

Application of an *in vitro* methodology for detecting active saponins in plant extracts. Technical note

Aplicación de una metodología *in vitro* para la detección de saponinas activas en extractos vegetales. Nota técnica

R. Rodríguez¹, Sarai Gómez¹ and M. Fondevila²

¹Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

²Universidad de Zaragoza, Universidad de Zaragoza - Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza-España

Email: rrodriguez@ica.co.cu

In order to evaluate the saponins presence in plant extracts in methanol (50%), obtained from the tropical shrub legumes *Enterolobium cyclocarpum* (enterolobium), *Acacia cornigera* (acacia), *Albizia lebbekoides* (Albizia) and *Leucaena leucocephala* (leucaena), a methodology based on two *in vitro* assays was applied: foam test and blood agar test. In both a completely randomized experimental design was applied, with five extracts per treatment (legume) and three repetitions per extract. The average value of the three repetitions per extract of each legume was considered the experimental unit. The enterolobium extracts were positive to both tests, while the other three legumes were negative ($P < 0.0001$). With the use of this methodology, based on the combination of these two tests, the presence of active saponins in *E. cyclocarpum* extracts was confirmed. Moreover, it could state that in the extracts of acacia, albizia and leucaena there were not presence of these compounds or tannins able to hydrolyzing the membrane of red blood cells.

Key words: *saponins, foam test, blood agar test, tropical legumes*

Introduction

Saponins are terpenic and steroid derivatives which are in many of the plants that are used as food or as a natural source for obtaining additives for ruminant diets (Wina *et al.* 2005). Although the wide range of biological effects of these compounds is known, most can be attributed to more or less complex interactions with biological membranes which affect their principal properties, among them permeability (Francis *et al.* 2002). Therefore, these secondary metabolites can be used to manipulate and improve, naturally, the processes of digestion and absorption of nutrients in animals which intake them (Makkar *et al.* 1998, Hart *et al.* 2008).

To study the biological effect of saponins there is not a chemical compound that shows higher chemical affinity for and inactivates them, as happen with polyethylene glycol which is used to evaluate the biological effect of tannins (Makkar *et al.* 1995). Therefore, it can not study their particular effect on the integral plant and it is necessary to previously extract these metabolites before evaluating them (Rodríguez and Fondevila 2012). To confirm the effectiveness of the extraction process and the presence of active

Para evaluar la presencia de saponinas en extractos vegetales en metanol (50 %), obtenidos a partir de las leguminosas arbustivas tropicales *Enterolobium cyclocarpum* (enterolobium), *Acacia cornigera* (acacia), *Albizia lebbekoides* (albizia) y *Leucaena leucocephala* (leucaena), se aplicó una metodología basada en dos ensayos *in vitro*: ensayo de la espuma y la prueba del agar sangre. En ambos se aplicó diseño experimental completamente aleatorizado, con cinco extractos por tratamiento (leguminosa) y tres repeticiones por extracto. El valor promedio de las tres repeticiones por extracto de cada leguminosa se consideró como la unidad experimental. Los extractos de enterolobium dieron positivo a ambas pruebas, mientras que los de las otras tres leguminosas mostraron resultados negativos ($P < 0.0001$). Con el empleo de esta metodología, basada en la combinación de estos dos ensayos, se confirmó la presencia de saponinas activas en extractos de *E. cyclocarpum*. Además, se pudo afirmar que en los extractos de acacia, albizia y leucaena no hubo presencia de estos compuestos o de taninos capaces de hidrolizar la membrana de los glóbulos rojos.

Palabras clave: *saponinas, ensayo de espuma, ensayo agar sangre, leguminosas tropicales*

Introducción

Las saponinas son derivados terpénicos y esteroidales que se encuentran en muchas de las plantas que se utilizan como alimento o como fuente natural para la obtención de aditivos destinados a las dietas de rumiantes (Wina *et al.* 2005). Aunque se conoce el amplio rango de efectos biológicos de estos compuestos, la mayoría se puede atribuir a interacciones más o menos complejas con las membranas biológicas que afectan sus principales propiedades, entre ellas la permeabilidad (Francis *et al.* 2002). Por ello, estos metabolitos secundarios se pueden utilizar para manipular y mejorar, de manera natural, los procesos de digestión y absorción de nutrientes en los animales que los consumen (Makkar *et al.* 1998, Hart *et al.* 2008).

