UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE *Azadirachta indica* Y *Cnidoscolus angustidens* PARA LA MITIGACIÓN DE GASES DE EFECTO INVERNADERO Y ACTIVIDAD ANTIPARASITANTE EN EQUINOS

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

TONANTZIN DÍAZ ALVARADO

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Junio 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE *Azadirachta indica* Y *Cnidoscolus angustidens* PARA LA MITIGACIÓN DE GASES DE EFECTO INVERNADERO Y ACTIVIDAD ANTIPARASITANTE EN EQUINOS

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:
TONANTZIN DÍAZ ALVARADO

COMITÉ DE TUTORES
DR. ABDELFATTAH ZEIDAN MOHAMED SALEM
DRA. MONA MOHAMED MOHAMED YASSEEN ELGHANDOUR
DRA. YAZMÍN ALCALÁ CANTO

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Junio 2025

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue caracterizar y evaluar el potencial de los extractos acuosos de dos especies vegetales, *Azadirachta indica* (neem) y *Cnidoscolus angustidens* (mala mujer), en la mitigación de gases con efecto invernadero (GEI) y en la actividad antiparasitaria frente a nematodos gastrointestinales del género *Strongylus* spp. en equinos. Esta propuesta surge como una alternativa fitoterapéutica ante el aumento de la resistencia parasitaria a los antihelmínticos sintéticos y el impacto ambiental derivado de las emisiones del sector pecuario.

En primera instancia, se realizó la caracterización fitoquímica de los extractos. Los resultados revelaron que *A. indica* presentó una alta concentración de fenoles totales (22.38 mg AG/g), flavonoides (5.62 mg EQ/g) y saponinas (23.33 mg/g MS), mientras que C. angustidens se destacó por su contenido elevado de taninos condensados (6.71%). Estos compuestos bioactivos son conocidos dado su potencial para interferir en la fisiología de los helmintos y modular la microbiota intestinal, lo que los posiciona como agentes bioactivos clave.

Los estudios de fermentación *in vitro* utilizando contenido fecal equino permitieron evaluar la producción de gases como CH_4, CO y H_2S en función del tiempo y dosis de los extractos. Los resultados mostraron reducciones de CH_4 de entre 4.41% y 54.54% en sustratos incubados y de hasta 61.82% en sustratos degradados. Las emisiones de CO se redujeron hasta en un 16.78% y las de H_2S en un 67.35%, sin alterar significativamente el pH fecal ni comprometer la funcionalidad fermentativa. Además, se observaron mejoras en la concentración de ácidos grasos de cadena corta, lo cual sugiere un resultado beneficioso sobre el perfil fermentativo intestinal.

Por otro lado, se efectuó la evaluación del potencial antihelmíntico mediante bioensayos *in vitro* frente a *Strongylus* spp., donde los extractos y sus fracciones (fenoles totales y saponinas) mostraron efectos inhibitorios significativos. El extracto de *A. indica* alcanzó una inhibición del 84%, mientras que los fenoles de *C. angustidens* alcanzaron una eficacia del 85.33%, lo que respalda su potencial uso como agentes antihelmínticos naturales. Sin embargo, la combinación 1:1 de ambos extractos presentó un efecto antagónico, disminuyendo la eficacia antiparasitaria, lo que evidencia la necesidad de estudios adicionales sobre interacciones fitoquímicas.

En conjunto, los extractos de *A. indica* y *C. angustidens* demostraron tener un efecto dual significativo: control antiparasitario y mitigación ambiental, sin afectar adversamente los parámetros de fermentación. Estos resultados validan la hipótesis de que dichas especies pueden constituir una estrategia fitogénica sustentable en la producción equina. Esta investigación contribuye al desarrollo de soluciones agroecológicas que reducen la dependencia de químicos sintéticos, alineándose con los objetivos globales de sostenibilidad y bienestar animal.

Palabras calves: Extractos acuosos; *Azadirachta indica*; *Cnidoscolus angustidens*; actividad antihelmíntica; gases de efecto invernadero.

ABSTRACT

The present research aimed to evaluate the potential of aqueous extracts from two plant species, *Azadirachta indica* (neem) and *Cnidoscolus angustidens* (mala mujer), in mitigating greenhouse gas (GHG) emissions and exerting antiparasitic activity against gastrointestinal nematodes of the genus *Strongylus* spp. in equines. This proposal emerges as a phytotherapeutic alternative in response to the increasing resistance of parasites to synthetic anthelmintics and the environmental impact associated with emissions from the livestock sector.

Initially, the phytochemical characterization of the extracts was conducted. The analyses revealed that *A. indica* exhibited a high concentration of total phenols (22.38 mg GAE/g), flavonoids (5.62 mg QE/g), and saponins (23.33 mg/g DM), whereas *C. angustidens* stood out for its elevated content of condensed tannins (6.71%). These secondary metabolites are known for their ability to interfere with helminth physiology and modulate the gut microbiota, positioning them as key bioactive agents.

In vitro fermentation studies using equine fecal content were performed to evaluate gas production (CH_4, CO, and H_2S) as a function of time and extract dosage. The results showed reductions in CH_4 emissions ranging from 4.41% to 54.54% in incubated substrates and up to 61.82% in degraded substrates. CO emissions were reduced by up to 16.78%, and H_2S by 67.35%, without significantly altering fecal pH or compromising fermentative function. Additionally, improvements in short-chain fatty acid concentrations were observed, suggesting a beneficial effect on the intestinal fermentative profile.

On the other hand, the anthelmintic activity was evaluated through in vitro bioassays against Strongylus spp., where the extracts and their fractions exhibited significant inhibitory effects. The *A. indica* extract achieved an 84% inhibition, while the phenolic fraction of *C. angustidens* reached an efficacy of 85.33%, supporting their potential as natural anthelmintic agents. However, the 1:1 combination of both extracts showed an antagonistic effect, reducing antiparasitic efficacy, highlighting the need for further studies on phytochemical interactions.

Overall, the extracts of *A. indica* and *C. angustidens* demonstrated a significant dual effect: antiparasitic control and environmental mitigation, without adversely affecting fermentation parameters. These results validate the hypothesis that these species can serve as a sustainable phytogenic strategy in equine production. This research contributes to the development of agroecological solutions that reduce reliance on synthetic chemicals, aligning with global sustainability and animal welfare goals.

Key words: Aqueous extracts; *Azadirachta indica*; *Cnidoscolus angustidens*; anthelmintic activity; greenhouse gases.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS i

RESUMEN iii

ABSTRACT v

ÍNDICE vii

ÍNDICE DE TABLAS xi

ÍNDICE DE FIGURAS xiii

1. INTRODUCCIÓN 1

2. REVISIÓN DE LITERATURA 3

2.1 Producción de metabolitos secundarios en plantas 3

2.1.1 Compuestos fenólicos 4

2.1.2 Terpenos 8

2.1.3 Alcaloides 11

2.2 Extracción de metabolitos secundarios 12

2.2.1 Material vegetativo 12

2.2.2 Selección del solvente 18

2.2.3 Método de extracción 22

2.2.4 Análisis en extractos para su identificación y/o cuantificación de metabolitos secundarios 28

2.3 Neem (*Azadirachta indica*) 32

2.4 Ortigo (*Cnidoscolus angustidens*) 35

2.5 Equinos 36

2.5.1 Producción nacional y mundial 36

2.5.2 Contribución de los equinos a los gases de efecto invernadero 40

2.5.3 Bienestar animal de equinos 44

2.6 Parásitos en equinos 48

2.6.1 Grupos farmacológicos utilizados 50

2.6.2 Resistencia antihelmíntica y estrategias sostenibles 51

2.6.3 Formas larvarias y tratamientos específicos 52

2.6.4 Factores de manejo y recomendaciones 53

2.6.5 Problemáticas sanitarias, ambientales y económicas del uso de fármacos antiparasitarios en equinos 53

2.6.6 Evaluación de actividad antiparasitante 57

2.7 Mecanismo de acción de los metabolitos secundarios como agente antihelmíntico .. 58

2.7.1 Taninos condensados 59

2.7.2 Saponinas 59

2.7.3 Alcaloides 59

2.7.4 Terpenoides 59

2.7.5 Flavonoides 60

2.8 Uso de extracto de neem como agente antiparasitario en rumiantes 60

3. JUSTIFICACIÓN 62

4. HIPÓTESIS 63

5. OBJETIVOS 64

5.1 Objetivo general 64

5.2 Objetivos específicos 64

6. MATERIALES Y MÉTODOS 65

6.1 Recolección y conservación del material vegetativo 65

6.2 Elaboración de extractos 65

6.3 Cuantificación de fenoles totales, flavonoides totales y taninos 66

6.3.1 Fenoles totales 66

6.3.2 Taninos 66

6.3.3 Flavonoides 67

6.4 Cromatografía de gases 68

6.5 Prueba *in vitro* de emisión de gases con efecto invernadero 68

6.5.1 Animales como donantes de inoculo 68

6.5.2 Incubaciones *in vitro* 69

6.5.3 Sustrato aparentemente degradado 70

6.5.4 Cálculos 70

6.6 Extracción de fenoles totales y saponinas por solventes 71

6.7 Prueba *in vitro* de actividad antihelmíntica 72

6.7.1 Obtención de huevos y larvas estrongilidos 72

6.7.2 Ensayo de inhibición larvaria de L3 73

7. RESULTADOS 74

7.1 Primer articulo 74

7.2 Segundo artículo 86

8. DISCUSIÓN GENERAL 109

9. CONCLUSIONES 111

10. BIBLIOGRAFÍA 113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de taninos hidrolizables y taninos condensados 7

Tabla 2. Clasificación de terpenos y sus metabolitos secundarios representativos 10

Tabla 3. Clasificación de las saponinas 11

Tabla 4. Producción de metabolitos secundarios en la planta de acuerdo con su etapa fenológica 14

Tabla 5. Producción de metabolitos secundarios en las plantas por condiciones ambientales 15

Tabla 6. Temperaturas recomendadas para el secado de material vegetativo conforme a sus metabolitos secundarios..... 17

Tabla 7. Polaridad de los solventes y la extracción de metabolitos secundarios 19

Tabla 8.Principales métodos de extracción de metabolitos secundarios 23

Tabla 9. Características para la cuantificación de metabolitos secundarios por medio de espectrofotometría 29

Tabla 10. Clasificación botánica del neem 32

Tabla 11. Identificación taxonómica de "mala mujer"..... 35

Tabla 12. Tipos de parásitos, características morfológicas, localización y efecto según ESCCAP (2018)..... 48

Tabla 13. Contenido de fenoles totales y taninos en los extractos crudos de las plantas Azadirachta indica, Cnidoscolus angustidens y la mezcla (1:1 v/v)**Errore. Il segnalibro non è definito.**

Tabla 14. Extracción de fenoles totales y saponinas mediante solventes de los extractos acuosos de *Azadirachta indica*, *Cnidoscolus angustidens* y su mezcla (1:1 v/v)**Errore. Il segnalibro non è definito.**

Tabla 15. Porcentaje de inhibición de las dosis de los extractos y compuestos bioactivos de las plantas *Azadirachta indica*, *Cnidoscolus angustidens* y su mezcla (1:1 v/v) sobre Strongylos spp. en equinos .....**Errore. Il segnalibro non è definito.**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funciones ecológicas de los principales metabolitos secundarios (Lustre, 2022). 4

Figura 2. Árbol de neem (*Azadirachta indica*)..... 34

1. INTRODUCCIÓN

El aumento de las enfermedades endoparasitarias en equinos, junto con los elevados costos y el aumento progresivo a la resistencia de los parásitos a los antiparasitarios convencionales, ha provocado una urgente necesidad de alternativas terapéuticas más sostenibles y eficaces (Larsen et al., 2002; Nielsen, 2012). Las plantas medicinales, en particular aquellas con propiedades antiparasitarias, han ganado relevancia como una opción viable para el control de endoparásitos intestinales en equinos (Hautala et al., 2019). Entre ellas, *Azadirachta indica* y *Cnidoscolus angustidens* destacan no solo por sus usos tradicionales, sino también por la presencia de metabolitos secundarios bioactivos que podrían influir de manera relevante en la salud de los animales.

Ambas plantas contienen compuestos como alcaloides, flavonoides, saponinas y terpenoides, los cuales se han asociado con diversas propiedades terapéuticas (IBUNAM, 2025; Sarkar et al., 2021). En el caso de *Azadirachta indica*, el azadiractín, un terpenoide de la familia de los limonoides ha demostrado tener efectos antiparasitarios, especialmente contra Strongylus, un parásito intestinal común en equinos (Barrabí & Arece, 2013). Además, los flavonoides presentes en ambas especies, como la quercetina y el kaempferol, poseen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que pueden colaborar en la disminución del nivel de infestación parasitaria y mejorar la salud general de los animales (Sarkar et al., 2021; Shewale & Rathod, 2018).

Aparte de sus beneficios para la salud animal, estas plantas tienen un potencial significativo en la reducción de gases de efecto invernadero (GEI) generados por los equinos. Investigaciones recientes sugieren que los metabolitos secundarios contenidos en especies

vegetales como *Azadirachta indica* y *Cnidoscolus angustidens* podrían contribuir a la reducción de la producción de metano durante la digestión en los animales (Alvarado et al., 2022; Elghandour, Acosta-Lozano, et al., 2023). Los terpenoides y saponinas, en particular, han mostrado propiedades moduladoras en la flora intestinal de rumiantes, lo que podría disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero, como el metano, que se generan durante el proceso digestivo (Elghandour, Acosta-Lozano, et al., 2023).

La caracterización y evaluación de los extractos acuosos de estas plantas para la mitigación de los GEI y su actividad antiparasitaria en equinos representan un área de investigación innovadora. Este estudio tiene como objetivo explorar y validar las propiedades bioactivas de los extractos de *Azadirachta indica* y *Cnidoscolus angustidens*, no solo para el control de parásitos intestinales, especialmente Strongylus, sino también para su potencial en la reducción de las emisiones de GEI, contribuyendo así a un enfoque más sustentable en la ganadería. Al proporcionar alternativas naturales y eficaces, se podría avanzar hacia un modelo de manejo animal que favorezca tanto la salud de los equinos como la sostenibilidad ambiental.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Producción de metabolitos secundarios en plantas

Las plantas son organismos sésiles incapaces de desplazarse ante condiciones adversas, por lo que han desarrollado complejos mecanismos de defensa frente a restricciones bióticas y factores exógenos (Guerriero et al., 2018). Entre estos mecanismos, destaca la biosíntesis de metabolitos secundarios, también llamados compuestos bioactivos que son sustancias derivadas del metabolismo primario de la planta (Biesalski et al., 2009), estas sustancias tienen un papel importante ya que responden a factores bióticos ya abióticos y son vitales para su existencia (Gonçalves & Romano, 2018).

La producción de metabolitos secundarios en plantas, también nombrados "compuestos bioactivos" dependen de factores internos y externos; dentro de los factores internos podemos ver la especie e incluso variedad de la planta, etapa de desarrollo, órgano vegetal y estado fisiológico (Isah & Isah, 2019); y en factores externos como luz, temperatura, disponibilidad de agua, nutrientes del suelo, interacción con otras plantas y ataques bióticos (Lustre, 2022).

Los metabolitos secundarios se catalogan en diferentes categorías de acuerdo a su estructura química, funciones biológicas y ecológicas (Guerriero et al., 2018; Isah & Isah, 2019; Lustre, 2022). De acuerdo con Lustre (2022) clasifica los metabolitos secundarios en las plantas conforme a sus funciones ecológicas, esto lo podemos ver en la Figura 1.

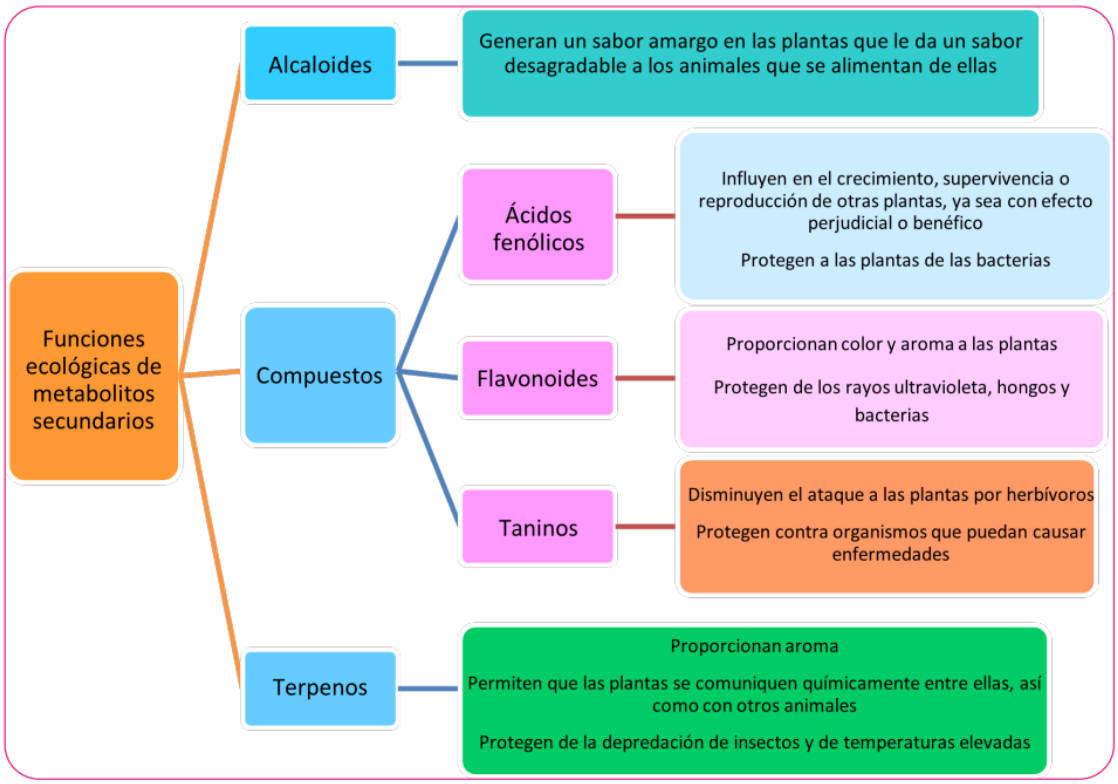


Figura 1. Funciones ecológicas de los principales metabolitos secundarios (Lustre, 2022).

Los metabolitos secundarios también han sido clasificados con base en su estructura química, destacándose principalmente los compuestos fenólicos, terpenoides y alcaloides (Guerriero et al., 2018).

2.1.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son una de las clases más abundantes y estructuralmente diversas dentro de los metabolitos secundarios de las plantas. Se identifican por la presencia de al menos un anillo aromático y uno o más grupos hidroxilo (-OH) (Peñarrieta et al., 2014). Estos compuestos derivan principalmente de la vía del ácido shiquímico y del metabolismo del

fenilpropanoide, y pueden clasificarse en una variedad de subgrupos, como flavonoides, ácidos fenólicos, taninos y estilbenos principalmente (Martín, 2018).

2.1.1.1 Flavonoides

Los flavonoides pertenecen a los compuestos fenólicos de bajo peso molecular, caracterizados por una estructura básica de 15 carbonos (C6-C3-C6) que comprende dos anillos aromáticos (A y B) y un anillo heterocíclico (C); cuya biosíntesis en plantas es de naturaleza mixta, ya que resulta de la convergencia de dos rutas metabólicas distintas. Estas rutas son la del ácido shikímico y la de la acetil-Coenzima A, las cuales confluyen para generar el aminoácido fenilalanina. Esta, a su vez, ingresa a la vía del fenilpropanoide, donde es transformada en p-cumaroil-CoA. A partir de este intermediario, la enzima chalcona sintasa cataliza la conversión del p-cumaroil-CoA en naringenina chalcona, marcando el inicio de la ruta biosintética de los flavonoides. Estos metabolitos secundarios se clasifican en ocho subgrupos principales: flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, flavanos, flavanoles, isoflavonas y chalconas (Mateus et al., 2023).

2.1.1.2 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos en las plantas forman un tipo importante de metabolitos secundarios dentro del grupo de los compuestos fenólicos. Se especifican por poseer un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo y un grupo carboxilo, incluyen principalmente dos clases: ácidos benzoicos (C6–C1): como el ácido salicílico y el ácido gálico; y ácidos cinámicos (C6–C3): como el ácido ferúlico, cafeico, sinápico y p-cumárico (Zárate et al., 2021).

2.1.1.3 Taninos

Los taninos son compuestos fenólicos de alto peso molecular presentes en diversas especies vegetales. Estas moléculas complejas contienen entre 12 y 16 grupos fenólicos, lo que les confiere una elevada capacidad para establecer interacciones con biomoléculas, especialmente mediante la formación de complejos con proteínas y metales. Esta propiedad está asociada a su característico sabor astringente (Sharma et al., 2021).

En términos de funcional, los taninos actúan como mecanismos de defensa química en las plantas, protegiéndolas de herbívoros, insectos y agentes patógenos (Das et al., 2020). Estructuralmente, se clasifican en dos grandes grupos: taninos hidrolizables, compuestos por ésteres de ácidos fenólicos y azúcares, y taninos condensados, formados por polímeros de flavonoides (Olivas et al., 2015).

***a) Taninos hidrolizable*s**: Su biosíntesis inicia a partir de la glucosa, la cual, tras ser procesada por la vía de las pentosas fosfato, se incorpora a la ruta del ácido shikímico. Esta ruta metabólica conduce a la formación de ácido shikímico, un intermediario fundamental en la síntesis de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina y triptófano. A través de sucesivas reacciones enzimáticas, el ácido shikímico da lugar al ácido gálico (3,4,5-trihidroxibenzoico), el cual puede esterificarse con moléculas de glucosa, generando gálico-glucósidos. La unión repetida de estas unidades mediante enlaces éster da origen a los taninos gálicos, mientras que la oxidación intramolecular de dos unidades de ácido gálico conduce a la formación de ácido elágico, precursor de los taninos elágicos (Olivas et al., 2015).

b) Taninos condensados: también denominados proantocianidinas, son polímeros de flavonoides que se originan a partir de la fenilalanina, un aminoácido aromático sintetizado

por la ruta del ácido shikímico. La fenilalanina se convierte en ácido cinámico mediante la acción de la enzima fenilalanina amonio-liasa, iniciando la ruta de los fenilpropanoides, la cual produce compuestos intermedios como el ácido p-cumárico, que son transformados a través de la acción de enzimas específicas como chalcona sintasa, chalcona isomerasa, flavanona 3-hidroxilasa, entre otras. Estas reacciones culminan en la producción de flavan-3-oles, como catequina y epicatequina, los cuales se polimerizan espontáneamente o por acción enzimática para formar los taninos condensados. Estas moléculas son altamente resistentes a la hidrólisis y participan activamente en la defensa vegetal, pigmentación y protección frente a estrés oxidativo (Dixon & Sarnala, 2020).

Se elaboró una tabla comparativa que muestra la comparación de taninos hidrolizables y taninos condensados en varios aspectos, esto de puede mostar en la Tabla 1.

Tabla 1. Comparación de taninos hidrolizables y taninos condensados

Aspecto	**Taninos hidrolizables**	**Taninos condensados**
Ruta base	Ácido shikímico	Fenilpropanoide + Flavonoide
Compuestos precursores	Ácido gálico, ácido elágico	Catequina, epicatequina
Tipo de compuestos	Ésteres de ácido fenólico y glucosa	Polímeros de flavonoides
Enzimas clave	Gálico sintasa, elágico sintasa	Chalcona sintasa, flavanona sintasa, reductasas
Solubilidad	Solubles en agua	Parcialmente solubles en agua

Estabilidad	Se hidrolizan con ácidos o enzimas	Resistentes a la hidrólisis
Coloración	Pálidos o amarillentos	Oscuros, tienden a formar pigmentos marrones
Presencia en plantas	Menos comunes	Más comunes
Productos de degradación	Ácidos fenólicos + azúcar	Antocianidinas (al ser tratadas con ácidos)
Funciones principales	Defensa química, antioxidante	Defensa, pigmentación, protección ultravioleta

2.1.1.4 Estilbenos

Se caracterizan por un esqueleto carbonado de 1,2-difeniletileno (C6–C2–C6), que consiste en una fracción de etileno en medio de dos anillos de benceno, biosintetizados por medio de la vía metabólica del ácido shiquímico mediante la acción de la enzima estilbeno sintasa (STS). Funcionan principalmente como fitoalexinas, participando en mecanismos de defensa contra patógenos, crecimiento bacteriano y fúngico y para contrarrestar los efectos dañinos de la luz ultravioleta (Khayri et al., 2023).

2.1.2 Terpenos

Los terpenos son caracterizados por ser insolubles en agua y derivan de unidades de isopropeno (5 átomos de C), los terpenos se catalogan por el número de unidades de isopropeno (5C) que contienen. Los terpenos que tienen dos unidades se llaman monoterpenos (10C), los que tienen tres unidades son sesquiterpenos (15C), los de cuatro

unidades son diterpenos (20C), los de seis unidades triterpenos (30C), ocho unidades tetraterpenos (40C) y politerpenos cuando tienen más de ocho unidades de isopropeno (Guimarães et al., 2019). Estos compuestos desempeñan un papel fundamental en las interacciones ecológicas de las plantas, ya sea como atrayentes de polinizadores, agentes de protección contra herbívoros y patógenos, o como protectores frente al estrés abiótico (Dudareva et al., 2013).

La síntesis de terpenos se lleva a cabo mediante dos rutas biosintéticas principales: la vía del mevalonato (MVA) y la vía del 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato/2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (DOXP/MEP). La vía del mevalonato ocurre en el citosol y utiliza como precursor el acetil-CoA, el cual, mediante una secuencia de transformaciones enzimáticamente catalizadas, da lugar al ácido mevalónico y posteriormente al isopentenil pirofosfato (IPP). Esta vía está implicada principalmente en la síntesis de sesquiterpenos (C_{15}), triterpenos (C_{30}) y otros compuestos derivados (Ávalos & Pérez, 2009).

Por otro lado, la vía MEP/DOXP se localiza en los plastidios, como los cloroplastos, y emplea como sustratos el piruvato y el gliceraldehído-3-fosfato (G3P) para la producción de IPP y su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Esta vía está asociada a la biosíntesis de monoterpenos (C_{10}), diterpenos (C_{20}) y tetraterpenos (C_{40}), como los carotenoides. Ambas rutas contribuyen a un fondo común de precursores que, a través de la acción de diversas sintasas y ciclasas de terpenos, dan lugar a una gran diversidad estructural y funcional de estos compuestos (Dudareva et al., 2013).

En Tabla 2 se observa la clasificación de terpenos y sus metabolitos secundarios representativos.

Tabla 2. Clasificación de terpenos y sus metabolitos secundarios representativos

Tipo de terpeno	Átomos de C	Ejemplo de metabolitos secundarios	Funciones biológicas/ecológicas
Hemiterpenos	C_5	Isopreno	Emisión foliar ante estrés térmico, protector frente a oxidación
Monoterpenos	C10	Limoneno, Mirceno, Geraniol, Pineno, Linalool	Atracción de polinizadores, defensa contra herbívoros, aceites esenciales
Sesquiterpenos	C15	Farnesol, Humuleno, β-Cariofileno, Nerolidol	Antimicrobianos, repelentes, señales alelopáticas
Diterpenos	C20	Giberelinas, Fitol, Taxol (paclitaxel), Cafestol	Regulación hormonal (giberelinas), defensa química (Taxol)
Sesterterpenos	C25	Ophiobolinas, Geranilgeranil acetato	Antifúngicos y citotóxicos (principalmente en hongos/microalgas)
Triterpenos	C30	Escualeno, β-Amyrina, Ácido ursólico, Ácido oleanólico	Precursores de esteroides y saponinas, actividad antiinflamatoria

Tetraterpenos	C40	β-Caroteno, Licopeno, Luteína, Zeaxantina	Pigmentos fotosintéticos, antioxidantes, precursores de vitamina A
Politerpenos	>C40	Caucho natural (poliisopreno)	Defensa mecánica, protección frente a patógenos

Dentro del grupo de triterpenos (C_{30}) están las saponinas, estos compuestos contienen un núcleo lipofílico (derivado del escualeno) y uno o varios azúcares (glucosa, ramnosa, arabinosa, entre otros). Las saponinas se clasifican de acuerdo con su núcleo base y su origen esto lo podemos observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de las saponinas

Tipo de saponina	**Núcleo base**	**Origen**	**Ejemplos**
Triterpenoides	Oleanano, ursano, lupano	Plantas dicotiledóneas	Ácido glicirrízico (regaliz), avenacina (avena)
Esteroidales	Espirostano, furostano	Liliáceas, solanáceas	Diosgenina (Dioscorea), tomatina (tomate)

2.1.3 Alcaloides

Los alcaloides representan una de las clases más amplias y químicamente diversas de metabolitos secundarios en materiales vegetales. Se han reconocido más de 15,000 compuestos de esta categoría, los cuales comparten tres características fundamentales: son

solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en su estructura molecular, y presentan actividad biológica relevante en diversos sistemas (Ávalos & Pérez, 2009; Dewick, 2009).

