

Actividad ovicida y larvicida de extractos acuosos de *Pluchea sericea* y *Artemisia tridentata* en *Haemonchus contortus*

Ovicidal and larvicidal activity of aqueous extracts of *Pluchea sericea* and *Artemisia tridentata* on *Haemonchus contortus*

Ramón Luck-Montero¹, Leonel Avendaño-Reyes¹, Carlos Enrique Ail-Catzim^{1*}, Jorge Cuéllar-Ordaz², Fernando Muñoz-Tenería³, Ulises Macías-Cruz¹

¹Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California. Ejido Nuevo León, Carretera a Delta s/n, CP. 21705, Mexicali, Baja California, México.

²Facultad de Estudios Superiores, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. 1o de Mayo s/n, Santa María las Torres, Campo Uno, CP. 54740, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.

³Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Km. 14.5 Carretera San Luis Potosí-Matehuala, Ejido Palma de la Cruz, CP. 78321, Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

*Autor de correspondencia: carlos.ail@uabc.edu.mx

Nota científica recibida: 03 de febrero de 2017 **aceptada:** 04 de junio de 2017

RESUMEN. El objetivo fue evaluar la actividad ovicida y larvicida de extractos acuosos de hojas de *Pluchea sericea* y *Artemisia tridentata* sobre *Haemonchus contortus*. Se evaluaron concentraciones de 100, 75, 50, 25 y 12.5 mg mL⁻¹ de cada extracto. Se tuvo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para todas las concentraciones en la inhibición de la eclosión de huevos y mortalidad larval de *H. contortus*. La dosis de 100 mg mL⁻¹ redujo la eclosión larvaria en 100 y 96.30%, con mortalidad larvaria del 92.67 y 89.33% para *P. sericea* y *A. tridentata*, respectivamente. La CL₅₀ fue de 23.21 y 23.26 mg mL⁻¹ para la inhibición de eclosión de huevos, para la mortalidad larvaria se tuvo una CL₅₀ de 20.36 y 27.18 mg mL⁻¹ para los extractos de *P. sericea* y *A. tridentata*, respectivamente. Los extractos acuosos de hojas de *P. sericea* y *A. tridentata* controlan los estadios de huevo y larva de *H. contortus*.

Palabras clave: Antihelmíntico, *Artemisia tridentata*, huevos de *H. contortus*, nematodo gastrointestinal, *Pluchea sericea*.

ABSTRACT. The objective was to evaluate the ovicidal and larvicidal activity of aqueous extracts of *Pluchea sericea* and *Artemisia tridentata* leaves on *Haemonchus contortus*. Concentrations of 100, 75, 50, 25 and 12.5 mg mL⁻¹ of each extract were assessed. There were significant differences ($p \leq 0.05$) for all the concentrations in the inhibition of egg hatching and larval mortality of *H. contortus*. The 100 mg mL⁻¹ dose reduced larval hatching by 100 and 96.30%, with larval mortality of 92.67 and 89.33% for *P. sericea* and *A. tridentata*, respectively. The LC₅₀ was 23.21 and 23.26 mg mL⁻¹ for the inhibition of egg hatching; for larval mortality, a LC₅₀ of 20.36 and 27.18 mg mL⁻¹ was found for the extracts of *P. sericea* and *A. tridentata*, respectively. The aqueous extracts of *P. sericea* and *A. tridentata* leaves control the egg and larval stages of *H. contortus*.

Key words: Anthelmintic, *Artemisia tridentata*, *H. contortus* eggs, gastrointestinal nematode, *Pluchea sericea*.