Para estudiar el efecto biológico de las saponinas no se cuenta con un compuesto químico que muestre gran afinidad química por ellas y las inactive, como sucede con el polietilenglicol que se emplea para evaluar el efecto biológico de los taninos (Makkar *et al.* 1995). Por ello, no se puede estudiar su efecto particular en la planta íntegra y es necesario extraer previamente estos metabolitos antes de evaluarlos (Rodríguez & Fondevila 2012). Para confirmar la efectividad del proceso de

saponins a methodology which allowed characterizing the presence of these metabolites in the extract before their use in any scientific study is needed, for avoiding unnecessary loss of time and resources. To characterize the presence of these compounds in plant extracts may apply different quantitative analysis techniques or other cheaper and faster, as the combination of *in vitro* tests, which allow confirm the presence of these compounds, of qualitative and semi-quantitative ways. This work had as objective to evaluate the saponins presence by two *in vitro* tests in extracts obtained from the tropical shrub legumes *Enterolobium cyclocarpum* (enterolobium), *Acacia cornigera* (acacia), *Albizia lebbekoides* (albizia) and *Leucaena leucocephala* (leucaena).

The four legume species were collected in November 2012. Leaves and petioles of plants from the arboretum of the Instituto de Ciencia Animal were taken. Legumes were completely established in typical red ferrallitic soil (Hernández *et al.* 2015), without irrigation and fertilization. It was took, approximately, 0.2 kg of fresh material of each example at a height of 1.5 meters, simulating the browsing of animals. The collected material was grouped by species, it was dried in forced air oven, with regulated temperature at 60 °C during 72 h. Then it was grounded in a hammer mill at a particle size of 0.5 mm and stored in sealed nylon bags until its experimental use in the Laboratorio de Nutrición de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España.

The alcoholic extraction of secondary metabolites was performed according to the procedure described by Goel *et al.* (2008). In beakers 10 g of each legume were weighed and were added 200 mL of methanol (50%) as an extraction solvent. This process was repeated five times per legume. The plant substrate was soaked in the solvent during 48 h, at rest, in dark at room temperature. Then it was centrifuged at 3000 x g (C 4.11 Centrifuge, Jouan, Saint-Nazaire, Francia) for 15 min and the supernatant was collected. The solid residue was washed with 100 mL of the extraction solvent and recentrifuged under the same conditions. The supernatant was mixed with the obtained in the first centrifugation.

The obtained alcoholic extract was concentrated by solvent extraction by means of roto-evaporation at 80 °C, 100 rpm and vacuum (UNIVEBA-401, J.P. Selecta S.A., Barcelona, España). When the concentration of plant extracts process ends, the content of roto-evaporation flasks was washed with distilled water and transferred to a 250 mL volumetric flask. Finally, after ensuring the proper washing flasks, there were make up the volume to the volumetric flask. The plant extracts, free of methanol, were stored at 4 °C in the volumetric flask, in dark, hermetically sealed, up to 72 h, to prevent their degradation or contamination.

extracción y la presencia de saponinas activas se necesita de una metodología que permita caracterizar la presencia de estos metabolitos en el extracto antes de su utilización en cualquier estudio científico, para evitar pérdidas innecesarias de tiempo y recursos.

Para caracterizar la presencia de estos compuestos en extractos vegetales se pueden aplicar diferentes técnicas de análisis cuantitativo u otras más económicas y rápidas, como la combinación de ensayos *in vitro*, que permiten confirmar la presencia de estos compuestos, de forma cualitativa y semicuantitativa. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la presencia de saponinas mediante dos ensayos *in vitro* en extractos obtenidos a partir de las leguminosas arbustivas tropicales *Enterolobium cyclocarpum* (enterolobium), *Acacia cornigera* (acacia), *Albizia lebbekoides* (albizia) y *Leucaena leucocephala* (leucaena).

