مجلة جامعة بابل / العلوم / العدد (3) / المجلد (14) : 2007

تأثير مستخلصي عصير الرمان والماء المغلي لقلف سيقان الرمان *Punica granatum* في بيوض وبالغات دودة الكبد العملاقة *Fasciola gigantica* في الزجاج.

جميل جري يوسف
كلية التربية للبنات
جامعة الكوفة

زينب علي حسين
كلية التمريض
جامعة الكوفة

جاسم حميد رحمه
كلية التربية للبنات
جامعة الكوفة

الخلاصة

هدفت الدراسة، الاختبار الحيوي لتأثير مستخلص عصير الرمان و مستخلص الماء المغلي لقلف سيقان نبات الرمان*Punica granatum* في بيوض وبالغات دودة الكبد العملاقة *Fasciola gigantica* في الزجاج.

اظهرت النتائج ان لمستخلصي عصير الرمان و الماء المغلي لقلف سيقان الرمان تأثيراً معنويا في خفض النسب المئوية لفقس البيوض وزيادة النسب المئوية لهلاك الديدان البالغة كلما زاد تركيز المستخلص مقارنة بمعاملة السيطرة. وبالاعتماد على قييم التركيز اللازم لهلاك50%(LC50) من الديدان البالغة ظهر بان مستخلص عصير الرمان أكثر كفاءة بحوالي 1.58 مرة بالمقارنة مع مستخلص الماء المغلي لقلف سيقان الرمان في هلاك بالغات دودة الكبد العملاقة في الزجاج.

Effect of two extracts (juice and boiling water of steam hulls) of pomegranate *punica granatum* on ova and adults of *Fasciola gigantica In vitro*.

Abstract

The study aimed to examine the effect of two extracts (Juice and boiling water of stem hulls) of *Punica granatum* on ova and adults of *Fasciola gigantica In vitro* .

Results showed a significant effect for both extracts in reducing of the percentage of ova hatching and increasing of the mortality percentage of adult worms.

On the bases of LC**50**`s to the adult worms , it was found that the effectiveness of pomegranate juice extracts was 1.58 times as that of boiling water extracts of steam hulls of pomegranate.

المقدمة

يعد مرض تعفن الكبد او مرض ديدان الكبد Fascioliasis من الامراض الواسعة الانتشار عالمياً، الذي يتسبب عن المذنبات المتكيسة Encysted metacercaria التي تعود الى دودة الكبد العملاقة *Fasciola gigantica* ، تكتمل دورة حياة الطفيلي بالحاجة للقوقع *Lymnaea auricularia* كمضيف وسطي وآكلات الأعشاب ونادراً الانسان كمضيف نهائي(Soulsby, 1982).

يشكل هذا المرض عائقاً كبيراً في نمو الثروة الحيوانية وازدهارها لما يسببه من خسائر اقتصادية كبيرة من اهمها النقص في اوزان الحيوانات المصابة وكذلك الخسائر المتأتية من تلف الاكباد وتكاليف الادوية المستعملة في السيطرة على المرض(Altaif, 1979).

استعملت العديد من العقاقير الكيمياوية في علاج المرض، ولكن لهذه العقاقير تأثيرات جانبية في الجسم وخاصة عندما يستعمل لمدة طويلة ولاحتمال عودة الاصابة في بعض الحالات ولمقاومة الطفيلي لبعض تلك المركبات العلاجية وتثبيطه لعملها، ولهذا اتجه العديد من الباحثين نحو بعض النباتات ، التي تتوافر بكثرة في المحيط البيئي، حيث استعملت منذ القدم في علاج العديد من الامراض التي تصيب الانسان والحيوان لاحتوائها على مركبات فعالة لها القدرة على علاج الكثير من الامراض الطفيلية من دون ان يكون لها تأثيرات جانبية كبيرة في الجسم الحي(AL- Saddi *et al*., 1996).