INTRODUCCIÓN

Haemonchus contortus es un nemátodo gastrointestinal de rumiantes que afecta la productividad de ovinos en diferentes regiones del mundo. Por su actividad hematófaga, provoca reducción en las tasas de crecimiento y fecundidad, así como incre-

mento en la mortalidad de animales (Moreno et al. 2010). Su tratamiento y control se basa exclusivamente en moléculas de químicos inorgánicos, lo que ha provocado resistencia a este tipo de productos (Van Wyk 2001). Esta problemática ha motivado la búsqueda de alternativas, para su manejo, siendo una de éstas el uso de plantas con propiedades an-

tihelmínticas (Irum et al. 2015). La exploración de plantas para el control de nemátodos gastrointestinales de ovejas y cabras ha sido extensa en los últimos diez años, lo que ha desarrollado el uso de extractos crudos o soluciones antiparasitarias. Entre las plantas investigadas con efecto ovicida y larvicida contra *H. contortus*, se reporta *Theobroma cacao* (Vargas-Magaña et al. 2014), *Citrus sinensis* (Islam et al. 2015), *Artemisia vestita*, *Artemisia maritima* (Irum et al. 2015) y *Rhizophora mangle* (Alemán et al. 2011).

La planta *Pluchea sericea* comúnmente conocida como Cachanilla, es un arbusto silvestre de hoja perenne, que crece en suelos arenosos o salinos en los desiertos de Baja California, Sonora y Chihuahua en México (Villaseñor y Villareal 2006). Existe evidencia reciente de su potencial en el control de plagas de los cultivos. Al respecto Ail-Catzim et al. (2015) reportan efecto insecticida y repelente de extractos acuosos, acetónicos y etanólicos de hojas y tallos de *P. sericea* sobre *Bemisia tabaci*. La planta *Artemisia tridentata* es un arbusto importante del oeste de América del Norte, se distribuye desde Columbia Británica hasta México (Jassbi et al. 2010). Los usos de esta especie por pueblos nativos americanos incluyen analgésicos, antiinflamatorios, antisépticos, actividad inmunestimulante, así como el tratamiento de aflicciones de origen espiritual (Turi et al. 2014).

No hay estudios que confirmen la actividad antihelmíntica de *P. sericea* y *A. tridentata* sobre *H. contortus*; por lo tanto, es importante estudiar los extractos de estas plantas, como una alternativa para el manejo de *H. contortus* en sistemas de producción ovina. Debido a lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto ovicida y larvicida de extractos acuosos de hojas de *P. sericea* y *A. tridentata* en huevos y larvas del tercer estadio (L_3) de *H. contortus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Parasitología del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Baja California, localizada

en Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California. Se recolectaron partes aéreas de *P. sericea* en el Valle de Mexicali ($32^{\circ} 24' 34''$ LN y $115^{\circ} 11' 31''$ LO), en el municipio de Mexicali y de *A. tridentata* en el Valle de la Trinidad ($31^{\circ} 24' 15''$ LN y $115^{\circ} 43' 55''$ LO), en el municipio de Ensenada. Las muestras de hojas se secaron a temperatura ambiente bajo sombra, para luego molerlas en un molino (Willey) para obtener partículas de 2 mm de diámetro.

Los extractos de estas plantas se obtuvieron de 200 g de muestra de hojas molidas en 2 L de agua destilada a 100°C , por 3 h. Posteriormente se filtró con gasa y algodón para separar los residuos sólidos, el filtrado de cada muestra se rotovaporó a 40°C y 0.2 bar de presión con un equipo Heidolph L3. El extracto concentrado se congeló a -50°C para su liofilización en un equipo Labconco. Se tuvieron rendimientos de extracto del 10 y 8% para *A. tridentata* y *P. sericea*, respectivamente.

Para la obtención de los huevos y larvas de *H. contortus*, se suministró oralmente 4000 larvas de tercer estadio (L_3) del parásito a dos ovinos machos (Donadores) no castrados de 4 meses de edad, con peso de 25 kg cada uno. A partir de 21 d post-infección se observaron por conteo 2 000 huevos de *H. contortus* g^{-1} de heces (HPG). Los donadores recibieron una dieta de mantenimiento, compuesta de 80% de paja de trigo más 20% de heno de alfalfa (Proteína cruda 9.3% y energía metabolizable 2.0 mcal kg^{-1} de materia seca), recomendada por la National Research Council (NRC 2007) y permanecieron en estabulación en corrales elevados con disponibilidad de agua *ad libitum*, de acuerdo a las normas de Bienestar Animal (OIE 2015). De los donadores todos los días se extrajeron las heces de forma directa del recto y se trasladaron al laboratorio para la recuperación de los huevos del parásito. Las muestras de heces frescas se maceraron en un mortero, se saturaron con agua destilada, y filtraron en tamices de 180, 106, 75 y 25 μm , para eliminar la materia orgánica; y retener los huevos en el último tamiz (Bizimenyera et al. 2006). Para luego recoger los huevos con una micropipeta Pasteur y se resuspendieron con solución salina saturada, luego se centrifugaron a 190 X g durante 5 min. Se ex-