Las cuatro especies de leguminosas se recolectaron en noviembre de 2012. Se tomaron hojas y pecíolos de plantas del arboretum del Instituto de Ciencia Animal. Las leguminosas estaban establecidas plenamente en suelo ferralítico rojo típico (Hernández *et al.* 2015), sin riego ni fertilización. Se tomó, aproximadamente, 0.2 kg de material fresco de cada ejemplar a altura de 1.5 metros, simulando el ramoneo de los animales. El material recolectado se agrupó por especie, se secó en estufa de aire forzado, con temperatura regulada a 60 °C durante 72 h. Luego se molió en molino de martillo a tamaño de partícula de 0.5 mm y se conservó en bolsas de nailon selladas hasta su utilización experimental en el Laboratorio de Nutrición de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España.

La extracción alcohólica de los metabolitos secundarios se realizó según el procedimiento descrito por Goel *et al.* (2008). En vasos de precipitado se pesaron 10 g de cada leguminosa y se le añadieron 200 mL de metanol (50 %) como solvente de extracción. Este proceso se repitió cinco veces por leguminosa. El sustrato vegetal se mantuvo embebido en el solvente durante 48 h, en reposo, en oscuridad, a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 3000 x g (Centrifuga C 4.11, Jouan, Saint-Nazaire, Francia) durante 15 min y se recolectó el sobrenadante. El residuo sólido se lavó con 100 mL del solvente de extracción y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El sobrenadante se mezcló con el obtenido en la primera centrifugación.

El extracto alcohólico obtenido se concentró por extracción del solvente mediante rotoevaporación a 80 °C, 100 rpm y vacío (UNIVEBA-401, J.P. Selecta S.A., Barcelona, España). Al finalizar el proceso de concentración de los extractos vegetales, el contenido de los balones de rotoevaporación se lavó con agua destilada y se trasvasó a un volumétrico de 250 mL. Finalmente, luego de garantizar el correcto lavado de los balones, se enrasaron los volumétricos. Los extractos vegetales, libres de metanol, se conservaron en los volumétricos a 4° C, en condiciones de oscuridad, herméticamente sellados, durante 72 h para evitar su degradación o contaminación.

Los extractos vegetales obtenidos se caracterizaron

The obtained plant extracts were characterized by a methodology based on the application of two *in vitro* assays, one qualitative and other semi-quantitative, known as foam test and blood agar test, respectively.

The foam test was carried out according to the procedure proposed by Rossi *et al.* (2007). This test is based on when shaking the aqueous solution of samples which contains saponins, stable foam is formed as the obtained by shaking the aqueous solution of a soap. To it, 1 mL of each extract was placed in a test tube and was added 9 mL of distilled water. Then the solution was filtered, an aliquot of 1 mL was taken and transferred to test tube of 5 mL, in all cases in triplicate. The test tubes were shaken single and vigorously in a tube shaker (Top mixer AT-1, SBS Instruments, S.A., Barcelona, Spain), for half a minute and then put to rest for 15 min. After that time, it was measured with millimeter ruler the height of the formed foam. It was considered that the test was negative for the saponins presence, when the foam height was lower than 5 mm, and positive when the foam reached 5 mm or more.

The blood agar test was carried out according to the procedure proposed by Lurssen (2001). This test is based on the saponins ability of hydrolyzing the membranes of the red blood cells. For the experiment, Petri dishes were taken with blood agar medium, dispensed in the bottom (TSS BIOMERIEUX REF 43001, Spain). Each dish was divided into four and in the middle of each subdivision, a blood agar layer was eliminated with the help of a test tube. Wells of 10 mm diameter were obtained in each subdivision, always taking care not to remove the blood agar from the wells bottom to prevent the extract spreading through the lower part of the Petri dish. Then, 100 μ L of each legume extract was added in one of the wells, trying that in all cases the liquid fill the well, but not to pass by the upper surface of the blood agar layer. Three Petri dishes for each of the five repetitions of plant extract previously obtained were used. All Petri dishes were incubated in the dark, at 37 °C, during 24 h. Subsequently it was measured with millimeter ruler the diameter of the hydrolysis halo (mm) which each extract produced around the well, known as a circular clear zone around it.

In both tests a completely randomized experimental design was applied, with five extracts by treatment (legume) and three repetitions per extract. The average value of the three repetitions per extract of each legume was considered the experimental unit. The InfoStat statistical package for comparison by variance analysis (ANOVA) of the results was used (Di Rienzo *et al.* 2010). When differences ($P < 0.05$) were found, the treatment means were compared by the multiple ranges Duncan test (1955).