استعملت مستخلصات قلف جذور وسيقان الرمان كقاتل وطارد للديدان الشريطية المعوية (Kapoor, 1990)، كما اشارت عدد من البحوث الحديثة الى استعمال مستخلصات قشور ثمار الرمان ضد انواع من البكتريا المرضية المعوية منها *Salmonella typhi* (Perez & Anesini, 1994) وبكتريا *Vibrio cholerae* (Guivara, 1994) وطفيلي *Giardia* (Ponce- macotela, 1994) وكذلك الفايرسات ومنها فايروس *Herpes simplex* (Zhang, 1995) وكذلك الفايروس المسبب لنقص المناعة المكتسبة (HIV)(Stewart,1995).

اثبتت بعض الدراسات الحديثة ان لمستخلصات قشور ثمار الرمان فعالية كبيرة في علاج بعض الامراض المتسببه عن الديدان الطفيلية حيث بينت دراسة المياح (2002) ان للمستخلص المائي لقشور ثمار الرمان فعالية ضد الاطوار غير الناضجة والديدان البالغة لدودة الكبد العملاقة *F.gigantica* خارج وداخل الجسم الحي في الفئران البيض، في حين اظهرت دراسة المبارك(2006)ان للمستخلصات(المائي المغلي والبارد والكحولي) فعلا ضد الرؤيسات الاولية لطفيلي المشوكات الحبيبية*Echinococcus granulosus* في الزجاج وعلاج داء الاكياس العدرية لطفيلي المشوكات الحبيبة في الفئران البيض. وبسبب زيادة الاهتمام بالتداوي بالاعشاب كبديل عن الادوية الكيمياوية، لذا اقترحت هذه الدراسة والتي تهدف الى التقييم الحيوي لفعالية مستخلص عصير الرمان والمستخلص المائي المغلي لقلف سيقان الرمان ضد بيوض وبالغات دودة الكبد العملاقة *F. gigantica* في الزجاج.

المواد وطرائق العمل

1- تحضير مستخلص عصير الرمان و مستخلص الماء المغلي لقلف سيقان الرمان.

جمعت ثمار الرمان ذات الحب الاحمر من الاسواق المحلية لمحافظة النجف، وفصلت حبات الرمان عن قشوره وعصرت الحبات بوساطة خلاط كهربائي، وفصل الراشح عن الراسب بوساطة جهاز الطرد المركزي وبسرعة 3000دورة/دقيقة ولمدة 15 دقيقة، وركز الراشح باستعمال المبخر الدوار بدرجة حرارة 40م ولمدة 24 ساعة، ثم وضع الراشح في اطباق زجاجية كبيرة الحجم في فرن كهربائي بدرجة حرارة 40 م وحفظ في الثلاجة لحين استعماله في تجارب الاختبار الحيوي. في حين جمع قلف سيقان الرمان من مزرعة للرمان في منطقة العباسية في محافظة النجف، وضع في اكياس نايلون معتمة، ثم غسل عدة مرات بالماء المقطر وترك في المختبر عدة ايام حتى جفافه، ثم قطع القلف الى قطع صغيرة وطحن بالمطحنة الكهربائية وحفظ المسحوق في قناني زجاجية معتمة ومحكمة الغلق في الثلاجة لحين استعماله. ولغرض تحضير المستخلص أخذ 50 غرام من مسحوق القلف ووضع في دورق زجاجي سعة 500 مللتر محكم الغطاء واضيف اليه 500 ملليتر من ماء مغلي ووضع على جهاز المحرك المغناطيسي لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة المختبرثم فصل الراشح عن الراسب بوساطة جهاز الطرد المركزي وبسرعة 3000 دورة/ دقيقة ولمدة 15 دقيقة، ثم ركز الراشح بأستعمال المبخر الدوار بدرجة حرارة 40م، ثم وضع الراشح في اطباق زجاجية كبيرة الحجم في فرن كهربائي بدرجة حرارة 40- 45م لحين جفاف المستخلص، بعدها حفظ المستخلص الجاف في الثلاجة لحين الاستعمال(Harborne, 1984).