Desde la perspectiva estructural, la mayoría de los alcaloides son compuestos heterocíclicos nitrogenados; sin embargo, existen ejemplos notables de alcaloides alifáticos, como la mescalina o la colchicina, que carecen de anillos nitrogenados, pero mantienen su clasificación debido a su origen biosintético y función biológica (Roberts et al., 2010). En condiciones fisiológicas, los valores de pH intracelular son alrededor de 7.2 en el citosol y entre 5.0 y 6.0 en la vacuola promueven la protonación del grupo amino, lo que les otorga a estos compuestos su carácter básico (alcalino) en disolución acuosa (Ávalos & Pérez, 2009).

2.2 Extracción de metabolitos secundarios

Para la extracción de los metabolitos secundarios en plantas se deben tomar varios factores en cuenta como: el material vegetativo que se usará, la recolección y preparación de este, selección del solvente, método de extracción y análisis de extractos para su identificación y/o cuantificación (Isah & Isah, 2019; Patil et al., 2023).

2.2.1 Material vegetativo

El contenido de metabolitos secundarios en las plantas está determinada por diversos factores, incluyendo el tipo, especie, variedad o genotipo, es decir no todas las plantas producen los mismos metabolitos, algunos compuestos presentan una distribución restringida a nivel de especie, género o familia vegetal, razón por la cual han sido utilizados como marcadores en la identificación taxonómica de las plantas (Lustre, 2022). Dado lo anterior

coincide con lo que mencionan Isah & Isah (2019) que la producción de la mayoría de los metabolitos secundarios puede realizar una función de respuesta al estrés específica en las células vegetales, por ejemplo: la producción de sesquiterpenos se asocia con el sistema de respuesta de defensa en los miembros de la familia Solanaceae, los glucosinolatos-mirosinasas son producidos por los miembros Brassicaceae, los estilbenos con las Vitácea, las isoflavonas con Fabácea, mientras que los limonoides son producidos por Rutácea y Meliaceae.

La producción de metabolitos secundarios en las plantas está estrechamente influenciada por su fisiología, la etapa fenológica en la que se encuentran y las condiciones ambientales predominantes durante su desarrollo. Estos factores pueden modular significativamente tanto la calidad como la cantidad de los metabolitos sintetizados (Alami et al., 2024).

2.2.1.1 Fisiología de la planta

La fisiología vegetal permite comprender los procesos biológicos que regularizan el crecimiento, el desarrollo, la reproducción y la supervivencia de las plantas en sus respectivos entornos. Si bien los metabolitos secundarios no son considerados esenciales para las funciones vitales básicas, cumplen funciones clave en la defensa contra herbívoros y patógenos, en la atracción de polinizadores y en la adaptación a condiciones ambientales adversas. La producción y acumulación de estos compuestos bioactivos influyen diversos factores, entre ellos la etapa fenológica y condiciones ecológicas en la que se rodea la planta, aspectos que serán abordados con mayor profundidad en apartados posteriores (Ávalos & Pérez, 2009).

2.2.1.2 Etapa fenológica

La producción de metabolitos secundarios varía según la etapa de crecimiento en la Tabla 4 se muestra etapa fenológica, la influencia sobre metabolitos secundarios y la función que realizan.

Tabla 4. Producción de metabolitos secundarios en la planta de acuerdo con su etapa fenológica

Etapa fenológica	Metabolitos secundarios	Función
Germinación y plántula	Producción limitada	Enfoque en crecimiento primario
Crecimiento vegetativo	Compuestos fenólicos y taninos	Se incrementa la producción de metabolitos relacionados con la defensa para proteger las hojas jóvenes
Floración	Flavonoides, antocianinas, terpenoides	Aumenta la síntesis de compuestos volátiles y pigmentos que atraen polinizadores
Fructificación y maduración de semillas	Alcaloides	Se pueden acumular metabolitos defensivos en frutos y semillas para protegerlos de herbívoros.

2.2.1.3 Condiciones ambientales

Las condiciones ecológicas externas influyen fuertemente en la cantidad y tipo de metabolitos secundarios que una planta produce como la luz solar, temperatura,

disponibilidad hídrica, ataques abióticos (herbívoros y patógenos) y disponibilidad de nutrientes principalmente, en la Tabla 5 se muestra las condiciones ambientales, así como la producción de metabolitos secundarios y la influencia que tienen sobre la planta.

Tabla 5. Producción de metabolitos secundarios en las plantas por condiciones ambientales

Condición ambiental	Metabolito secundario	Influencia sobre la planta
Luz	Aumenta la producción de compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas	La radiación UV estimula su síntesis como mecanismo de defensa
Temperatura		Temperaturas extremas (altas o bajas) pueden inducir estrés
Disponibilidad hídrica	Induce síntesis de alcaloides y terpenoides	El estrés hídrico leve o moderado puede inducir la síntesis de estos metabolitos como mecanismos de protección.
Ataques abióticos	Producción de alcaloides, saponinas, glucósidos	Respuesta directa a herbívoros o patógenos. Activación de rutas para producir toxinas, inhibidores de digestión u

		otros compuestos defensivos
Disponibilidad de nutrientes	Aumenta la producción de compuestos carbonados como fenoles y flavonoides	Baja disponibilidad de nitrógeno

2.2.1.4 Recolección del material vegetativo

La recolección del material vegetativo (hojas, tallos, flores, raíces, fruto) influye de forma determinante en la extracción y cantidad de metabolitos secundarios presentes en las plantas. Estos compuestos bioactivos no están distribuidos uniformemente y su producción varía según múltiples factores asociados al proceso de recolección, como el órgano vegetal que se desea recolectar, la etapa fenológica que ya se abordado anteriormente, pero también influye el momento del día y estación del año en que se recolecta, por ejemplo: algunos metabolitos fluctúan en el ciclo circadiano (ciertos compuestos fenólicos o volátiles) durante el día/noche, otro componente puede ser la estación del año ya que en verano puede haber más concentración de ciertos flavonoides o taninos y en primavera, algunas plantas presentan mayor acumulación de compuestos antioxidantes (Jones & Kinghorn, 2012; Pant et al., 2021).

2.2.1.5 Preparación del material vegetativo

Durante la preparación del material vegetativo, es fundamental considerar las condiciones postcosecha, tales como la luz, la temperatura y la humedad. Diversos estudios señalan que, tras la recolección, el material debe ser secado en un ambiente ventilado, evitando la

exposición directa a la luz solar, ya que esta puede inducir la oxidación o volatilización de ciertos compuestos bioactivos (Jones & Kinghorn, 2012). La humedad residual representa un factor crítico, pues su presencia puede favorecer el desarrollo de microorganismos, especialmente hongos. Asimismo, la temperatura empleada durante el proceso de deshidratación influye directamente en la estabilidad de los metabolitos secundarios; temperaturas elevadas pueden provocar su degradación o pérdida. Por esta razón, se recomienda realizar el secado a temperaturas controladas, preferentemente entre 35 a 45 °C (Patil et al., 2023; Singh et al., 2023). En la Tabla 6 se muestra la temperatura recomendada para secado y la sensibilidad de los metabolitos secundarios.

Tabla 6. Temperaturas recomendadas para el secado de material vegetativo conforme a sus metabolitos secundarios

Tipo de metabolito	**Sensibilidad**	**Temperatura recomendada para secado**
Aceites esenciales (terpenos, monoterpenos)	Muy volátiles	30–40 °C, preferiblemente a sombra
Alcaloides	Estables, pero sensibles al pH	Hasta 50 °C, evitando humedad excesiva
Flavonoides y fenoles	Moderadamente sensibles	40–50 °C, protegidos de la luz
Taninos	Relativamente estables	Hasta 50 °C
Saponinas y glucósidos	Sensibles a hidrólisis	35–45 °C, secado rápido sin humedad residual

Otro factor relevante en los métodos de extracción de metabolitos secundarios es el tamaño de partícula del material vegetal. Según la literatura, una disminución en el tamaño de partícula mejora la eficiencia de extracción, puesto que mejora la exposición del material vegetal al solvente, favoreciendo la extracción, facilitando la difusión de los compuestos bioactivos (Azwanida, 2015). Una vez que el material ha sido deshidratado, puede someterse a un proceso de molienda, si así se requiere, para obtener una granulometría adecuada. Posteriormente, debe ser almacenado en condiciones controladas: en un ambiente seco, alejado de la luz y, preferentemente, en frascos de vidrio ámbar. Estas medidas son fundamentales para evitar la degradación, oxidación o volatilización de metabolitos sensibles durante el almacenamiento (World Health Organization, 2011).

2.2.2 Selección del solvente

La elección del solvente es uno de los elementos más críticos en la extracción de metabolitos secundarios de plantas ya que actúa como vehículo de extracción, determinando qué metabolitos se extraen, en qué cantidad y con qué pureza. Por eso, su selección debe basarse en: la polaridad del compuesto objetivo, el uso final del extracto y consideraciones de seguridad, costo y sostenibilidad.

La polaridad de una molécula está definida por la distribución de los electrones en sus enlaces químicos. Una molécula se considera polar cuando presenta una distribución asimétrica de la densidad electrónica, lo que genera regiones con cargas parciales opuestas (positiva y negativa). En contraste, una molécula es apolar cuando los electrones están distribuidos de forma simétrica, sin regiones diferenciadas de carga eléctrica.

Los disolventes no polares o también llamados apolares, se caracterizan por tener constantes dieléctricas bajas y son eficientes en la disolución de compuestos igualmente apolares. Por otro lado, los disolventes polares poseen constantes dieléctricas elevadas y son capaces de disolver sustancias polares, gracias a su capacidad para formar interacciones dipolo-dipolo o enlaces por puente de hidrógeno. Existen también disolventes con polaridad intermedia, también conocidos como semipolares, como el cloroformo y el acetato de etilo, los cuales pueden solubilizar tanto compuestos polares como apolares, dependiendo de la naturaleza química de la sustancia y del sistema de extracción utilizado.

Cada metabolito secundario tiene una polaridad específica, y solo se disuelve eficientemente en solventes de polaridad similar, por ello en la Tabla 7 se relacionan los solventes más comunes con los tipos de metabolitos secundarios que suelen extraer, según su polaridad y características químicas.

Tabla 7. Polaridad de los solventes y la extracción de metabolitos secundarios

Solvente	**Polaridad**	**Constante dieléctrica**	**Temperatura (°C)**	**Metabolitos secundarios comunes extraídos**	**Observaciones**
Agua	Altamente polar	78.5	100	Glucósidos, taninos, saponinas, algunos flavonoides	Ecológico, pero extrae muchos compuestos no

					deseados también
Metanol	Polar	32.6	65	Flavonoides, fenoles, alcaloides, lignanos	Alta eficiencia; tóxico, requiere evaporación o purificación
Etanol	Polar	24.3	78	Flavonoides, taninos, alcaloides, terpenoides	Muy usado en aplicaciones alimentarias y farmacéuticas
n- butanol	Polar	17.8	20	Saponinas, glicósidos, alcaloides y taninos condensados	Extracción de metabolitos muy polares
Acetona	Semipolar	20.7	56	Alcaloides, terpenos, compuestos fenólicos	Muy eficaz; puede mezclarse con agua para ajustar polaridad

Cloroformo	Semipolar	4.8	61	Alcaloides, lípidos, esteroides	Tóxico; útil en extracciones fraccionadas.
Acetato de etilo	Semipolar	6.0	77	Flavonoides (agliconas), alcaloides intermedios, terpenoides, fenólicos	Usado síntesis y purificación en fármacos y extracción de saborizantes y aromas en industria alimentaria
Éter etílico	No polar	4.1	35	Terpenos, aceites esenciales, esteroides	Alta volatilidad; usado en extracción de aceites.
Hexano	No polar	1.89	69	Terpenos, carotenoides, lípidos, clorofila	Excelente para compuestos lipofílicos.
Diclorometano	Polar	9.1	40	Alcaloides, terpenoides,	Tóxico, pero eficaz en

	compuestos volátiles	extracciones selectivas.

2.2.3 Método de extracción

Existen diversos métodos para la extracción de metabolitos secundarios, cuya eficacia puede verse afectada por múltiples elementos, tales como la temperatura, la naturaleza química de los compuestos a extraer y el tipo de solvente empleado, como se ha mencionado previamente. Con el objetivo de conocer las técnicas más apropiadas según sus características, se elaboró en la Tabla 8 una comparación que resume los métodos de extracción más comúnmente utilizados, junto con sus principales ventajas, desventajas y condiciones operativas.

Tabla 8.Principales métodos de extracción de metabolitos secundarios

Método	Descripción	Tiempo	Temperatura	Solventes comunes	Tipo de compuestos	Ventajas	Desventajas	Usos comunes
Maceración	El material vegetativo se remoja en un solvente a temperatura ambiente o ligeramente elevada durante un tiempo determinado	24-72 horas	20-30 °C (ambiente)	Etanol, metanol, etanol:agua, agua	Flavonoides, alcaloides, saponinas, taninos	-Simple y económico. -No requiere equipos sofisticados	Lento (puede tomar días)	Extractos acuosos y etanólicos de hojas o raíces
Infusión	Se añade agua caliente al material vegetal, como preparar té	5-30 minutos	70-95 °C	Agua	Polares, termoestables (fenoles, mucílagos)	-Ideal para compuestos hidrosolubles y termoestables.	-Degrada compuestos sensibles al calor.	Tés medicinales

						-Fácil de realizar	-Solo para compuestos polares	
Decocción	Hervir el material vegetal en agua durante determinado tiempo	15-60 minutos (hervor)	95-100 °C	Agua	Compuestos resistentes al calor (raíces, corteza)	-Ideal para compuestos hidrosolubles y termoestables -Fácil de realizar	-Degrada compuestos sensibles al calor -Solo para compuestos polares	Preparación tradicional de hierbas
Soxhlet	Método de extracción continua con un disolvente caliente que se recicla	4-8 horas (continuo)	60-90 °C (según solvente)	Hexano, etanol, metanol	Lípidos, aceites esenciales, alcaloides	-Muy eficiente para compuestos no volátiles	-Lento (horas) -Usa mucho solvente -No adecuado para	Aceites esenciales, compuestos lipofílicos.

	continuamente sobre el material vegetal					-Asegura extracción completa	compuestos termolábiles	
Ultrasonido	El ultrasonido genera cavitación en el solvente, rompiendo paredes celulares y liberando compuestos	15-60 minutos	25-50 °C	Etanol:agua (50-80%), metanol	Flavonoides, polifenoles, antioxidantes	-Rápida -Menor uso de solvente -A baja temperatura	-Necesita equipo específico -Puede degradar algunos compuestos si se usa por mucho tiempo	Flavonoides, polifenoles, antioxidantes
Microondas	Las microondas calientan rápidamente el agua dentro de las células vegetales,	5-15 minutos	60-120 °C	Etanol, agua, acetona	Polifenoles, terpenoides, alcaloides	-Muy rápida -Alta eficiencia -Menor cantidad de solvente	-Equipos costosos -Puede dañar compuestos sensibles si no se controla	Polifenoles, aceites esenciales, alcaloides

	rompiéndolas y liberando compuestos							
Arrastre por vapor	El vapor arrastra los compuestos volátiles de la planta, que luego se condensan y separan	1-3 horas	100-110 °C	Vapor de agua	Aceites esenciales, compuestos volátiles	-Ideal para aceites esenciales y compuestos volátiles -No necesita solventes orgánicos.	-No útil para compuestos no volátiles -Puede causar degradación térmica	Aromaterapia, cosméticos, industria alimentaria
Fluidos supercríticos	Usa CO_2 en estado supercrítico (entre gas y líquido) para	1-4 horas	31-60 °C	CO_2 + solventes (etanol, metanol)	Terpenoides, lípidos, compuestos volátiles	-Muy selectiva y eficiente	-Requiere equipos sofisticados -Costoso	Productos farmacéuticos, nutracéuticos

extraer compuestos lipofílicos	-No deja residuos tóxicos

2.2.4 Análisis en extractos para su identificación y/o cuantificación de metabolitos secundarios

El análisis de extractos vegetales puede abordarse mediante diversas metodologías, en relación con los objetivos específicos de cada estudio, tales como la identificación, cuantificación y caracterización estructural de los metabolitos presentes. Existen métodos desde cribado fitoquímico, espectrofotometría y cromatografía principalmente.

El cribado fitoquímico existe tanto cualitativo como cuantitativo, en el cribado fitoquímico cualitativo permite la detección preliminar de diferentes clases de metabolitos secundarios derivados de las plantas, como alcaloides, flavonoides, terpenoides, saponinas, taninos y compuestos fenólicos. Este análisis orienta la selección de técnicas más específicas para su posterior caracterización. Por otro lado, el análisis cuantitativo posibilita la estimación de la concentración relativa o absoluta de estos metabolitos, lo cual es esencial para optimizar procesos de extracción, purificación e identificación (Nortjie et al., 2022).

La espectrofotometría es un método analítico que mide la absorbancia de luz de una sustancia en función de la longitud de onda. Se fundamenta en la ley de Beer-Lambert, que relaciona la absorbancia con la concentración del compuesto en solución, usando un espectrofotómetro UV-Vis que generalmente tiene una longitud de onda de 200-800nm y se usa una solución líquida del extracto vegetal. Dentro de sus ventajas es que no requiere equipos muy sofisticados, es rápido y reproducible y es apto para cuantificación total (no individual); sus limitaciones son que no identifica compuestos individuales y requiere estándares y buena calibración (Castellanos et al., 2018)

Su proceso básico es hacer reaccionar el extracto con un reactivo especifico, esperar el tiempo adecuado, leer la absorbancia y calcular la concentración a partir de una curva estándar, en la Tabla 9 se muestran las características de los metabolitos comúnmente medidos para este tipo de técnica

Tabla 9. Características para la cuantificación de metabolitos secundarios por medio de espectrofotometría

Metabolito secundario	**Reactivo**	**Longitud de onda**	**Compuesto estándar**	**Resultado**
Fenoles totales	Folin-Ciocalteu	750-765 nm	Ácido gálico	mg equivalentes de ácido gálico / g de extracto (mg GAE/g)
Flavonoides totales	$AlCl_3$ en etanol + $NaNO_2$ y NaOH	415 nm	Quercetina o catequina	mg equivalentes de quercetina / g (mg QE/g)
Taninos condensados	Vanilina-HCl o butanol-HCl	500-550 nm	Catequina o ácido tánico	mg equivalentes de catequina (CE) / g (mg CE/g)
Actividad antioxidante (DPPH)	Radical libre DPPH	517 nm	Disminución de absorbancia =	Trolox o ácido ascórbico

Actividad antioxidante (ABTS)	ABTS (2,2′-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico ácido))	734 nm	capacidad antioxidante Disminución de absorbancia del radical al ser reducido por antioxidantes	µmol equivalentes de Trolox (TE) / g de muestra seca (µmol TE/g)

La cromatografía es una técnica analítica fundamental para la separación, identificación y cuantificación de compuestos, basada en las diferencias en su tamaño molecular, forma, carga y afinidad con las fases móvil y estacionaria. El analito, disuelto en una fase móvil, se transporta por una fase estacionaria, y su separación ocurre según la velocidad diferencial con la que migra cada compuesto. Esta metodología es ampliamente utilizada en el análisis de metabolitos secundarios debido a su versatilidad y alta sensibilidad (Tiwari & Talreja, 2022). Entre las técnicas cromatográficas más utilizadas para el estudio de metabolitos secundarios se encuentran:

a) Cromatografía en Papel (PC)

Esta técnica emplea papel de celulosa como fase estacionaria, el cual actúa simultáneamente como soporte y medio de separación. La muestra se deposita cerca del extremo inferior del papel, que luego se coloca en una cámara cromatográfica con un disolvente adecuado. El disolvente asciende por capilaridad, arrastrando los compuestos solubles. La separación se debe a la solubilidad del analito en la fase móvil y su adsorción a la fase estacionaria. El tipo

de papel influye en el rendimiento: papeles de baja porosidad reducen la velocidad del frente del disolvente, mientras que los papeles más gruesos permiten una mayor capacidad de carga de muestra (Tiwari & Talreja, 2022) .

b) Cromatografía en Capa Fina (TLC)

La cromatografía en capa fina utiliza una placa recubierta con una fina capa de adsorbente, como sílica gel o alúmina, adherida a un soporte inerte (vidrio, plástico o aluminio). La muestra se aplica en forma de punto o línea, y la fase móvil se desplaza por capilaridad a través del adsorbente, separando los compuestos con base en sus interacciones diferenciales con la fase estacionaria. Esta técnica es sencilla, económica y permite una visualización rápida mediante agentes reveladores o luz UV (Tiwari & Talreja, 2022).

c) Cromatografía de Gases (GC)

La cromatografía de gases es una técnica utilizada para la separación y análisis de compuestos volátiles y termoestables. La muestra se vaporiza e inyecta en una columna cromatográfica, donde es arrastrada por un gas inerte (fase móvil) a través de una fase estacionaria líquida, recubierta sobre un soporte sólido. La disolución se debe a la distribución diferencial de los analitos entre ambas fases. GC es altamente eficiente y suele ajustarse a detectores como el FID (detector de ionización de llama) o espectrómetros de masas (GC-MS) para una identificación precisa (Nortjie et al., 2022).

d) Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La HPLC es un método moderno que permite la separación de compuestos de bajo y alto peso molecular, incluso no volátiles, bajo condiciones de alta presión. La muestra es

inyectada en una columna empacada con partículas sólidas (fase estacionaria) y es arrastrada por una fase móvil líquida. La interacción de los analitos con la columna determina su tiempo de retención. La detección se realiza comúnmente mediante espectrofotometría UV-visible, siendo el detector de arreglo de diodos (DAD) uno de los más utilizados para el análisis espectral simultáneo de múltiples compuestos. Esta técnica ofrece alta resolución, sensibilidad y reproducibilidad, siendo ampliamente utilizada en la investigación fitoquímica (Nortjie et al., 2022).

2.3 Neem (*Azadirachta indica*)

El árbol de neem (*Azadirachta indica*) también conocido como "árbol de paraíso" y "margosa", es de origen asiático y corresponde a la familia "Meliaceae", en la Tabla 10 se describe su clasificación botánica de acuerdo con Baley (1977). Esta planta crece en regiones áridas, tropicales y subtropicales (Fernández et al., 2016), en altitudes que van desde la costa hasta 1000 msnm, se desarrolla en temperaturas desde 5 °C hasta 50 °C, se adapta fácilmente a diferentes condiciones edafológicas, con mejor adaptación en suelos drenados y con un pH entre 6.2- 7.0 (Cruz & Del Ángel, 2004; Kadir et al., 2012) .

Tabla 10. Clasificación botánica del neem

Taxonomía botánica del neem	
Reino	Vegetal
Subreino	Trachaeophyta
División	Embriofitas
Subdivisión	Angiospermas

Clase	Dicotiledónea
Orden	Geraniales
Familia	Meliaceae
Género	*Azadirachta*
Especie	*Azadirachta indica*

En la Figura 2 se muestra el árbol de neem, este puede llegar a una altura de 30 m y el diámetro de su copa de hasta 25 m; su raíz es pivotante y puede medir el doble de la altura del árbol. Su hoja es peciolada de forma aserrada llega a medir de 7-10 cm de largo y 3-4 cm de ancho; estas se agrupan en foliolos. Su flor mide 5 mm, esta puede ser de color blanca, crema o amarillenta crece de manera axilar en racimos de hasta 22 cm de largo. Los racimos de frutos o drupas presentan mesocarpio fibroso que rodea un endocarpio leñoso; tienen forma elipsoidal de 1.4–2.4 cm de largo y textura lisa; están cubiertos por cascara verde que conforme va madurando se torna amarillenta. Su semilla es de forma elipsoidal y mide 1.4 cm de largo y 6.5 mm de ancho (Cruz & Del Ángel, 2004) .

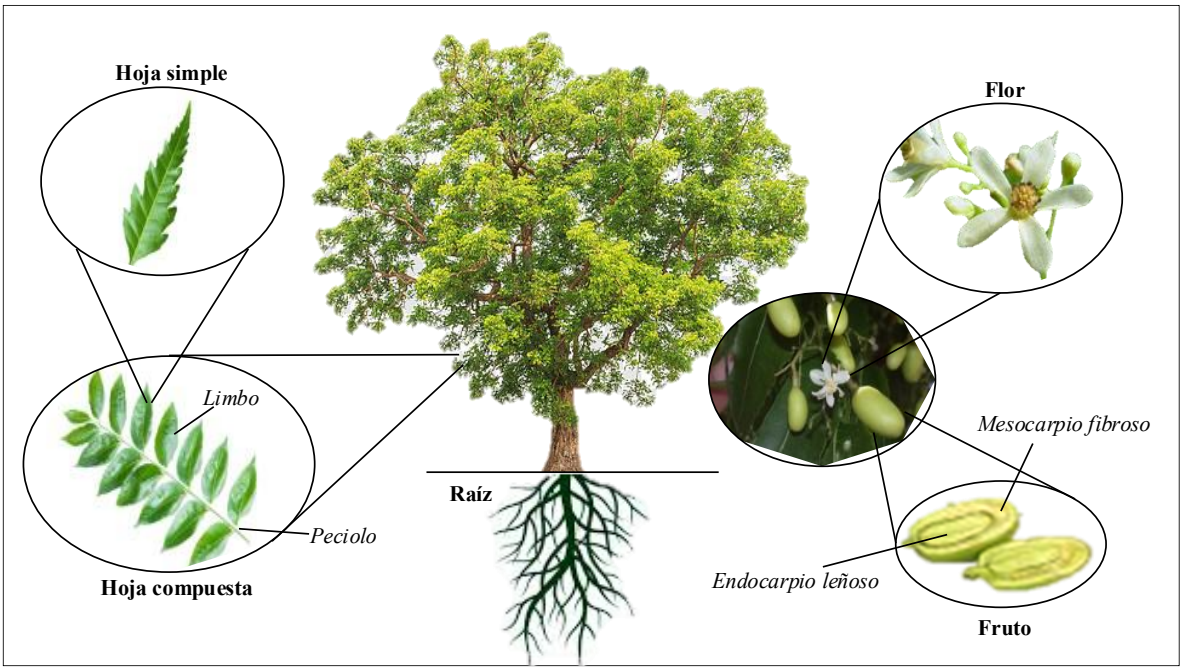


Figura 2. Árbol de neem (Azadirachta indica)

Es un árbol adaptable a condiciones poco favorables de desarrollo como la escasez de agua, por esta razón que ha sido introducido en otras partes del mundo, principalmente para programas de reforestación y uso ornamental (Kaggwa et al., 2022). Es un forraje ampliamente distribuido en el mundo, efectivo y económico para la alimentación animal (Fernández et al., 2016).

El neem (*Azadirachta indica*), conocido por sus múltiples aplicaciones en medicina tradicional, agricultura y cosmética, es una planta rica en metabolitos secundarios. Diversos estudios fitoquímicos han identificado numerosos compuestos bioactivos, especialmente en sus hojas, semillas, corteza y frutos. Los metabolitos secundarios más importantes son:

a) Limonóides (Triterpenoides tetranortriterpenoides): azadiractina, nimbina, Nimbidina, salanina, gedunina, epoxyazadiradiona, azadirona, deacetilgedunina, β-sitosterol, campesterol, stigmasterol (Islas et al., 2020; Vega, 2014)

b) Flavonoides y Polifenoles estan especialmente presentes en hojas y flores: quercetina, kaempferol, rutin, catequinas, ácidos fenólicos (como ácido gálico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico) y taninos (Gupta et al., 2017; Rahmani et al., 2018).

c) Aceites esenciales y compuestos volátiles, principalmente en las semillas y hojas: eugenol, cineol, terpineol, α-terpineno (Vega, 2014).

2.4 Ortigo (*Cnidoscolus angustidens*)

Cnidoscolus angustidens en algunas regiones de México, se le conoce como "mala mujer", "ortiga brava", “caribe”, o "chichicastle", crece principalmente en climas cálido-secos y se desarrollan en matorrales xerófilos, bosques tropicales caducifolios y zonas perturbadas. Es una planta herbácea o subarbustiva, posee hojas lobuladas, flores pequeñas (usualmente blancas) y se reproduce por semillas, además tiene pelos urticantes que causan irritación intensa al contacto con la piel (IBUNAM, 2025). En la Tabla 11 se muestra la descripción taxonómica.

