Artículo científico

Actividad ovicida *in vitro* de la fracción rica en glicerol de *Jatropha curcas* L. en nematodos gastrointestinales de ovejas

In vitro ovicidal activity of the glycerol-rich fraction of *Jatropha curcas* L. in gastrointestinal nematodes of sheep

Javier Arece-García[1] *https://orcid.org/0000-0001-7902-2701*, Mildrey Soca-Pérez[1] *https://orcid.org/0000-0002-8962-9993*, Dayron Martín-Prieto[1] *https://orcid.org/0000-0002-9073-6198*, Rosa María Rodríguez Calle[1] *https://orcid.org/0000-0003-3394-2144*, Yoel López-Leyva[1] *https://orcid.org/0000-0001-9111-4633*, Ramón Luck-Montero[2] *https://orcid.org/0000-0002-1393-9725* y José Ángel Sotolongo Pérez[3] *https://orcid.org/0000-0002-4446-1998*

[1]Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey, Universidad de Matanzas. Central España Republicana, CP 44280. Matanzas, Cuba. [2]Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá. Calle Carlos Lara 157. Panamá. [3]Grupo Empresarial LABIOFAM. Avenida Independencia, km 16 ½, Rancho Boyeros. La Habana, Cuba. Correo electrónico: arece@ihatuey.cu, mildrey.soca@ihatuey.cu, dayron.martín@ihatuey.cu, yoel.lopez@ihatuey.cu, jasp@labiofam.gtm.minag.cu

Resumen

Objetivo: Evaluar el efecto que ejerce la fracción del aceite de *Jatropha curcas* L., rica en glicerol, en la eclosión de huevos de nematodos parásitos de ovinos.

Materiales y Métodos: Se realizó un experimento sobre la base de un diseño completamente aleatorizado. Se evaluó *in vitro* la inhibición de la eclosión de huevos de nematodos gastrointestinales de ovinos en diferentes concentraciones de la fracción rica en glicerol (diluciones seriadas desde 100 hasta 156 mg/mL). Se usó como control negativo la glicerina (10 v/v), con calidad analítica y agua destilada. Además, se identificaron los componentes de la fracción rica en glicerol mediante cromatografía gaseosa y se estudió la presencia de ésteres de forbol mediante espectrometría de masas, acoplada a un detector de tiempo de vuelo.

Resultados: La fracción rica en glicerol registró una fuerte actividad ovicida con efecto dosis dependiente, con concentración letal media de $3{,}60 \times 10^{-4}$ mg/mL. No se encontraron ésteres de forbol en la fracción rica en glicerol, mientras que la glicerina constituyó el compuesto mayoritario (74,8 %). Le siguieron los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico.

Conclusiones: La fracción rica en glicerol inhibe la eclosión de huevos de nematodos parásitos gastrointestinales de ovinos, con efecto dosis dependiente. No se detectaron ésteres de forbol y el componente mayoritario fue la glicerina.

Palabras clave: antihelmínticos, nematoda, ovinos

Abstract

Objective: To evaluate the effect exerted by the glycerol-rich fraction of *Jatropha curcas* L. oil, on the hatching of eggs from nematodes that parasitize sheep.

Materials and Methods: A trial was conducted based on a complete randomized design. The inhibition of the hatching of eggs from sheep gastrointestinal nematodes in different concentrations of the glycerol-rich fraction (seriated dilutions from 100 to 156 mg/mL) was evaluated *in vitro*. Glycerin (10 v/v) was used as negative control, with analytical quality and distilled water. In addition, the components of the glycerol-rich fraction were identified through gas chromatography and the presence of phorbol esters was studied by mass spectrometry, coupled to a time-of-flight detector.

Results: The glycerol-rich fraction recorded a strong ovicidal activity with dose-dependent effect, with mean lethal concentration of $3{,}60 \times 10^{-4}$ mg/mL. No phorbol esters were found in the glycerol-rich fraction; while glycerin constituted the main compound (74,8 %). It was followed by palmitic, stearic, oleic and linoleic acids.