2- الكشف عن وجود التانينات Tannins و القلويدات Alkaloids في مستخلص عصير الرمان ومستخلص الماء المغلي لقلف سيقان الرمان

تم الكشف عن وجود التانينات Tannins في المستخلص وذلك بخلط كميات متساوية من المستخلص مع 1% من محلول كلوريد الحديديك، حيث ان ظهور راسب اخضر مزرق دلالة على وجود التانينات في

المستخلص في حين تم الكشف عن وجود القلويدات Alkaloids في المستخلص و ذلك بمزج 5 مللتر من المستخلص مع 5 مللتر من كاشف دراكندروف Dragendroffs reagent حيث ان ظهور راسب برتقالي محمر، دلالة على وجود القلويدات في المستخلص(Harborne, 1984).

3-جمع بيوض وبالغات دودة الكبد العملاقة *F. gigantica*

جمعت البيوض والبالغات من اكياس الصفراء واكباد الابقار والجاموس المصابة طبيعياً بدودة الكبد العملاقة من مجزرة النجف،حيث وضعت الاكباد و اكياس الصفراء في حاويات خاصة ونقلت الى مختبر الحيوان/ كلية التربية- جامعة الكوفة ، حيث فتحت اكياس الصفراء و غسلت ورسبت محتويات الكيس عدة مرات بالماء المقطر، وشخصت البيوض اعتماداً على(Kendall(1965، ثم وضعت البيوض المعزولة في دوارق زجاجية مع الماء المقطر لحين اجراء تجارب الاختبار الحيوي ولغرض جمع الديدان البالغة فتحت اكياس الصفراء بوساطة سكين حادة داخل اناء معدني وغسلت عدة مرات بالمحلول الملحي الفسلجي 0.85% وتم الحصول على الديدان البالغة الموجودة داخل القنوات الصفراوية وذلك بالضغط بهدوء على الكبد لعزل الديدان منها(Boray, 1969)، ثم وضعت الديدان المعزولة في دوارق زجاجية مع المحلول الملحي الفسلجي لحين اجراء تجارب الاختبار الحيوي .

4- تجارب الاختبار الحيوي

4-1 تأثير تراكيز مختلفة من مستخلصي عصير الرمان والماء المغلي لقلف سيقان الرمان في بيوض دودة الكبد العملاقة *F. gigantiea*

اخذ 2 غرام من المادة الجافة لكل من مستخلص عصير الرمان ومستخلص الماء المغلي لقلف سيقان الرمان واذيب كل منها في 100 ملليتر من الماء المقطر وبذلك اصبح تركيز المحلول الاساسي Stock Solution 2% او ما يعادل 20 ملغم /مل ثم حضرت ثلاثة تراكيز مختلفة (4،8و12 ملغم/مل) من مستخلص عصير الرمان واربعة تراكيز مختلفة (4،8،12و16ملغم/ مل) من مستخلص الماء المغلي لقلف سيقان الرمان وذلك باستعمال الماء المقطر كمذيب وحفظت في الثلاجة لحين استعمالها في تجارب الاختبار الحيوي.