Tabla 11. Identificación taxonómica de "mala mujer"

Categoría	Información

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malpighiales
Familia	Euphorbiaceae
Género	*Cnidoscolus*
Especie	*Cnidoscolus angustidens*

En un estudio realizado por Troyo et al. (1999) se evaluó la fenología de *Cnidoscolus angustidens*, el contenido de aceite y proteína en las semillas, y su potencial de uso agrícola. Las plantas cultivadas alcanzaron entre 20 y 50 cm de altura durante su fase reproductiva, con fructificación en la segunda mitad de esta etapa. Sus hojas presentan tricomas urticantes que actúan como defensa contra herbívoros. Las semillas contienen un 26% de aceite comestible y entre 30% y 36% de proteína. Se estimó un rendimiento de 500 kg/ha, con posibilidades de mejora mediante domesticación. Estos resultados destacan el potencial de *C. angustidens* como cultivo alternativo en zonas áridas y semiáridas (Troyo et al., 1999)

2.5 Equinos

2.5.1 Producción nacional y mundial

La población equina a nivel global constituye un recurso estratégico multifuncional que sostiene medios de vida rurales, impulsa actividades económicas y conserva expresiones culturales arraigadas en numerosas regiones del mundo. Su relevancia se extiende desde usos

tradicionales como el transporte y la tracción agrícola, hasta aplicaciones más recientes en el turismo rural, las terapias asistidas con animales y el deporte de alto rendimiento. De acuerdo con estimaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), existen aproximadamente 116 millones de équidos en el planeta, cifra que agrupa a caballos, asnos y mulas. De este total, 36 millones de ejemplares se localizan en 38 países de bajos ingresos, donde su participación en los sistemas de subsistencia es crítica para el funcionamiento diario de comunidades rurales, particularmente aquellas que carecen de acceso a tecnologías modernas o infraestructura básica (FAO, 2023). La FAO ha destacado que, a pesar de su importancia, la información sobre la producción equina es insuficiente o poco sistematizada, lo que limita la capacidad de los gobiernos y organismos internacionales para tomar decisiones informadas en torno a su uso, comercialización, salud y protección legal. Además, la falta de monitoreo adecuado abre la puerta a problemas estructurales como el comercio irregular de animales, la falta de controles sanitarios efectivos y el olvido institucional de un sector clave para millones de personas.

Esta preocupación ha sido compartida por organizaciones especializadas como The Brooke, que señalan una clara subrepresentación de los équidos en los censos ganaderos y en las políticas agropecuarias nacionales, especialmente en África, Asia y América Latina. Según sus estimaciones, existen al menos 100 millones de équidos de trabajo a nivel global (muchos de ellos no registrados oficialmente) cuya fuerza de tracción y transporte proporciona servicios vitales en las cadenas productivas agrícolas, en el abastecimiento de agua, y en la movilidad cotidiana de comunidades rurales. La organización estima que su trabajo beneficia indirectamente a más de 600 millones de personas y advierte que el desconocimiento institucional de su función impide aplicar programas de salud animal, financiamiento rural o

políticas de bienestar adecuadas (The Brooke, 2024). Por ello, se propone que los gobiernos reconozcan formalmente a los équidos como ganado productivo, los integren a los sistemas estadísticos y los alineen con políticas de desarrollo sostenible, en especial aquellas enfocadas en el alivio de la pobreza, la seguridad alimentaria y la resiliencia climática.

En este escenario, México representa un caso relevante. De acuerdo con los resultados obtenidos del Censo Agropecuario 2022 que realizo el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), la población equina en el país se estima en alrededor de 6.4 millones de ejemplares, cifra que posiciona a México como el tercer país con mayor cantidad de caballos en el mundo, después de Estados Unidos (8.6 millones) y China (7.7 millones) (INEGI, 2022; FAO, s.f.). Aunque el INEGI reconoce a los équidos como parte de las unidades de producción pecuaria, el censo no ofrece un desglose detallado sobre su producción primaria (carne, piel, leche) ni sobre las características estructurales de su aprovechamiento. Sin embargo, estudios previos como el VIII Censo Agrícola, Ganadero y Forestal de 2007 y la Encuesta Nacional Agropecuaria 2014 revelan que en múltiples regiones del país los caballos continúan siendo utilizados como animales de trabajo, en tareas de arado, transporte de carga, manejo de ganado y desplazamiento en zonas serranas o de difícil acceso. Además, el financiamiento para la compra de equinos mediante créditos productivos también fue documentado, lo que sugiere que su tenencia está vinculada a estrategias de diversificación productiva y sostenibilidad de las unidades agropecuarias (INEGI, 2022).

La producción equina mexicana es también representativa por su diversidad funcional. Además de sus usos agrícolas y laborales, los caballos son protagonistas en sectores como la charrería, deporte nacional de México reconocido por la UNESCO como patrimonio cultural

inmaterial de la humanidad; en eventos deportivos internacionales de salto, doma o carreras; en turismo ecuestre, con rutas rurales y ferias locales; en terapias asistidas con animales, donde se emplean en el tratamiento de trastornos motrices y emocionales; y en manifestaciones culturales como desfiles, procesiones y festivales tradicionales, que muestran la profunda relación histórica entre el caballo y la identidad nacional. Esta amplia gama de usos contribuye no solo al empleo rural y urbano, sino también a la generación de ingresos derivados del comercio de animales, equipamiento, alimentos especializados y servicios veterinarios.

A nivel internacional, la FAO ha desarrollado herramientas como el *Gridded Livestock of the World* (GLW3), que permite visualizar con precisión geoespacial la distribución de los équidos, contribuyendo a la planificación territorial, la gestión de recursos forrajeros y la evaluación de riesgos ambientales. Los datos revelan que, además de México, los países con mayor población de caballos son aquellos con fuerte arraigo ecuestre y dependencia de tracción animal: Brasil con 5.7 millones y Argentina con 3.5 millones, siendo este último un país con un extenso sector ganadero que integra a los caballos en labores de pastoreo, trabajo rural y turismo de estancia (FAO, 2024). A pesar de la ausencia de cifras homogéneas sobre productos derivados de la producción equina (como carne o subproductos industriales), se reconoce que en muchas economías rurales los équidos son un activo productivo clave, y su inclusión en las estadísticas oficiales permitiría visibilizar su verdadero valor económico, social y ecológico.

Además de sus múltiples funciones productivas, los caballos han adquirido un valor ecológico emergente. En algunas regiones, como Galicia (España), poblaciones de caballos

semisalvajes son utilizadas en programas de manejo de combustibles forestales, pues su pastoreo ayuda a controlar la biomasa y reduce el riesgo de incendios forestales. Asimismo, en contextos urbanos y turísticos de alto poder adquisitivo, como en el estado de Florida (EE. UU.), eventos como el Winter Equestrian Festival generan millones de dólares anualmente en servicios asociados al deporte ecuestre, veterinaria especializada, hotelería y comercio local, lo que reafirma la polivalencia económica del sector equino incluso en entornos industrializados (FAO, 2023). Por tanto, la producción y aprovechamiento de équidos no solo debe evaluarse desde la perspectiva agropecuaria tradicional, sino como un sistema complejo que articula producción, conservación, cultura y bienestar.

La producción equina en México y en el mundo representa un componente infraestimado del sistema agroalimentario y territorial, cuya magnitud e impacto real continúan invisibilizados por la falta de estadísticas específicas y políticas públicas diferenciadas. Los équidos siguen siendo esenciales para millones de personas, no solo como animales de trabajo, sino también como símbolo de identidad, resiliencia y vinculación social. La consolidación de sistemas estadísticos que incluyan a los caballos, burros y mulas en los censos, inventarios ganaderos y políticas de bienestar animal, así como su alineación con los objetivos de sostenibilidad y equidad rural, es una tarea urgente para garantizar el aprovechamiento justo, ético y sostenible de estos animales.

2.5.2 Contribución de los equinos a los gases de efecto invernadero

Aunque históricamente el foco de atención en materia de emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) se ha centrado en el ganado bovino, ovino y porcino, es relevante considerar también la contribución de otras especies ganaderas como los equinos (caballos,

burros y mulas), en especial por su papel multifuncional en sistemas agropecuarios de subsistencia, transporte rural y actividades recreativas o culturales. A nivel mundial, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ha estimado que el sector ganadero es responsable de aproximadamente el 14.5% de las emisiones globales antropogénicas de GEI, una proporción considerable si se comparan con las emisiones del sector transporte o industrial. Estas emisiones se originan principalmente en la fermentación entérica (metano), el manejo de estiércol (óxidos de nitrógeno y metano), la deforestación para el establecimiento de pastizales, la producción y transporte de insumos como piensos, fertilizantes y combustibles, y en menor medida, el uso de energía en las instalaciones pecuarias (FAO, 2013).

Los equinos, al no ser rumiantes, tienen un sistema digestivo monogástrico con fermentación posterior al intestino delgado (cecal), lo que disminuye significativamente la producción de metano durante la digestión, en comparación con especies como bovinos u ovinos, cuyo sistema ruminal genera una mayor proporción de este gas durante la fermentación entérica. Si bien el modelo de evaluación ambiental GLEAM (*Global Livestock Environmental Assessment Model*), desarrollado por FAO, contempla diversos parámetros de impacto por especie ganadera, sus reportes públicos no ofrecen datos específicos desagregados para los caballos. No obstante, esta ausencia de información detallada no debe interpretarse como irrelevancia ambiental, ya que en países con una alta densidad de población equina o fuerte dependencia de équidos de trabajo, su impacto acumulado podría ser mayor del esperado. Esta omisión ha sido señalada por organizaciones como *The Brooke*, que advierten sobre la invisibilización sistemática de los équidos de trabajo en censos ganaderos, inventarios de

emisiones y políticas públicas, a pesar de su importancia funcional para más de 600 millones de personas en todo el mundo (The Brooke, 2024).

En el contexto mexicano, la situación es análoga. De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), durante el periodo comprendido entre 1990 y 2018, las emisiones nacionales de GEI atribuibles a la ganadería fueron en promedio de 55,058.9 gigagramos de CO_2 equivalente por año, con una tendencia al alza del 7% durante ese tiempo. Del total, un 90.4% de las emisiones correspondieron a metano (CH_4), producto principalmente de la fermentación entérica del ganado bovino y, en menor proporción, de ovinos y caprinos. En particular, los bovinos cárnicos representaron el 79% de las emisiones, mientras que los bovinos lecheros aportaron otro 13% (INEGI, 2022). Los caballos, aunque incluidos como parte del sector ganadero, no aparecen en los informes con datos desagregados, lo que evidencia su baja participación relativa en la generación de GEI. Esta subrepresentación estadística puede explicarse por su menor población estimada en alrededor de 6.4 millones de ejemplares, en comparación con más de 34 millones de bovinos en el país, así como por su metabolismo digestivo menos emisivo.

No obstante, los equinos no están completamente exentos de impactos ambientales. Además del metano que sí se genera en pequeña proporción durante la fermentación cecal, también se consideran fuentes indirectas de emisión el manejo del estiércol, el uso de suplementos concentrados en caballos deportivos, y la energía asociada al transporte y mantenimiento en instalaciones ecuestres. Sin embargo, en comparación con la huella ambiental de otras especies intensivas, estas emisiones suelen ser mínimas o dispersas, y en algunos casos se ven compensadas por los beneficios ecosistémicos que los caballos pueden brindar, como en

los sistemas silvopastoriles, ecoturismo o conservación del paisaje a través del pastoreo controlado.

Desde una perspectiva institucional, *The Brooke* ha enfatizado que la falta de datos sistemáticos sobre las emisiones producidas por équidos impide evaluar su verdadero impacto en el cambio climático, y dificulta además su incorporación en políticas públicas como los Planes Nacionales de Adaptación, los Inventarios Nacionales de Emisiones o los programas afines con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). La organización ha propuesto que los gobiernos incluyan a los équidos de trabajo como parte formal del sector ganadero, los incorporen en censos agropecuarios y utilicen marcos regulatorios robustos que puedan mejorar la calidad de la información disponible (The Brooke, 2024). Esta inclusión no solo contribuiría a dimensionar con mayor precisión su huella ambiental, sino también a proteger el bienestar de estos animales y el sustento de las comunidades rurales que dependen de ellos. Aunque los equinos no figuran como grandes emisores de gases de efecto invernadero en comparación con otras especies ganaderas, su impacto no debe subestimarse, sobre todo en regiones donde constituyen una fuerza de trabajo activa. La integración de estos animales en los sistemas de monitoreo ambiental, junto con una recopilación sistemática de datos sobre sus emisiones y prácticas de manejo, resulta crucial para avanzar hacia una ganadería más sostenible, equitativa e inclusiva, donde todas las especies (incluidas las tradicionalmente ignoradas) sean consideradas dentro de los esfuerzos globales de mitigación y adaptación al cambio climático.

2.5.3 Bienestar animal de equinos

El bienestar animal de los equinos es un tema cada vez más relevante a nivel mundial, no solo desde una perspectiva ética, sino también en relación con la sostenibilidad del uso de estos animales en diversas actividades humanas, tanto en contextos rurales como deportivos. Los caballos, burros y mulas desempeñan roles fundamentales en los medios de vida de millones de personas, pero su bienestar sigue siendo comprometido por múltiples factores que abarcan desde la gestión deficiente hasta la falta de reconocimiento de sus necesidades fisiológicas y comportamentales.

En un estudio hecho en Etiopía por Bihon et al. (2025), evaluaron el bienestar de 384 equinos (186 burros, 144 caballos y 54 mulas) a través de observaciones físicas y entrevistas estructuradas con sus propietarios. Se identificó una serie de prácticas de manejo deficientes: el 54.2% de los propietarios no utilizaban monturas, el 72.4% no practicaban cuidado del casco, y el 13% no limpiaban los espacios donde los animales eran confinados. Se observó una prevalencia del 52.1% de lesiones en piel, boca y patas, especialmente en burros, y se concluyó que factores como el tipo de trabajo, el nivel educativo del propietario y el acceso a servicios veterinarios influyen significativamente en el estado de salud de los equinos. Además, la expectativa de vida de estos animales se ha reducido drásticamente, de 30 años a tan solo entre 4 y 6 años, debido a estos factores de riesgo acumulativos.

Desde una perspectiva más fisiológica y conductual, Greening & McBride (2022) subrayan en su revisión la importancia crítica del sueño en el bienestar equino. Aunque el sueño es un proceso universal en los mamíferos, rara vez se incorpora en los marcos regulatorios o evaluativos del bienestar animal. Los caballos requieren tanto sueño NREM (movimientos

oculares no rápidos) como REM (movimientos oculares rápidos), y la privación de estas fases puede tener efectos negativos sobre su salud mental, emocional y física. La revisión hace un llamado a considerar la creación de entornos que permitan a los equinos dormir adecuadamente, destacando que factores como el entorno, la seguridad y las condiciones de alojamiento influyen directamente en la cantidad y calidad del sueño.

En el contexto de los deportes ecuestres, Holmes et al. (2022) identificaron numerosos riesgos a lo largo del ciclo de vida de los equinos utilizados en competencias, desde la cría hasta la jubilación. Entre los factores de riesgo mencionados se encuentran el uso de equipo inadecuado, el entrenamiento intensivo, las prácticas de transporte, y las condiciones de estabulación. El artículo enfatiza que, si bien ha habido avances normativos en algunos países como el Reino Unido, persisten desafíos importantes derivados de valores culturales diversos, la falta de consenso entre los actores involucrados, y la dificultad de aplicar de manera efectiva los principios del bienestar animal. Se destaca, además, la necesidad de adoptar modelos evaluativos más completos, como el de los "cinco dominios" (nutrición, ambiente, salud, comportamiento y estado mental), que permitan una visión más holística del bienestar animal.

De forma complementaria, Rioja et al. (2020) aplicaron el método Delphi para priorizar los problemas de bienestar más urgentes según expertos en equinos en el Reino Unido. Entre los principales se identificaron: la falta de bioseguridad, la eutanasia tardía, el desconocimiento por parte de los propietarios sobre las necesidades de los equinos, el estrés inducido por el uso humano, la obesidad y el suministro de dietas inadecuadas. Esta priorización proporciona

un marco útil para dirigir los esfuerzos de investigación, educación y formulación de políticas públicas.

En conjunto, estos estudios evidencian que el bienestar equino es un fenómeno complejo y multifactorial que requiere enfoques integrales. Las intervenciones deben considerar no solo la salud física, sino también los aspectos psicológicos y comportamentales de los equinos, además de los contextos socioeconómicos en los que se encuentran. Mejorar el bienestar de estos animales implica promover la educación de los propietarios, el acceso a servicios veterinarios, el reconocimiento del dolor y la incomodidad, y la implementación de políticas públicas que integren a los équidos en censos agropecuarios y estrategias de desarrollo sostenible.

Uno de los aspectos menos abordados, pero de gran relevancia en el estudio del bienestar equino, es la relación entre las condiciones ambientales y la aparición de enfermedades respiratorias crónicas, particularmente el asma equina. En su revisión narrativa, Mańkowska & Witkowska (2024) subrayan que esta enfermedad, tanto en sus formas leves o moderadas como en su presentación grave, forma una de las principales amenazas para la salud y el bienestar de los caballos a nivel global, afectando no solo su función respiratoria, sino también su rendimiento deportivo y calidad de vida. El asma equina está fuertemente influenciada por múltiples factores ambientales, como la ventilación inadecuada, el tipo de cama utilizada, la calidad del forraje y la exposición constante a contaminantes aéreos, microorganismos y partículas de polvo orgánico. Variables como la temperatura, la humedad ambiental y la presencia de esporas y polen en el aire pueden agravar significativamente los síntomas, especialmente en animales con asma estacional o inducida por pasturas (SPAOPD).

Además, se ha documentado que los contaminantes atmosféricos, incluyendo partículas finas en suspensión (PM2.5), gases como amoníaco, dióxido de carbono, óxidos de nitrógeno y azufre, así como hongos del género Aspergillus y Penicillium, tienen un impacto directo sobre las vías respiratorias de los equinos, favoreciendo procesos inflamatorios crónicos y alteraciones estructurales. El tipo de alojamiento resulta determinante: los establos cerrados, con poca ventilación y alta densidad animal, presentan una mayor concentración de aerosoles microbianos y polvo que los sistemas al aire libre o de pastoreo. Asimismo, prácticas como la provisión de heno seco de baja calidad, el uso de camas polvorientas (como la paja) y la escasa supervisión del contenido de moho o polvo en los alimentos, incrementan sustancialmente el riesgo de exacerbación respiratoria. Frente a esta problemática, los autores recomiendan diversas estrategias de mitigación ambiental: el remojo o vaporizado del heno antes de su consumo, el uso de camas alternativas como virutas de madera o turba, y la implementación de una ventilación adecuada y constante. También se ha sugerido que dietas con bajo contenido proteico, complementadas con aditivos como zeolita o microorganismos que degradan el amoníaco, pueden disminuir la concentración de gases nocivos en el ambiente del establo. Finalmente, el papel del propietario resulta fundamental en la adopción y mantenimiento de estas medidas. Una mayor educación sobre los factores ambientales de riesgo y las estrategias de manejo preventivo puede mejorar significativamente el bienestar de los caballos con asma y, además, contribuir a prevenir su aparición en individuos clínicamente sanos (Mańkowska & Witkowska, 2024).

2.6 Parásitos en equinos

Se le considera parásito a un agente biológico que se desarrolla sobre o dentro de un hospedador organismo y se alimenta a expensas de él (Love, 2003), es elemental el reconocer las consecuencias que estos tienen como resultado en la vida del organismo hospedero.

Para el caso de equinos son susceptibles a mantener un nivel de parásitos determinado de manera continua, manteniendo una convivencia amigable entre ellos, estos organismos se alojan en diferentes órganos y tejidos, entre los cuales se encuentran piel, diferentes secciones de intestino y pulmones por mencionar algunos. Sin embargo, cuando la carga parasitaria rebasa el punto de equilibrio parásito/ huésped, es el momento en el que se presentan enfermedades parasitarias y efectos colaterales nocivos provocados por los mismos (Nielsen et al., 2014).

De acuerdo con lo antes mencionado es importante identificar las principales especies de parásitos que afectan lo equinos, así como su localización y efectos, tal como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Tipos de parásitos, características morfológicas, localización y efecto según ESCCAP (2018).

Especie parasita	Características morfológicas	Localización	Efecto
Parascaris equorum	♀ 16–50 cm, ♂ 15–28 cm, redondeados, apertura bucal con tres labios	Intestino delgado	Dificultades respiratorias y malestares estomacales

Strongyloides westeri	0.8 cm, muy fino	Intestino delgado	Enteritis y tiflocolitis
Trichostrongylus axei	0.4 cm, fino como un pelo	Estómago	Enteritis, diarrea, debilitación general y pérdida de apetito
Strongylus vulgaris, Strongylus equinus	1–5 cm de longitud, delgados, cápsula bucal grande	Intestino grueso	Fiebre, taquicardia, anorexia y diarrea
Anoplocephala perfoliata	4–8 cm de longitud, planos, segmentados	Intestino delgado/ciego	Ulceras y enteritis catarral debido a su fijación a la mucosa de la pared intestinal
Ciatostominos	0.5–2 cm de longitud, delgados, cápsula bucal pequeña	Intestino grueso	Enteritis y tiflocolitis
Gasterophilus spp., *larvas de reznos*	1.5–2 cm de longitud, forma de tonel, dos ganchos bucales	Cavidad bucal, esófago, estómago, intestinos	Ulcera gástrica e intestinal, obstrucción gástrica, puede inducir anemia, diarrea, ruptura gástrica y peritonitis

Habronema spp., Draschia megastoma	1.0–2,5 cm, finos, filiformes	Estómago	Infectan el revestimiento de la mucosa del estómago y causan gastritis
Oxyuris equi (oxiuros)	♀ 4–15 cm y extremo posterior afilado, ♂ 0.9–1.2 cm	Intestino grueso/recto	Pérdida de apetito

♀ hembra y ♂ macho (Bianchi et al., 2019; ESCCAP, 2018; Love, 2003).

Las parasitosis gastrointestinales representan uno de los principales desafíos sanitarios en la medicina veterinaria equina, no solo por su alta prevalencia a nivel mundial, sino también por el impacto negativo que ejercen sobre el bienestar, la condición corporal, el rendimiento y, en algunos casos, la vida del animal. Dentro de los endoparásitos más comunes en equinos destacan los nematodos gastrointestinales, particularmente los estrónglilos (tanto grandes como pequeños), el *Parascaris equorum*, el *Oxyuris equi* y, en algunas regiones, cestodos como *Anoplocephala perfoliata* (Nielsen, 2012; Saeed et al., 2019). En este contexto, el tratamiento farmacológico constituye una herramienta clave, aunque su efectividad está cada vez más comprometida por la aparición de resistencia antihelmíntica.

2.6.1 Grupos farmacológicos utilizados

Existen tres principales grupos de antiparasitarios utilizados en equinos para el manejo de nematodos gastrointestinales: los bencimidazoles (como el fenbendazol), las tetrahidropirimidinas (pirantel) y las lactonas macrocíclicas (ivermectina, moxidectina, doramectina). Estos compuestos, en formulaciones orales o inyectables, han sido aplicados

con éxito desde hace décadas en programas de control regular de endoparásitos (Nielsen, 2012; Oliva et al., 2021).

El estudio experimental desarrollado en Perú por Oliva et al. (2021) evaluaron la eficacia comparativa de dos antiparasitarios orales: la doramectina (11.4 mg/kg) y el fenbendazol (7.5 mg/kg), administrados a yeguas jóvenes naturalmente infectadas con *Strongylus* sp., *Parascaris* sp. y *Oxyuris* sp. A los 30 días postratamiento, la doramectina mostró una eficacia del 97% en la reducción de huevos por gramo de heces (hpg), mientras que el fenbendazol presentó una eficacia significativamente menor, del 51%. Este resultado confirma la mayor eficacia de las lactonas macrocíclicas frente a cepas resistentes de nematodos gastrointestinales, especialmente en condiciones de campo.

2.6.2 Resistencia antihelmíntica y estrategias sostenibles

La creciente resistencia a los antihelmínticos ha sido documentada ampliamente en caballos, incluyendo resistencia a benzimidazoles, pirantel y, en algunos casos, incluso a ivermectina y moxidectina (Larsen et al., 2002; Nielsen, 2012; Saeed et al., 2019). Esta resistencia se ha atribuido al uso frecuente y no selectivo de tratamientos antihelmínticos, muchas veces sin diagnóstico previo ni monitoreo de cargas parasitarias. La situación es crítica en países como Dinamarca, donde estudios epidemiológicos han evidenciado una alta prevalencia de resistencia en *Cyathostominea* spp. y un bajo rendimiento de tratamientos únicos, dependiendo del fármaco, la edad del caballo y el historial de manejo del potrero (Larsen et al., 2002).

Por este motivo, diversos autores recomiendan reemplazar los esquemas de desparasitación sistemática por estrategias más sostenibles, como la "terapia selectiva". Este enfoque consiste

en tratar solo a los individuos con cargas parasitarias elevadas, determinadas mediante recuentos fecales (FEC), reduciendo así la presión de selección sobre los parásitos y preservando la eficacia de los fármacos (Nielsen, 2012). La implementación de programas basados en refugios parasitarios, es decir, mantener una proporción de la población parasitaria sin exposición al fármaco se ha postulado como una estrategia clave para mitigar el desarrollo de resistencia.

2.6.3 Formas larvarias y tratamientos específicos

Una de las principales problemas en el control de los nematodos equinos es la presencia de formas larvarias encistadas, como ocurre con los cyathostomins, cuya emergencia masiva puede provocar el síndrome de ciateostomosis larval, una condición clínica grave caracterizada por diarrea, pérdida de peso y riesgo de muerte (Nielsen, 2012; Saeed et al., 2019). Frente a este desafío, el tratamiento con moxidectina ha demostrado ser el más eficaz, alcanzando entre 60% y 80% de eficacia contra estas formas larvarias. Alternativamente, se ha utilizado fenbendazol a altas dosis durante cinco días consecutivos, aunque su eficacia se ha visto comprometida por la resistencia creciente (Nielsen, 2012). Por otro lado, parásitos como Anoplocephala perfoliata han cobrado mayor relevancia debido a su asociación con cólicos, invaginaciones intestinales e impactaciones ileales. Para el control de cestodos, las combinaciones de ivermectina o moxidectina con prazicuantel han mostrado buenos resultados, ampliando el espectro de acción de los tratamientos convencionales (Nielsen, 2012; Saeed et al., 2019).

2.6.4 Factores de manejo y recomendaciones

Más allá del tratamiento farmacológico, diversos factores de manejo influyen en la eficacia del control antiparasitario. En un estudio epidemiológico realizado en Dinamarca, se identificaron como factores de riesgo significativos la falta de rotación de pasturas, la introducción de animales sin desparasitación previa y la ausencia de asesoría veterinaria sobre el manejo higiénico del pasto (Larsen et al., 2002). El tipo de explotación (escuelas de equitación vs. criaderos), la edad de los caballos y la densidad de población también afectaron tanto la carga parasitaria como la eficacia del tratamiento. Las recomendaciones actuales incluyen la implementación de programas de monitoreo mediante coprología periódica, uso rotativo de fármacos con diferentes mecanismos de acción, educación al propietario sobre el uso racional de antihelmínticos, y el fortalecimiento del rol del veterinario como asesor clave en los programas de control parasitario.

2.6.5 Problemáticas sanitarias, ambientales y económicas del uso de fármacos antiparasitarios en equinos

El uso sistemático de fármacos antiparasitarios ha sido por muchos años el pilar fundamental en la prevención y tratamiento de infecciones por endoparásitos en equinos. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado la existencia de diversas problemáticas sanitarias, ambientales y económicas asociadas a la aplicación extensiva, y en ocasiones indiscriminada, de estos tratamientos. Estas problemáticas no solo afectan la eficacia terapéutica, sino también comprometen la sostenibilidad de los sistemas de producción equina, la salud ambiental y la economía de los propietarios.

2.6.5.1 Problemáticas sanitarias

La resistencia antihelmíntica, es una de los principales problemas sanitarios es el desarrollo de resistencia a los antihelmínticos en poblaciones de nematodos gastrointestinales. Esta resistencia ha sido documentada de manera consistente en distintas regiones del mundo, afectando a todos los grupos principales de fármacos: bencimidazoles, tetrahidropirimidinas y lactonas macrocíclicas (Nielsen, 2012; Saeed et al., 2019).

En Dinamarca, por ejemplo, se identificaron altos niveles de resistencia a benzimidazoles y sospecha de resistencia a pirantel en Cyathostominea spp., afectando negativamente la eficacia de tratamientos individuales (Larsen et al., 2002). En Perú, un estudio en yeguas reveló una eficacia significativamente mayor de doramectina (97%) en comparación con fenbendazol (51%), sugiriendo la posible aparición de resistencia a este último (Oliva et al., 2021).

Por su parte la subestimación diagnóstica y las técnicas tradicionales de recuento de huevos fecales (FEC) no permiten detectar fases prepatentes de los parásitos. Esto puede llevar a decisiones terapéuticas incorrectas y perpetuar las infecciones (Nielsen, 2012). La falta de herramientas diagnósticas específicas limita la implementación de terapias selectivas efectivas.