Conclusions: The glycerol-rich fraction inhibits the hatching of eggs from parasite gastrointestinal nematodes in sheep, with dose-dependent effect. No phorbol esters were detected and the main component was glycerin.

Keywords: anthelmintics, Nematoda, sheep

Introducción

El parasitismo gastrointestinal constituye una amenaza importante para la producción de rumiantes en el trópico. Por décadas, el control parasitario en pequeños rumiantes se ha desarrollado sobre la base de tratamientos antiparasitarios convencionales arbitrarios que, en muchas ocasiones, se aplican con frecuencia mensual, lo

Recibido: 17/02/2022
Aceptado: 31/05/2022

Como citar este artículo: Arece-García, Javier; Soca-Pérez, Mildrey; Martín-Prieto, Dayron; Rodríguez-Calle, Rosa-María; López-Leyva, Yoel; Luck-Montero, Ramón & Sotolongo-Pérez, José Ángel. Actividad ovicida *in vitro* de la fracción rica en glicerol de *Jatropha curcas* L. en nematodos gastrointestinales de ovejas. *Pastos y Forrajes*. 45:eE18, 2022

Este es un artículo de acceso abierto distribuido en Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC4.0) *https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/* El uso, distribución o reproducción está permitido citando la fuente original y autores.

que ha conllevado a la aparición de genotipos de parásitos resistentes a la mayoría de los productos químicos (Arece-García *et al.,* 2017)

En este contexto, la búsqueda de alternativas de control constituye un reto para los investigadores. En los últimos años, la aplicación de la medicina verde ha ganado espacio, lo que ha permitido valorizar los recursos vegetales (Romero-Benavides *et al*., 2017; French, 2018). Se ha informado actividad antihelmíntica en diferentes plantas y sus partes, con variabilidad en los resultados, en función de la familia de la planta y de la composición química de los compuestos bioactivos (Borges y Borges, 2016). El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y la Red de Información de Recursos de Germoplasma han identificado 1 030 plantas con compuestos químicos que tienen actividad antihelmíntica. Por su alto contenido de aceite, *Jatropha curcas* L. se considera una planta oleaginosa. Los frutos cosechados pueden producir hasta 25 % en peso de aceite, después de descascarados y prensados (Alherbawi *et al*., 2021). La composición mayoritaria de este aceite es de 64 % de triacilgliceroles, 12 % de compuestos hidrocarbonados y 9 % de ácidos grasos libres, entre los que se encuentran el oleico, linoleico, palmítico y esteárico (Neupane *et al*., 2021). A su vez, presenta una composición similar a la de muchos aceites comestibles. Sin embargo, no se ha comercializado para consumo humano por sus efectos tóxicos, atribuidos a los ésteres de forbol, curcina, entre otros (Phulia *et al*., 2018). De ahí que el aceite de *J. curcas* se utilice, fundamentalmente, para la producción de biodiesel (Yaqoob *et al*., 2021).

A pesar de poseer estas sustancias tóxicas, se ha detectado actividad antimicrobiana, así como molusquicida y anticancerígena, entre otras aplicaciones biológicas (Bosou *et al*., 2020; Rahu *et al*., 2021). En la pasada década, se desarrolló una investigación que demostró el efecto antihelmíntico del extracto etanólico de las semillas de *J. curcas* en la inhibición de la eclosión de los huevecillos y la migración de las larvas de *Haemonchus contortus in vitro* (Monteiro *et al*., 2011).

