinas (27), los terpenoides (17) y flavonoides (28).

En el caso de *M. oleifera*, se encontró en un tamizaje fitoquímico la presencia de alcaloides, glicósidos, flavonoides, esteroides, terpenoides, saponinas, taninos y antraquinonas (29), mientras que en Nigeria (30) se encontraron concentraciones de taninos condensados (TC) de 21,9 %. Por su parte, *G. sepium* es una planta que presenta una gran variedad de metabolitos secundarios, tales como saponinas, taninos y alcaloides (31) y también se han encontrado concentraciones de TC entre 3,6 y 4,6 % (32).

Es muy probable que los TC (fundamentalmente en *M. oleifera*) sean los principales responsables de la actividad inhibitoria de la migración larvaria. La forma en que los TC actúan, continúa en un debate profundo. Sobre el tema, existen dos hipótesis: la primera de ellas se sustenta en los posibles efectos directos de estas sustancias al poseer la capacidad de formar

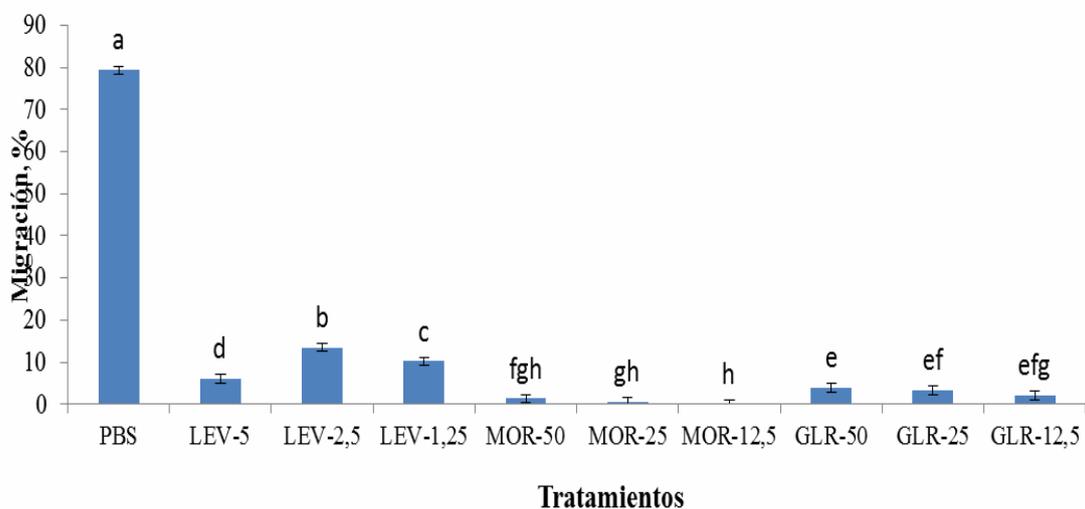


FIGURA. Porcentaje de migración de larvas L_3 de estrongílicos gastrointestinales de ovinos frente a extractos acuosos de *M. oleifera* (MOR) y *G. sepium* (GLR)./ *Migration percentage of sheep gastrointestinal strongyle larvae L_3 against *M. oleifera* (MOR) and *G. sepium* (GLR) aqueous extracts.*

complejos con las proteínas de los parásitos del tracto gastrointestinal (33). Estos, se considera que actúan de dos formas fundamentales: I) unión a las proteínas libres, lo que reduce la cantidad de nutrientes disponibles y las larvas mueren o, II) unión a la cutícula de la larva que es rica en glicoproteínas, causando la muerte de la larva (34). Esta hipótesis constituye la más aceptada en estudios *in vivo* de corta duración o en estudios *in vitro*. En adición, los taninos intervienen en la disminución de la capacidad fecundativa de los parásitos (35) y, directamente sobre los parásitos adultos (36, 37).

Es muy probable que los efectos antiparasitarios no sean solo por algún metabolito secundario en particular, sino por la presencia combinada de ellos. Es conocido que la *M. oleifera* (38) y el *G. sepium* (27) poseen niveles considerables de lectinas. Posiblemente, la combinación de los efectos de los TC condensados y este metabolito secundario contribuyeron a inmovilizar mayor cantidad de larvas y posiblemente interfirieron en la capacidad de migración de las L₃ de nematodos gastrointestinales de ovinos.