La disminución del rendimiento y salud animal son base del fracaso en el control parasitario eficiente se traduce en menor ganancia de peso, deterioro de la condición corporal, menor rendimiento deportivo y mayor susceptibilidad a otras enfermedades, especialmente en animales jóvenes e inmunocomprometidos (Oliva et al., 2021; Saeed et al., 2019).

2.6.5.2 Problemáticas ambientales

a) Contaminación de suelos y agua

Muchos antihelmínticos, particularmente las lactonas macrocíclicas como la ivermectina y la moxidectina, se excretan en las heces en formas activas. Estas sustancias contaminan el suelo y los ecosistemas asociados, afectando organismos no blancos como insectos coprófagos, lombrices y microorganismos del suelo, que son esenciales para la descomposición y reciclaje de nutrientes (Nielsen, 2012; Saeed et al., 2019).

b) Desequilibrio ecológico

El uso indiscriminado de antiparasitarios genera presión de selección no solo sobre los parásitos objetivo, sino también sobre otras especies. La eliminación de especies sensibles puede dar paso a la proliferación de especies resistentes o de menor valor ecológico, alterando la biodiversidad local.

c) Impacto sobre fauna benéfica

La reducción de insectos coprófagos interfiere en la degradación natural de las heces, lo que puede aumentar la acumulación de parásitos en el ambiente y favorecer su transmisión. Además, algunos estudios han sugerido que estos efectos pueden tener repercusiones en términos de impactos duraderos sobre las propiedades del suelo y la estabilidad de los ecosistemas de pastoreo (Nielsen, 2012).

2.6.5.3 Problemáticas económicas

a) Costos directos de tratamiento

El costo de los antihelmínticos, sumado a los gastos veterinarios asociados a su aplicación y monitoreo, representa una carga económica significativa para los propietarios. Esta carga se incrementa cuando los tratamientos no son efectivos debido a resistencia o errores diagnósticos (Larsen et al., 2002).

b) Costos indirectos por pérdida de productividad

Caballos con parasitosis crónicas o mal controladas presentan una disminución en la eficiencia alimenticia, en el rendimiento físico y en la capacidad reproductiva. Esto es particularmente crítico en caballos de deporte, trabajo o alta genética, donde las pérdidas económicas por bajo rendimiento pueden ser sustanciales (Oliva et al., 2021).

c) Necesidad de infraestructura y diagnóstico especializado

La implementación de estrategias como la terapia selectiva requiere la infraestructura necesaria para realizar recuentos fecales de rutina, así como capacitación en el uso e interpretación de resultados. Esto representa una inversión adicional que no todos los sistemas de producción están en condiciones de afrontar (Nielsen, 2012).

d) Regulaciones y barreras de acceso

En países como Dinamarca, donde los antihelmínticos han sido restringidos a prescripción veterinaria obligatoria, los propietarios deben asumir los costos y la logística de estos procedimientos. Aunque estas regulaciones tienen el objetivo de mejorar la eficacia del control, pueden ser percibidas como una carga por parte de los usuarios (Larsen et al., 2002; Nielsen, 2012).

2.6.6 Evaluación de actividad antiparasitante

La evaluación de la actividad antihelmíntica de nuevos fármacos, ya sean de origen sintético o natural, constituye un proceso clave en el desarrollo de alternativas terapéuticas frente a parásitos gastrointestinales. Esta evaluación se realiza de manera progresiva a través de ensayos *in vitro*, *in vivo*, y eventualmente mediante estudios clínicos bajo normativas internacionales (Holdsworth et al., 2006; Taylor et al., 2016).

Los ensayos *in vitro* permiten una primera aproximación a la eficacia de los compuestos, evaluando la viabilidad, la motilidad o la inhibición del desarrollo de diferentes estadios parasitarios (huevo, larva o adulto) en condiciones controladas de laboratorio. Métodos ampliamente utilizados incluyen la prueba de inhibición de la eclosión de huevos (Egg Hatch Assay), la inhibición del desarrollo larval (Larval Development Test), y la prueba de migración larval (Larval Migration Inhibition Test) (Cringoli et al., 2010).

En los ensayos *in vivo*, se evalúa la eficacia en animales hospedadores infectados de forma natural o experimental. El enfoque más común es la determinación de la reducción en el conteo de huevos en heces (FECRT, Fecal Egg Count Reduction Test), antes y después del tratamiento, utilizando técnicas como McMaster o Mini-FLOTAC (Cringoli et al., 2010). La eficacia se expresa como porcentaje de reducción del conteo de huevos, calculado con la fórmula propuesta por la WAAVP:

$$FECR\ (\%) = \left(1 - \frac{Media\ post - tratamiento}{Media\ pre - tratamiento}\right) x\ 100$$

Además, en estudios terminales o experimentales, se puede realizar un conteo directo de los parásitos en el tracto gastrointestinal post mortem para validar la eficacia del tratamiento (Holdsworth et al., 2006).

El análisis *in vivo* también considera signos clínicos (ganancia de peso, condición corporal, anemia, diarrea) y, en estudios avanzados, biomarcadores bioquímicos y moleculares asociados al daño parasitario o a la respuesta inmunitaria del hospedador (Kaplan, 2020). Finalmente, cualquier nuevo fármaco debe someterse a una evaluación toxicológica, que incluya pruebas de toxicidad aguda, subcrónica y crónica, determinación de la DL_{50} (dosis letal media) y estudios de seguridad sobre órganos blanco, especialmente hígado, riñón y sistema hematológico (OCDE, 2001).

Este enfoque integral permite determinar no solo la efectividad del tratamiento, sino también su seguridad y viabilidad como alternativa en el manejo de parasitosis, especialmente en el contexto actual de creciente resistencia a fármacos convencionales.

2.7 Mecanismo de acción de los metabolitos secundarios como agente antihelmíntico

Los metabolitos secundarios vegetales cumplen una función esencial en la defensa química de las plantas, y su uso como agentes antihelmínticos ha sido ampliamente investigado como una alternativa al uso de fármacos sintéticos, ante la creciente resistencia helmíntica. Entre los metabolitos con mayor actividad destacan los taninos condensados, alcaloides, terpenoides, saponinas y flavonoides, cada uno con mecanismos particulares que afectan la fisiología del parásito.

2.7.1 Taninos condensados

Los taninos, especialmente los proantocianidoles (taninos condensados), actúan principalmente alterando la integridad de la cutícula del parásito y formando complejos con proteínas de la superficie tegumentaria o del aparato digestivo de los nematodos, reduciendo la disponibilidad de nutrientes. Además, interfieren con enzimas digestivas del parásito (Hoste et al., 2006).

2.7.2 Saponinas

Las saponinas poseen una estructura triterpénica o esteroidal que les permite interaccionar con los lípidos de las membranas celulares, alterando la permeabilidad y generando lisis celular. En nematodos, se ha descrito daño estructural en la membrana de las células intestinales y alteración de la homeostasis iónica (Makkar et al., 2007).

2.7.3 Alcaloides

Los alcaloides ejercen efectos neurotóxicos sobre los helmintos al actuar sobre canales iónicos o neurotransmisores. Por ejemplo, los alcaloides isoquinoleínicos y pirrolizidínicos interfieren en la neurotransmisión colinérgica, provocando parálisis muscular o bloqueo de la contracción del sistema nervioso central del parásito (Eguale et al., 2011).

2.7.4 Terpenoides

Los terpenoides afectan la función mitocondrial del parásito, interfieren en la síntesis de ATP y pueden inducir estrés oxidativo. También inhiben enzimas cruciales para el metabolismo del nematodo (Braga et al., 2021).

2.7.5 Flavonoides

Los flavonoides actúan como antioxidantes, pero también pueden generar disfunción enzimática en helmintos mediante la interacción con grupos sulfhidrilo y la inhibición de enzimas digestivas, además de tener potenciales efectos inmunomoduladores sobre el hospedador (Spiegler et al., 2017).

2.8 Uso de extracto de neem como agente antiparasitario en rumiantes

En un estudio *in vitro* se evaluó el efecto antihelmíntico de hojas y semillas de neem (*Azadirachta indica*) en extractos acuosos contra la eclosión de huevecillos e inhibición larvario de estrongilos gastrointestinales, se realizaron tres concentraciones de cada extracto (500, 250 y 125 mg/ ml), como resultado el extracto de semilla en la concentración de 500 mg/ ml disminuyo la eclosión de huevecillos en un 99.1 % sin diferencias estadísticamente significativas con Albendazol e inhibió el desarrollo larvario hacia L3 en un 88.8 %. Para el extracto de hojas disminuyo un 80 % en la eclosión de los huevecillos e interfirió un 70 % el desarrollo de las larvas, con estos resultados se podría considerar el extracto de neem (*Azadirachta indica*) como una alternativa como control parasitario (Barrabí & Arece, 2013).

También se ha reportado un estudio *in vivo* comparativo del efecto de neem (*Azadirachta indica*) e Ivermectina al 1% sobre la carga parasitaria gastrointestinal en bovinos donde se estudiaron 30 bovinos de la raza Brangus, se dividió en dos grupos: el primer grupo se le administro hojas deshidratadas de neem (10 g/ animal/ día) y el segundo grupo se le administro Ivermectina al 1% por vía subcutánea a dosis de 0.2 mg/ kg, se determinó la carga parasitaria al inicio y al final durante 60 días, como resultado no hubo diferencia

estadísticamente significativa, este trabajo demostró que el uso neem (*Azadirachta indica*) es una alternativa natural válida para el control de parásitos gastrointestinales en el ganado.

3. JUSTIFICACIÓN

El tratamiento farmacológico de las enfermedades endoparasitarias en equinos presenta un desafío creciente, no solo debido a los altos costos y la resistencia de los parásitos a los medicamentos convencionales, sino también por los impactos ambientales asociados al uso de antiparasitarios sintéticos. Estos productos, además de generar resistencias, contribuyen a la contaminación de los ecosistemas. Por ello, la identificación de estrategias ambientalmente responsables, entre ellas el empleo de plantas medicinales con propiedades antiparasitarias, se vuelve crucial. Plantas como *Azadirachta indica* y *Cnidoscolus angustidens* se presentan como opciones viables, ya que sus extractos acuosos podrían ofrecer una forma accesible, económica y efectiva de controlar parásitos intestinales en equinos. Además de sus propiedades antiparasitarias, el uso de estas plantas en la dieta de los caballos podría contribuir a la mitigación de los gases de efecto invernadero (GEI). Algunos estudios sugieren que ciertos compuestos presentes en las plantas pueden influir positivamente en la reducción de las emisiones de metano y otros GEI generados en el proceso digestivo de los animales. Esta doble función (como antiparasitarios naturales y como moduladores de las emisiones de gases) hace que el uso de estas plantas represente una alternativa innovadora y sustentable en la ganadería. Al reducir el uso de antiparasitarios sintéticos y contribuir a un manejo ambiental más responsable, se promueve tanto la salud animal como la protección del medio ambiente.

4. HIPÓTESIS

Los extractos acuosos de *Azadirachta indica* y *Cnidoscolus angustidens* poseen propiedades bioactivas que contribuyen significativamente a la mitigación de gases de efecto invernadero, al tiempo que exhiben actividad antiparasitaria sobre parásitos intestinales en equinos, pudiendo ofrecer una alternativa natural y eficaz para el control de enfermedades parasitarias en equinos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar y evaluar los extractos acuosos de *Azadirachta indica* y *Cnidoscolus angustidens* para la mitigación de gases de efecto invernadero y actividad antiparasitante sobre parásitos intestinales que provocan enfermedades en equinos

5.2 Objetivos específicos

- Cuantificar fenoles totales, flavonoides totales y taninos de los extractos acuosos de las hojas de *Azadirachta indica* y raíz de *Cnidoscolus angustidens.*
- Caracterizar los extractos acuosos de las hojas de *Azadirachta indica* y raíz de *Cnidoscolus angustidens* por medio de cromatografía de gases.
- Hacer una prueba *in vitro* para determinar si los extractos de *Azadirachta indica* y *Cnidoscolus angustidens* y su combinación reducen de la emisión de gases con efecto invernadero (CH_4, CO y H_2S) en la dieta de equinos.
- Extraer fenoles totales y saponinas de los extractos acuosos de las hojas de *Azadirachta indica,* raíz de *Cnidoscolus angustidens* y su combinación.
- Evaluar el efecto antiparasitario del extracto acuoso, fenoles totales y saponinas de *Azadirachta indica, Cnidoscolus angustidens* y su combinación sobre la sobrevivencia *in vitro* de los parásitos *Strongylus* spp.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Recolección y conservación del material vegetativo

Durante los meses de agosto y septiembre de 2022 se recolectaron las hojas de *Azadirachta indica* y raíces de *Cnidoscolus angustidens* en el municipio de Puente de Ixtla, Morelos para ambas plantas se consideró su etapa fenológica en floración.

Para la conservación de las hojas de *Azadirachta indica* se deshidrataron a temperatura ambiente (22-28 °C) y posteriormente fueron molidas en el molino Willey Modelo 5KH39ON5525, México. En el caso de *Cnidoscolus angustidens* se retiró la epidermis para molerse en un molino de mano ESTRELLA Modelo COD423, México, posteriormente se deshidrato en Incubadora BINDER Modelo FD115, Alemania.

Ambas plantas se almacenaron en frascos a temperatura ambiente (es decir, entre 22-28 °C) para su posterior uso.

6.2 Elaboración de extractos

Se elaboraron tres extractos el primero fue de *Azadirachta indica*, el segundo de *Cnidoscolus angustidens* y el tercero se utilizó una mezcla de ambas plantas en una relación de 1:1.

Cada extracto se utilizó 1 g de material vegetativo y 8 mL de agua, se dejó en maceración en frascos ámbar por 72 h a temperatura ambiente (22-28 °C), posteriormente se filtró y se almacenó a 4 °C para su posterior uso (Salem et al., 2014).

6.3 Cuantificación de fenoles totales, flavonoides totales y taninos

6.3.1 Fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu, empleando una solución stock de ácido gálico a una concentración de 0.1 mg/mL (p/v). Para la construcción de la curva patrón, se prepararon disoluciones en un rango de 0.1 mL a 1 mL. En celdas de 2.5 mL se adicionaron 75 µL de Folin-Ciocalteu, 120 µL de cada disolución, 1,005 µL de agua destilada y 300 µL de Na_2CO_3 al 15%, dejándose reposar en oscuridad por 2 h. Posteriormente, se midieron las absorbancias a 760 nm en un espectrofotómetro y se construyó la curva de calibración con las absorbancias (eje Y) frente a las concentraciones de ácido gálico (eje X) (Alvarado et al., 2020).

6.3.2 Taninos

La determinación de taninos fue por el método de Doll et al. (2012) el cual se basa en la extracción de taninos y la cuantificación del contenido de fenoles totales (CFT) y fenoles residuales (CFR), obteniendo el contenido de taninos por diferencia (CFT - CFR).

Para la extracción de taninos de la muestra se preparó una solución de extracto (10 mg/mL) en metanol y una mezcla de gelatina al 20% (p/v) con NaCl saturado al 35.9% (p/v). Posteriormente, se adicionó 1 g de caolín en un matraz de 25 mL, se incorporó la solución del extracto y se completó con la solución de gelatina-NaCl. La mezcla se agitó durante 30 min para favorecer la precipitación de taninos, se centrifugó a 4000 rpm por 10 min y se filtró con papel Whatman No. 4. El sobrenadante se sometió a dos diluciones sucesivas con etanol (4 mL de sobrenadante + 6 mL de etanol), seguido de centrifugación (4000 rpm, 15 min) y

filtración. La segunda dilución se refrigeró (4 °C, 24 h) y posteriormente se filtró para obtener la solución libre de taninos.

La determinación de CFT y CFR se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu. Para CFT se analizó el extracto, mientras que para CFR se empleó la solución obtenida tras la extracción de taninos.

6.3.3 Flavonoides

La cuantificación de flavonoides se realizó siguiendo la metodología descrita por Zaragoza et al. (2024), con algunas modificaciones. Para ello, se construyó una curva de calibración empleando una solución estándar de quercetina a una concentración de 0.025 g en 250 mL de etanol al 80% (0.1 mg/mL), protegida de la luz. A partir de esta solución madre, se prepararon diluciones en un rango de 0.1 mL a 1 mL. A cada alícuota se añadieron 1.5 mL de etanol al 96%, 0.1 mL de cloruro de aluminio anhidro al 10%, 0.1 mL de acetato de potasio y 2.8 mL de agua destilada. Posteriormente, las muestras se dejaron reaccionar durante 30 minutos y la absorbancia fue medida a 415 nm utilizando un espectrofotómetro. Se construyó la curva de calibración con las absorbancias (eje Y) frente a las concentraciones de quercetina (eje X).

Para la cuantificación en las muestras, se tomaron 500 µL del extracto y se sometieron al mismo procedimiento descrito para la curva de calibración, sustituyendo la quercetina por el extracto. Los tubos de reacción se incubaron durante 30 minutos y su absorbancia se registró a una longitud de onda de 415 nm. Como control blanco, el cloruro de aluminio anhidro fue sustituido por agua destilada en las mediciones tanto de la curva de calibración como de la muestra.

6.4 Cromatografía de gases

Se realizó por medio de un análisis GC/ MS el cual consiste en una cromatografía de gases traza (GC) Ultra-ISQ Mass Espectrómetro (Thermo Scientific, Austin, TX, EE. UU.) con columna capilar directa TG-5MS (30 m 9 0.25 mm 9 0.25 lm de espesor de película). Para las temperaturas del programa del horno de la columna, el inyector y el detector, así como las propiedades de separación e identificación se utilizó como lo menciona El-Hefny et al. (2017). Los constituyentes se identificaron sobre la base de la búsqueda en la biblioteca de espectros de masas NIST y Wiley (Adams 2007).

6.5 Prueba *in vitro* de emisión de gases con efecto invernadero

6.5.1 Animales como donantes de inoculo

Para el caso de equinos se usó el contenido fecal como fuente de inoculo (1/2 kg de cada caballo) de 3 animales con un peso de 400 a 500 kg, las muestras fecales individuales se recolectaron del ciego de cada animal antes de la primera evacuación del día; estas muestras se mezclaron y homogenizaron para obtener una muestra homogénea y representativa del contenido fecal para ser utilizado como fuente de microorganismos en la incubación in vitro. Para el caso de bovinos se utilizó liquido ruminal como fuente de inoculo de 2 animales de raza cebú con un peso de 470 y 486 kg; estas muestras se mezclaron y homogenizaron para obtener una muestra homogénea y representativa del líquido ruminal para ser utilizado como fuente de microorganismos en la incubación in vitro.

6.5.2 Incubaciones *in vitro*

Los contenidos fecales de los equinos se usaron como fuente de inóculo, se mezclaron con la solución tampón de Goering & Van Soest (1970) sin tripticasa en la proporción de 1:4 vol/vol, el medio de incubación se mezcló posteriormente y se filtró a través de cuatro capas de estopilla en un matraz con un espacio de cabeza libre de O2. Se inoculó tres tandas idénticas de incubación en botellas de suero de 120 ml que contenían 0,5 g de sustrato (dieta: 70 % fibra y 30 % concentrado) en presencia de diferentes dosis de los tres extractos (es decir, 0, 0,6, 1,2 y 1,8 ml), considerando como blancos los frascos con sustratos, pero sin los extractos.

Después de llenar todas las botellas con el sustrato, el extracto, la solución amortiguadora de Goering y Van Soest, el contenido fecal o liquido ruminal, se lavaron con dióxido de carbono (CO2) y se cerraron inmediatamente con tapones de goma, se agitaron y se colocaron en una incubadora (Incubadora BINDER Modelo FD115, Alemania) a 39 °C.

La producción total de gas (PSI) se registró a las 2, 4, 20, 22, 24, 26, 44 y 46 horas utilizando el transductor de presión (Extech Instruments, Waltham, EE. UU.) siguiendo la técnica de Theodorou et al. (1994). En los mismos tiempos de incubación, se midieron las concentraciones de CH_4, CO y H_2S en el espacio libre de las botellas usando un detector de gas basado en difusión (Monitor de Dräger Safety X-am 20500, Lübeck, Alemania).

Después de cada registro, utilizando una aguja de jeringa, se dispersó el gas para evitar la acumulación de gas.

6.5.3 Sustrato aparentemente degradado

Después de muestrear el sobrenadante para la determinación del pH usando electrodos en un medidor de pH (Conductronic pH15, Puebla, México), el contenido de cada botella se filtró al vacío a través de crisoles de vidrio sinterizado (porosidad gruesa n.° 1, tamaño de poro 100-160 mm; Pyrex, Stone , REINO UNIDO). Luego, los residuos de incubación se secaron a 70 ºC durante la noche para estimar la desaparición aparente de MS (DMS). La degradabilidad de la MS a las 48 h de incubación (es decir, sustrato degradado, DMD; %) se calculó como la diferencia entre el contenido de MS del sustrato y su MS no degradable [4].

6.5.4 Cálculos

Para estimar los parámetros cinéticos de la producción de gases (GP), CH_4, CO, O_2 y H_2S, los resultados de GP, CH_4, CO y H_2S (mL/g MS) fueron ajustados utilizando la opción NLIN de SAS al modelo de France et al. (2000):

$$A = b \times \left(1 - e^{-c(t-Lag)}\right)$$

Donde:

A es el volumen de GP, CH_4, CO, O_2 y H_2S en el tiempo **t**;

b es la producción asintótica de GP, CH_4, CO y H_2S (ml/g MS);

c es la tasa de producción de GP, CH_4, CO y H_2S (/h), y

Lag (h) es el tiempo de retraso discreto antes del inicio de la producción de GP, CH_4, CO y H_2S.

La energía metabolizable (EM, MJ/kg MS) se estimó de acuerdo con Menke et al. (1979):

$$ME = 2.20 + 0.136\ GP + 0.0057\ CP\ \left({}^{g}/_{kg}\ DM\right)$$

Donde:

GP es la producción neta de gas en ml a partir de una muestra seca de 200 mg tras 24 h de incubación.

La concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) se calculó según Getachew et al. (2002):

$$SCFA\left({}^{mmol}/_{200\ mg\ DM}\right) = 0.0222\ GP - 0.00425$$

Donde:

GP es la producción neta de gas a las 24 h (ml/200 mg MS).

6.6 Extracción de fenoles totales y saponinas por solventes

La extracción de fenoles totales y saponinas se realizó con el método descrito por Salem et al. (2011), basado en una extracción en dos fases mediante separación de solventes. En la primera fase, se mezclaron 100 mL de agua desionizada, 200 mL del extracto y 100 mL de acetato de etilo (≥99.5% de pureza, grado reactivo ACS) en un embudo. de decantación sujeta a un soporte universal. La mezcla fue agitada durante 1 minuto y posteriormente dejada en reposo por 30 minutos. Luego de la separación de fases, se recuperó la fase superior y se transfirió a placas petri previamente pesadas y secadas hasta alcanzar peso constante, donde

se encontraban los fenoles totales y la inferior se mantuvo en el embudo de decantación para la siguiente etapa de extracción.

En la segunda fase, se incorporaron 100 mL de n -butanol (≥99% de pureza, grado reactivo ACS) a la fase inferior, agitándose nuevamente durante 1 minuto y permitiendo su reposo por un período de 30 a 60 minutos. La fase superior obtenida fue cuidadosamente separada y transferida a placas petri previamente pesadas y secadas hasta alcanzar peso constante. Posteriormente, los solventes fueron evaporados y el contenido de las cajas petri (fenoles totales y saponinas) se procesan mediante análisis gravimétrico, calculando la diferencia de peso antes y después del secado. Los resultados fueron expresados en miligramos por gramo de materia seca (mg/g MS) y se retiró la muestra seca de las cajas petri que consecutivamente fueron resguardadas en frascos de vidrio a temperatura ambiente para su posterior uso.

Para confirmar que se extrajo saponinas se utilizó la prueba Salkowki, este método cualitativo consiste en una reacción de color al agregar cloroformo y ácido sulfúrico a las saponinas extraídas, si existe una coloración anaranjada indica una reacción positiva (Donald et al., 2017).

6.7 Prueba *in vitro* de actividad antihelmíntica

6.7.1 Obtención de huevos y larvas estrongilidos

Los huevos del parásito fueron obtenidos por vía rectal de 5 caballos naturalmente, las larvas se obtuvieron por cultivo larvario según la técnica descrita por Figueroa (2015). Para obtener un dato representativo, los huevos se usaron dentro de las primeras tres horas de haberse

tomado la muestra, teniendo en cuenta que la sensibilidad disminuye cuando la embrionación incrementa.

6.7.2 Ensayo de inhibición larvaria de L3

Las larvas en estadio L3 de *Strongylus* spp. fueron obtenidas mediante cultivo larvario a partir de muestras fecales, incubadas durante un periodo de 7 a 14 días. Posteriormente, se procedió a su cuantificación y a la evaluación de su viabilidad, considerando su integridad morfológica y motilidad. Para el bioensayo, se emplearon placas ELISA de 96 pozos, en las cuales se colocaron aproximadamente 200 larvas L3 por pozo, realizando tres repeticiones por tratamiento.

A cada pozo se le adicionaron 100 µL del extracto vegetal en diferentes concentraciones (1200 µg y 1800 µg), un tratamiento con albendazol (300 µg/100 µL) como control positivo, y un grupo control negativo sin tratamiento. Las placas fueron incubadas a 28 °C. Se realizaron observaciones a las 0, 24 y 48 horas post-tratamiento; en cada punto temporal se tomaron aproximadamente 20 larvas por pozo, las cuales se realizó el conteo de la inhibición de cada tratamiento.

7. RESULTADOS

7.1 Primer articulo

Journal of Equine Veterinary Science 116 (2022) 104049

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Equine Veterinary Science

journal homepage: www.j-evs.com

Original Research

Influence of *Azadirachta indica* and *Cnidoscolus angustidens* Dietary Extracts on Equine Fecal Greenhouse Gas Emissions

Tonantzin Díaz Alvarado[a], Mona M.M.Y. Elghandour[a], Nsikan Joseph Ekanem[b], Yazmin Alcala-Canto[c], Alejandro Esquivel Velázquez[a], Edson Brodeli Figueroa Pacheco[d], Rayudika Aprilia Patindra Purba[e], Abdelfattah Z.M. Salem[a,*]

[a] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México
[b] Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Uyo, Uyo, Akwa Ibom State, Nigeria
[c] Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, México
[d] Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Universidad Autónoma de Guerrero, Iguala de la Independencia, Guerrero, México
[e] School of Animal Technology and Innovation, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 April 2022
Received in revised form 8 June 2022
Accepted 13 June 2022
Available online 16 June 2022

Keywords :
Azadirachta indica
Cnidoscolus angustidens
Plant ex tracts
Greenhouse gas es
Mitigation strategy
Fermentation profile

ABSTRACT

The present study was conducted to investigate the aqueous extracts of *Azadirachta indica* (AZN), *Cnidoscolus angustidens* (CNA), and their combination (MIX) at dosages of 0-, 0.6-, 1.2-, and 1.8- mL for their ability to reduce greenhouse gases and fermentation profiles in an *in vitro* study using horse feces and a nutrient-dense diet (as substrate). The quantity of greenhouse gas and fermentation profiles were determined in *in vitro* incubation for 48 h. Extracts of AZN, CNA, and MIX reduced total gas production of the incubated and degraded substrates in a dose-dependent and time-dependent manner. Production of CH_4 was reduced ($P < .05$) by 4.41% to 54.54% with the incubated substrates and by 1.16% to 61.82% with the degraded substrates. However, AZN and MIX reduced ($P < .05$) CO by 4.43% to 12.85% with the incubated substrates and by 0.70% to 16.78% with the degraded substrates. In like manner, the plant extracts and combination reduced ($P < .05$) H_2S production in a dose-dependent and time-dependent manner by 18.37% to 67.35% with the incubated substrates and by 8.51% to 67.23% with the degraded substrates. Extracts maintained pH within the normal range, reduced dry matter digestibility and metabolizable energy, and improved ($P < .05$) concentration of short chain fatty acids. Overall, aqueous extracts of AZN and CNA and their combinations had a positive effect on reducing the greenhouse gas production with no deleterious effect on fecal horses' fermentation activities.

© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Greenhouse gases are that trap heat in the atmosphere [1], and this resulted in climate change by affecting the atmosphere chemically in the long term [2], leading to global warming. The three main greenhouse gases are methane (CH_4), carbon dioxide (CO_2) and nitrous oxide (N_2O). Others are the fluorinated gases such as the hydrofluorocarbons, perfluorocarbons, sulfur hexafluoride, and nitrogen trifluoride [1]. Methane is a greenhouse gas that is formed when organic materials are decomposed in an anaerobic environment such as the rumen. It emanates both from natural and anthropogenic sources. Globally, 50% to 65% of total methane emissions come from anthropogenic sources [1]. Methane is produced mainly from enteric fermentation (39%) and manure storage (10%, [3]). In the agricultural sector, enteric methane accounts for the largest (40%) emission concentration [4,5], while in the livestock sub-sector, enteric methane accounts for 80% of the emissions [6]. Methane gas has a negative effect on the atmosphere than CO_2. This is because CH_4 gas has a global warming potentials of about 25 to 36 times higher than CO_2 over 100 years [1,7] and 80 times more potent over 10 to 20 years from release [7]. Methane emission is detrimental to animal productivity as it represents a significant gross energy loss of 2% to 12% of the gross energy (GE) intake by the animals [6–8].