استعملت 400 بيضة بالنسبة لمستخلص عصير الرمان، اذ قسمت الى 4 مجموعات ،كل مجموعة تحوي على 100 بيضة التي بدورها قسمت الى 4 مكررات(25 بيضة /مكرر) ، وضع كل مكرر من البيوض في وعاء زجاجي صغير مع 100مللتر من الماء المقطر ثم اضيفت التراكيز الثلاثة من مستخلص عصير الرمان الى المجموعات الثلاثة من البيوض ، في حين تركت المجموعة الرابعة كسيطرة حيث تم معاملتها بالماء المقطر فقط ، كما استعملت 500 بيضة بالنسبة لمستخلص الماء المغلي لقلف سيقان الرمان ،حيث قسمت الى 5 مجموعات ،كل مجموعة تحوي على 100 بيضة ،التي قسمت بدورها الى 4 مكررات(25 بيضة /مكرر) ، حيث وضع كل مكرر من البيوض في وعاء زجاجي صغير الحجم مع 100 مللتر من الماء المقطر واضيفت التراكيز الاربعة من مستخلص الماء المغلي لقلف سيقان الرمان الى المجموعات الاربعة ، في حين تركت المجموعة الخامسة كسيطرة حيث تم معاملتها بالماء المقطر فقط، تم تعريض البيوض لتراكيز المستخلصات لمدة 24 ساعة، بعدها نقلت البيوض الى ماء مقطر خالي من المستخلصات وتم تغيير الماء المقطر كل 48ساعة والى نهاية فترة التجربة ، تركت مجموعات البيوض في الظلام داخل الحاضنة بدرجة حرارة 25م ولمدة 17يوماً (المياح،2002).

2-4 تأثير تراكيز مختلفة من مستخلصي عصير الرمان والماء المغلي لقلف سيقان الرمان في بالغات دودة الكبد العملاقة *F. gigantica*

اخذ 20 غرام من المادة الجافة لمستخلص عصير الرمان واذيبت في 100 ملليتر من الماء المقطر وبذلك اصبح تركيز المحلول الاساسي Stock Solution 20% او ما يعادل 200 ملغم /مل و منه حضرت ثلاثة تراكيز مختلفة (40 و 80 و 160 ملغم/مل). في حين اخذ 40 غرام من المادة الجافة لمستخلص الماء المغلي لقلف سيقان الرمان واذيبت في 100 ملليتر من الماء المقطر وبذلك اصبح تركيز المحلول الاساسي Stock Solution 40% او ما يعادل 400 ملغم /مل و منه حضرت اربعة تراكيز مختلفة (40 و 80 و 160 و 320 ملغم/مل).

استعملت 120 دودة بالغة بالنسبة لمستخلص عصير الرمان التي قسمت الى 4 مجموعات كل مجموعة تحوي على 30 دودة التي بدورها قسمت الى 3 مكررات(10 دودة /مكرر) ،حيث وضع كل مكرر من الديدان في وعاء زجاجي صغير مع 100 مللتر من المحلول الملحي الفسلجي بعدها اضيفت التراكيز الثلاثة من مستخلص عصير الرمان الى المجموعات الثلاثة من الديدان في حين تركت المجموعة الرابعة كمعاملة سيطرة اذ تم معاملتها بالماء المقطر فقط ، كما استعملت 150 دودة بالنسبة لمستخلص الماء المغلي لقلف سيقان الرمان حيث قسمت الى 5 مجموعات ،كل مجموعة تحوي على 30 دودة وبدورها قسمت الى 3 مكررات(10 دودة /مكرر) ، اذ وضع كل مكرر من الديدان في وعاء زجاجي مع 100 مللتر من المحلول الملحي الفسلجي وعوملت المجموعات الاربعة من الديدان بالتراكيز الاربعة من مستخلص الماء المغلي لقلف سيقان الرمان في حين تركت المجموعة الخامسة كسيطرة اذ تم معاملتها بالماء المقطر فقط، سجلت الهلاكات بعد مرور 10 دقيقة من التعرض الى تراكيز مختلفة من المستخلصات ، عدت الدودة ميتة عند عدم قدرتها على تحريك جسمها او محجمها الفمي او مخروطها الامامي (المياح،2002).