Del proceso de extracción del biodiesel del aceite de las semillas de *J. curcas* se obtiene la fracción rica en glicerol (FRG), como resultado de la transesterificación del mismo (Salaheldeen *et al*., 2021). Este producto se puede incluir en la nutrición de los rumiantes por sus propiedades glucogénicas (Khattab, 2015) y se han estimado valores energéticos superiores al *Zea mays* L. (Mach *et al*., 2009). El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto que ejerce la fracción del aceite de *J. curcas*, rica en glicerol, en la eclosión de huevos de nematodos gastrointestinales de ovejas

Materiales y Métodos

Obtención del aceite y la fracción rica en glicerol de J. curcas. Se utilizaron frutos maduros de *J. curcas*, nativa de Cuba, cosechados en la provincia de Guantánamo. Se secaron al sol y se descascararon para la obtención de las semillas. Estas se prensaron con la utilización de una máquina expeler, con potencia de 7,5 kW, velocidad de 1 400 r.p.m. y capacidad de 200 kg de semillas/hora. El aceite en bruto obtenido se filtró mediante un filtro prensa, con el propósito de garantizar un filtrado de 25 micrones. Posteriormente, el aceite se sometió a un proceso de calentamiento a 105 ºC para la extracción de todas las impurezas solubles y volátiles, incluyendo el agua (Rizo, 2019). La FRG se obtuvo del proceso del biodiesel mediante transesterificación del aceite con metanol e hidróxido de sodio como catalizador (Che Hamzah *et al*., 2020).

A la FRG se le determinó su densidad y se prepararon soluciones acuosas de trabajo en concentraciones de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 y 1,56 mg de FRG/mL de solvente.

Prueba de inhibición de la eclosión de huevos. Los huevos se colectaron de estrongílidos mediante la técnica de Hubert y Kerboeuf (1992) y se depositaron en placas de cultivo celular de 24 pocillos de fondo plano (Corning™) para su enfrentamiento con cada una de las concentraciones de la FRG antes mencionadas, sobre la base de un diseño completamente aleatorizado con seis réplicas por tratamiento. Se utilizó como control una solución de glicerina PA (10 %, v/v) (AppliChen PanReac).

Se incubaron durante 48 h y transcurrido ese tiempo, se detuvo la eclosión con 10 µL de solución de Lugol. Se contaron las larvas y los huevos en su totalidad y se determinó el porcentaje de eclosión (Marie-Magdeleine *et al*., 2010; Busari *et al*., 2021).

Análisis de la composición química de la FRG. Para la determinación del perfil de compuestos químicos, se utilizó la técnica de cromatografía gaseosa (cromatógrafo de gases *Thermo Scientific*), acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS). Se usó una temperatura del inyector y del detector FID de 250 ºC, con flujo de 1 mL/min. Los ácidos se identificaron por comparación de sus tiempos de retención y sus espectros de masas, con una biblioteca de datos de espectros de masas de compuestos conocidos.

Cuantificación de los ésteres de forbol en FRG. La FRG de *J. curcas* se mezcló con metanol (1:1, v:v) y se analizó mediante cromatografía en fase reversa, con la utilización de columnas C-18, en sistemas HPLC acoplados a un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo (MS-TOF -Agilent Technologies 6230 TOF LC/MC, USA). La muestra se analizó por triplicado y se usó el metanol como control para determinar el estado limpio de la columna. Se utilizó como estándar de ésteres de forbol el forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, SIGMA-Neu *et al*., 2018).

Análisis estadístico. Los porcentajes de eclosión, según las concentraciones de la FRG, se compararon mediante un análisis de varianza simple. Previo a ello, los valores se transformaron mediante el arcoseno de la raíz del valor, y se verificó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas. Se utilizó un nivel de significación de 0,05 y las medias se compararon mediante el test de Tukey. Se aplicó el paquete estadístico SAS, versión 9.0.