trajo el sobrenadante y se lavó con agua destilada en un tamiz de 25 μm para eliminar la solución salina. Para el caso de larvas L_3 , se utilizó la técnica de Corticelli y Lai (1963), que consistió en colocar materia fecal húmeda dentro de una caja de Petri, para luego colocar dentro de otra caja Petri de mayor tamaño, y añadir agua destilada entre ambas cajas y tapar la caja Petri. Los huevos se mantuvieron durante 15 d bajo condiciones de 26 °C y humedad relativa de 85%, después de este periodo se observó la presencia de larvas L_3 .

Los experimentos de inhibición de huevos se realizaron depositando en cada pozo de una microplaca (96 pozos) 100 huevos contenidos en 50 μL de agua destilada y se agregaron 50 μL de cada una las concentraciones de 100, 75, 50, 25 y 12.5 mg mL^{-1} de los extractos de *P. sericea* o *A. tridentata*, y se incluyó un testigo absoluto (agua destilada) y un testigo comercial (Albendazol 1.0 mg mL^{-1}). Se tuvieron 10 repeticiones para cada concentración y testigos. Las microplacas se sellaron y se mantuvieron por 24 h en incubadora a 27 °C y humedad de 85%. Transcurrido el tiempo se detuvo la eclosión, con la adición de 10 μL de solución de lugol al 3% (Assis et al. 2003). La evaluación de la inhibición de huevos se realizó colocando 10 alícuotas de 10 μL de cada tratamiento en un portaobjetos para cuantificar los huevos no eclosionados y larvas vivas, mediante un microscopio compuesto con aumento de 10X. El porcentaje de inhibición de eclosión de huevos (IEH) se calculó mediante la fórmula:

$$\text{IEH (\%)} = \frac{\# \text{ de huevos no eclosionados}}{\# \text{ de huevos total en cada pozo}} \times 100$$

Los experimentos de mortalidad larval se realizaron depositando en cada pozo de una microplaca (96 pozos) 30 larvas L_3 contenidos en 30 μL de una solución tampón de fosfato a la que se le agregaron 30 μL de las concentraciones de los extractos de *P. sericea* o *A. tridentata*. También se incluyó un testigo absoluto (tampón de fosfato) y un testigo comercial (Albendazol 1.0 mg mL^{-1}). Se tuvieron cinco repeticiones para cada concentración y testigos. Las microplacas se sellaron y se mantuvieron por 24 h en incubadora a 27 °C

y humedad de 85%. La evaluación de la mortalidad se realizó colocando seis alícuotas de 10 μL de cada tratamiento en un portaobjeto para cuantificar las larvas muertas mediante un microscopio compuesto (Fisher Scientific Micromaster) con aumento de 10X. Se consideró como larvas muertas, aquellas que presentaran enroscamiento del cuerpo o cuerpo estirado, sin movimiento sinusoidal después de haber sido estimuladas por la luz del microscopio (Ferreira et al. 2013). El porcentaje de mortalidad larval (ML) se calculó con la fórmula:

$$\text{ML (\%)} = \frac{\# \text{ de larvas } L_3 \text{ muertas}}{\# \text{ total de larvas } L_3 \text{ en cada pozo}} \times 100$$