5- التحليل الاحصائي

حللت التجارب وفق التصميم العشوائي الكامل واستخرج اقل فرق معنوي .L.S.D تحت مستوى 5% لبيان معنوية النتائج Daniel(1988) وبالاعتماد على Finney(1977) تم حساب قيم التركيز اللازم لهلاك 50% من الديدان البالغة و ذلك بتطبيق طريقة المربعات الصغرى Least square method لأنحراف القيم وبالاعتماد على هذه القيم استخرجت كفاءة المستخلص وحسب المعادلة الآتية:

$$\text{كفاءة المستخلص} = \frac{\text{قيمة التركيز اللازم لهلاك 50\% لأقل المستخلصات كفاءة}}{\text{قيمة التركيز اللازم لهلاك 50\% للمستخلص الاخر}} = \ldots\ldots(\text{مرّة})$$

النتائج والمناقشة

تم اختبار فعالية مستخلصي عصير الرمان والماء المغلي لقلف سيقان الرمان في النسبة المئوية لفقس بيوض دودة الكبد العملاقة، فقد اظهرت النتائج في جدول (1) ان للمستخلصين تأثيراً معنوياً في خفض النسب المئوية لفقس البيوض كلما زاد تركيز المستخلص مقارنة بمعاملة السيطرة فقد كان معدل النسبة المئوية لفقس

البيوض 43.4 و62.3% لمستخلصي عصير الرمان والماء المغلي لقلف سيقان الرمان على التوالي عند المعاملة بالتركيز 4 ملغم/مل في حين لم يحصل فقس للبيوض عند المعاملة بالتراكيز 12 و16 ملغم /مل من مستخلصي عصير الرمان والماء المغلي لقلف سيقان الرمان ،كما ابدى المستخلصين تأثيراً معنوياً في زيادة النسب المئوية لهلاك الديدان البالغة كلما زاد تركيز المستخلص مقارنة بمعاملة السيطرة، فقد كان معدل النسبة المئوية لهلاك الديدان البالغة 50.9 و35.4% لمستخلصي عصير الرمان والماء المغلي لقلف سيقان الرمان على التوالي عند المعاملة بالتركيز 40 ملغم/مل ،في حين كانت النسبة المئوية لهلاك الديدان البالغة عند المعاملة بالتراكيز 160 و320 ملغم/مل من مستخلصي عصير الرمان والماء المغلي لقلف سيقان الرمان على التوالي جدول (2) وعند مقارنة كفاءة المستخلصين في هلاك الديدان البالغة وبالاعتماد على قيم التركيز اللازم لهلاك 50%(LC50) من الديدان البالغة جدول (3) ظهر بان مستخلص عصير الرمان أكفأ بحوالي 1.58 مرة من مستخلص الماء المغلي لقلف سيقان الرمان ،حيث كان LC50 لمستخلص عصير الرمان 36.30 ملغم/مل بينما كان LC50 لمستخلص الماء المغلي لقلف سيقان الرمان 57.54 ملغم/مل .

ان الفعالية العالية لمستخلص عصير الرمان في هلاك المهدبات داخل البيوض وبالتالي عدم فقسها وكذلك كفاءته في هلاك الديدان البالغة ربما تعود لاحتواء المستخلص على نسبة كبيرة من مركبات التانينات Tannins التي اثبتت الدراسات بان هذه المركبات تعمل على تحطيم الغشاء الخلوي للكائن الحي من خلال تاثيرها على الدهون والبروتينات فيه وبالتالي يفقد الكائن قدرته على النمو ،او انها تخترق الغشاء الخلوي وتحجب المواقع الفعالة لبعض الانزيمات داخل الخلية والتي قد تكون ضرورية لنمو الكائن الحي (Al-Jasim & Barakat, 1973; Anthony,1976) .كما ذكرت بعض الدراسات ان التانينات لها القابلية على ترسيب البروتينات الموجودة في الغشاء الخلوي او في داخل الخلية الحية عند تنافذها من خلال الغشاء وتكوين أواصر هيدروجينية مع المركبات النتروجينية او البروتينات وبالتالي تثبيط بعض الانزيمات الضرورية في الكائن الحي (Reed,1995;Covington,1997; Athanasiadou and Kyriazakis, 2004; Braga *et al*.,2005).