Se realizó un análisis de regresión Probit mediante el paquete estadístico SAS, versión 9.0, con el fin de determinar la concentración letal media (CL_{50}) para la eclosión de los huevecillos. Se aplicaron los valores del grupo control positivo para la corrección de los resultados, siguiendo el modelo de González-Garduño *et al.* (2014), donde:

$$Pr\ (^{respuesta}) = C + (1\text{-}C)\ F\ (X'\beta) = C + (1\text{-}C)\ \Phi\ (b0 + b1x\ log10\ (dosis))$$

Donde:
β - vector de parámetros estimados
F - función de distribución acumulativa (normal)
X - vector de variables explicativas
Pr - probabilidad de una respuesta
C - tasa de respuesta natural (proporción de individuos que responden a la dosis cero)

Resultados y Discusión

Los resultados de la eclosión de huevecillos, según la concentración de la FRG de *J. curcas,* se muestran en la tabla 1. La FRG redujo considerablemente ($p < 0,05$) la eclosión de los huevecillos, con un efecto dosis dependiente y constituye el primer informe conocido de actividad ovicida de la FRG de *J. curcas* en nematodos parásitos.

Se han informado resultados similares al presente estudio, pero con partes de la planta. En este sentido, Monteiro *et al.* (2011) evaluaron el extracto etanólico de semilla de *J. curcas* y obtuvieron una inhibición de la eclosión de 99,8 % en una concentración de 50 mg/mL. En la inhibición de la eclosión de huevecillos, Eguale y Giday (2009) informaron en el extracto acuoso e hidroalcohólico de esta parte de la planta CL_{50} de 0,1 y 0,23 mg/mL respectivamente, cifras superiores a las registradas en el presente estudio, que fueron de $3,60 \times 10^{-4}$ mg/mL (tabla 1).

Salles *et al.* (2014) afirman que esta planta posee moléculas de alto y bajo peso molecular (corte de 12 kDa) y sostienen que los inhibidores de tripsina son el principal candidato en la interferencia del desarrollo embrionario de los huevecillos. Aun cuando no se determinó en el glicerol la presencia de inhibidores de la tripsina, no se ha informado su presencia en este coproducto, debido quizás al propio proceso de transesterificación, que conduce a la desnaturalización de las proteínas.

Es posible que existan otras sustancias en la FRG, como son las sales, que hayan influido en

Tabla 1. Promedio del porcentaje de eclosión de huevos y concentración letal media (CL_{50}) en diferentes concentraciones de la fracción rica en glicerol de *J. curcas.*

Indicador	Concentración, mg/mL	Eclosión, %	EE ±	CL_{50}
Fracción rica en glicerol	0	97,9[1a]	0,05	$3,60 \times 10^{-4}$ mg/mL
	1,56	7,25[c]		
	3,12	6,35[c]		
	6,25	5,29[b]		
	12,5	4,07[bc]		
	25	3,26[bc]		
	50	1,88[cd]		
	100	1,00[e]		
Glicerina	10	99.90[a]		

CL: concentración letal media
Letras desiguales en una misma columna difieren a $p < 0,05$

este resultado, sobre todo porque en la transesterificación del aceite para la obtención del biodiesel se rompe el enlace éster de los ésteres de forbol, y ocurren reacciones de oxidación, transesterificación y epimerización (Goel *et al*., 2007). Esto coincide con los resultados de este estudio, donde no se encontraron los ésteres de forbol en la FRG (fig. 1). También se corresponde con lo informado por Herath *et al.* (2017), quienes tampoco hallaron ésteres de forbol en la FRG de *J. curcas*.

En el análisis de la FRG mediante cromatografía gaseosa no se registraron restos de metanol que pudieran ser potencialmente tóxicos para los huevos (tabla 2). Se halló, como mayor constituyente, el glicerol (74,80 %) y ácidos carboxílicos de cadena larga, a diferencia de un estudio desarrollado por Pradhan *et al*. (2012). Estos autores encontraron en el glicerol de *J. curcas* materia no saponificada, mono y diglicéridos, así como trazas de éteres de metilo.