Nitrous oxide (N_2O) is released from manure storage and the application of organic and inorganic fertilizers to soils. It is also very detrimental as its global warming potential is 265 times

* *Conflict of interest statement:* The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Ethical statement: Not applicable.

* Corresponding author at: Abdelfattah Z.M. Salem, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca 50000, Estado de Mexico, Mexico.

E-mail addresses: asalem70@yahoo.com, salem@uaemex.mx (A.Z.M. Salem).

https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.104049
0737-0806/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

Table 1
Chemical composition of the diet (substrate used during the *in vitro* evaluation) as well as the secondary metabolites (Total phenolics and flavonoids) of *Azadirachta indica* and *Cnidoscolus angustidens*.

Diet	g/kg DM	
Crude protein	130	
Nitrogen free extract	580	
Crude fiber	80	
Ether extract	30	
Organic matter	870	
Secondary metabolites:	*Azadirachta indica*	*Cnidoscolus angustidens*
Total phenolics (mg gallic acid /g)	72.6	65.3
Total flavonoid (mg quercetin /g)	122.2	5.62

Abbreviation: DM, dry matter.

higher than carbon dioxide [3]. The standard unit acceptable to account for the global warming potential is the carbon dioxide equivalent [3,9]. Mitigation strategies are therefore aimed at directly reducing the amount of these greenhouse gases emitted and by so doing, indirectly make more energy available to improve livestock productivity [3,8]. Many plants contain bioactive substances which make them quite useful in pharmacological studies and other life-cycle assessment. Neem (*Azadirachta indica*) is a medicinal plant that contains many biological active compounds. These compounds can be extracted from *A. indica* include alkaloids, flavonoids, saponins, tannins, reducing sugar, glycosidessteroids, triterpinoids, phenolic compounds, carotenoids, ketones, salannin, volatile oils, meliantriol, nimbin and *azadirachtin* [10,11]. In addition, Al-Marzooqi et al [12] reported the presence of 64% unsaturated fatty acids, 33% saturated fatty acids and 2.3% other fatty acids in neem seed oil.

The common name of *Cnidoscolus angustidens*is is mala mujer (in spanish) and it is an herbaceous perennial plant in the family Euphorbiaceae. *C. angustidens* is a wild flowering plant native to the Cape Region of Baja California Sur in north-west Mexico and it is known as "caribe" by the locals [13]. Mala mujer is rich in essential oils. Also, León et al [13] reported the following fatty acid composition in *C. angustidens*: 9.50% palmitic acid (C16), 5.00% stearic acid (C18), 32% oleic acid (C18:1), 52.00% linoleic acid (C18:2), 0.51% linolenic acid (C18:3), 0.70% eicosanoic acid (C20) and 0.73% arachidonic acid (C20:4).

Previous reviews on the different strategies to mitigate enteric CH_4 production and other greenhouse gases by ruminants have been published [3,8]. Grossi et al [3] in their review categorized the greenhouse gases mitigation strategies into enteric fermentation (including forage quality), manure storage and animal management, reporting variable (uncertain, low, medium and high) mitigation potentials. Black et al [8] among other things, reviewed the use of various feed supplements and the potential of anti-methanogenic forages such as Leucaena, Desmanthus, Australian Tar Bush shrub, *Eremophila glabra*, Biserrula, native Australian Melaleuca and Leptospermum plants and their extracts in reducing methane and other greenhouse gases. Most of these forages contain primary compounds such as essential oils and plant secondary metabolites such as condensed and hydrolysable tannins [14]. These biological active compounds possess both beneficial and detrimental effects [15,16]; increased bacterial proteins and overall nutrient flow and digestibility to the duodenum for subsequent absorption by the ruminant [17,18]; defaunation [19,20], bactericidal or bacteriostatic properties [17], antimethanogenic [21,22] and other antimicrobial activities. The objective of this study, therefore, was to assess the effect of the aqueous extract of *A. indica* (leaves) and *C. angustidens* (roots) inoculated with horse fecal contents on the mitigation potential of greenhouse gases, dry matter digestibility, short chain fatty acids, metabolizable energy and organic matter digestibility.

2. Materials and Methods

2.1. Vegetative Materials

Roots of the *C. angustidens* were taken manually from five plants in Puente de Ixtla, Morelos, Mexico, in the month of August, later they were washed and peeled for later use. Leaves samples of the *A. indica*, were taken from five trees in the municipal of Tecpan de Galeana, Guerrero, Mexico, in February, after which this vegetative material was dried at 40°C (BINDER Model FD115 Incubator, Germany) and ground (Willey Mill Model 5KH39ON5525, Mexico with a 1 mm sieve) in the laboratory of bromatology at the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of the Autonomous University of the State of Mexico. Finally, it was stored at room temperature (i.e., 25°C–30°C) for later use.

2.2. Preparation of Aqueous Extracts

Three aqueous extracts were prepared, the first was from the *C. angustidens* plant (CNA) using a ratio of one g of previously collected vegetative material and 8 mL of distilled water, which was crushed in a blender and left to macerate in amber bottles for 72 h at room temperature (i.e., between 22°C and 30°C), and , it was subsequently filtered for *in vitro* evaluation. The second aqueous extract of the *A. indica* plant (AZN) was obtained by mixing one g of dry matter/8 mL of distilled water and leaving it to rest in amber bottles for 72 h, and then it was filtered for use in *in vitro* gas production. Finally, an extract was made with the combination (MIX) of the two previous ones in a 1:1 vol/vol ratio (Table 1).

2.3. Animals as Inoculum Donors

The fecal content was used as a source of inoculum from 3 horses with body weight of 400 to 500 kg; individual fecal samples (1/2 kg of each horse) were collected, from the rectum of each animal, before the first evacuation of the day. These samples were mixed and homogenized to obtain a homogeneous and representative sample of fecal content to be used as a source of microorganisms in *in vitro* incubation.

2.4. In Vitro Incubations

The fecal contents were mixed with the Goering and Van Soest [23] buffer solution without trypticase in the ratio of 1:4 vol/vol. The incubation medium was subsequently mixed and filtered through four layers of cheesecloth in a flask with an O_2-free

Table 2
In vitro fecal gas production kinetics and total production at 6, 24 and 48 h of the incubated and degraded diet with the aqueous extract of *Azadirachta indica* (AZN), *Cnidoscolus angustidens* (CNA) or their combination (MIX, 1:1, vol/vol) at 0, 0.6, 1.2, and 1.8 mL/g DM incubated with fecal contents of horses.

Plant Species Extract	Extract Dose (mL/g DM)	Gas Production Kinetics[a]			Gas Production (mL gas/g DM incubated)			Gas Production (mL gas/g DM degraded)		
		b	c	Lag	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
AZN	0	337.9	0.031	2.578	113.8	258.1	344.9	588.6	1333.8	1775.3
	0.6	205.3	0.231	2.710	69.9	152.8	214.2	325.9	723.3	1039.2
	1.2	358.6	0.033	1.933	119.8	273.9	368.1	652.2	1488.6	1994.0
	1.8	278.6	0.022	3.001	77.4	152.8	247.9	362.4	716.4	1166.0
	Linear	0.3957	0.9489	0.8007	0.2705	0.1816	0.2371	0.1856	0.138	0.1713
	Quadratic	0.4039	0.9546	0.5584	0.3903	0.3042	0.307	0.2277	0.1911	0.1744
CNA	0	337.9	0.031	2.578	113.8	258.1	344.9	588.6	1333.8	1775.3
	0.6	312.7	0.024	1.455	76.6	181.0	294.2	481.7	1089.7	1811.8
	1.2	280.8	0.035	1.953	96.1	229.0	291.2	444.5	1061.1	1343.3
	1.8	280	0.045	0.885	82.4	189.5	278.9	412.0	955.2	1422.3
	Linear	0.2738	0.3259	0.0394	0.0097	0.0409	0.1998	0.0717	0.0527	0.2701
	Quadratic	0.528	0.8306	0.7206	0.8159	0.8373	0.6256	0.4712	0.5789	0.3512
MIX	0	337.9	0.031	2.578	113.8	258.1	344.9	588.6	1333.8	1775.3
	0.6	303.5	0.030	1.266	84.5	199.2	294.2	477.0	1134.5	1611.4
	1.2	196.2	0.049	5.665	62.3	90.3	157.8	320.2	469.1	811.9
	1.8	303.2	0.028	0.635	78.6	187.0	293.4	371.5	882.5	1375.8
	Linear	0.5654	0.7655	0.165	0.0728	0.1016	0.392	0.0762	0.1075	0.171
	Quadratic	0.0377	0.065	0.0062	0.0506	0.0041	0.0113	0.1219	0.018	0.0106
SEM pooled [b]		35.65	0.0205	0.6342	12.11	30.06	38.71	75.71	174.35	210.32
P value:										
Extract		0.832	0.4026	0.3291	0.6007	0.4287	0.6127	0.7159	0.524	0.5055
Dose:		0.2275	0.4186	0.1149	0.0218	0.0294	0.1151	0.0381	0.0378	0.1086
Linear		0.1445	0.99	0.1518	0.0092	0.0091	0.0543	0.0064	0.006	0.0249
Quadratic		0.2527	0.8344	0.0811	0.7147	0.4401	0.2411	0.8306	0.5388	0.3243
Extract × Dose		0.1083	0.2919	0.0471	0.3503	0.0564	0.0652	0.1926	0.042	0.0235

Abbreviation: DM, dry matter.
[a] *b* is the asymptotic gas production (mL/g DM); *c* is the rate of gas production (/h); *Lag* is the initial delay before gas production begins (h).
[b] SEM standard error of the mean.

Table 3
In vitro fecal methane production kinetics and total production at 6, 24 and 48 h of the incubated and degraded diet with the aqueous extract of *Azadirachta indica* (AZN), *Cnidoscolus angustidens* (CNA) or their combination (MIX, 1:1, vol/vol) at 0, 0.6, 1.2, and 1.8 mL/g DM incubated with fecal contents of horses.

Plant Species Extract	Extract Dose (mL/g DM)	CH_4 Production Kinetics[a]			CH_4 Production (mL CH_4/g DM incubated)			CH_4 Production (mL CH_4/g DM degraded)		
		b	c	Lag	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
AZN	0	7.06	0.063	13.591	0.11	0.68	2.46	0.55	3.45	12.76
	0.6	7.01	0.052	9.476	0.07	0.54	1.92	0.33	2.63	9.64
	1.2	11.61	0.102	19.310	0.13	0.74	4.52	0.72	4.02	24.37
	1.8	9.64	0.061	11.552	0.11	0.63	2.60	0.52	2.89	12.11
	Linear	0.4125	0.9553	0.7405	0.9109	0.8799	0.9195	0.8882	0.7249	0.9245
	Quadratic	0.2434	0.2868	0.2269	0.6159	0.7558	0.1129	0.3625	0.5386	0.0708
CNA	0	7.06	0.063	13.591	0.11	0.68	2.46	0.55	3.45	12.76
	0.6	8.85	0.095	12.501	0.10	0.65	2.72	0.63	3.78	15.63
	1.2	12.32	0.115	19.011	0.09	0.88	3.51	0.40	4.10	16.43
	1.8	21.95	0.095	18.378	0.16	1.57	6.41	0.78	7.97	32.76
	Linear	0.0016	0.6134	0.3633	0.0673	0.0281	0.0213	0.1762	0.0347	0.0274
	Quadratic	0.4511	0.5092	0.5016	0.0591	0.4215	0.4607	0.091	0.3275	0.354
MIX	0	7.06	0.063	13.591	0.11	0.68	2.46	0.55	3.45	12.76
	0.6	14.81	0.095	18.262	0.11	1.05	4.58	0.59	6.25	25.38
	1.2	9.45	0.891	17.468	0.09	0.75	2.54	0.49	4.01	13.03
	1.8	16.12	0.048	17.136	0.05	0.70	5.00	0.21	3.41	24.28
	Linear	0.0592	0.9797	0.386	0.1576	0.9697	0.0249	0.1457	0.9867	0.0676
	Quadratic	0.5647	0.1456	0.5472	0.6363	0.8725	0.1741	0.5587	0.8045	0.2786
SEM pooled [b]		1.999	0.0975	3.2451	0.0224	0.1969	0.7601	0.1195	1.0684	4.1153
P value:										
Extract		0.0952	0.4474	0.4369	0.4777	0.2809	0.293	0.4291	0.3063	0.3124
Dose:		0.002	0.3654	0.2669	0.9114	0.573	0.0298	0.9791	0.7397	0.0831
Linear		0.0002	0.9825	0.4743	0.9494	0.1844	0.0043	0.6972	0.2768	0.0119
Quadratic		0.837	0.0937	0.1265	0.8991	0.864	0.9426	0.917	0.9547	0.9912
Extract × Dose		0.07	0.5423	0.7089	0.1855	0.2748	0.0481	0.1018	0.2546	0.0342

Abbreviation: DM, dry matter.
[a] *b* is the asymptotic CH_4 production (mL/g DM); *c* is the rateof CH_4 production (/h); *Lag* is the initial delay before CH_4 production begins (h).
[b] SEM standard error of the mean.

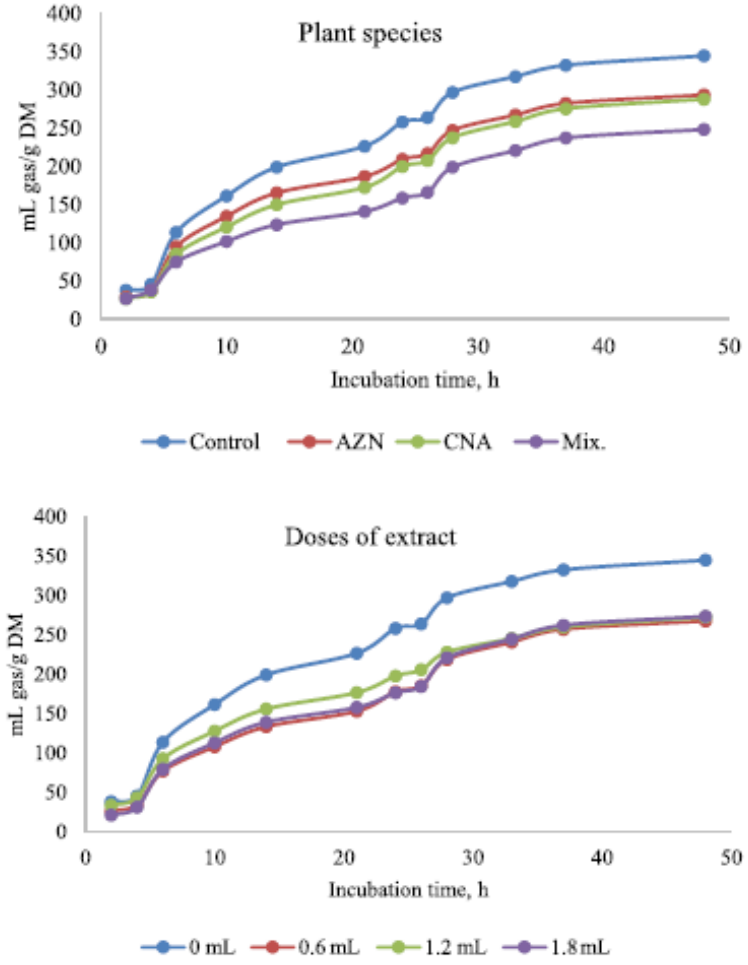


Fig. 1. Horse fecal total gas production (mL/g dry matter (DM)) at different hours of incubation as affected by the dietary inclusion with the aqueous extract of *Azadirachta indica* (AZN), *Gnidoscolus angustidens* (CNA) or their combination (MIX, 1:1, vol/vol) at 0, 0.6, 1.2, and 1.8 mL/g DM incubated with fecal contents of horses.

headspace. Three identical incubation runs were inoculated into 120 mL serum bottles containing 0.5 g of substrate in the presence of different doses (i.e., 0, 0.6-, 1.2- and 1.8- mL) of the three extracts (i.e., 1.2, AZN, CNA and MIX), considering as blank the bottles with substrates but without the extracts. The dosage level of the extract was chosen based on previous studies, and as a result of reduced and sustainable mitigation of the production of equine fecal methane, carbon monoxide, and hydrogen sulfide [24,25].

However, after filling all the bottles with the substrate, extract, the buffer solution and fecal content, they immediately closed with rubber stoppers, sealed with aluminum on the bottle neck, shaken, and then they were placed in an incubator (BINDER Model FD115 Incubator, Germany) at 39°C.

Total gas production (PSI) was recorded from 2 to 48 h after incubation using the pressure transducer (Extech Instruments, Waltham, MA, USA) following the technique of Theodorou et al [26]. At the same incubation times, the concentrations of CH_4, CO and H_2S in the free space of the bottles were measured using a diffusion-based gas detector (Dräger Safety Monitor X-am 2500, Lübeck, Germany). To avoid gas accumulation, the gas was dispersed after each recording with a syringe needle.

2.5. Apparently Degraded Substrate

After sampling the supernatant for pH determination using electrodes on a pH meter (Conductronic pH15, Puebla, Mexico), the contents of each bottle were vacuum filtered through sintered glass crucibles (coarse porosity #1, pore size 100–160 mm; Pyrex, Stone, UK). Then, the incubation residues were dried at 70°C overnight to estimate the apparent disappearance of DM (DMD). The DM degradability at 48 h of incubation (i.e., substrate degraded, DMD; %) was calculated as the difference between the DM content of the substrate and its non-degradable DM.

2.6. Calculations

To estimate the kinetic parameters of gas production (GP), CH_4, CO and H_2S results of GP, CH_4, CO and H_2S (mL/g DM) were fitted

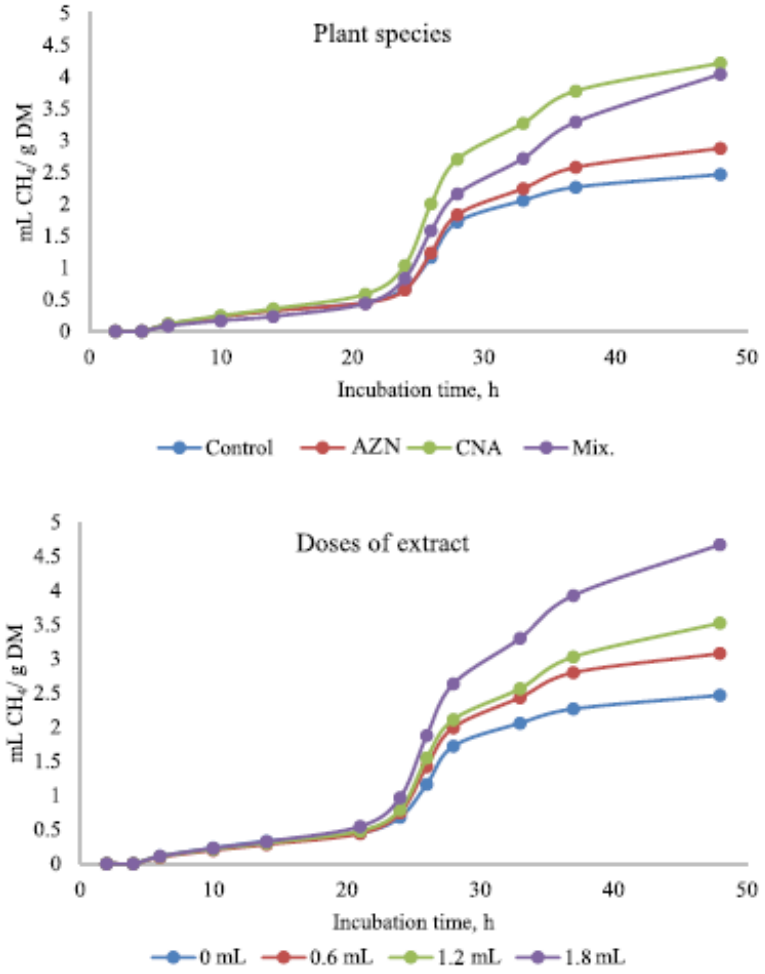


Fig. 2. Horse fecal Methane (CH_4) production (ml/g dry matter (DM)) at different hours of incubation as affected by the dietary inclusion with the aqueous extract of *Azadirachta indica* (AZN), *Cnidoscolus angustidens* (CNA) or their combination (MIX, 1:1, vol/vol) at 0, 0.6, 1.2, and 1.8 mL/g DM incubated with fecal contents of horses.

using the NLIN option of SAS to the France et al [21] model as:

$$A = b \times \left(1 - e^{-c(t - Lag)}\right)$$

where *A* is the volume of GP, CH_4, CO and H_2S at time *t*; *b* the asymptotic GP, CH_4, CO and H_2S (mL/g DM); *c* is the rate of GP, CH_4, CO and H_2S (/h), and *Lag* (h) is the discrete lag time prior to GP, CH_4, CO and H_2S.

Metabolizable energy (ME, MJ/kg DM) was estimated according to Menke et al [22] as:

$$ME = 2.20 + 0.136\ GP + 0.0057\ CP\left(g/kg DM\right)$$

where GP is net gas production in mL from 200 mg dry sample after 24 h of incubation.

Short chain fatty acids concentration (SCFA) was calculated according to Getachew et al. [33] as:

$$SCFA\left(mmol/200\ mg\ DM\right) = 0.0222\ GP - 0.00425$$

where GP is the 24 h net gas production (mL/200 mg DM).

2.7. Statistical Analysis

Experiments were completely randomized with repeated measures in time. Data from each of the three runs within the same sample of each of the three individual samples (*A. indica*, *C. angustidens* or their combination (MIX)) were averaged prior before statistical analysis, and mean values of each individual sample were used as the experimental unit. Results of fecal fermentation parameters, methane conversion efficiency were analyzed as a factorial experiment using the PROC GLM option of SAS [24] as:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + E_j + (P \times D)_{ij} + E_{ijk}$$

here: Y_{ijk}= is every observation of the *i*th plant species (Pi) with *j*th extract dose (E_j); μ is the general mean; $(P \times E)_{ij}$ is the interaction between plant species and extract dose; E_{ijk} represents the experimental error, normally distributed with the average 0 and the constant variance. Linear and quadratic polynomial contrasts were used to examine responses of greenhouses gas production of the fermented diet fermentation with the increasing addition lev-

Table 4
In vitro fecal methane proportions at 6, 24 and 48 h of the incubated and degraded diet with the aqueous extract of *Azadirachta indica* (AZN), *Cnidoscolus angustidens* (CNA) or their combination (MIX, 1:1, vol/vol) at 0, 0.6, 1.2, and 1.8 mL/g DM incubated with fecal contents of horses.

Plant Species Extract	Extract Dose (mL/g DM)	CH_4 (mL / 100 mL gas)			CH_4 (mg /mL gas)			CH_4 (g /kg DM)		
		6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
AZN	0	0.94	2.69	7.08	0.28	0.81	2.12	0.50	3.16	11.46
	0.6	0.94	3.02	7.13	0.28	0.91	2.14	0.32	2.52	8.94
	1.2	1.11	2.75	12.08	0.33	0.83	3.63	0.61	3.46	21.00
	1.8	1.33	3.50	9.64	0.40	1.05	2.89	0.53	2.93	12.09
	Linear	0.3119	0.4894	0.4202	0.3116	0.4898	0.4206	0.903	0.8803	0.9194
	Quadratic	0.9323	0.7327	0.1916	0.9312	0.7318	0.1918	0.6158	0.755	0.113
CNA	0	0.94	2.69	7.08	0.28	0.81	2.12	0.50	3.16	11.46
	0.6	1.28	3.50	8.90	0.38	1.05	2.67	0.45	3.02	12.67
	1.2	0.89	3.83	12.17	0.27	1.15	3.65	0.40	4.10	16.32
	1.8	1.94	8.15	22.69	0.58	2.44	6.81	0.74	7.31	29.81
	Linear	0.0089	0.0028	0.0008	0.0089	0.0028	0.0008	0.0661	0.0281	0.0213
	Quadratic	0.059	0.1915	0.3269	0.0588	0.1912	0.3268	0.0593	0.4221	0.4607
MIX	0	0.94	2.69	7.08	0.28	0.81	2.12	0.50	3.16	11.46
	0.6	1.28	5.31	15.63	0.38	1.59	4.69	0.51	4.89	21.30
	1.2	1.39	6.35	14.17	0.42	1.91	4.25	0.43	3.48	11.82
	1.8	0.56	3.96	18.28	0.17	1.19	5.48	0.21	3.24	23.25
	Linear	0.2406	0.5628	0.0186	0.2406	0.5631	0.0187	0.1596	0.9696	0.0249
	Quadratic	0.0429	0.135	0.662	0.0429	0.135	0.6619	0.6331	0.8722	0.1741
SEM pooled[a]		0.1804	0.8720	1.9683	0.0541	0.2616	0.5905	0.1045	0.9157	3.5347
P value:										
Extract		0.3538	0.0882	0.0192	0.3539	0.0882	0.0192	0.4751	0.2809	0.2931
Dose:		0.361	0.0704	0.0003	0.3606	0.0705	0.0003	0.9095	0.573	0.0298
Linear		0.0846	0.0103	<0.0001	0.0844	0.0103	<0.0001	0.9598	0.1842	0.0044
Quadratic		0.9081	0.642	0.6169	0.909	0.6429	0.617	0.9035	0.8651	0.9424
Extract × Dose		0.0139	0.076	0.0535	0.0138	0.0759	0.0535	0.186	0.2747	0.0481

Abbreviation: DM, dry matter.
[a] SEM standard error of the mean.

els (doses) of the plant species extracts. Statistical significance was declared at $P < .05$.

3. Results and Discussion

3.1. Total Gas Production

Total gas production (mL gas/g DM incubated or degraded) was affected by plant species extract and dose dependent. However, apart from the incubated and degraded diet, with the AZN extract at 1.2 mL dosage, produced more gas than their respective control substrate diets at 6, 24 and 48 h. Diet characteristics, such as contents of crude protein, degradable nitrogen and dietary fiber influence the efficacy of plant extracts to produce gas (Table 2, Fig. 1). Since the plant species were high degradable nitrogen, and this must have been responsible for the lower gas production *versus* control diets, corroborating similar findings by Akanmu et al [27] with lucerne substrate. When Garcia-Montes de Oca et al [28] incubated seven different legumes and wild arboreal pods of Mexican calabash (*Crescentia alata*), esculent lead tree (*Leucaena esculenta*), guamuchil (*Phitecellobium dulce*), bastard cedar (*Guazuma ulmifolia*), needle bush (*Acacia farnesiana*), mimosa (*Mimosa* sp.) and elephant ear tree (*Enterolobium cyclocarpum*). They reported that *Leucaena esculenta* produced less gas *versus other plant species* due to the fact that it has a lower effective degradability and slower degradation speed. These characteristics allowed some of the protein in *L. esculenta* to escape during fermentation. Lower effective degradability and slower degradation speed may account for the low gas production of the leaf extracts and mixtures utilized in this study (Table 3, Fig. 2).

3.2. Methane Production

The potential of methane reduction, with the dietary inclusión of plants aqueous extracts and their combinations, was dose-dependent and time-dependent and did not follow any pattern. There was reduced methane production with the AZN leaf extract at 0.6 mL infusion irrespective of time of sampling for the incubated and degraded substrates. Reduced methane production was also recorded for AZN aqueous extract incubated at 1.8 mL dosage for 6 h. Moreover, AZN extracts substrate degraded at 1.8 mL reduced methane production at 6, 24 and 48 h. However, for the incubated AZN extracts substrate, the reduction of methane was of 7.35% (1.8 mL at 24 h) to 36.36% (at 0.6 mL at 6 h), while the range of methane reduction, for the AZN degraded substrate, was of 5.08% (1.8 mL at 48 h) to 40.00% (0.6 mL at 6 h). For the CNA extract incubated substrates, reduced methane production compared to the control were recorded at 0.6 mL at 6 h (9.09%), 0.6 mL at 24 h (4.41%) and 1.2 mL at 6 h (18.18%). The only low methane production for the degraded CNA extract substrate was at the 1.2 mL dosage at 6 h (27.27%).