اما فعالية مستخلص المائي المغلي لقلف سيقان الرمان في هلاك المهدبات داخل البيض وهلاك بالغات دودة الكبد العملاقة ربما تعود لاحتواء المستخلص على المركبات القلويدية Alkaloids ، فقد ذكر زمزم(1985) ان قلف سيقان وجذور الرمان غنية بالقلويدات منها isopelletierine والذي له فائدة في علاج الديدان الشريطية ،كما ذكرت بعض الدراسات بان المركبات القلويدية الفعالة في قلف جذور وسيقان الرمان ومنها المركب Pelletierne تؤثر على النفاذية الاختيارية للغشاء البلازمي من خلال تأثيرها على الدهون والبروتينات المكونة له او انها تنفذ من خلال الغشاء وترتبط مع بعض الانزيمات المهمة في انتاج الطاقة والضرورية لديمومة حياة الطفيلي (Wren,1988;Kapoor,1999; Tripathi and Singh, 2000; Holetz, *et al*.,2002).

نستنتج من هذه الدراسة بان لمستخلص عصير الرمان فعالية كبيرة في هلاك المهدبات داخل البيوض والبالغات لدودة الكبد العملاقة وبلية مستخلص الماء المغلي لقلف سيقان الرمان في الزجاج .

جدول (1) تأثير تراكيز مستخلصي عصير الرمان و الماء المغلي لقلف سيقان الرمان*P. granatum* في فقس بيوض دودة الكبد العملاقة *F. gigantica*

تركيز المستخلص (ملغم/مل)	معدل النسبة المئوية لفقس البيوض عند المعاملة بالمستخلصات	
	عصير الرمان	الماء المغلي لقلف سيقان الرمان
السيطرة	94.5	92.2
4	43.4	62.3
8	13.6	46.4
12	0	17.6
16	–	0
قيمة L.S.D. تحت مستوى 0.05	14.2	12.8

جدول (2) تأثير تراكيز مستخلصي عصير الرمان و الماء المغلي لقلف سيقان الرمان*P. granatum* في بالغات دودة الكبد العملاقة *F. gigantica*

تركيز المستخلص (ملغم/مل)	معدل النسبة المئوية لهلاك الديدان البالغة عند المعاملة بالمستخلصات	
	عصير الرمان	الماء المغلي لقلف سيقان الرمان
السيطرة	3.3	7.3
40	50.9	35.4
80	85.7	64.7
160	100	81.8
320	–	100
قيمة L.S.D. تحت مستوى 0.05	13.7	11.8

جدول(3) التراكيز اللازمة لمستخلصي عصير الرمان و الماء المغلي لقلف سيقان الرمان*P. granatum* في هلاك 50% من بالغات دودة الكبد العملاقة *F. gigantica*

نوع المستخلص	التراكيز اللازمة لهلاك 50% ملغم/مل	كفاءة المستخلص
عصير الرمان	36.30	1.58
المائي المغلي لقلف سيقان الرمان	57.54	1.00

المصادر

المبارك ، زينب علي حسين(2006). تاثير مستخلصات قشور ثمار الرمان *Punica granatum* في علاج داء المشوكات الحبيبي لطفيلي *Echinococcus granulosus* في الفئران البيض Balb/c. رسالة ماجستير، كلية التربية للبنات، جامعة الكوفة، 110 صفحة.

المياح، زهرة عباس حسن(2002). تأثير المستخلص المائي لقشور الرمان في دودة الكبد العملاقة *Fasciola gigantica*. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة البصرة، 101 صفحة.

زمزم، حمدي(1985). عجائب الطب الشعبي في التغذية. دار الهجرة للطباعة والنشر والتوزيع، دار الايمان، بيروت.

Al- Jasim, H. A. and Barakat, M. M. (1973). Effect of some vegetable extracts on the activity of polygalacturonase. J. Sci. Food. Agric., 24: 119- 121.