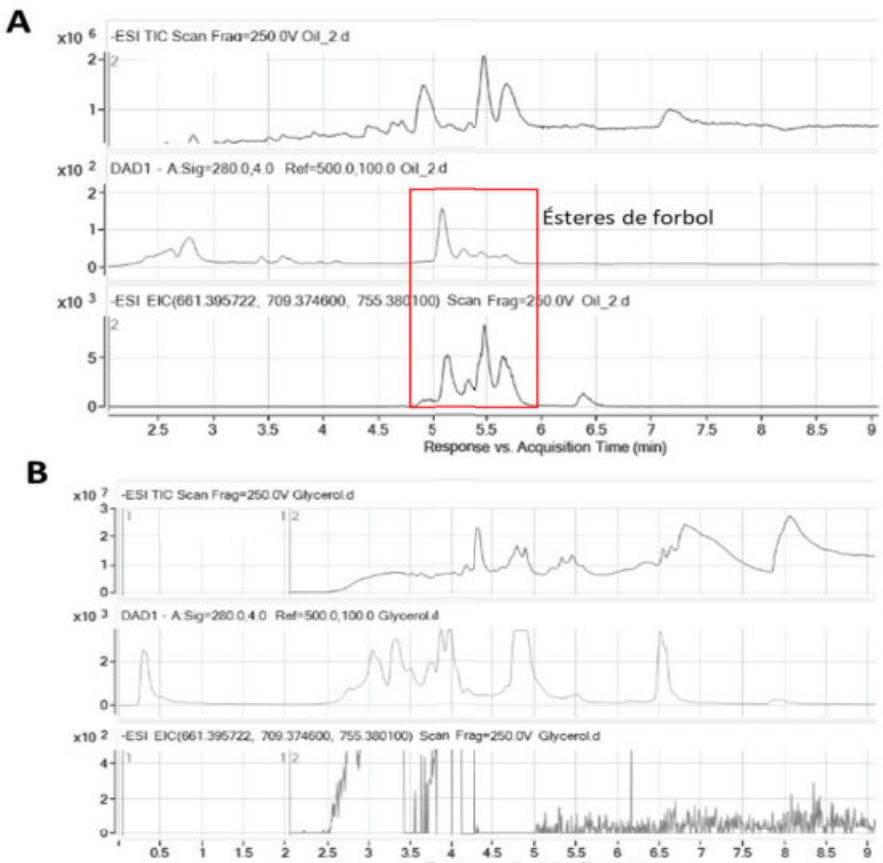


Figura 1. Detección de los ésteres de forbol mediante MS-TOF en la fracción rica en glicerol. Análisis de una muestra de aceite de *J. curcas*.
A. Análisis de una muestra de la fracción rica en glicerol. En el cuadrado rojo se señalan las señales positivas a los ésteres de forbol

Tabla 2. Composición química por CG-MS de la FRG de *J. curcas*.

Compuesto	Masa molar, g/moL	%
Glicerol	92,1	74,8
Ácido palmítico	256,4	5,6
Ácido esteárico	284,5	1,0
Ácido oleico	282,0	9,0
Ácido linoleico	280,0	9,0

Conclusiones

La fracción rica en glicerol inhibió la eclosión de huevos de nematodos, parásitos gastrointestinales de ovinos, con efecto dosis dependiente. No se encontraron ésteres de forbol y el componente mayoritario fue la glicerina.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses entre ellos.

Contribución de los autores

- Javier Arece-García. Generó la idea y ejecutó la investigación, buscó información bibliográfica y redactó el manuscrito.
- Mildrey Soca-Pérez. Generó la idea de la investigación, buscó información bibliográfica y revisó el manuscrito.
- Dayron Martín-Prieto. Generó ideas y contribuyó a la redacción del manuscrito.
- Rosa María Rodríguez-Calle. Contribuyó a la redacción del manuscrito.
- Yoel López-Leyva. Generó la idea de la investigación, buscó información bibliográfica y revisó el manuscrito.
- Ramón Luck-Montero. Generó la idea de la investigación, buscó información bibliográfica y revisó el manuscrito.
- José Ángel Sotolongo-Pérez. Contribuyó en la adquisición de aceite y fracción rica en glicerol y revisó el manuscrito.