A varying range in methane reduction was similarly observed in the substrates that had the AZN: CNA extract mixture (MIX). The lowest percentage (1.16%) of methane production was recorded for the substrate degraded at 1.8 mL extract dose for 24 h, while the highest percentage (61.8%) of methane reduction was for the substrate infused with 1.8 mL extract dose mixture for 6 h. The substrate with the extract mixture also reduced methane production up to 10.9% at the 1.2 mL extract dose degraded for 6 h. There was also an reduced, of methane production, by18.18% (1.2 mL at 6 h) and 54.54% (1.8 mL at 6 h) of the substrates incubated with the MIX. Thus, there was a 4.4% to 54.5% methane reduction with the incubated substrates and a 1.16% to 61.82% reduction with the degraded substrates. The anti-methanogenic activities of these aqueous extracts were likely due to the rich contents of the diets as well as the presence of plant secondary metabolites [29,30] and essential oils [12,21]. Chaturvedi et al [31] also reported that a combination of *Emblica officinalis: A. indica* and *A. indica: Clerodendrum phlomidis* at 0.5% supplementation reduced *in vitro* methane production by 30.93 and 28.17%, respectively. For the substrates

Table 5
In vitro fecal carbon monoxide (CO) production kinetics and total production at 6, 24 and 48 h of the incubated and degraded diet with the aqueous extract of *Azadirachta indica* (AZN), *Cnidoscolus angustidens* (CNA) or their combination (MIX, 1:1, vol/vol) at 0, 0.6, 1.2, and 1.8 mL/g DM incubated with fecal contents of horses.

Plant Species Extract	Extract Dose (mL/g DM)	CO Production Kinetics[a]			CO Production (mL /g DM incubated)			CO Production (mL /g DM degraded)		
		b	c	Lag	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
AZN	0	3475.0	0.813	5.019	0.054	0.316	1.214	0.275	1.572	5.940
	0.6	4066.5	0.068	4.859	0.086	0.393	1.058	0.382	1.790	4.943
	1.2	6594.2	0.028	6.059	0.141	0.701	2.374	0.768	3.823	12.751
	1.8	4861.9	0.068	6.876	0.074	0.475	1.414	0.343	2.214	6.594
	Linear	0.6058	0.1884	0.4412	0.7473	0.5732	0.812	0.8067	0.6309	0.8705
	Quadratic	0.3097	0.3848	0.9566	0.1652	0.2302	0.1714	0.0843	0.1216	0.09
CNA	0	3475.0	0.813	5.019	0.054	0.316	1.214	0.275	1.572	5.940
	0.6	6101.5	0.027	6.206	0.085	0.510	1.829	0.466	2.749	9.997
	1.2	8640.3	0.031	10.080	0.106	0.753	2.449	0.490	3.498	11.342
	1.8	4139.9	0.029	7.162	0.144	0.896	2.919	0.720	4.499	14.862
	Linear	0.7963	0.1677	0.1838	0.0443	0.0221	0.0593	0.0329	0.0143	0.0446
	Quadratic	0.0554	0.4085	0.0141	0.8436	0.4295	0.5844	0.9596	0.5854	0.7793
MIX	0	3475.0	0.813	5.019	0.054	0.316	1.214	0.275	1.572	5.940
	0.6	5549.2	0.034	10.694	0.095	0.600	2.492	0.504	3.343	13.394
	1.2	3936.3	0.025	5.581	0.071	0.302	1.098	0.359	1.561	5.556
	1.8	7065.6	0.095	10.462	0.056	0.540	2.239	0.248	2.482	10.566
	Linear	0.1657	0.2027	0.0375	0.9656	0.2998	0.1519	0.8993	0.3813	0.1336
	Quadratic	0.5312	0.3661	0.2869	0.6981	0.4921	0.2949	0.6034	0.599	0.2937
SEM pooled [b]		1604.00	0.1931	1.3593	0.0294	0.1448	0.4988	0.1347	0.7155	2.2635
P value:										
Extract		0.7875	0.9967	0.1018	0.4933	0.266	0.3072	0.435	0.2596	0.2538
Dose:		0.2585	0.0371	0.072	0.3101	0.1048	0.1611	0.2404	0.0935	0.1213
Linear		0.201	0.0193	0.0124	0.1899	0.0228	0.0334	0.2139	0.0249	0.0279
Quadratic		0.124	0.1255	0.5271	0.1787	0.3495	0.4755	0.1097	0.2464	0.3771
Extract × Dose		0.5134	1.000	0.0634	0.6066	0.3895	0.2033	0.326	0.1852	0.0765

Abbreviation: DM, dry matter.
[a] *b* is the asymptotic Carbon monoxide (CO) production (ppm); *c* is the rate of Carbon monoxide (CO) production (/h); *Lag* is the initial delay before Carbon monoxide (CO) production begins (h).
[b] SEM standard error of the mean.

incubated with the AZN extracts, lowered fecal methane proportions were emitted at the 6 h , 24 h and at the 48 h from the 0.6 mL dosage compared with their respective controls. Moreover, the CNA and MIX extracts incubated substrates emitted also lower CH_4 proportions *versus* controls at al the three incubation times (Table 4)This may likely be due to the high content of essential oils present in the aqueous extract mixture at that dosage [12]. They reported that neem seed oil affected ruminal fermentation in a dose-dependent manner which was dependent on the composition of the feed and the controlled conditions of the *in vitro* environment. They explained that the potency and interactions of the fatty acids, especially the unsaturated fatty acids, were responsible for the reduction in methane proportion. The lowest methane proportions obtained in this study with the highest dose (dose-dependent) mixture of the extracts at the 6 h (time-dependent) is in line with the findings of Al-Marzooqi et al [12].

3.3. Carbon Monoxide Production

The plant extracts and their combinations affected CO reduction in a dose-dependent and time-dependent manner compared to the respective controls. The AZN extract reduced CO at the rate of 12.85% at 0.6 mL incubated for 48 h and by 16.78% at 0.6 mL degraded for 48 h. The CNA extract did not reduce CO production at any dosage and time frame. The MIX reduced CO production *versus* control sample was 4.43% (at 1.2 mL incubated for 24 h), 9.55% (at 1.2 mL incubated for 48 h), 9.82% (at 1.8 mL degraded for 24 h), 0.7% (at 1.2 mL degraded for 24 h) and 6.46% (at 1.2 mL degraded for 48 h). Thus, in the incubated substrates, aqueous species extracts reduced CO production at the range of 4.43% (1.2 mL/24 h) to 12.85% (0.6 mL/48 h) and in the degraded diets, 0.7% (1.2 mL/24 h) to 16.78% (0.6 mL/48 h; Table 5, Fig. 3). The species-dependent, dose-dependent and time-dependent reduction of CO in this study may be due to the characteristics of the substrate diet, plant secondary metabolites and essential oils present in the plant species [12,27].

3.4. Hydrogen Sulfide Production

The H_2S production of the plant extracts were dose-dependent and time-dependent. For the AZN extract, there was a 34.69% (0.6 mL at 48 h) reduction in H_2S production in the incubated substrates and 12.50% (0.6 mL at 24 h) to 32.77% (0.6 mL at 48 h) H_2S reduction in the degraded substrates. The CNA extract substrates reduced H_2S production by 28.57% (1.2 mL at 48 h), 33.33% (1.2 mL at 24 h and 1.8 mL at 24 h) and 38.77% (1.8 mL at 48 h) in the incubated substrates, and by 29.36% (1.2 mL at 48 h), 33.62% (1.8 mL at 48 h) and 37.50% (1.2 mL at 24 h and 1.8 mL at 24 h) in the degraded substrates. There were significant reductions in H_2S production especially in the MIX at different doses and time of incubation and degradation. The incubated substrate including the MIX reduced H_2S by 18.37% (0.6 mL for 48 h) to 67.35% (1.2 mL for 48 h). In the same vein, the degraded substrate including the MIX reduced H_2S production by 8.51% (0.6 mL for 48 h) to 67.23% (1.2 mL for 48 h; Table 6, Fig. 4). The substrates with the aqueous extracts mixture produced less H_2S due to its lower effective degradability and slower degradation speed, as it was degraded in the 48 h. These findings corroborated the report of Garcia-Montes de Oca et al [28] for the high-quality legume *Leucaena esculenta*.

Table 6
In vitro fecal hydrogen sulfide (H_2S) production kinetics and total production at 6, 24 and 48 h of the incubated and degraded diet with the aqueous extract of *Azadirachta indica* (AZN), *Cnidoscolus angustidens* (CNA) or their combination (MIX, 1:1, vol/vol) at 0, 0.6, 1.2, and 1.8 mL/g DM incubated with fecal contents of horses.

Plant Species Extract	Extract Dose (mL/g DM)	H_2S Production Kinetics[a]			H_2S Production (mL/g DM incubated) [b]		H_2S Production (mL/g DM degraded)	
		b	c	Lag	24 h	48 h	24 h	48 h
AZN	0	398.3	0.033	5.022	0.003	0.049	0.016	0.235
	0.6	255.0	0.028	6.708	0.003	0.032	0.014	0.158
	1.2	396.7	0.028	7.014	0.004	0.079	0.021	0.433
	1.8	531.8	0.027	6.554	0.015	0.107	0.072	0.502
	Linear	0.6454	0.485	0.623	0.064	0.104	0.078	0.160
	Quadratic	0.7848	0.7799	0.649	0.276	0.962	0.373	0.678
CNA	0	398.3	0.033	5.022	0.003	0.049	0.016	0.235
	0.6	651.8	0.030	5.880	0.003	0.066	0.018	0.389
	1.2	638.0	0.032	2.931	0.002	0.035	0.010	0.166
	1.8	104.1	0.042	2.542	0.002	0.030	0.010	0.156
	Linear	0.5623	0.3364	0.2282	0.307	0.408	0.472	0.413
	Quadratic	0.3856	0.4373	0.6193	0.715	0.825	0.675	0.716
MIX	0	398.3	0.033	5.022	0.003	0.049	0.016	0.235
	0.6	170.8	0.039	2.746	0.002	0.040	0.011	0.215
	1.2	69.3	0.029	6.010	0.001	0.016	0.008	0.077
	1.8	255.8	0.125	5.275	0.002	0.034	0.008	0.164
	Linear	0.5424	0.2403	0.8825	0.195	0.430	0.225	0.412
	Quadratic	0.2205	0.4431	0.5647	0.286	0.132	0.470	0.126
SEM pooled [c]		193.83	0.0141	1.3682	0.0016	0.0151	0.0082	0.0727
P value:								
Extract		0.4174	0.4014	0.1503	0.0357	0.041	0.0536	0.0488
Dose:		0.9656	0.4489	0.982	0.2152	0.7814	0.3071	0.9045
Linear		0.6204	0.2118	0.8603	0.1608	0.556	0.1662	0.5867
Quadratic		0.9086	0.3647	0.7184	0.1636	0.4396	0.2556	0.6369
Extract × Dose		0.6057	0.6255	0.4331	0.0562	0.0539	0.0901	0.0342

Abbreviation: DM, dry matter.
[a] *b* is the asymptotic hydrogen sulfide (H_2S) production (ppm); *c* is the rate of hydrogen sulfide (H_2S) production (/h); *Lag* is the initial delay before hydrogen sulfide (H_2S) production begins (h).
[b] Production of H_2S at 6 hours (mL/g DM incubated and degraded) was zero.
[c] SEM standard error of the mean.

Table 7
In vitro fecal fermentation profile[a] and methane conversion efficiency to short chain fatty acids (CH_4: SCFA at 24 h, mmol/mmol), metabolizable energy (CH_4: ME (g/MJ)), and organic matter (CH_4:OM (mL/g)) of the dietary inclusion with different doses of *Azadirachta indica* (AZN), *Cnidoscolus angustidens* (CNA) or their combination (MIX, 1:1, vol/vol) at 0, 0.6, 1.2, and 1.8 mL/g DM incubated with fecal contents of horses.

Plant Species Extract	Extract Dose (mL/g DM)	Fecal Fermentation Profile				Methane Conversion Efficiency		
		pH	DMD%	SCFA mmol/g DM	ME, MJ/kg DM 24 h	CH_4: ME (g/MJ)	CH_4:OM (mL/g)	CH_4: SCFA at 24 h (mmol/mmol
AZN	0	6.43	5.71	39.32	6.91	3.52	0.46	0.75
	0.6	6.24	3.38	40.66	5.71	4.92	0.38	0.60
	1.2	6.05	6.06	37.06	7.09	3.60	0.49	0.83
	1.8	6.13	3.3716667	42.644	5.71	4.60	0.47	0.70
	Linear	0.4518	0.181	0.3569	0.1816	0.4668	0.9606	0.8804
	Quadratic	0.5036	0.3035	0.2199	0.3041	0.7174	0.9099	0.7548
CNA	0	6.43	5.71	39.32	6.91	3.52	0.46	0.75
	0.6	6.91	4.00	33.98	6.03	4.59	0.49	0.72
	1.2	6.84	5.06	43.38	6.58	5.02	0.62	0.98
	1.8	6.80	4.18	40.26	6.13	10.68	1.18	1.75
	Linear	0.1496	0.0409	0.8707	0.0408	0.0027	0.0128	0.028
	Quadratic	0.2889	0.8373	0.4784	0.8374	0.1905	0.341	0.4215
MIX	0	6.43	5.71	39.32	6.91	3.52	0.46	0.75
	0.6	6.89	4.40	37.02	6.24	6.97	0.78	1.17
	1.2	7.05	1.98	39.31	5.00	8.40	0.62	0.83
	1.8	6.96	4.13	42.05	6.10	5.20	0.54	0.77
	Linear	0.0532	0.1016	0.6154	0.1017	0.5598	0.819	0.9695
	Quadratic	0.1172	0.0041	0.7688	0.0041	0.1284	0.6733	0.8728
SEM pooled[b]		0.147	0.667	3.015	0.343	1.127	0.144	0.219
P value:								
Extract		0.0005	0.4276	0.958	0.4291	0.1374	0.2144	0.2807
Dose:		0.4562	0.0293	0.4755	0.0294	0.0658	0.3811	0.5727
Linear		0.246	0.009	0.4114	0.0091	0.0095	0.091	0.1841
Quadratic		0.4263	0.4399	0.8157	0.4404	0.6268	0.9011	0.8644
Extract × Dose		0.2867	0.0562	0.6961	0.0564	0.0637	0.2698	0.2745

Abbreviation: DM, dry matter.
[a] SCFA is the short chain fatty acids (mmol/g DM); DMD is the *in vitro* dry matter digestibility (%); ME is the metabolizable energy (MJ/kg DM).
[b] SEM standard error of the mean.

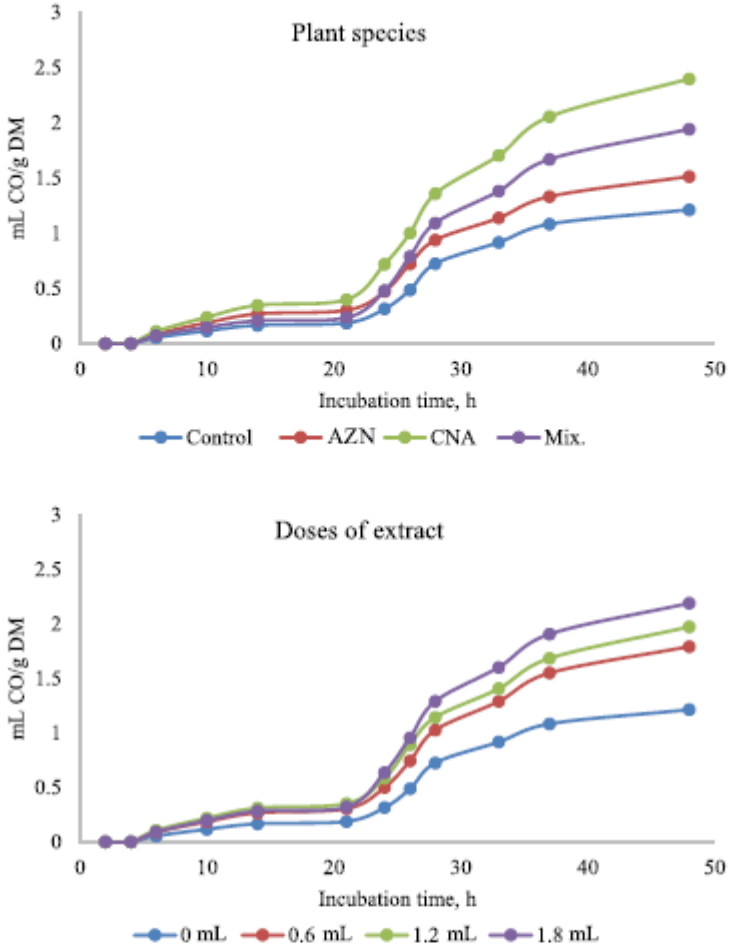


Fig. 3. Horse fecal carbon monoxide (CO) production (mL/g dry matter (DM)) at different hours of incubation as affected by the dietary inclusion with the aqueous extract of *Azadirachta indica* (AZN), *Cnidoscolus angustidens* (CNA) or their combination (MIX, 1:1, vol/vol) at 0, 0.6, 1.2, and 1.8 mL/g DM incubated with fecal contents of horses.

3.5. Fermentation Profile

Fecal pH ranged from 6.05 (in the AZN extract at 1.2 mL dose) to 7.05 (in the MIX at 1.2 mL dose). However, the solution with the AZN extracts lowered the pH at all dosages of inclusion, whereas increased pH *versus* control, was recorded for incubated substrates with the CNA and AZN: CNA mixture. The fatty acid composition of AZN may likely be responsible for the pH reduction [12]. The pH range was within the normal values (6.05–7.05), however, the range of values from 6.44 to 6.69 were reported by Chaturvedi et al [31] except for the MIX at 1.2 mL dose .

The dry matter digestibility (DMD) ranged from 1.98% (MIX at the 1.2 mL dose) to 6.06% (AZN extract at the 1.2 mL dose). The highest DMD (6.06%) was obtained in the AZN extract substrate at the 1.2 mL dose, while the least DMD (1.98%) was recorded for the MIX at the 1.2 mL dose *versus* control. Reduced DMD was recorded for the plant extracts and their combination. Only the AZN substrate at 1.2 mL dose increased DMD *versus* control.

The contents of short chain fatty acids were also species-dependent and dose-dependent and ranged from 33.98 to 43.38 mmol/g DM in all the substrates. Metabolizable energy (ME) ranged from 5.00 MJ/kg in the 1.2 mL dose in the mixture to 7.09 MJ/kg in the AZN substrate with 1.2 mL doses. Lower ME (MJ/kg DM at 24 h) was released from the incubated substrates. Apart from the AZN, 1.2 mL dose substrate, which released higher energy than the control, all other diets, irrespective of extract type and dose produced lower energy. The varying results of the fermentation profile were likely due to the essential oil, fatty acids, and plant secondary metabolites in the leaf extracts [12,32].

For the methane conversion efficiency, the CH_4:ME (g/MJ) was lowest in the AZN extract at the 1.2 mL dose. The proportion of methane to *in vitro* organic matter (CH_4: OM (mL/g) was least in the AZN extract at 0.6 mL dose. The proportion of methane to SCFA (CH_4: SCFA at 24 h mmol/mmol) was lower in the AZN extract at 0.6 mL (0.60 mmol/mmol), AZN extract at 1.8 mL dose (0.70 mmol/mmol) and the CNA extract at 0.6 mL dose

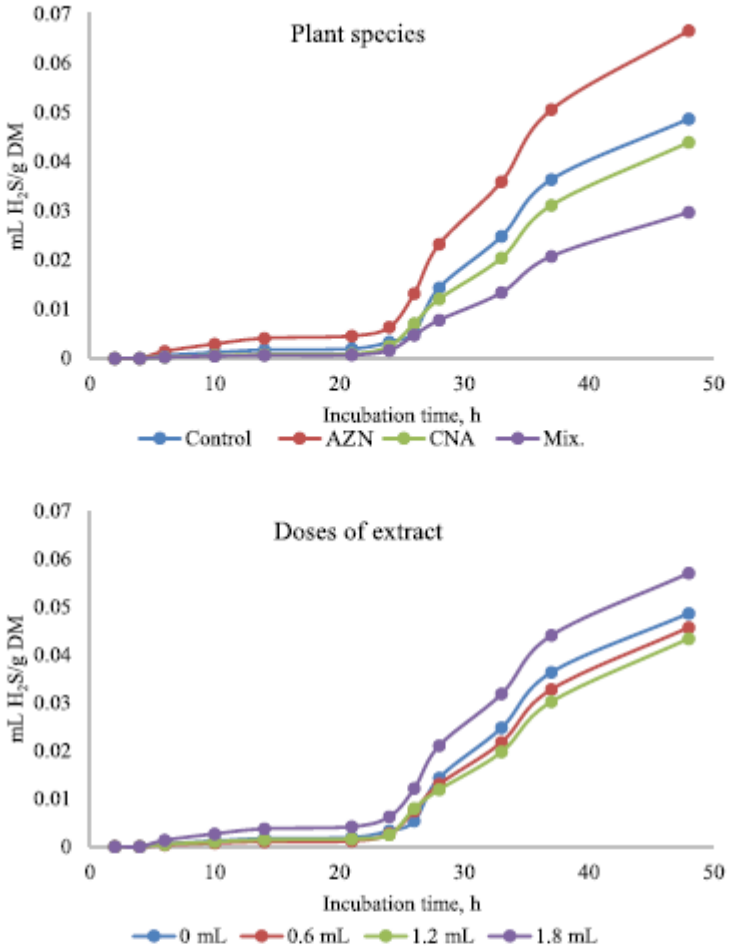


Fig. 4. Horse fecal Hydrogen sulfide (H_2S) production (mL/g dry matter (DM)) at different hours of incubation as affected by the dietary inclusion with the aqueous extract of *Azadirachta indica* (AZN), *Cnidoscolus angustidens* (CNA) or their combination (MIX, 1:1, vol/vol) at 0, 0.6, 1.2, and 1.8 mL/g DM incubated with fecal contents of horses.

(0.72 mmol/mmol) compared to the control (0.75 mmol/mmol) – (Table 7).

4. Conclusions

Aqueous extracts of *A. indica*, *C. angustidens* and their combination (MIX) presented a detected reduction in total gas production as well as the greenhouse gases production and considered as a new strategy to mitigate the greenhouse gas emissions in horses toward a clean environmental agriculture. However, varying reduction results in total gas, methane, carbon monoxide (CO) and hydrogen sulfide (H_2S) emissions, which were plant species-dependent, dose-dependent and time-dependent was obtained. Future studies, however, are warranted to confirm the current results and to investigate the effects of dietary plant supplementation for *C. angustidens*, *A. indica* and their combination on digestion and enteric greenhouse gas emissions in horses.

References

[1] EPA (United States Environmental Protection Agency) (2022). Overview of Greenhouse Gases. https://www.epa.gov/ghgemissions/overview-greenhouse-gasesff-gases. Retrieved April 16, 2022.
[2] Dogan, S. (2007). IklimDe_gis_ikli_gi"ndeTürkiye'ninAdımları. Available at: http://www.bitem.gazi.edu.tr/pdf/iklimturkiye.pdf; 2007 (in Turkish). Accessed 10/01/2016.
[3] Grossi G, Goglio P, Vitali A, Williams AG. Livestock and climate change: impact of livestock on climate and mitigation strategies. Anim Front 2019;9:69–76.
[4] Braimoh AK, Hou X, Heumesser C, Zhao YG. Greenhouse gas mitigation opportunities in agricultural landscapes: a practitioner's guide to agricultural and land resources management. Washington, DC, USA: Office of the Publisher, The World Bank; 2016.
[5] Statistical yearbook 2014: Latin America and the Caribbean food and agriculture. Vitacure, Santiago de Chile: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); 2014.
[6] Gerber PJ, Hristov AN, Henderson B, Makkar H, Oh J, Lee C, et al. Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: a review. Animal 2013;7:220–34.
[7] Fouts JQ, Honan MC, Roque BM, Tricarico JM, Kebreab E. Board invited review: enteric methane mitigation interventions. Transl Anim Sci 2022;6:txac041.

[8] Black JL, Davison TM, Box I. Methane emissions from ruminants in Australia: mitigation potential and applicability of mitigation strategies. Animals 2021;11:951.
[9] IPCC Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of working group i to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. NY, USA: Cambridge University United Kingdom and New York; 2013.
[10] Deshpande PK, Gothalwal R, Pathak AK. Phytochemical analysis and evaluation of antimalarial activity of *Azadirachta indica*. Pharm Innov 2014;3:12.
[11] Vinoth B, Manivasagaperumal R, Rajaravindran M. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Azadirachta indica* A. Juss. Int Res J Plant Sci. 2012;2:50–5.
[12] Al-Marzooqi W, Saliam SM, Alqaisi O, El-Zaiat HM. Potential of graded doses of neem (*Azadirachta indica*) seed oil on ruminal fermentation characteristics, degradability, and methane formation *in vitro*. Ann Anim Sci 2021.
[13] León-De La Luz JL, Troyo-Diéguez E, Ortega-Nieblas MM, López-Gutiérrez F. 'Caribe'(*Cnidoscolus angustidens* Torr.), a promising oilseed geophyte from north-west Mexico. J Arid Environ 1999;41:299–308.
[14] Paengkoum S, Petlum A, Purba RAP, Paengkoum P. Protein-binding affinity of various condensed tannin molecular weights from tropical leaf peel. J Appl Pharm Sci 2021;11:114–20.
[15] Purba RAP, Yuangklang C, Paengkoum P. Enhanced conjugated linoleic acid and biogas production after ruminal fermentation with *Piper betle* L. supplementation. Ciênc Rural 2020;50:e20191001.
[16] Ekanem NJ, Inyang UA, Ikowuzie K. Chemical composition, secondary metabolites and nutritive value of elephant-ear tree (*Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb): a review. Niger J Anim Prod 2022;49:277–86.
[17] Purba RAP, Yuangklang C, Paengkoum S, Paengkoum P. Milk fatty acid composition, rumen microbial population and animal performance in response to diets rich in linoleic acid supplemented with *Piper betle* leaves in Saanen goats. Anim Prod Sci 2020. doi:10.1071/AN20182.
[18] Purba RAP, Paengkoum S, Yuangklang C, Paengkoum P, Salem AZM, Liang JB. Mammary gene expressions and oxidative indicators in ruminal fluid, blood, milk, and mammary tissue of dairy goats fed a total mixed ration containing piper meal (*Piper betle* L.). Ital J Anim Sci 2022;21:129–41.
[19] Koenig KM, Ivan M, Teferedegne BT, Morgavi DP, Rode LM, Ibrahim IM, et al. Effect of dietary *Enterolobium cyclocarpum* on microbial protein flow and nutrient digestibility in sheep maintained fauna-free, with total mixed fauna or with *Entodinium caudatum* monofauna. Brit J Nutr 2007;98:504–16.
[20] Ban C, Paengkoum S, Yang S, Tian XZ, Thongpea S, Purba RAP, et al. Feeding meat goats mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) peel rich in condensed tannins, flavonoids, and cinnamic acid improves growth performance and plasma antioxidant activity under tropical conditions. J Appl Anim Res 2022;50:307–15.
[21] France J, Dijkstra J, Dhanoa MJ, López S, Bannink A. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. Br J Nutr 2000;83:143–50.
[22] Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. J Agr Sci 1979;93:217–22.
[23] Goering HK, Van Soest PJ. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). Vitacure, Santiago de Chile: US Agricultural Research Service; 1970.
[24] PROC GLM option SAS, et al. User's guide: statistics, version 9.0. Cary, NC. SAS Institute 2002;114:104021.
[25] Elghandour MMMY, Adegbeye MJ, Barbabosa-Pilego A, Perez NR, Hernández SR, Zaragoza-Bastida A, et al. Equine contribution in methane emission and its mitigation strategies. J Equine Vet Sci 2019;72:56–63.
[26] Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim Feed Sci Tech 1994;48:185–97.
[27] Akanmu AM, Hassen A, Adejoro FA. Gas production, digestibility and efficacy of stored or fresh plant extracts to reduce methane production on different substrates. Animals 2020;10:146.
[28] Garcia-Montes de Oca CA, Gonzalez-Ronquillo M, Salem AZM, Romero-Bernal J, Pedraza JF, Estrada JG. Chemical composition and *in vitro* gas production of some legume browse species in subtropical areas of Mexico. Trop Subtrop Agroecosystems 2011;14:589–95.
[29] Suong NTM, Paengkoum S, Salem AZM, Paengkoum P, Purba RAP. Silage fermentation quality, anthocyanin stability, and *in vitro* rumen fermentation characteristic of ferrous sulfate heptahydrate-treated black cane (*Saccharum sinensis* R.). Front Vet Sci. 2022;9:896270.
[30] Suong NTM, Paengkoum S, Purba RAP, Paengkoum P. Optimizing anthocyanin-rich black cane (*Saccharum sinensis* Roxb.) silage for ruminants using molasses and iron sulphate: A sustainable alternative. Fermentation 2022;8:248.
[31] Chaturvedi I, Dutta TK, Singh PK, Sharma A. Effect of combined herbal feed additives on methane, total gas production and rumen fermentation. Bioinformation 2015;11:261–6.
[32] Purba RAP, Paengkoum S, Yuangklang C, Paengkoum P. Flavonoids and their aromatic derivatives in *Piper betle* powder promote *in vitro* methane mitigation in a variety of diets. Cienc Agrotec 2020;44:e012420.
[33] Getachew G, DePeters EJ, Robinson PH. In vitro gas production provides effective method for assessing ruminant feeds. Calif Agric 2004;58:1–12.