AGRADECIMIENTOS

El proyecto fue cofinanciado por el Ministerio de la Agricultura (Proyecto No. P131LH001-0072) y el Programa CAPES/MES-Proyectos. Agradecemos también a la Dra. Carine Marie-Magdeleine de la Unité de Recherches Zootechniques del INRA, Guadeloupe, por la asistencia técnica en estas investigaciones.

REFERENCIAS

1. Arece J, Mahieu M, Archimède H, Aumont G, Fernández M, González E, et al. Comparative efficacy of six anthelmintics for the control of nematodes in sheep in Matanzas, Cuba. *Small Rum Res.* 2004;5(1-2):61-67.
2. Githiori JB, Athanasiadou S, Thamsborg SM. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet Parasitol.* 2006;139:308-320.
3. Marie-Magdeleine Carine, Udino L, Philibert L, Bocage B, Archimède H. In vitro effects of Cassava (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stages of *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol.* 2010;1-2: 85-92.
4. Alawa CBI, Adamu AM, Gefu JO, Ajanusi OJ, Abdu PA, Chiezey NP, et al. In vitro screening of two Nigerian medicinal plants (*Vermonia amygdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. *Vet Parasitol.* 2003;113:73-81.
5. Diehl MS, Atindehou KK, Téré H, Betschart B. Prospect for anthelmintic plants in the Ivory Coast using ethno-botanical criteria. *J Ethnopharmacol.* 2004;95:277-284.
6. Maciel MV, Morais SM, Bevilaqua CM, Camurça-Vasconcelos AL, Costa CT, Castro CM. Ovicidal and larvicidal activity of *Melia azedarach* extracts on *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol.* 2006;140:98-104.
7. Bizimenyera ES, Githiori JB, Eloff JN, Swan GE. In vitro activity of *Peltophorum africanum* Sond (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Parasitol.* 2006;142:336-343.
8. Marrero Evangelina, Alfonso HA, García Teresita, Rodríguez-Diego JG, Figueredo María de los Ángeles, Pérez R. Actividad antihelmíntica de *Bromelia pinguin* L. (Bromeliaceae) en terneros. *Rev Salud Anim.* 1994;16(1-3):63-68.
9. Olivares J. *Oesophagostomum columbianum*: Puesta en evidencia, caracterización y control en ovinos de la región de Huichapán. Estado de Hidalgo, México. Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. CENSA. La Habana, Cuba. 2001; 137 p.
10. Díaz Maykelis, Pérez Y, Cazaña Yanet, Prieto Marlene, Wencomo Hilda, Lugo Yudit. Determinación de antioxidantes en variedades e híbridos de *Morus alba*. *Pastos y Forrajes.* 2010;33(3):301-310.
11. Hubert J, Kerboeuf D. A new method for culture of larvae used in diagnosis of ruminant gastrointestinal strongylosis: Comparison with fecal cultures. *Can J Comp Med.* 1984;48:63-71.
12. Hubert J, Kerboeuf D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet Rec.* 1992;130:442-446.