The results of the foam test to the extracts of the

mediante una metodología basada en la aplicación de dos ensayos *in vitro*, uno cualitativo y otro semicuantitativo, conocidos como ensayo de la espuma y del agar sangre, respectivamente.

El ensayo de la espuma se realizó según el procedimiento propuesto por Rossi *et al.* (2007). Esta prueba se basa en que al agitar la solución acuosa de muestras que contenga saponinas, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar la solución acuosa de un jabón. Para ello, se tomó 1 mL de cada extracto, se colocó en tubo de ensayo y se le añadió 9 mL de agua destilada. Después se filtró la solución, se tomó una alícuota de 1 mL y se traspasó a tubo de ensayo de 5 mL, en todos los casos por triplicado. Los tubos de ensayos se agitaron individual y vigorosamente en agitador de tubos (Top mixer AT-1, SBS Instruments, S.A., Barcelona, España), durante medio minuto y luego se pusieron a reposar durante 15 min. Al cabo de ese tiempo, se midió con regla milimetrada la altura de la espuma formada. Se consideró que la prueba fue negativa para la presencia de saponinas, cuando la altura de la espuma fue menor que 5 mm, y positiva cuando la espuma alcanzó los 5 mm o más.

El ensayo de agar sangre se ejecutó según el procedimiento propuesto por Lurssen (2001). Este ensayo se basa en la capacidad de las saponinas de hidrolizar las membranas de los glóbulos rojos. Para el experimento, se tomaron placas de Petri con medio agar sangre, dispensado en el fondo (TSS BIOMERIEUX REF 43001, España). Se subdividió cada placa en cuatro y en el centro de cada subdivisión se eliminó una capa del agar sangre con la ayuda de un tubo de ensayo. Se obtuvieron pocillos de 10 mm de diámetro en cada subdivisión, siempre cuidando no eliminar el agar sangre del fondo de los pocillos para evitar que el extracto se difundiera por la parte inferior de la placa de Petri. Luego, se añadieron 100 μ L de extracto de cada leguminosa en uno de los pocillos, tratando de que en todos los casos el líquido cubra el pocillo, pero no discurriera por la superficie superior de la capa de agar sangre. Se emplearon tres placas de Petri por cada una de las cinco repeticiones de extracto vegetal obtenidas previamente. Todas las placas de Petri se incubaron en oscuridad, a 37 °C, durante 24 h. Posteriormente se midió con regla milimetrada el diámetro del halo de hidrólisis (mm) que produjo cada extracto alrededor del pocillo, reconocido como una zona clara circular alrededor del mismo.

En ambos ensayos se aplicó diseño experimental completamente aleatorizado, con cinco extractos por tratamiento (leguminosa) y tres repeticiones por extracto. El valor promedio de las tres repeticiones por extracto de cada leguminosa se consideró como la unidad experimental. Para la comparación por análisis de varianza (ANOVA) de los resultados se utilizó el paquete estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2010). Cuando se encontraron diferencias ($P < 0.05$), las medias de los tratamientos se compararon por la dódima de rangos múltiple de Duncan (1955).

Los resultados de la prueba de la espuma a los extractos

four evaluated legumes are shown in figure 1. Only the enterolobium extracts showed positive results to the saponins presence, as the foam height of the extracts of acacia, albizia and leucaena was lower than 5 mm ($P < 0.0001$).

In figure 2 are showed the results of blood agar test. The enterolobium extracts had an hydrolytic effect on the membranes of red blood cells which form the blood agar, while those of the rest of legumes had no such effect ($P < 0.0001$). This test also allowed verifying that the extracts of acacia, albizia and leucaena not either contain tannins with hydrolytic capacity, it is known that some of these polyphenolic compounds may interfere in this test, when having hydrolytic capacity on the membranes of red blood cells (Scalbert 1991, Hernández *et al.* 2006).

It is known that *E. cyclocarpum* is an species rich in saponins (Wina *et al.* 2005) and the use of methanol as solvent provides good results to extracts these compounds (Sowemimo *et al.* 2015). However, the information on the content of secondary metabolites in the other legumes is abundant regarding the tannins, but low in relation to the saponins. Ekpenyong (1990) refers the presence of saponins in leucaena and that the bitter taste of its foliage, is partly due, to the presence of these compounds. Awe *et al.* (2013) observed moderate contents of saponins in this species.