Referencias bibliográficas

Alherbawi, M.; AlNouss, A.; McKay, G. & Al-Ansari, T. Optimum sustainable utilisation of the whole fruit of *Jatropha curcas*: An energy, water and food nexus approach. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 137:110605, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110605.

Arece-García, J.; López-Leyva, Y.; Olmedo-Juárez, A.; Ramírez-Vargas, G.; Reyes-Guerrero, D.; López Arellano, Ma. E. *et al*. First report of multiple anthelmintic resistance in goat farm in Cuba. *Helminthologia*. 54 (4):358-362., 2017. DOI: https://doi.org/10.1515/helm-2017-0037.

Borges, D. G. L. & Borges, F. de A. Plants and their medicinal potential for controling gastrointestinal nematodes in ruminants. *Nematoda*. 3:e92016, 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.4322/nematoda.00916.

Bossou, Annick F. A. D.; Olaye, T.; Bogninou, Gbedossou S. R.; Koudoro, Y. A.; Agbangnan, D. C. P.; Bothon F. T. Diane *et al.* Medical benefit, pharmacology and toxicity of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae): A Review. *Int. J. of Adv. Res.* 8 (1):856-864, 2020. DOI: http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/10374.

Busari, O.; Soetan, K. O.; Aiyelaagbe, O. O. & Babayemi, O. J. Phytochemical screening and *in vitro* anthelmintic activity of methanolic extract of *Terminalia glaucescens* leaf on *Haemonchus contortus* eggs. *Acta Trop.* 223:106091, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106091.

Che Hamzah, N. H.; Khairuddin, N.; Siddique, B. M. & Hassan, M. A. Potential of *Jatropha curcas* L. as biodiesel feedstock in Malaysia: A concise review. *Processes*. 8 (7):786, 2020. DOI: https://doi.org/10.3390/pr8070786.

Eguale, T. & Giday, M. *In vitro* anthelmintic activity of three medicinal plants against *Haemonchus contortus*. *Int. J. Green Pharm*. 3 (1):29-34. https://cyberleninka.org/article/n/280673.pdf, 2009.

French, Katherine E. Plant-based solutions to global livestock anthelmintic resistance. *Ethnobiol. Lett.* 9 (2):110-123, 2018. DOI: https://doi.org/10.14237/ebl.9.2.2018.980.

Goel, G.; Makkar, H. P. S.; Francis, G. & Becker, K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *Int J Toxicol*. 26 (4):279-288, 2007. DOI: https://doi.org/10.1080/10915810701464641.

González-Garduño, R.; López-Arellano, M. E.; Ojeda-Robertos, N.; Liébano-Hernández, E. & Mendoza-de Gives, P. Diagnóstico *in vitro* y en campo de resistencia antihelmíntica en nematodos gastrointestinales de pequeños rumiantes. *Arch. med. vet.* 46 (3):399-405, 2014. DOI: https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2014000300008.

Herath, K.; Girard, Lauren; Reimschuessel, Renate & Jayasuriya, Hiranthi. Application of time-of-flight mass spectrometry for screening of crude glycerins for toxic phorbol ester contaminants. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci*. 1046:226-234, 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.01.005.

Hubert, J. & Kerboeuf, D. A. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet. Rec*. 16 (30):442-446, 1992. DOI: https://doi.org10.1136/vr.130.20.442.

Khattab, M. S. A. Glycerol as feedstuff for ruminant. *Science International*. 3 (3):90-94, 2015. DOI: https://doi.org/10.17311/sciintl.2015.90.94.

Mach, N.; Bach, A. & Devant, M. Effects of crude glycerin supplementation on performance and meat quality of Holstein bulls fed high-concentrate diets. *J. Anim. Sci*. 87 (2):632-638, 2009. DOI: https://doi.org/10.2527/jas.2008-0987.