13. Roberts FHS, O'Sullivan JP. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Aust J Agr Res.* 1950;1:99-102.
14. Marie-Magdeleine Carine, Mahieu M, D'Alexis S, Philibert L, Archimede H. In vitro effects of *Tabernaemontana citrifolia* extracts on *Haemonchus contortus*. *Res Vet Sci.* 2010;89(1):88-92.
15. Duncan D. Multiple rangers and multiple F. Test. *Biometric.* 1955; 1:11.
16. Waller PJ, Dobson RJ, Donald AD, Griffiths DA, Smith EF. Selection studies on anthelmintic resistant and susceptible populations of *Trichostrongylus colubriformis* of sheep. *Int J Parasitol.* 1985;15:669-676.
17. Molan AL, Meagher LP, Spencer PA, 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.* 2003;33:1691-1698.
18. Assis LM, Bevilaqua CML, Morais Vieira LS, Costa CTC, Souza JAL. Ovicidal and larvicidal activity in vitro of *Spigelia anthelmia* Linn. extracts on *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol.* 2003;117:43-49.
19. Martín RJ, Robertson AP, Bjorn H. Target sites of anthelmintics. *Parasitol.* 1997;114: S111-S124.
20. Barrabí Mireysi, Arece J. Actividad antihelmíntica in vitro de extracto acuoso de hojas y semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). I. Inhibición de la eclosión de huevos y del desarrollo larvario. *Rev Salud Anim.* 2013;35(2): 103-108.
21. Pessoa LM. Actividade ovicida in vitro de plantas medicinais contra *Haemonchus contortus*. Tesis en opción al grado de Máster en Parasitología Veterinaria. Universidade Estadual do Ceará. Brasil. 2001; 68 p.
22. Costa CTC, Morais SM, Bevilaqua DE, Souza CML, et al. Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus contortus*. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2002;11:57-60.
23. Marie-Magdeleine Carine. Etude de ressources végétales tropicales pour un usage anthelminthique en élevage de ruminants. Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Agronómicas. Universidad de las Antillas, Guadalupe F.W.I. 2009; 276 p.
24. Al-Shaibani IR, Phulan M, Arijó A, Qureshi TA. Ovicidal and larvicidal properties of *Adhatoda vasica* (L.) extracts against gastrointestinal nematodes of sheep in vitro. *Pakistan Vet J.* 2008;28(2):79-83.
25. Martin RJ. Modes of Action of Anthelmintic Drugs. *Vet J.* 1997;154:11-34.
26. Nguyen TM, Binh DV, Ørskov RV. Effect of foliages containing condensed tannins on gastrointestinal parasites. *Anim Feed Sci Tech.* 2005;121:77-87.
27. Ríos de Álvarez Leyla, Jackson F, Greer A, Bartley Y, Bartley DJ, et al. In vitro screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. *Vet Parasitol.* 2012;186:390-398.
28. Ademola IO, Akanbi AI, Idowu SO. Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* chromatographic seed fractions on gastrointestinal sheep nematodes. *Pharm Biol.* 2005;45:599-604.
29. Sinha SN. Phytochemical analysis and antibacterial potential of *Moringa oleifera* Lam. *IJSID.* 2012;2(4): 401-407.
30. Ogbe AO, Affiku JP. Proximate study, mineral and anti-nutrient composition of *Moringa oleifera* leaves harvested from Lafia, Nigeria: potential benefits in poultry nutrition and health. *J Microbiol, Biotechnol Food Sci.* 2012;1(3):296-308.
31. García DE, Medina María G. Composición química, metabolitos secundarios, valor nutritivo y aceptabilidad relativa de diez árboles forrajeros. *Zootecnia Trop.* 2006;24(3):233-250.
32. Romero Claudia, Palma JM, López J. Influencia del pastoreo en la concentración de fenoles totales y taninos condensados en *Gliricidia sepium* en el trópico seco. *LRRD.* 2000;12(4).
33. Mueller-Harvey I. Unraveling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J Sci Food Agr.* 2006;86:2010-2037.
34. Cala C, Chagas ACS, Oliveira MCS, Matos AP, Borges LMF, et al. In vitro Anthelmintic effect of

- Melia azedarach* L. and *Trichilia clausenii* against sheep gastrointestinal nematodes. *Exp Parasitol.* 2012;130:98-102.
35. Martínez-Ortíz de Montellano Cintli, Vargas-Magaña JJ, Canul-Ku HL, Miranda-Soberanis R, Capetillo-Leal C, et al. Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult population of *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet Parasitol.* 2010;172:283-290.
36. Manolaraki F, Sotiraki S, Stefanakis A, Skampardonis V, Volanis M, Hoste H. Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitol.* 2010;137:684-696.
37. Martínez-Ortíz de Montellano Cintli, Arroyo-López C, Fourquaux I, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H. Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under in vivo and in vitro conditions. *Exp Parasitol.* 2013;133:281-286.
38. Coelho Juliene, Santos ND, Napoleão TH, Gomes FS, Ferreira RS, et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere.* 2009;77:934-938.

Recibido: 10-9-2013.

Aceptado: 8-11-2013.