There are also references of the presence of these secondary metabolites in species of the Acacia and Albizia genus (Wina *et al.* 2005, Kokila *et al.* 2013), but no specific was found for the species which were evaluated in this study.

From the point of view of ruminant nutrition, it is important to confirm the presence of active saponins in plant extracts to determine the real potential of the use of

de las cuatro leguminosas evaluadas se muestran en la figura 1. Solo los extractos de enterolobium mostraron resultados positivos a la presencia de saponinas, pues la altura de la espuma de los extractos de acacia, albizia y leucaena fue menor a los 5 mm ($P < 0.0001$).

En la figura 2 se muestran los resultados del ensayo del agar sangre. Los extractos de enterolobium tuvieron un efecto hidrolítico sobre las membranas de los glóbulos rojos que conforman el agar sangre, mientras que los del resto de las leguminosas no tuvieron ese efecto ($P < 0.0001$). Esta prueba también permitió verificar que los extractos de acacia, albizia y leucaena tampoco contenían taninos con capacidad hidrolítica, pues se sabe que algunos de estos compuestos polifenólicos pueden interferir en esta prueba, al tener capacidad hidrolítica sobre las membranas de los glóbulos rojos (Scalbert 1991, Hernández *et al.* 2006).

Se conoce que *E. cyclocarpum* es una especie rica en saponinas (Wina *et al.* 2005) y que el uso de metanol como solvente brinda buenos resultados para extraer estos compuestos (Sowemimo *et al.* 2015). Sin embargo, la información sobre el contenido de metabolitos secundarios en las otras leguminosas es abundante en lo que respecta a los taninos, pero escasa en relación a las saponinas. Ekpenyong (1990) refiere la presencia de saponinas en leucaena y que el sabor amargo de su follaje se debe, parcialmente, a la presencia de estos compuestos. Awe *et al.* (2013) observaron moderados contenidos de saponinas en esta especie.

También hay referencias de la presencia de estos metabolitos secundarios en especies de los géneros Acacia y Albizia (Wina *et al.* 2005, Kokila *et al.* 2013), pero no se encontró ninguna específica para las especies que se evaluaron en este estudio.

Desde el punto de vista de la nutrición de rumiantes, es importante confirmar la presencia de saponinas

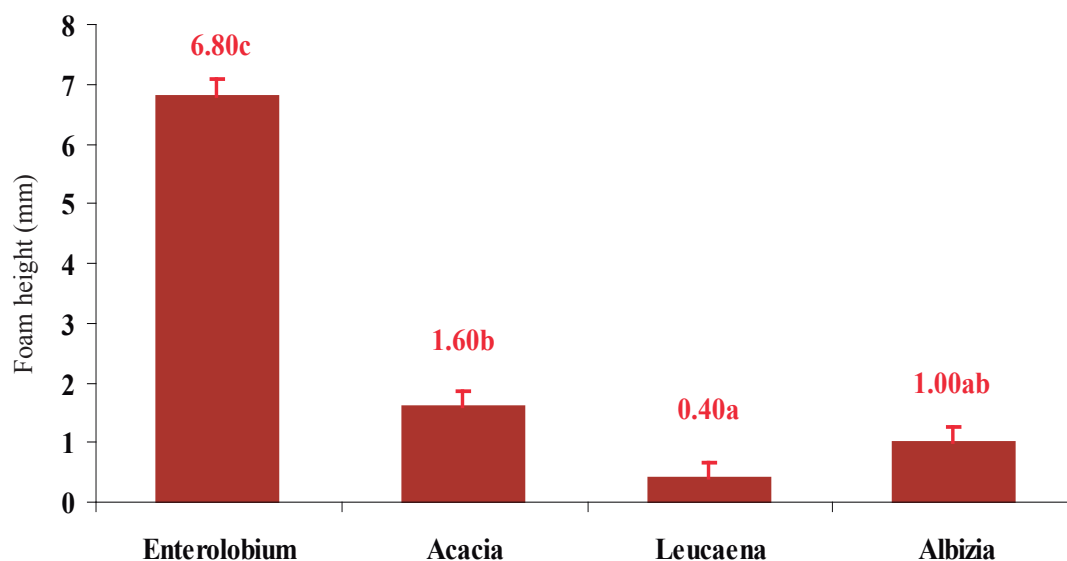


Figure 1. Response of the extracts of the evaluated legumes (SE = 0.274; $P < 0.05$) to the application of the foam test.