Los resultados de los experimentos se analizaron mediante análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar con el procedimiento PROC GLM de SAS[®] versión 9.0, las medias del porcentaje de inhibición y mortalidad larval para cada extracto se compararon con la prueba de Tukey con probabilidad de 5.0%. Se estimó el valor de la concentración letal media (CL_{50}) y sus límites fiduciales al 95% para cada extracto y cada estadio del parásito mediante el PROC PROBIT de SAS versión 9.0; se consideró que dos valores de CL_{50} son estadísticamente iguales si existe traslape entre sus límites fiduciales a 95% (Robertson et al. 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas *P. sericea* y *A. tridentata* exhibieron actividad ovicida y larvicida sobre *H. contortus* dependiente de la concentración de sus extractos, el análisis de varianza indicó diferencias significativas entre los tratamientos para el porcentaje de inhibición de eclosión de huevos ($F=153.44$; $gl=6$, 63; $P=0.0001$) y mortalidad de larvas L_3 ($F=13.30$; $gl=6$, 28; $P=0.0001$). Todas las concentraciones de los extractos de *P. sericea* y *A. tridentata* presentaron mayor ($p < 0.05$) porcentaje de inhibición de eclosión y mortalidad larval sobre *H. contortus* (Figura 1 y 2) que el testigo absoluto que tuvo 13% de inhibición de eclosión de huevos y 0% de mortalidad larval, lo que indica que las dos plantas tienen efecto ovicida y larvicida sobre el parásito

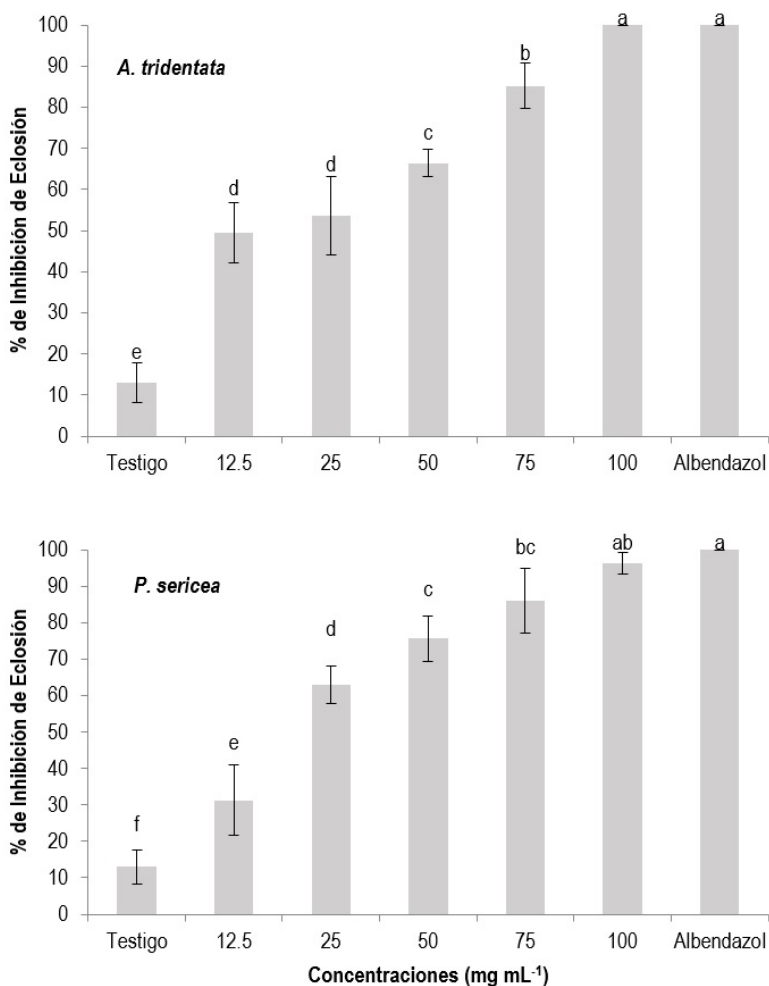


Figura 1. Porcentaje de inhibición de eclosión de huevos de *H. contortus* expuestos a cinco concentraciones de extractos acuosos de *P. sericea* y *A. tridentata*.

gastrointestinal.

Los extractos de *P. sericea* y *A. tridentata* con 100 mg mL⁻¹ tuvieron 100 y 96.30% de inhibición de eclosión de huevos, respectivamente (Figura 1), resultados que coinciden con Mini et al. (2013), quienes con 100 mg mL⁻¹ de extracto acuoso de *Aristolochia indica* tuvieron 90% de inhibición de eclosión de huevos de *H. contortus*. Los extractos de *P. sericea* y *A. tridentata* fueron cinco veces más eficaces en comparación al extracto acuoso de semillas de *Azadirachta indica* reportado por Barrabí-Puerta y Arece-García (2013). En contraste, los extractos

de las plantas estudiadas presentaron menor eficacia en comparación con el extracto acuoso de *Artemisia campestri*, que con 2 mg mL⁻¹ presentó 100% de inhibición de eclosión de huevos de *H. contortus* (Akkari et al. 2014).