7.2 Segundo artículo

Anthelmintic activity of extracts and bioactive compounds from *Azadirachta indica* and *Cnidoscolus angustidens* on *Strongylus* spp. in horses

Tonantzin Díaz-Alvarado[a], Yazmin Alcala-Canto[b], Mona M.M.Y. Elghandour[a], María Dolores Mariezcurrena-Berasain[c], Abdelfattah Z.M. Salem [a,*]

[a] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autonoma del Estado de Mexico, Instituto Literario Avenue, Toluca, Estado de Mexico, Mexico
[b] Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, México
[c] Facultad de Ciencias Agricolas, Universidad Autonoma del Estado de Mexico, Instituto Literario Avenue, Toluca, Estado de Mexico, Mexico

Abstract

Gastrointestinal endoparasitic diseases, particularly those caused by nematodes of the genus *Strongylus*, represent one of the main health challenges in equine production. The prolonged use of synthetic anthelmintics has led to the development of resistance, which has prompted the search for more sustainable therapeutic alternatives. In this context, plant extracts rich in secondary metabolites are emerging as a promising option. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* anthelmintic activity of aqueous extracts and bioactive compounds (total phenols and saponins) from *Azadirachta indica* and *Cnidoscolus angustidens* against L3 larvae of *Strongylus* spp. in horses. Three extracts were prepared: the first one from *Azadirachta indica*, the second one from *Cnidoscolus angustidens*, and the third one as a 1:1 (v/v) mixture thereof. These were characterized phytochemically by spectrophotometry and gas chromatography. Anthelmintic activity was evaluated by a larval inhibition assay in

ELISA plates, using two doses (1200 and 1800 µL). The results indicated that *Azadirachta indica* had the highest concentration of total phenols (22.38 mg GAE/g) and saponins (23.33 mg/g) on DM (dry mass) basis, while *Cnidoscolus angustidens* stood out for its tannin content (6.71%) and gallic acid (23.45 mg/mL). The highest larval inhibition was recorded with the total phenols of *Cnidoscolus angustidens* (85.33%), the saponins of *Azadirachta indica* (72.66%), and the crude extracts of both species (up to 84%). In contrast, the mixture of extracts showed a significant reduction in anthelmintic activity, evidencing a possible antagonistic interaction between their metabolites. These findings support the potential of *Azadirachta indica* and *Cnidoscolus angustidens* as natural sources of anthelmintic compounds for application in veterinary medicine.

Keywords: Anthelmintic activity, *Strongylus*, *Azadirachta indica*, *Cnidoscolus angustidens*, bioactive compounds.

1. Introduction

Horses have played a crucial role in human history, serving as essential companions in agriculture, transport, and warfare. Today, they continue to support rural livelihoods, especially in regions where mechanization is limited. In sport and recreation, horses contribute significantly to global economies through equestrian industries and tourism [1]. Culturally, horses symbolize strength, freedom, and tradition across many societies. Moreover, therapeutic programs involving horses offer physical and emotional benefits to people with disabilities or trauma [2].

Endoparasitic diseases represent one of the main health challenges in equine production, particularly those caused by gastrointestinal nematodes of the Strongylidae family, such as

Strongylus spp. [3]. These parasites not only affect the animal's body condition and performance but can also cause serious complications such as colic and arterial damage, compromising equine welfare. Traditionally, the control of these helminths has depended on the intensive use of synthetic anthelmintics (drugs that kill or control parasitic worms), mainly benzimidazoles, macrocyclic lactones, and pyrimidines; however, their continuous use without rotation has led to the increasing emergence of resistant strains, limiting the effectiveness of conventional treatments and requiring the development of sustainable alternatives [4, 5].

In response to this problem, plant extracts and their bioactive compounds have attracted growing interest for their potential as natural anthelmintic agents. Various plant species have shown biological properties attributable to secondary metabolites such as tannins, flavonoids, saponins, and phenols, which act by altering essential structures of the parasite, such as the cuticle, digestive system, or energy metabolism [6, 7]. Among these plants, *Azadirachta indica* (neem) and *Cnidoscolus angustidens* (mala mujer) have been reported to contain bioactive compounds that could have anthelmintic activity and are available in tropical and subtropical regions of Mexico.

The present study aimed to evaluate the *in vitro* anthelmintic activity of aqueous extracts and isolated compounds (total phenols and saponins) from *Azadirachta indica* and *Cnidoscolus angustidens* on *Strongylus* spp. in horses. The individual and combined effects of both plant species were compared, and metabolite concentrations were determined using solvent extraction and spectrophotometric techniques. This work contributes to the knowledge of phytotherapeutic alternatives in antiparasitic control, promoting integrated strategies that align with the principles of sustainability and animal health.

2. Materials and methods

This study was conducted at the Parasitology Research Laboratory of the National Autonomous University of Mexico and the Bromatology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry of the Autonomous University of the State of Mexico.

2.1 Plant material

Leaves of *Azadirachta indica* and roots of *Cnidoscolus angustidens* were collected in the municipality of Puente de Ixtla in the state of Morelos, Mexico, during August and September 2022, when the plants were considered to be in their flowering phenological stage. Five *Azadirachta indica* plants were taken and dehydrated at room temperature, and seven *Cnidoscolus angustidens* plants were sampled and dehydrated at 35 °C for 72 hours (BINDER Incubator Model FD115, Germany). Both plants were ground (Willey Mill, Model 5KH39ON5525, Mexico, with a 1 mm sieve) and finally stored at room temperature (i.e., between 22-30 °C) for later use.

2.2 Plant extracts

Three aqueous extracts were prepared, using a ratio of 1 g of plant material to 8 ml of deionized water for *Cnidoscolus angustidens* and *Azadirachta indica*. The extracts were left to macerate in amber bottles for 72 hours at room temperature (i.e., between 22-30 °C) and then filtered. Finally, a third extract was prepared by combining the two previous extracts in a 1:1 ratio.

2.3 Quantification of phenols by spectrophotometry

2.3.1 Total phenols

Total phenols were quantified using the Folin-Ciocalteu method, employing a stock solution of gallic acid at a concentration of 0.1 mg/mL (w/v). To construct the standard curve, solutions were prepared in a range from 0.1 mg/mL to 1 mg/mL. In 2.5 mL measurement vials, 75 µL of Folin-Ciocalteu reagent, 120 µL of each solution, 1.005 µL of deionized water, and 300 µL of 15% Na_2CO_3 were added and left to stand in the dark for 2 h. Subsequently, the absorbances were measured at 760 nm in a spectrophotometer, and the calibration curve was constructed with the absorbances (Y axis) against the gallic acid concentrations (X axis) [8].

2.3.2 Tannins

Tannins were determined using the method described by Doll et al. [9], which is based on the extraction of tannins and the quantification of total phenolic content (TPC) and residual phenolic content (RPC), obtaining the tannin content by the difference (TPC - RPC).

To extract tannins from the sample, an extract solution (10 mg/mL) was prepared in methanol and a mixture of 20% (w/v) gelatin with 35.9% (w/v) saturated NaCl. Subsequently, 1 g of kaolin was added to a 25 mL flask, the extract solution was added, and the gelatin-NaCl solution was admixed to complete the mixture. The mixture was stirred for 30 min to promote tannin precipitation, centrifuged at 4000 rpm for 10 min, and filtered with Whatman No. 4 paper. The supernatant was subjected to two successive dilutions with ethanol (4 mL of supernatant + 6 mL of ethanol), followed by centrifugation (4000 rpm, 15 min) and filtration. The second dilution was refrigerated (4 °C, 24 h) and then filtered to obtain the tannin-free solution. The TPC and RPC were determined using the Folin-Ciocalteu method. For TPC,

the extract was analyzed, while for RPC, the solution obtained after tannin extraction was used.

2.4 Identification of phenolic compounds by gas chromatography

This was performed using GC/MS analysis, which consists of trace gas chromatography (GC) Ultra-ISQ Mass Spectrometer (Thermo Scientific, Austin, TX, USA) with a direct TG-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness). The column oven, injector, and detector temperatures, as well as the separation and identification properties, were used as described by EL-Hefny et al. [10]. The constituents were identified based on a search of the NIST and Wiley mass spectrum libraries [11].

2.5 Extraction of total phenols and saponins by solvents

The extraction of total phenols and saponins was carried out following the method described by Salem et al. [12], based on a two-phase extraction by solvent separation. In the first phase, 100 mL of deionized water, 200 mL of extract, and 100 mL of ethyl acetate (≥99.5% purity, ACS reagent grade) were mixed in a decanting funnel attached to a universal support. The mixture was shaken for 1 minute and then left to stand for 30 minutes. After the phase separation, the upper phase was recovered and transferred to Petri dishes that had been previously weighed and dried to a constant weight, where the total phenols were found, and the lower phase was kept in the decanting funnel for the next stage of extraction.

In the second phase, 100 mL of n-butanol (≥99% purity, ACS reagent grade) was added to the lower phase, stirred again for 1 minute, and allowed to stand for 30 to 60 minutes. The upper phase obtained was carefully separated and transferred to Petri dishes that had been

previously weighed and dried to a constant weight. Subsequently, the solvents were evaporated, and the contents of the Petri dishes (total phenols and saponins) were processed by gravimetric analysis, calculating the difference in weight before and after drying. The results were expressed in milligrams per gram of dry matter (mg/g DM), and the dry sample was removed from the Petri dishes. Specimen were then stored in glass jars at room temperature for later use.

To confirm that saponins were extracted, the Salkowki test was used. This qualitative method consists of a color reaction when chloroform and sulfuric acid are added to the extracted saponins. If an orange color appears, it indicates a positive reaction [13].

To determine the doses used in the in vitro anthelmintic activity assays, the Codex Alimentarius of the FAO was used as a reference, which establishes a maximum daily intake limit for saponins of up to 500 mg/kg of body weight [14]. Based on this guideline and to ensure non-toxic conditions in the experimental model, a dose of 300 mg/kg/day was selected.

Regarding total phenols, the criteria reported by the US Pharmacopeia [15] were considered, which indicate that concentrations below 1% are within a safe margin for pharmaceutical products. For this reason, a concentration of 0.5% total phenols, extracted from the respective plant extracts, was selected for use.

Both compounds, saponins and total phenols, were dissolved in analytical-grade dimethyl sulfoxide (DMSO) for their application in *in vitro* assays, to evaluate their anthelmintic activity against L3 larvae of *Strongylus* spp.

2.6 In vitro testing of anthelmintic activity

2.6.1 Obtaining Strongylus spp. eggs and larvae

The parasite eggs were obtained rectally from five naturally infected horses, and the larvae were obtained by larval culture according to the technique described by [16]. To obtain representative data, the eggs were used within the first three hours after sampling, taking into account that sensitivity decreases as embryonation increases.

2.6.2 L3 larval inhibition assay

Strongylus spp. L3 stage larvae were obtained by larval culture from fecal samples, incubated for a period of 7 to 14 days. Subsequently, they were quantified, and their viability was evaluated, considering their morphological integrity and motility. For the bioassay, 96-well ELISA plates were used, in which approximately 200 L3 larvae were placed per well, with three replicates per treatment.

To each well, 100 µL of the plant extract in different concentrations was added (1200 µg and 1800 µg), next to a treatment with albendazole (300 µg/100 µL) as a positive control, and a negative control group without treatment. The plates were incubated at 28°C. Observations were made at 0, 24 and 48 hours post-treatment; at each time point, approximately 20 larvae per well were taken, and the inhibition of each treatment was counted.

2.7 Statistical analysis

The study was structured in two experimental phases. The first phase corresponded to the phytochemical characterization of the extracts of *Azadirachta indica*, *Cnidoscolus angustidens*, and their mixture (1:1), under a completely randomized design with a single factor (type of extract), evaluating as response variables the contents of total phenols (mg GAE/g), tannins (mg GAE/g and %), and saponins (mg/g DM), with GAE being gallic acid

equivalents. The second phase consisted of the *in vitro* evaluation of the anthelmintic activity of the crude extracts, total phenols, and saponins against L3 larvae of *Strongylus* spp., using a completely randomized 3*2 factorial design, where the factors were compound type (crude extract, total phenols, saponins) and dose (1200 µL and 1800 µL). The response variable was the percentage of larval inhibition. In both experiments, the data were subjected to normality (Shapiro-Wilk) and homoscedasticity (Levene) tests and then analyzed using ANOVA. Significant differences between means ($P \leq 0.05$) were identified using the Tukey test. Statistical analysis was performed using Statgraphics Centurion 18 (Statgraphics Technologies Inc., The Plains, Virginia, USA).

3. Results and Discussion

3.1 Phenol content of extracts from Azadirachta indica, Cnidoscolus angustidens, and their mixture

Table 1 shows the results obtained for the total phenol and tannin content in the crude extracts of *Azadirachta indica*, *Cnidoscolus angustidens*, and their mixture (1:1 v/v).

Table 1. Total phenol and tannin content in crude extracts of *Azadirachta indica*, *Cnidoscolus angustidens*, and their mixture (1:1 v/v)

Extract	**Total Phenols (mg GAE/ g)**	**Tannins (mg GAE/g)**	**Tannins (%)**
Azadirachta indica	22.38±0.63 c	0.35±0.01 a	1.58±0.08 a

Cnidocolus angustidens	5.07±0.08 a	0.34±0.03 a	6.71±0.42 c
MIX (1:1)	11.77±0.10 b	0.37±0.04 a	3.19±0.33 b

The table shows the means ± standard deviation

Letters a, b, c shows statistically significant differences (P≤0.05) vertically

Regarding total phenol content, three statistically significant groups were identified, with the highest concentration observed in *Azadirachta indica* (22.38 mg GAE/g dry matter) and the lowest in *Cnidoscolus angustidens* (5.07 mg GAE/g dry matter). These results slightly exceed those reported by Aguilar et al. [17], who, using an aqueous extract with a ratio of 1:8 (g dry matter/mL water), obtained 18.4 mg GAE/g dry matter in *Azadirachta indica*.

Using butanol as a solvent yielded a concentration of 107.3 mg GAE/g, while hexane yielded only 20.8 mg GAE/g, demonstrating the influence of the solvent on the efficiency of phenolic compound extraction [18].

Similarly, Munguía [19] evaluated the effect of infusion time on the extraction of total phenols in *Azadirachta indica* leaves at 90°C, finding that the highest yield (194.38 mg GAE/g of dry matter) was achieved after 8 minutes of infusion. Similarly, Patil et al. [20] demonstrated that variables such as particle size, extraction time and temperature, and solid-liquid ratio significantly affect the yield of total phenols. In their study, the optimal conditions included a particle size of 0.15 mm, extraction time of 60 minutes, solid-liquid ratio of 1:50 (g/mL), and temperature of 55°C, obtaining a maximum yield of 17.26 mg GAE/g of dry matter.

Various studies have shown that factors such as the type of solvent, extraction temperature, and particle size directly influence the efficiency of total phenol recovery. Patil et al. [20]

pointed out that the use of ethanol and the optimization of parameters such as the solid-liquid ratio and contact time significantly improve the yield of these compounds. Therefore, the differences observed in this study could be related to environmental conditions, the phenological stage of harvest, and the extraction parameters used.

Regarding the condensed tannin content, no statistically significant differences were observed when expressed in mg GAE/g of dry matter. However, when analyzed in percentage terms, three statistically distinct groups were identified, with *Cnidoscolus angustidens* being the species with the highest content (6.71%) and *Azadirachta indica* having the lowest (1.58%). These differences are relevant from a functional point of view, since tannins represent a subclass of total phenolic compounds and have been associated with anthelmintic effects by interfering with the integrity of the cuticle and metabolism of gastrointestinal nematodes, preventing their development and viability [21, 22].

3.2 Phenolic compounds of Azadirachta indica and Cnidoscolus angustidens

The results of the gas chromatography analysis are shown in Table 2, which shows the phenols of *Azadirachta indica* and *Cnidoscolus angustidens*.

Table 2. Phenolic compounds of *Azadirachta indica* and *Cnidoscolus angustidens*

RT (Min)	**Compounds**	***Azadirachta indica*** **(mg/mL)**	***Cnidoscolus angustidens*** **(mg/mL)**
4.20	Caffeic acid	8.66	-
5.10	Ferulic acid	6.24	0.69
7.00	Gallic acid	18.36	23.45

8.1	Chlorogenic acid	-	3.66
8.60	Syringic acid	5.04	12.47
11.00	Salicylic acid	5.72	-
12.30	Ellagic Acid	19.05	-

The characterization of phenolic compounds by gas chromatography revealed significant differences in the phytochemical composition of *Azadirachta indica* and *Cnidoscolus angustidens*. Seven phenolic acids were identified, three of which were shared by both species (gallic, ferulic, and syringic acids), while the others were unique to each plant, suggesting a functional differentiation in their bioactive profiles.

Gallic acid was the most abundant compound in both extracts, with concentrations of 23.45 mg/mL in *Cnidoscolus angustidens* and 18.36 mg/mL in *Azadirachta indica*. This compound has been widely recognized for its antioxidant, anti-inflammatory, and anthelmintic properties, particularly in the inhibition of digestive enzymes in helminths [23, 24]. The high concentration of *Cnidoscolus angustidens* could be related to its effectiveness against gastrointestinal parasites, as has been observed in studies with other extracts rich in tannins and phenolic acids [25].

On the other hand, ellagic acid, identified only in *Azadirachta indica* (19.05 mg/mL), stands out for its anti-protozoal and antiparasitic properties, as well as its potential as an immunomodulator [26]. This exclusive presence reinforces the therapeutic value of *Azadirachta indica* in veterinary applications. Likewise, salicylic acid (5.72 mg/mL), also exclusive to this species, has been linked to plant defense mechanisms and bacteriostatic effects [27].

In *Cnidoscolus angustidens*, the presence of chlorogenic acid (3.66 mg/mL) provides an additional profile with hepatoprotective and antimicrobial potential [28]. Although this compound was not identified in the *Azadirachta indica* extract, its presence in *Cnidoscolus angustidens* could complement the synergistic action of the other phenolic acids, strengthening its phytotherapeutic application.

Ferulic acid and syringic acid were detected in both species, although with marked differences in concentration. Syringic acid, in particular, was more than twice as concentrated in *Cnidoscolus angustidens* (12.47 mg/mL) compared to *Azadirachta indica* (5.04 mg/mL), which may enhance its antioxidant and anti-inflammatory capacity, as reported in other phytochemical studies [29].

These qualitative and quantitative differences in the phenolic profile between the two species reflect their metabolic and ecological adaptations, as well as their differential potential in therapeutic applications. Therefore, the diversity and concentration of these compounds support the use of *Azadirachta indica* and *Cnidoscolus angustidens* as a promising source of active ingredients for the development of phytotherapeutic strategies against gastrointestinal parasites.

3.3 Yield of total phenols and saponins using solvents

Table 3 shows the results of the extraction of total phenols and saponins using solvents from the aqueous extracts of *Azadirachta indica*, *Cnidoscolus angustidens*, and their mixture (1:1 v/v).

Table 3. Extraction of total phenols and saponins using solvents from aqueous extracts of *Azadirachta indica*, *Cnidoscolus angustidens*, and their mixture (1:1 v/v)

Extract	Total Phenols (mg/g DM)	Saponins (mg/g DM)
Azadirachta indica	16.33±0.57 b	23.33±1.15 b
Cnidocolus angustidens	8.33±0.57 a	15.66±0.57 a
Mix (1:1)	15.33±1.15 b	16.66±1.15 a

the table shows means ± standard deviation. Letters a, b, c, show statistically significant differences (P=0.05) vertically.

In the extraction of total phenols by solvents, two statistically significant groups were found where there was a higher amount in *Azadirachta indica* with 16.33 mg/g DM and lower in *Cnidoscolus angustidens* with 8.33 mg/g DM, this agrees with the results of the quantification of total phenols by spectrophotometry.

In the case of saponins, two statistically significant groups were formed where there was a higher amount of saponins in *Azadirachta indica* with 23.33 mg/g DM. Saponins, in particular, have the ability to alter helminth cell membranes, increasing their permeability and causing their lysis [30], which reinforces their potential as anthelmintic agents.

This study reinforces what has been said by authors such as [30, 31] where aqueous extracts of *Azadirachta indica* were shown to have high levels of bioactive compounds such as glucids, saponins and tannins, which contribute to their efficacy against helminths.

3.4 Anthelmintic activity of the extracts on Strongylos spp. of equines

For times 0 and 24 hours, the extracts and bioactive compounds showed no inhibitory effect on *Strongylus* spp. However, the positive control showed 57% inhibition at 24 hours and reached 99% at 48 hours. In contrast, in the negative control, the helminths remained alive during the entire observation period. The inhibitory activity of the extracts began to manifest itself after 48 hours. The corresponding results are presented in Table 4, the percentage of inhibition of the doses of the extracts and bioactive compounds of the plants *Azadirachta indica*, *Cnidoscolus angustidens* and their mixture (1:1 v/v) on *Strongylos* spp. in equines.

Table 4. Percentage inhibition of the doses of the extracts and bioactive compounds of the plants *Azadirachta indica*, *Cnidoscolus angustidens* and their mixture (1:1 v/v) on *Strongylos* spp. in horses.

Factor		**Crude extract**	**Total Phenols**	**Saponins**
Extract	Dose (µL)	%	%	%
Azadirachta	1200	77.00±1.00 by	58.33±1.52 bx	72.66±2.51 cy
indica	1800	84.00±4.00 bz	59.00±2.00 bx	71.00±1.73 cy
Cnidoscolus	1200	81.00±2.00 by	65.00±2.00 bx	69.00±1.00 cx
angustidens	1800	83.00±3.00 by	85.33±5.03 cy	70.00±1.00 cx
Mezcla (1:1)	1200	45.66±4.50 ay	52.66±1.52 ay	29.66±1.52 bx
	1800	51.33±2.08 ay	49.00±1.00 ay	19.66±1.15 ax

The table shows the means ± standard deviation.

Letters a, b, c, show statistically significant differences (P=0.05) vertically.

Letters x, y, z show statistically significant differences (P=0.05) horizontally.

The use of aqueous extracts against *Strongylos* spp. showed higher inhibition with *Azadirachta indica* and *Cnidoscolus angustidens* at a dose of 1800 µL with an inhibition of 84 and 83 %, respectively, and lower inhibition with the mixture extract at the dose of 1200 µL with 52.66%.

Regarding the use of total phenols against *Strongylos* spp. had higher inhibition *Cnidoscolus angustidens* with a dose of 1800 µL with an inhibition of 85.33 % and lower inhibition with the mixture extract at the same dose with 49%. This could be due to the fact that *Cnidoscolus angustidens* showed a higher amount of tannins, and these compounds have been reported to generate an inhibitory action on the enzymatic secretion of tyrosine kinase, nonspecific cholinesterase and esterase, which generates paralysis in parasites[32]. It is also reported that the anthelmintic action is due to the binding of tannins exerted on cuticle proteins [33].

The use of saponins against *Strongylos* spp. showed higher inhibition with *Azadirachta indica* at a dose of 1200 µL with an inhibition of 72.66 % and lower inhibition with the mixture extract at the dose of 1800 µL with 19.66%. It should be emphasized that these findings agree with the quantification of saponins by solvent extraction; the extract that had the highest amount for this compound was *Azadirachta indica*. The main action of saponins on the parasite lies in increasing the permeability of the cuticle of the parasites, causing vacuolization and death [34].

4. Conclusions

The results of this study confirm that aqueous extracts and bioactive compounds of *Azadirachta indica* and *Cnidoscolus angustidens* possess significant *in vitro* anthelmintic activity against L3 larvae of *Strongylus* spp. in equines. *Azadirachta indica* was characterized

by a high content of total phenols (22.38 mg GAE/g) and saponins (23.33 mg/g DM), while *Cnidoscolus angustidens* presented the highest percentage of condensed tannins (6.71%) and a notable concentration of gallic acid. This differential composition was reflected in the biological efficacy: total phenols from *Cnidoscolus angustidens* showed the highest larval inhibition (85.33%), followed by saponins from *Azadirachta indica* (72.66%) and crude extracts of both species (up to 84%).

However, the 1:1 mixture of the extracts evidenced a significant reduction in anthelmintic activity, suggesting an antagonistic effect between the metabolites of both plants. Taken together, these findings support the potential of *Azadirachta indica* and *Cnidoscolus angustidens* as sustainable phytotherapeutic alternatives for the control of gastrointestinal helminths in equines.

References

[1] FAO, "Modelo Mundial de Evaluación Ambiental Ganadera (GLEAM) | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura." Accessed: May 22, 2025. [Online]. Available: https://www.fao.org/gleam/en/

[2] FAO, "Équidos de trabajo en cifras: por qué los datos son importantes para las políticas | FAO." Accessed: May 22, 2025. [Online]. Available: https://www.fao.org/agroecology/database/detail/en/c/1473377/

[3] U. E. Emeto, C. C. Okolo, and N. E. Nweze, "Strongyliasis Occurs in Epidemic Proportion amongst other Nematodiasis and Cestodiasis of Horses (Equus caballus) in Obollo-Afor Southeastern Nigeria," *Veterinary Sciences: Research and Reviews*, vol. 8, no. 1, 2022, doi: 10.17582/journal.vsrr/2022.8.1.15.22.

[4] T. M. Craig, P. L. Diamond, N. S. Ferwerda, and J. A. Thompson, “Evidence of Ivermectin Resistance by Parascaris equorum on a Texas Horse Farm,” *J Equine Vet Sci*, vol. 27, no. 2, pp. 67–71, Feb. 2007, doi: 10.1016/J.JEVS.2006.12.002.

[5] C. Saumell *et al.*, “The route of administration drastically affects ivermectin activity against small strongyles in horses,” *Vet Parasitol*, vol. 236, pp. 62–67, Mar. 2017, doi: 10.1016/J.VETPAR.2017.01.025.

[6] M. I. Barrabí and J. I. Arece, “Actividad antihelmíntica in vitro de extracto acuoso de hojas y semillas de Neem (Azadirachta indica A. Juss). I. Inhibición de la eclosión de huevos y del desarrollo larvario,” *Revista de Salud Animal*, vol. 35, no. 2, pp. 103–108, 2013, Accessed: Apr. 22, 2025. [Online]. Available: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2013000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es

[7] M. M. M. Y. Elghandour *et al.*, “Moringa oleifera as a Natural Alternative for the Control of Gastrointestinal Parasites in Equines: A Review,” *Plants 2023, Vol. 12, Page 1921*, vol. 12, no. 9, p. 1921, May 2023, doi: 10.3390/PLANTS12091921.

[8] T. Alvarado, M. D. Mariezcurrena, A. Z. M. Salem, and D. L. Pinzón, “Antimicrobial and Antioxidant Activities of Two Medicinal Plants Cuphea aequipetala var. hispida (Cav.) Koehne and Eryngium comosum Delaroche F Against Bacteria Related to Equine Infections,” *J Equine Vet Sci*, vol. 94, p. 103269, Nov. 2020, doi: 10.1016/J.JEVS.2020.103269.

[9] U. Doll, I. Rodríguez, C. Soto, and I. Razmilic, “Propagación de estacas y concentración de taninos y flavonoides en hojas de dos procedencias de Ugni molinae de la región del Maule

(Chile)," *Bosque (Valdivia)*, vol. 33, no. 2, pp. 203–209, 2012, doi: 10.4067/S0717-92002012000200010.

[10] M. EL-Hefny, H. M. Ali, N. A. Ashmawy, and M. Z. M. Salem, "Chemical Composition and Bioactivity of Salvadora persica Extracts against Some Potato Bacterial Pathogens," *Bioresources*, vol. 12, no. 1, Jan. 2017, doi: 10.15376/biores.12.1.1835-1849.

[11] R. P. Adams, *Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry*, 4th Edition. Carol Stream, 2007.

[12] A. Z. M. Salem *et al.*, "Effect of natural extracts of Salix babylonica and Leucaena leucocephala on nutrient digestibility and growth performance of lambs," *Anim Feed Sci Technol*, vol. 170, no. 1–2, pp. 27–34, Nov. 2011, doi: 10.1016/J.ANIFEEDSCI.2011.08.002.

[13] D. Mac Donald, E. F. Valencia, M. Cuyos, and R. Dueñas, "Extracción, identificación y evaluación de saponinas en Agaricus Bisporus," *Biotempo*, vol. 5, pp. 3–36, Sep. 2017, doi: 10.31381/BIOTEMPO.V5I0.889.