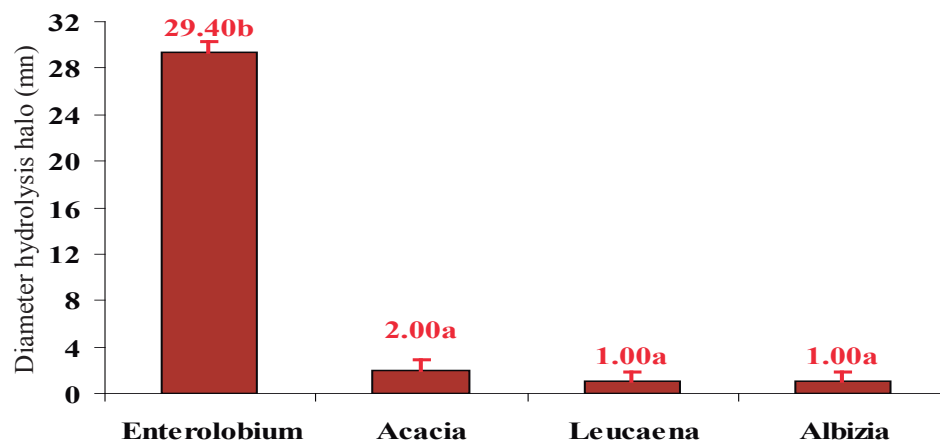


Figure 2. Response of the extracts of the evaluated legumes (SE = 0.894; $P < 0.05$) to the application of the blood agar test.

sources rich in saponins as a natural tool to manipulate ruminal fermentation towards an increase of microbial protein which is produced and reaches the duodenum, and to make a more efficient use of fermentable energy of the diet (Rodríguez and Fondevila 2012). Therefore, it is essential to ensure the quality of these extracts by confirming the active presence of these secondary metabolites in them.

It is concluded that the use of this methodology, based on the combination of these two *in vitro* assays, allowed confirming the presence of active saponins in *E. cyclocarpum* extracts and saying that there were not present in the extracts of acacia, albizia and leucaena of these compounds or tannins capable of hydrolyzing the membrane of red blood cells.

activas en extractos vegetales para poder determinar las potencialidades reales de empleo de fuentes ricas en saponinas como herramienta natural para manipular la fermentación ruminal hacia un aumento de la proteína microbiana que se produce y alcanza el duodeno, así como para hacer un uso más eficiente de energía fermentable de la dieta (Rodríguez and Fondevila 2012). Por ello, es imprescindible garantizar la calidad de estos extractos mediante la confirmación de la presencia activa de estos metabolitos secundarios en los mismos.

Se concluye que el empleo de esta metodología, basada en la combinación de estos dos ensayos *in vitro*, permitió confirmar la presencia de saponinas activas en extractos de *E. cyclocarpum* y afirmar que no hubo presencia en los extractos de acacia, albizia y leucaena de estos compuestos o de taninos capaces de hidrolizar la membrana de los glóbulos rojos.