En relación a la mortalidad larval, los extractos de *P. sericea* y *A. tridentata* con 100 mg mL⁻¹ presentaron 92.67 y 89.33% de mortalidad (Figura 2), resultados que son similares a los de Irum et al. (2015), quienes con 100 mg mL⁻¹ de extracto de *A. maritima* y *A. vestita* tuvieron 100 y 85% de mortalidad larval, respectivamente. Sin embargo,

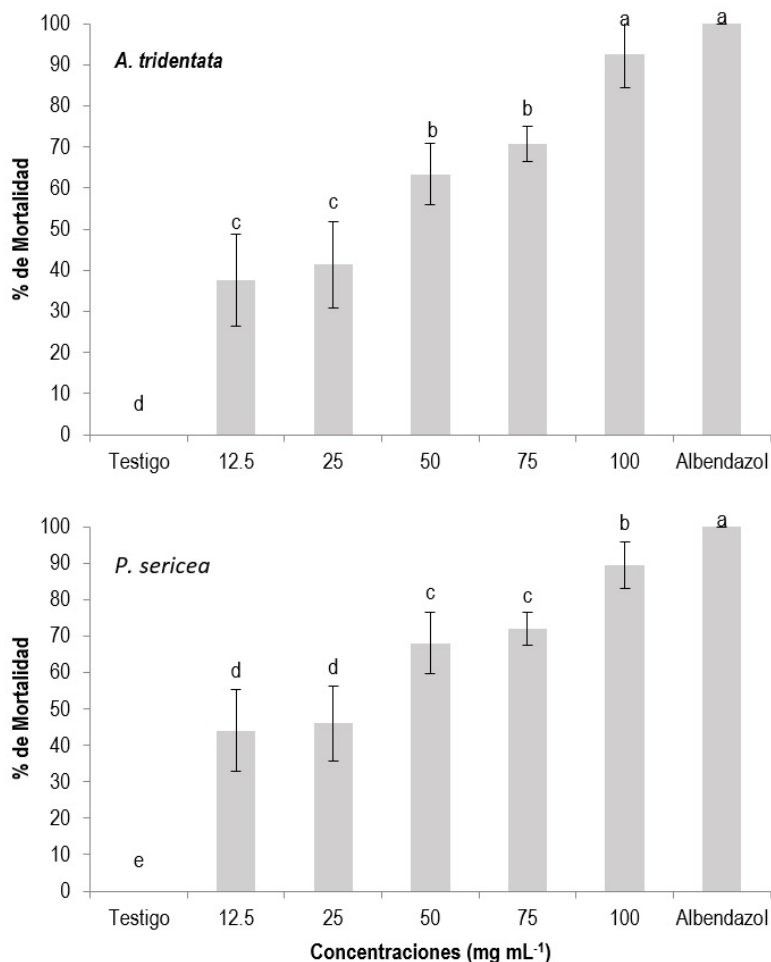


Figura 2. Porcentaje de mortalidad de larvas (L₃) de *H. contortus* expuestas a cinco concentraciones de extractos acuosos de *P. sericea* y *A. tridentata*.

los extractos de ambas plantas estudiadas tuvieron menor eficacia que los extractos acuosos de *Saba senegalensis* (Belemiliga et al. 2016) y *Piptadenia viridiflora* (Morais-Costa et al. 2016), ya que con 15 y 19.31 mg mL⁻¹ registraron 97.77 y 93.13% de mortalidad larval, respectivamente.

Las plantas *P. sericea* y *A. tridentata* presentaron moderada eficacia sobre huevos y larvas de *H. contortus*, en comparación con los resultados de otros estudios, con 100 mg mL⁻¹ de extractos de ambas plantas se obtuvo inhibición de eclosión de huevos y mortalidad larval similar al obtenido con albendazol (Figura 1 y 2). Lo que indica que los ex-

tractos de estas plantas pueden ser una alternativa para el control de nemátodos gastrointestinales de pequeños rumiantes, representando además una alternativa para sustituir a los productos químicos que exhiben inadecuado control debido a la resistencia.