Marie-Magdeleine, Carine.; Mahieu, M.; Philibert, L.; Despois, P. & Archimède, H. Effect of cassava (*Manihot esculenta*) foliage on nutrition,

parasite infection and growth of lambs. *Small Rumin. Res*. 93 (1):10-18, 2010. DOI: https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.04.024.

Monteiro, M. V.; Bevilaqua, C. M.; Morais, S. M.; Machado, L. K.; Camurça-Vasconcelos, A. L. & Campello, C. C. *et al.* Anthelmintic activity of *Jatropha curcas* L. seeds on *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol*. 182 (2-4):259-263, 2011. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.010.

Neu, P. M.; Schober, S. & Mittelbach, M. Quantification of phorbol esters in *Jatropha curcas* by HPLC-UV and HPLC-ToF-MS with standard addition method. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 120 (8):1800146, 2018. DOI: https://doi.org/10.1002/ejlt.201800146.

Neupane, D.; Bhattarai, D.; Ahmed, Z.; Das, B.; Pandey, S.; Solomon, J. K. Q. *et al.* Growing Jatropha (*Jatropha curcas* L.) as a potential second-generation biodiesel feedstock. *Inventions*. 6:60, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/inventions6040060.

Phulia, V.; Sardar, P.; Sahu, N. P.; Sanap, B. N.; Shamna, N.; Fawole, F. J. *et al.* Effect of detoxification methods on anti-nutritional factors and proximate composition of defatted. *Anim. Nutr. Feed Technol*. 18:67-77, 2018. DOI: https://doi.org/10.5958/0974-181X.2018.00006.9.

Pradhan, S.; Naik, S. N.; Ashhar, M.; Khan, I. & Sahoo, P. K. Experimental assessment of toxic phytochemicals in *Jatropha curcas*: oil, cake, bio-diesel and glycerol. *J. Sci. Food Agric.* 92 (3):511-519, 2012. DOI: https://doi.org/0.1002/jsfa.4599.

Rahu, M. I.; Naqvi, S. H. A.; Memon, N. H.; Idrees, M.; Kandhro, F.; Pathan, N. L. *et al.* Determination of antimicrobial and phytochemical compounds of *Jatropha curcas* plant. *Saudi J. Biol. Sci*. 28 (5):2867-2876, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.02.019.

Rizo, A. *Efectos repelentes y acaricidas del aceite de las semillas de Jatropha curcas L. en larvas de Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887)*. 2. Matanzas, Cuba: EEPF Indio Hatuey, Universidad de Matanzas, 2019.

Romero-Benavides, J. C.; Ruano, Ana L.; Silva-Rivas, R.; Castillo-Veintimilla, Paola; Vivanco-Jaramillo, Sara & Bailon-Moscoso, Natalia. Medicinal plants used as anthelmintics: Ethnomedical, pharmacological, and phytochemical studies. *Eur. J. Med. Chem*. 129:209-217, 2017. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.02.005.

Salaheldeen, M.; Mariod, A. A.; Aroua, M. K.; Rahman, S. M. A.; Soudagar, M. E. M. & Fattah, I. M. R. Current state and perspectives on transesterification of triglycerides for biodiesel production. *Catalysts*. 11:112, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/catal11091121.

Salles, Hévila O.; Braga, Ana C. L.; Nascimento, Maria T. dos S. C. do; Sousa, Ana M. P.; Lima, A. R.; Vieira, L. da S. *et al.* Lectin, hemolysin and protease inhibitors in seed fractions with ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. *Braz. J. Vet. Parasitol*. 23 (2):136-143, 2014. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014050.

Yaqoob, H.; Teoh, Y. H.; Sher, F.; Ashraf, M. U.; Amjad, S.; Jamil, M. A. *et al. Jatropha curcas* biodiesel: A lucrative recipe for Pakistan's energy sector. *Processes* 9(7):1129, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/pr9071129.