References

- Awe, F. A., Giwa-Ajeniya, A. O., Akinyemi, A. A. & Ezeri, G. N. O. 2013. "Phytochemical analysis of *Acalypha wilkesiana*, *Leucaena leucocephala*, *Pepperomia pellucida* and *Senna alata* leaves". The International Journal of Engineering and Sciences, 2 (9): 41–44, ISSN: 0020-7225.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. 2010. InfoStat. version 2010, [Windows], Universidad Nacional de Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, Available: <<http://www.infostat.com.ar/>>.
- Duncan, D. B. 1955. "Multiple Range and Multiple F Tests". Biometrics, 11 (1): 1–42, ISSN: 0006-341X, DOI: 10.2307/3001478.
- Ekpenyong, T. E. 1990. "Leucaena leaf meal". In: Thacker P. A. & Kirkwood R. N., Non-Traditional Feeds for Use in Swine Production, USA: Butterworth Publishers, pp. 225–236, ISBN: 978-0-409-90190-0, Available: <https://books.google.com/cu/books?id=asop31SWKpkC&pg=PR2&lpg=PR2&dq=Nontraditional+feed+sources+for+use+in+swine+production+1990&source=bl&ots=nmTWn5mI9R&sig=SctgwULO__33fmpp0QY9kkcrbVM&hl=es-419&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=Nontraditional%20feed%20sources%20for%20use%20in%20swine%20production%201990&f=false>, [Consulted: May 3, 2016].
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S. & Becker, K. 2002. "The biological action of saponins in animal systems: a review". British Journal of Nutrition, 88 (06): 587, ISSN: 0007-1145, 1475-2662, DOI: 10.1079/BJN2002725.
- Goel, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. 2008. "Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane". Animal Feed Science and Technology, 147 (1-3): 72–89, ISSN: 03778401, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2007.09.010.
- Hart, K. J., Yáñez-Ruiz, D. R., Duval, S. M., McEwan, N. R. & Newbold, C. J. 2008. "Plant extracts to manipulate rumen fermentation". Animal Feed Science and Technology, 147 (1-3): 8–35, ISSN: 03778401, DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2007.09.007.
- Hernández, J. A., Pérez, J. J. M., Bosch, I. D. & Castro, S. N. 2015. Clasificación de los suelos de Cuba 2015. Mayabeque, Cuba: Ediciones INCA, 93 p., ISBN: 978-959-7023-77-7.

- Hernández, O. Y., Mollineda, D. N. & González, M. D. M. 2006. "Estudio de la actividad hemolítica de los posibles taninos extraídos a partir de la *Boldoa purpurascens* Cav.". REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 7 (10): 1–5, ISSN: 1695-7504.
- Kokila, K., Priyadharshini, S. D. & Sujatha, V. 2013. "Phytopharmacological properties of Albizia species: A review". International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5 (Supp. 3): 70–73, ISSN: 0975-1491.
- Lursen, L. M. 2001. Cuantificación de saponinas esteroidales en *Yucca elephantantipes* (Flor de Izote). Graduated Thesis, Universidad de San Carlos de Guatemala, Ciudad de Guatemala, Guatemala, 47 p.
- Makkar, H. P. S., Blümmel, M. & Becker, K. 1995. "Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques". British Journal of Nutrition, 73 (06): 897, ISSN: 0007-1145, 1475-2662, DOI: 10.1079/BJN19950095.
- Makkar, H. P. S., Sen, S., Blümmel, M. & Becker, K. 1998. "Effects of Fractions Containing Saponins from *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria*, and *Acacia auriculiformis* on Rumen Fermentation". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46 (10): 4324–4328, ISSN: 0021-8561, 1520-5118, DOI: 10.1021/jf980269q.
- Rodríguez, R. & Fondevila, M. 2012. "Effect of saponins from *Enterolobium cyclocarpum* on *in vitro* microbial fermentation of the tropical grass *Pennisetum purpureum*: Fermentation of *Pennisetum purpureum* with saponins". Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 96 (5): 762–769, ISSN: 09312439, DOI: 10.1111/j.1439-0396.2011.01161.x.
- Rossi, C. A., de León, M., González, G. L. & Pereyra, A. M. 2007. "Secondary metabolites presence in ten Browne Woody plants in the xerophitic woodland in the argentine arid chaco region. Short note". Tropical and Subtropical Agroecosystems, 7: 133, ISSN: 1870-0462.
- Scalbert, A. 1991. "Antimicrobial properties of tannins". Phytochemistry, 30 (12): 3875–3883, ISSN: 00319422, DOI: 10.1016/0031-9422(91)83426-L.
- Sowemimo, A., Venables, L., Odedeji, M., Koekemoer, T., van de Venter, M. & Hongbing, L. 2015. "Antiproliferative mechanism of the methanolic extract of *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. (Fabaceae)". Journal of Ethnopharmacology, 159: 257–261, ISSN: 03788741, DOI: 10.1016/j.jep.2014.11.023.
- Wina, E., Muetzel, S. & Becker, K. 2005. "The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Production. A Review". Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (21): 8093–8105, ISSN: 0021-8561, 1520-5118, DOI: 10.1021/jf048053d.

Received: October 14, 2015