En la tabla 1 se presenta la concentración letal media (CL₅₀) de los extractos de *P. sericea* y *A. tridentata* para el porcentaje de inhibición de huevos y mortalidad larval de *H. contortus*, no observándose diferencias significativas ($p > 0.05$) entre estos valores para ambos estadios del parásito, ya que existe traslape entre sus límites fiduciales al 95% (Robertson et al. 2007). Los extractos

Tabla 1. Concentración Letal media (CL₅₀) para la inhibición de eclosión de huevos y mortalidad de larvas L₃ *H. contortus* expuestos a extractos acuosos de *P. sericea* y *A. tridentata*.

Extracto	CL ₅₀ * (mg mL ⁻¹)	Límites fiduciales 95% (mg mL ⁻¹)	Ecuación de predicción	χ ² **	P
Huevos					
<i>P. sericea</i>	23.21 ^a	24.54-28.29	y= -3.0586+2.2394x	565.7	0.0001
<i>A. tridentata</i>	23.26 ^a	20.78-25.66	y= -2.6200+1.9169x	355.4	0.0001
Larvas					
<i>P. sericea</i>	20.36 ^a	11.61-29.73	y= -1.7017+1.3002x	55.2	0.0001
<i>A. tridentata</i>	27.18 ^a	19.09-35.20	y= -2.5145+1.7531x	46.2	0.0001

* Valores de CL₅₀ seguidos de letras iguales en la columna no son diferentes estadísticamente según Robertson et al. (2007). ** Indica la prueba de significancia para la pendiente de la ecuación de predicción.

acuoso de *A. tridentata* y *P. sericea* registraron una CL₅₀ de 23.26 y 23.21 mg mL⁻¹, respectivamente; para el porcentaje de inhibición de huevos, valores que son superiores a 1.0 mg mL⁻¹ de extracto de *A. campestris* sobre huevos de *H. contortus* reportados por Akkari et al. (2014). Valores inferiores para la CL₅₀ de extractos metanólicos de *Annona squamosa* y *Eclipta prostrata*, extractos de etil acetato de *Solanum torvum* y *Catharanthus roseus*, y extractos acetónicos de *Terminalia chebula* fueron reportados por Kamaraj y Rahuman (2011). La CL₅₀ para la mortalidad larval obtenida es similar a la obtenida por Irum et al. (2015) para el extracto de *A. maritima* (CL₅₀= 12. 2 mg mL⁻¹). Pero en general, los valores de CL₅₀ de los extractos de *P. sericea* (20.36 mg mL⁻¹) y *A. tridentata* (27.18 mg mL⁻¹) son superiores en comparación con otros estudios que evalúan la actividad larvicida de extractos de plantas sobre *H. contortus* (Zhu et al. 2013, Acharya et al. 2014, Akkari et al. 2014). La diferencia en eficacia que exhibieron *P. sericea* y *A. tridentata* en comparación con otros estudios realizados para evaluar la actividad ovicida y larvicida sobre *H. contortus* puede estar relacionada con el disolvente utilizado para la preparación de los extractos. Los extractos a base de agua presentan menor actividad antihelmíntica en comparación con los extractos a base de disolventes orgánicos (Bizimenyera et al. 2006), debido a que el agua extrae menos compuestos bioactivos de las plantas (Alawa et al. 2003). Por ejemplo, los extractos acetónicos presentan más compuestos bioactivos de

amplio rango de polaridad (Eloff 1998) y exhiben mayor actividad ovicida y larvicida sobre *H. contortus* que los extractos acuosos (Adamu et al. 2013, Fouche et al. 2016). En muchas investigaciones se ha utilizado dimetil sulfóxido, compuesto que tiene capacidad emulsionante y solubiliza compuestos altamente polares o no polares, facilitando el paso de los compuestos a través del corión del huevo y la cutícula de la larva, lo que incrementa el porcentaje de inhibición de eclosión del huevo y mortalidad larval de *H. contortus* (Acharya et al. 2014). El no emplear solvente químico, puede explicar la diferencia en eficacia que presentaron los extractos acuosos de *P. sericea* y *A. tridentata*. Los extractos acuosos tienen la ventaja de presentar menor citotoxicidad en comparación con los extractos a base de acetona (Nchu et al. 2011), aspecto que corrobora la mayor inocuidad de los extractos acuosos sobre los organismos, además la baja citotoxicidad es un aspecto importante para evaluar la selectividad de este tipo de compuestos sobre los hospederos de los parásitos (Fouche et al. 2016).