Al. Saddi, A. A.; Yones, F. N. and Al. Hadethi, A. W. (1996). Primitive study on the efficiency of *Allium sativum* extraet in experimental infection mice with *Hymenolopsis nana*- Technical Research. Techn., 31: 58- 63.

Altaif, K. I. (1979). Effect of anthelmintic treatment on the performance of Awassi sheep in Iraq. Trop. Anim. Hilth. Prod., 11:241- 245.

Anthony, H. R.(1976). Chemical microbiology: An introduction to microbial physiology 3rd . ed Butterworth and Co. publ. London.

Athanasiadou, S. and Kyriazakis, I. (2004). Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production system. Proceeding of the Nutrition Society,63:631-639.

Boray, J. C.(1969). Experimental fascioliasis in Australia. In: Advances in parasitology, Dawes, B(ed.) Acad. Press, London and New York, 7: 95- 210.

Braga,L.C.; Shupp, J.W.; Cummings, C.; Jett, M.; Takahashi, J.A.; Carmo, L.S.; Chartone-Souza, E. and Nascimento, A.M.A. (2005).Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production .Journal of Ethnopharmacology , 96(1-2); 335-339.

Covington, A. D.(1997). Modern tanning chemistry. J. chem.. Soc. Rev., 26: 73- 146.

Daniel, W. W.(1988). Biostatistics. A foundation for analysis in heaith sciences, 4th ed., John wiley & Sons, Inc.

Finney, D. J.(1977). Probit analysis, 3rd ed., London- Cambridge, University press, 333pp.

Guivara, J. M.(1994). The *in vitro* action of plants on *Vibrio cholerae*. Revista in Gastroenterologia del peru, 14: 27- 31.

Harborne, J. B.(1984). Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. 2nd ed., chapman and Hall, London, 288pp.

Holetz, F.B.; Ueda- Nakamura, T.; Filho, B.P.D.; Cortez, D.A.G.; Mello, J.C.P. and Nakamura, C.V.(2002). Effect of plant extracts used in folk medicine on cell growth and differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai*_(Kinetoplastida, trypanosomatidae) cultivated in defined medium. Margina, 24(3): 657-662.

Kapoor, L. D.(1990). CRC Handbook of Ayurvedic medicinal plants. CRC press, Boca Raton, Florida.

Kendall, S. B.(1965). Relatioships between the species of *Fasciola* and the molluscan hosts. In: Dawes, B.(ed.) Advances in parasitology, Acad. Press, London and New York, 3:59-95.

Perez, C. and Anesini, C.(1994). *In Vitro* antibacterial activity of Argentinian folk medicinal plants against *Salmonella typhi*. J. Ethnopharmacol., 44: 41- 46.

Ponce- macotela, M.(1994).[*In Vitro* effect on *Giardia* of 14 plant extracts]. Revista de Investigacion clinica, 46: 343- 347.

Reed, J. D.(1995). Nutritional toxicology of tannins related polyphenols in forage legumes. J. Ani. Soc., 73: 1516- 1528.

Soulsby, E. J. L.(1982). Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals, 7th ed., Bailliere Tindall, London, 809pp.

Stewart, G.(1995). Antiviral and antifungal compositions comprise a mixture of a ferous sait and a plant extract of pomegranate rind, *Vibumum plicaum*, leaves or flower, tea leaves or maple leaves in aqueous solution. Int. search Rep.(patent pending): cited by Lee and Watson(1998).

Tripathi, S.M. and Singh, D.K. (2000). Molluscicidal activity of *Punica granatum* bark and *Canna indica* root, Braz. J.Med. Biol. Res., 33(11): 1351-1355.

Wren, R. C.(1988). Potter's New Cyclopedia of Botanical Drugs and Preparations. The C. W. Daniel Company, Essex.

Zhang, J.(1995). [Antiviral activity of tannin from pericarp of *Punica granatum* against genital *Herpes simplex* Virus *in vitro*.]. ching Kuo- Chung Yao Tsa Chi (China Journal of Chinese materia Medica). 20: 556- 558.