Se presenta evidencia de la actividad ovicida y larvicida *in vitro* de extractos acuosos de *P. sericea* y *A. tridentata* sobre *H. contortus*, que indica que puede usarse para el control de nemátodos gastrointestinales en pequeños rumiantes; la eficacia de ambos extractos sobre *H. contortus* depende de la concentración. Se recomienda realizar análisis fitoquímicos para identificar los compuestos bioactivos responsables de la actividad ovicida y larvicida de los extractos de *P. sericea* y *A. tridentata*.

LITERATURA CITADA

- Acharya J, Hildreth MB, Reese NR (2014) *In vitro* screening of forty medicinal plant extracts from United States Northern Great Plains for anthelmintic activity against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 201: 75-81.
- Adamu M, Naidoo V, Eloff J (2013) Efficacy and toxicity of thirteen plant leaf acetone extracts used in ethnoveterinary medicine in South Africa on egg hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. *BMC Veterinary Research* 9: 1-8.
- Ail-Catzim CE, García-López AM, Troncoso-Rojas R, González-Rodríguez RE, Sánchez-Segura Y (2015) Efecto insecticida y repelente de extractos de *Pluchea sericea* (Nutt.) sobre adultos de *Bemisia tabaci* (Genn.). *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 21: 33-41.
- Akkari H, Rtibi K, B'chir F, Rekik M, Darghouth MA, Gharbi M (2014) *In vitro* evidence that the pastoral *Artemisia campestris* species exerts an anthelmintic effect on *Haemonchus contortus* from sheep. *Veterinary Research Communications* 38: 249-255.
- Alawa CBI, Adamu AM, Gefu JO, Ajanusi OJ, Abdu PA, Chiezey NP, et al. (2003) *In vitro* screening of two Nigerian medicinal plant (*Vernonia amigdalina* and *Annona senegalensis*) for anthelmintic activity. *Veterinary Parasitology* 113: 73-81.
- Alemán Y, Sánchez LM, Pérez T, Rodríguez Y, Olivares JL, Rodríguez JG (2011) Actividad larvicida de extractos de *Rhizophora mangle* L. contra estrongídeos gastrointestinales de ovinos. *Revista Salud Animal* 33: 111-115.
- Assis LM, Leal CM, Morais SM, Souza JAL (2003) Ovicidal and larvicidal activity *in vitro* of *Spieled anthelia* Linn. extract on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 117: 43-49.
- Barrabí-Puerta M, Arece-García J (2013) Actividad antihelmíntica *in vitro* de extracto acuoso de hojas y semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). Inhibición de la eclosión de huevos y del desarrollo larvario. *Revista Salud Animal* 35: 103-108.
- Belemlilga MB, Traoré A, Quédraogo S, Kaboré A, Tamboura HH, Gissou IP (2016) Anthelmintic activity of *Saba senegalensis* (A.DC.) pichon (*Apocynaceae*) extract against adult worm and eggs of *Haemonchus contortus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6: 945-949.
- Bizimenyera ES, Githiori JB, Eloff JN, Swan GE (2006) *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (*Fabaceae*) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology* 142: 336-343.
- Corticelli B, Lai M (1963) Ricerche sulla tecnica di coltura delle larve infestive degli strongili gastro-intestinali del bovino. *Acta Medica Veterinaria* 9: 347-357.
- Eloff JN (1998) Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology* 60: 1-8.
- Ferreira LE, Castro PMN, Chagas ACS, França SC, Belebani RO (2013) *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (*Annonaceae*) against *Haemonchus contortus* from sheep. *Experimental Parasitology* 134: 327-332.
- Fouche G, Sakong BM, Adenubi OT, Pauw E, Leboho T, Wellington KW, et al. (2016) Anthelmintic activity of acetone extracts from South African plants used on egg hatching of *Haemonchus contortus*. Onderstepoort. *Journal of Veterinary Research* 83: a1164. doi 10.4102/ojvr.v83i1.1164.

- Irum S, Ahmed H, Mukhtar M, Mushtaq M, Mirza B, Donskow-Lysoniewska K, Qayyum M, Simsek S (2015) Anthelmintic activity of *Artemisia vestita* Wall ex DC. and *Artemisia maritima* L. against *Haemonchus contortus* from sheep. *Veterinary Parasitology* 212: 451-455.
- Islam MK, Siraj MA, Sarker AB, Saha S, Mahmud I, Rahman MM (2015) *In-vitro* anthelmintic activity of three Bangladesh plants against *Paramphistomum cervi* and *Haemonchus contortus*. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 12: 171-174.
- Jassbi AR, Zamanizadehnajari S, Baldwin IT (2010) Phytotoxic volatiles in the roots and shoots of *Artemisia tridentata* as detected by headspace solid-phase microextraction and gas chromatographic-mass spectrometry analysis. *Journal of Chemical Ecology* 36: 1398-1407.
- Kamaraj C, Rahuman AA (2011) Efficacy of anthelmintic properties of medicinal plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science* 91: 400-404.
- Mini KP, Venkateswaran KV, Gomathinayagam S, Selvasubramanian S, Bijargi SR (2013) *In vitro* Anthelmintic effect of aqueous and ethanol extract of *Aristolochia indica* against *Haemonchus contortus*. *Journal of Physiology and Pharmacology Advances* 3: 148-158.
- Morais-Costa F, Bastos GA, Soares AC, Costa EG, Vasconcelos VO, Oliveira NG, Braga FC, Duarte ER, Lima WS (2016) *In vitro* and *in vivo* action of *Piptadenia viridiflora* (Kunth) Benth against *Haemonchus contortus* in sheep. *Veterinary Parasitology* 223: 43-49.
- Moreno FC, Gordon IJ, Wright AD, Benvenuti MA, Saumell CA (2010) Efecto antihelmíntico *in vitro* de extractos de plantas sobre larvas infectantes de nematodos gastrointestinales de rumiantes. *Archivos de Medicina Veterinaria* 42: 155-163.
- National Research Council (2007) Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids, and new world camelids. The National Academies Press. Washington, USA. 384p.
- Nchu F, Githiori JB, Mcgaw LJ, Eloff JN (2011) Anthelmintic and cytotoxic activities of extracts of *Markhamia obtusifolia* Sprague (*Bignoniaceae*). *Veterinary Parasitology* 183: 184-188.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (2015) Estatus sanitario oficial de los países miembros. <http://www.oie.int/es/bienestar-animal/el-bienestar-animal-de-un-vistazo/>. Fecha de consulta 16 de abril de 2016.
- Robertson J, Russell R, Preisler H, Savin NE (2007) Bioassays with Arthropods. 2nd Edition. CRC Press. Florida, USA. 224p.
- Turi CE, Shipley PR, Murch SJ (2014) North American *Artemisia* species from the subgenus *Tridentatae* (*Sagebrush*): A phytochemical, botanical and pharmacological review. *Phytochemistry* 98: 9-26.
- Van Wyk JA (2001) Refugia-overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 68: 55-67.
- Vargas-Magaña JJ, Torres-Acosta JFJ, Aguilar-Caballero AJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H, Chan-Pérez JI (2014) Anthelmintic activity of acetone-water extract against *Haemonchus contortus* eggs: Interactions between tannins and other plant secondary compounds. *Veterinary Parasitology* 206: 322-327.
- Villaseñor JL, Villarreal JA (2006) El género *Pluchea* (Familia: *Asteraceae*. Tribu: *Plucheeae*) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 77: 59-65.
- Zhu L, Dai JL, Yang L, Qiu J (2013) *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of the essential oil of *Artemisia lancea* against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* 195: 112-117.