[14] FAO, "CODEXALIMENTARIUS FAO-WHO." Accessed: Jun. 13, 2025. [Online]. Available: https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/search/es/?cx=018170620143701104933%3Aqq82jsfba7w&q=saponinas&cof=FORID%3A9

[15] US Pharmacopeia, "USPNF Site Search." Accessed: Jun. 13, 2025. [Online]. Available: https://www.uspnf.com/es/search?search=phenols+

[16] J. Figueroa, C. Jasso, E. Liébano, P. Martínez, R. Rodríguez, and J. Zárate, "Capítulo 3: Examen coproparasitoscópico ," in *Técnicas para el diagnóstico de parásitos con*

importancia en salud pública y veterinaria, Rodríguez-Vivas RI, Ed., México, DF: AMPAVE-CONASA, 2015, pp. 78–128.

[17] E. Aguilar, E. M. Marcín, M. Á. Magaña, Á. T. Piñeiro, J. F. de J. Torres, and M. Itza, "Potential of plant extracts to inhibit egg hatching and migration of Haemonchus contortus larvae," *Veterinaria México OA*, vol. 10, p. 2023, 2023, doi: 10.22201/FMVZ.24486760E.2023.1258.

[18] Z. S. Saleh and M. A. Hossain, "Biological activities of different neem leaf crude extracts used locally in Ayurvedic medicine," *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering*, vol. 18, no. 2, pp. 128–131, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.psra.2016.09.013.

[19] R. R. Munguía, "Revista Electrónica Nova Scientia Propiedades antioxidantes de infusiones de neem (Azadirachta indica) encapsuladas con proteína de soya Antioxidant properties of neem (Azdirachta indica) infusions encapsulated with soy protein," *Nova Scientia*, vol. 18, no. 1, pp. 167–185, 2017.

[20] S. S. Patil, U. B. Deshannavar, S. N. Gadekar, A. H. Gadagi, and S. A. Kadapure, "Optimization studies on batch extraction of phenolic compounds from Azadirachta indica using genetic algorithm and machine learning techniques," *Heliyon*, vol. 9, no. 11, p. e21991, Nov. 2023, doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e21991.

[21] N. Jamra, G. Das, P. Singh, and M. Haque, "Anthelmintic efficacy of crude neem (Azadirachta indica) leaf powder against bovine strongylosis," *J Parasit Dis*, vol. 39, no. 4, pp. 786–788, Dec. 2015, doi: 10.1007/S12639-014-0423-9.

[22] A. A. Sakti, K. Kustantinah, and R. W. Nurcahyo, “In Vitro and in Vivo Anthelmintic Activities of Aqueous Leaf Infusion of Azadirachta indica against Haemonchus contortus,” *Tropical Animal Science Journal*, vol. 41, no. 3, pp. 185–190, Dec. 2018, doi: 10.5398/tasj.2018.41.3.185.

[23] S. Escareño, M. A. Alonso, P. Mendoza, E. Castillo, and E. Von, “Anthelmintic-like activity of polyphenolic compounds and their interactions against the cattle nematode Cooperia punctata,” *Vet Parasitol*, vol. 274, p. 108909, Oct. 2019, doi: 10.1016/J.VETPAR.2019.08.003.

[24] N. Kahkeshani *et al.*, “Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: A mechanistic review,” *Iran J Basic Med Sci*, vol. 22, no. 3, p. 225, Mar. 2019, doi: 10.22038/IJBMS.2019.32806.7897.

[25] H. Hoste, F. Jackson, S. Athanasiadou, S. M. Thamsborg, and S. O. Hoskin, “The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants,” *Trends Parasitol*, vol. 22, no. 6, pp. 253–261, Jun. 2006, doi: 10.1016/J.PT.2006.04.004/ASSET/82CA131B-7E92-47D0-B4BA-BF6A1411762F/MAIN.ASSETS/GR1.SML.

[26] D. A. Vattem and K. Shetty, “Biological functionality of ellagic acid: A review,” *J Food Biochem*, vol. 29, no. 3, pp. 234–266, Jun. 2005, doi: 10.1111/j.1745-4514.2005.00031.x.

[27] M. Rivas and J. Plasencia, “Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development,” *J Exp Bot*, vol. 62, no. 10, pp. 3321–3338, Jun. 2011, doi: 10.1093/JXB/ERR031.

[28] S. Kang, S. Hong, J. S. Kim, H. Wang, C. Moon, and T. Shin, “Chlorogenic Acid as a Promising Therapeutic for Multiple Sclerosis: Evidence from an Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model,” *J Biol Regul Homeost Agents*, vol. 38, no. 4, pp. 3331–3344, Apr. 2024, doi: 10.23812/J.BIOL.REGUL.HOMEOST.AGENTS.20243804.264.

[29] N. F. Santos, R. Salas, B. Hernández, and C. Villanueva, “Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds,” *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*, Jan. 2019, doi: 10.5772/INTECHOPEN.83815.

[30] M. Hawsah *et al.*, “In vitro studies for the antiparasitic activities of Azadirachta indica extract,” *Food Science and Technology*, vol. 43, 2023, doi: 10.1590/fst.117122.

[31] S. Priyanka, S. Dixit, and S. Sahoo, “Phytochemical and Biochemical Characterizations from Leaf Extracts from Azadirachta Indica: An Important Medicinal Plant,” *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, vol. 06, no. 02, 2017, doi: 10.4172/2161-1009.1000323.

[32] G. E. Tresia, D. Evvyernie, and R. Tiuria, “Phytochemical Screening and in Vitro Ovicidal, Larvacidal, and Nematicidal Effects of Murraya paniculata (L.) Jack Extract on Gastrointestinal Parasites of Goats,” *Media Peternakan Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor*, vol. 39, no. 3, pp. 173–179, Dec. 2016, doi: 10.5398/medpet.2016.39.3.173.

[33] D. Kerboeuf, M. Riou, and F. Guegnard, “Flavonoids and Related Compounds in Parasitic Disease Control,” *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 8, no. 2, pp. 116–128, Feb. 2008, doi: 10.2174/138955708783498168.

[34] G.-X. Wang, J. Han, L.-W. Zhao, D.-X. Jiang, Y.-T. Liu, and X.-L. Liu, “Anthelmintic activity of steroidal saponins from Paris polyphylla,” *Phytomedicine*, vol. 17, no. 14, pp. 1102–1105, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.phymed.2010.04.012.

8. DISCUSIÓN GENERAL

La presente investigación demuestra el doble alcance de los extractos acuosos de *Azadirachta indica* y *Cnidoscolus angustidens* como agentes fitoterapéuticos sostenibles en la producción equina, evidenciando tanto su eficacia antiparasitaria contra nematodos gastrointestinales del género *Strongylus* spp. como su capacidad para mitigar emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) en condiciones *in vitro*. En ambos estudios, se observó una clara influencia de la composición fitoquímica de los extractos sobre su funcionalidad biológica. *A. indica* destacó por su elevada concentración de fenoles totales (22.38 mg Ácido Gálico /g) y saponinas (23.33 mg/g Materia Seca, mientras que *C. angustidens* presentó una proporción superior de taninos condensados (6.71%), metabolitos ampliamente asociados a efectos antiparasitarios.

En cuanto a la actividad antihelmíntica, los extractos crudos de ambas especies mostraron una alta eficacia (84% y 83% de inhibición larvaria a 1800 µL para *A. indica* y *C. angustidens*, respectivamente). Además, se evidenció que los fenoles aislados de *C. angustidens* superaron en eficacia a los de *A. indica* (85.33% vs. 59%), lo cual sugiere que la potencia biológica depende no sólo de la concentración global de metabolitos, sino también de su especificidad estructural. Por otro lado, las saponinas de *A. indica* también demostraron una fuerte inhibición larvaria (72.66%), confirmando su rol en la disrupción de membranas celulares de helmintos. No obstante, la combinación de ambos extractos resultó en una menor eficacia antiparasitaria, lo que sugiere posibles interacciones antagónicas entre sus metabolitos.

Desde la perspectiva ambiental, los extractos también mostraron un efecto positivo en la reducción de gases nocivos generados por la fermentación fecal equina. La suplementación

con *A. indica*, *C. angustidens* o su mezcla (MIX) produjo una reducción significativa y dependiente de la dosis de metano (CH_4), monóxido de carbono (CO) y sulfuro de hidrógeno (H_2S), alcanzando reducciones de hasta 61.82% para CH_4, 16.78% para CO y 67.23% para H_2S en sustratos degradados. Estos efectos se relacionan directamente con la presencia de metabolitos secundarios como taninos, fenoles y aceites esenciales, los cuales interfieren con la microbiota metanogénica, modificando las rutas fermentativas y promoviendo la producción de ácidos grasos volátiles de forma eficiente.

Ambas líneas de evidencia subrayan el valor estratégico de emplear extractos vegetales en la alimentación equina, no sólo como alternativa al uso de antihelmínticos sintéticos, sino también como una herramienta de mitigación del impacto ambiental del sector pecuario. Los resultados obtenidos respaldan la hipótesis de que *A. indica* y *C. angustidens*, gracias a su riqueza en compuestos bioactivos, pueden integrarse en programas de manejo sostenible equino, contribuyendo simultáneamente al control parasitario y a la reducción de emisiones contaminantes sin comprometer los procesos fermentativos normales del animal.

9. CONCLUSIONES

Los hallazgos de este estudio confirman que los extractos acuosos de *Azadirachta indica* y *Cnidoscolus angustidens* contienen perfiles fitoquímicos diferenciados con alta concentración de metabolitos secundarios con actividad biológica relevante, particularmente frente a *Strongylus spp.* y en la modulación de gases de efecto invernadero en equinos. En la caracterización fitoquímica, *A. indica* presentó contenidos más altos de fenoles totales (22.38 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra), flavonoides (5.62 mg equivalentes de quercetina/g), y saponinas (23.33 mg/g materia seca), mientras que *C. angustidens* mostró mayor concentración de taninos condensados (6.71%). Estos metabolitos han sido asociados con efectos antiparasitarios por alteraciones en la permeabilidad cuticular y desbalance osmótico en nematodos. Los bioensayos in vitro confirmaron una inhibición larval superior al 84% para los extractos de *A. indica* y del 85.33% para los fenoles de *C. angustidens*, indicando un efecto específico de estos compuestos sobre la viabilidad de *Strongylus spp.*. Adicionalmente, en el modelo in vitro de fermentación fecal equina, ambos extractos redujeron significativamente la producción de CH_4 (hasta 61.82%), CO (hasta 16.78%) y H_2S (hasta 67.35%), en función dosis-tiempo, sin alterar el pH fisiológico, y mejorando el perfil de ácidos grasos de cadena corta, a pesar de una disminución moderada en la digestibilidad de materia seca. La mezcla 1:1 de ambos extractos no mostró sinergia ni para la acción antihelmíntica ni para la reducción de gases, indicando posibles antagonismos entre metabolitos. En conjunto, estos resultados validan la hipótesis de trabajo, demostrando que *A. indica* y *C. angustidens* son fuentes prometedoras de metabolitos bioactivos aplicables en la mitigación ambiental y el control parasitario en sistemas equinos sustentables,

representando una estrategia agroecológica viable frente a la resistencia farmacológica y el cambio climático.

10. BIBLIOGRAFÍA

Alami, M. M., Guo, S., Mei, Z., Yang, G., Wang, X., Alami, M. M., Guo, S., Mei, Z., Yang, G., & Wang, X. (2024). Environmental factors on secondary metabolism in medicinal plants exploring accelerating factors. *Medicinal Plant Biology 2024 1:E016*, *3*(1), 0–0. https://doi.org/10.48130/MPB-0024-0016

Alvarado, T. D., Elghandour, M. M. M. Y., Ekanem, N. J., Alcala-Canto, Y., Velázquez, A. E., Pacheco, E. B. F., Purba, R. A. P., & Salem, A. Z. M. (2022). Influence of Azadirachta indica and Cnidoscolus angustidens Dietary Extracts on Equine Fecal Greenhouse Gas Emissions. *Journal of Equine Veterinary Science*, *116*, 104049. https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2022.104049

Alvarado, T. D., Mariezcurrena Berasain, M. D., Salem, A. Z. M., & Pinzón Martínez, D. L. (2020). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Two Medicinal Plants Cuphea aequipetala var. hispida (Cav.) Koehne and Eryngium comosum Delaroche F Against Bacteria Related to Equine Infections. *Journal of Equine Veterinary Science*, *94*, 103269. https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2020.103269

Ávalos, A., & Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. In *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal* (Vol. 2, Issue 3, pp. 119–145). Ana G. Moreno. https://hdl.handle.net/20.500.14352/50406

Azwanida, N. N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, *04*(03). https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196

Barrabí, M. I., & Arece, J. I. (2013). Actividad antihelmíntica in vitro de extracto acuoso de hojas y semillas de Neem (Azadirachta indica A. Juss). I. Inhibición de la eclosión de huevos y del desarrollo larvario. *Revista de Salud Animal*, *35*(2), 103–108. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2013000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Bianchi, M. V., Mello, L. S. de, Wentz, M. F., Panziera, W., Soares, J. F., Sonne, L., Driemeier, D., & Pavarini, S. P. (2019). Fatal parasite-induced enteritis and typhlocolitis in horses in Southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology : Orgao Oficial Do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, *28*(3), 443–450. https://doi.org/10.1590/S1984-29612019056

Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Walter, P., & Weber, P. (2009). Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, *25*(11–12), 1202–1205. https://doi.org/10.1016/J.NUT.2009.04.023

Bihon, A., Amognehegn, D., Derbew, G., & Yirsa, T. (2025). Working equines: Assessment of welfare and management practices in and around Debre Markos District, Northwest Ethiopia. *Equine Veterinary Journal*. https://doi.org/10.1111/EVJ.14497;WGROUP:STRING:PUBLICATION

Braga, T. M., Rocha, L., Chung, T. Y., Oliveira, R. F., Pinho, C., Oliveira, A. I., Morgado, J., & Cruz, A. (2021). Azadirachta indica A. Juss. In Vivo Toxicity—An Updated Review. *Molecules*, *26*(2), 252. https://doi.org/10.3390/MOLECULES26020252

Castellanos, C. I., Velendia, R. J., Gonzalez, M. A., Varela, D. A., & Ramírez, E. (2018). *APLICACIONES Y GENERALIDADES DE UN ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS UV-1800 DE SHIMADZU*.

Craig, T. M., Diamond, P. L., Ferwerda, N. S., & Thompson, J. A. (2007). Evidence of Ivermectin Resistance by Parascaris equorum on a Texas Horse Farm. *Journal of Equine Veterinary Science*, *27*(2), 67–71. https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2006.12.002

Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M. P., & Utzinger, J. (2010). FLOTAC: New multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nature Protocols*, *5*(3), 503–515. https://doi.org/10.1038/NPROT.2009.235;SUBJMETA=1647,2230,326,417,631;KWRD=ISOLATION

Cruz, M., & Del Ángel, R. (2004). *El árbol de nim: establecimiento y aprovechamiento en la Huasteca Potosina* (INIFAP-CIRNE, Vol. 3).

Das, A. K., Islam, M. N., Faruk, M. O., Ashaduzzaman, M., & Dungani, R. (2020). Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities. *South African Journal of Botany*, *135*, 58–70. https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2020.08.008

Dewick, P. M. (2009). Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition*, 1–539. https://doi.org/10.1002/9780470742761;WGROUP:STRING:PUBLICATION

Dixon, R. A., & Sarnala, S. (2020). Proanthocyanidin Biosynthesis—a Matter of Protection. *Plant Physiology*, *184*(2), 579. https://doi.org/10.1104/PP.20.00973

Doll, U., Rodríguez, I., Soto, C., & Razmilic, I. (2012). Propagación de estacas y concentración de taninos y flavonoides en hojas de dos procedencias de Ugni molinae de la región del Maule (Chile). *Bosque (Valdivia)*, *33*(2), 203–209. https://doi.org/10.4067/S0717-92002012000200010

Donald, D. Mac, Valencia, E. F., Cuyos, M., & Dueñas, R. (2017). Extracción, identificación y evaluación de saponinas en Agaricus Bisporus. *Biotempo*, *5*, 3–36. https://doi.org/10.31381/BIOTEMPO.V5I0.889

Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J. K., & Kaplan, I. (2013). Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist*, *198*(1), 16–32. https://doi.org/10.1111/NPH.12145;WGROUP:STRING:PUBLICATION

Eguale, T., Tadesse, D., & Giday, M. (2011). In vitro anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of Haemonchus contortus. *Journal of Ethnopharmacology*, *137*(1), 108–113. https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.063

Elghandour, M. M. M. Y., Acosta-Lozano, N., Alvarado, T. D., Castillo-Lopez, E., Cipriano-Salazar, M., Barros-Rodríguez, M., Inyang, U. A., Purba, R. A. P., & Salem, A. Z. M. (2023). Influence of Azadirachta indica and Cnidoscolus angustidens aqueous extract on cattle ruminal gas production and degradability in vitro. *Frontiers in Veterinary Science*, *10*, 1090729. https://doi.org/10.3389/FVETS.2023.1090729/BIBTEX

Elghandour, M. M. M. Y., Maggiolino, A., Vázquez-Mendoza, P., Alvarado-Ramírez, E. R., Cedillo-Monroy, J., De Palo, P., & Salem, A. Z. M. (2023). Moringa oleifera as a Natural

Alternative for the Control of Gastrointestinal Parasites in Equines: A Review. *Plants 2023, Vol. 12, Page 1921*, *12*(9), 1921. https://doi.org/10.3390/PLANTS12091921

Emeto, U. E., Okolo, C. C., & Nweze, N. E. (2022). Strongyliasis Occurs in Epidemic Proportion amongst other Nematodiasis and Cestodiasis of Horses (Equus caballus) in Obollo-Afor Southeastern Nigeria. *Veterinary Sciences: Research and Reviews*, *8*(1). https://doi.org/10.17582/journal.vsrr/2022.8.1.15.22

ESCCAP. (2018). *Guía para el tratamiento y control de las infecciones por parásitos gastrointestinales de los équidos 8*.

FAO. (2013). *Manual de agricultura climáticamente inteligente | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. https://www.fao.org/climate-smart-agriculture-sourcebook/production-resources/module-b2-livestock/b2-overview/en/

FAO. (2023). *Équidos de trabajo en cifras: por qué los datos son importantes para las políticas | FAO*. https://www.fao.org/agroecology/database/detail/en/c/1473377/

FAO. (2024). *Modelo Mundial de Evaluación Ambiental Ganadera (GLEAM) | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. https://www.fao.org/gleam/en/

Fernández, R., Villarroel, A., Cuamo, L., & Storaci, V. (2016). Evaluación de un sistema de regeneración por embriogénesis somática de Neem (Azadirachta indica). *Acta Biológica Colombiana*, *21*(3), 581. https://doi.org/10.15446/abc.v21n3.52626

France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M. S., Lopez, S., & Bannink, A. (2000). Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: Derivation of models and other mathematical considerations. *British Journal of Nutrition*, *83*(2), 143–150. https://doi.org/10.1017/S0007114500000180

Getachew, G., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2002). Tropical browses: contents of phenolic compounds, in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. *The Journal of Agricultural Science*, *139*(3), 341–352. https://doi.org/10.1017/S0021859602002393

Goering, H., & Van Soest, P. (1970). *Aparatos para el análisis de fibra de forrajes, reactivos, procedimientos y algunas aplicaciones. Manual Agrícola USDA-ARS 379, Washington D. C. - Referencias - Publicaciones de Investigación Científica*. https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=1878643

Gonçalves, S., & Romano, A. (2018). Production of Plant Secondary Metabolites by Using Biotechnological Tools. In *Secondary Metabolites - Sources and Applications*. InTech. https://doi.org/10.5772/intechopen.76414

Greening, L., & McBride, S. (2022). A Review of Equine Sleep: Implications for Equine Welfare. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*, 916737. https://doi.org/10.3389/FVETS.2022.916737/XML/NLM

Guerriero, G., Berni, R., Muñoz-Sanchez, J. A., Apone, F., Abdel-Salam, E. M., Qahtan, A. A., Alatar, A. A., Cantini, C., Cai, G., Hausman, J. F., Siddiqui, K. S., Hernández-Sotomayor, S. M. T., & Faisal, M. (2018). Production of Plant Secondary Metabolites:

Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. *Genes*, *9*(6). https://doi.org/10.3390/GENES9060309

Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Guimarães, M. C. C., Endringer, D. C., Fronza, M., & Scherer, R. (2019). Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(13). https://doi.org/10.3390/MOLECULES24132471

Gupta, S. C., Prasad, S., Tyagi, A. K., Kunnumakkara, A. B., & Aggarwal, B. B. (2017). Neem (Azadirachta indica): An indian traditional panacea with modern molecular basis. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, *34*, 14–20. https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2017.07.001

Hautala, K., Näreaho, A., Kauppinen, O., Nielsen, M. K., Sukura, A., & Rajala-Schultz, P. J. (2019). Risk factors for equine intestinal parasite infections and reduced efficacy of pyrantel embonate against Parascaris sp. *Veterinary Parasitology*, *273*, 52–59. https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2019.08.004

Holdsworth, P. A., Vercruysse, J., Rehbein, S., Peter, R. J., Letonja, T., & Green, P. (2006). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of ectoparasiticides against biting lice, sucking lice and sheep keds on ruminants. *Veterinary Parasitology*, *136*(1), 45–54. https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2005.11.008

Holmes, T. Q. ;, Brown, A. F., Mclean, A., Holmes, T. Q., & Brown, A. F. (2022). Champing at the Bit for Improvements: A Review of Equine Welfare in Equestrian Sports in the

United Kingdom. *Animals 2022, Vol. 12, Page 1186*, *12*(9), 1186. https://doi.org/10.3390/ANI12091186

Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S. M., & Hoskin, S. O. (2006). The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*, *22*(6), 253–261. https://doi.org/10.1016/J.PT.2006.04.004/ASSET/82CA131B-7E92-47D0-B4BA-BF6A1411762F/MAIN.ASSETS/GR1.SML

IBUNAM. (2025). *Cnidoscolus angustidens Torr.* https://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:452484

INEGI. (2022). *Estimación de las emisiones de gases de efecto invernadero provenientes del ganado en México, 1990-2018 – REALIDAD, DATOS Y ESPACIO REVISTA INTERNACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA*. https://rde.inegi.org.mx/index.php/2022/01/03/estimacion-de-las-emisiones-de-gases-de-efecto-invernadero-provenientes-del-ganado-en-mexico-1990-2018/

Isah, T., & Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*, *52*(1), 39. https://doi.org/10.1186/S40659-019-0246-3

Islas, J. F., Acosta, E., G-Buentello, Z., Delgado-Gallegos, J. L., Moreno-Treviño, M. G., Escalante, B., & Moreno-Cuevas, J. E. (2020). An overview of Neem (Azadirachta indica) and its potential impact on health. *Journal of Functional Foods*, *74*, 104171. https://doi.org/10.1016/J.JFF.2020.104171

Jones, W. P., & Kinghorn, A. D. (2012). Extraction of plant secondary metabolites. *Methods in Molecular Biology*, *864*, 341–366. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_13,

Kadir, M. F., Bin Sayeed, M. S., & Mia, M. M. K. (2012). Ethnopharmacological survey of medicinal plants used by indigenous and tribal people in Rangamati, Bangladesh. *Journal of Ethnopharmacology*, *144*(3), 627–637. https://doi.org/10.1016/J.JEP.2012.10.003

Kaggwa, B., Kyeyune, H., Munanura, E. I., Anywar, G., Lutoti, S., Aber, J., Bagoloire, L. K., Weisheit, A., Tolo, C. U., Kamba, P. F., & Ogwang, P. E. (2022). Safety and Efficacy of Medicinal Plants Used to Manufacture Herbal Products with Regulatory Approval in Uganda: A Cross-Sectional Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, *2022*. https://doi.org/10.1155/2022/1304839

Kaplan, R. M. (2020). Biology, Epidemiology, Diagnosis, and Management of Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematodes of Livestock. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, *36*(1), 17–30. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.12.001

Khayri, J. M., Mascarenhas, R., Harish, H. M., Gowda, Y., Lakshmaiah, V. V., Nagella, P., Al-Mssallem, M. Q., Alessa, F. M., Almaghasla, M. I., & Rezk, A. A. S. (2023). Stilbenes, a Versatile Class of Natural Metabolites for Inflammation—An Overview. *Molecules*, *28*(9), 3786. https://doi.org/10.3390/MOLECULES28093786

Larsen, M. M., Lendal, S., Chriél, M., Olsen, S. N., & Bjørn, H. (2002). Risk factors for high endoparasitic burden and the efficiency of a single anthelmintic treatment of Danish

horses. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *43*(2), 99–106. https://doi.org/10.1186/1751-0147-43-99,

Love, S. (2003). Treatment and prevention of intestinal parasite-associated disease. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, *19*(3), 791–806. https://doi.org/10.1016/J.CVEQ.2003.08.003

Lustre, H. (2022). Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. *Revista Digital Universitaria*, *23*(2). https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2022.23.2.10

Makkar, H. P. S., Francis, G., & Becker, K. (2007). Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *Animal*, *1*(9), 1371–1391. https://doi.org/10.1017/S1751731107000298

Mańkowska, A., & Witkowska, D. (2024). The Most Common Environmental Risk Factors for Equine Asthma—A Narrative Review. *Animals*, *14*(14), 2062. https://doi.org/10.3390/ani14142062

Martín, D. A. (2018). Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, *9*(1), 81–104. https://doi.org/10.22490/21456453.1968

Mateus, J. F., Sergio, ;, Díaz, A., Juliet, A., Pedroza, M., Costa, M., & Díaz, A. (2023). Effect of biotic and abiotic factors on the content of flavonoids in leaves of Passiflora sp. L.:

A systematic review. *Scientia Agropecuaria*, *14*(4), 465–478. https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2023.039

Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., & Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *The Journal of Agricultural Science*, *93*(1), 217–222. https://doi.org/10.1017/S0021859600086305

Nielsen, M. K. (2012). Sustainable equine parasite control: Perspectives and research needs. *Veterinary Parasitology*, *185*(1), 32–44. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.012

Nielsen, M. K., Pfister, K., & Von Samson-Himmelstjerna, G. (2014). Selective therapy in equine parasite control—Application and limitations. *Veterinary Parasitology*, *202*(3–4), 95–103. https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2014.03.020

Nortjie, E., Basitere, M., Moyo, D., & Nyamukamba, P. (2022). Extraction Methods, Quantitative and Qualitative Phytochemical Screening of Medicinal Plants for Antimicrobial Textiles: A Review. *Plants*, *11*(15), 2011. https://doi.org/10.3390/PLANTS11152011

OCDE. (2001). *Directrices de la OCDE para el ensayo de sustancias químicas, Sección 4 | OCDE*. https://www.oecd.org/en/publications/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4_20745788.html

Oliva, M., León, Z., Alarcón, W. N., Ramírez, J. M., & Rodríguez, C. S. (2021). Eficacia de antiparasitarios orales en el tratamiento y control de nematodos gastrointestinales en equinos. *TAYACAJA*, *4*(1), 145–155. https://doi.org/10.46908/tayacaja.v4i1.160

Olivas, F. J., Wall, A., González, G. A., López, J., Álvarez, E., De La Rosa, L. A., & Ramos, A. (2015). Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutr Hosp*, *31*(1), 55–66. https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.7699

OMS. (2020). *Resistencia a los antibióticos*. https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance

Pant, P., Pandey, S., & Dall'Acqua, S. (2021). The Influence of Environmental Conditions on Secondary Metabolites in Medicinal Plants: A Literature Review. *Chemistry and Biodiversity*, *18*(11). https://doi.org/10.1002/CBDV.202100345,

Patil, S. S., Deshannavar, U. B., Gadekar-Shinde, S. N., Gadagi, A. H., & Kadapure, S. A. (2023). Optimization studies on batch extraction of phenolic compounds from Azadirachta indica using genetic algorithm and machine learning techniques. *Heliyon*, *9*(11), e21991. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21991

Peñarrieta, J. M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). PHENOLIC COMPOUNDS IN FOOD ‡. *Bolivian Journal of Chemistry*, *31*(2), 68–81. http://www.bolivianchemistryjournal.org,http://www.scribd.com/bolivianjournalofchemistry

Rahmani, A., Almatroudi, A., Alrumaihi, F., & Khan, A. (2018). Pharmacological and therapeutic potential of neem (Azadirachta indica). *Pharmacognosy Reviews*, *12*(24), 250. https://doi.org/10.4103/phrev.phrev_8_18

Rioja, F. C., Connor, M., Bacon, H., & Dwyer, C. M. (2020). Determining a Welfare Prioritization for Horses Using a Delphi Method. *Animals*, *10*(4), 647. https://doi.org/10.3390/ani10040647

Roberts, M. F., Strack, D., & Wink, M. (2010). Biosynthesis of Alkaloids and Betalains. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism: Second Edition*, *40*, 20–91. https://doi.org/10.1002/9781444320503.CH2;CTYPE:STRING:BOOK

Saeed, M. A., Beveridge, I., Abbas, G., Beasley, A., Bauquier, J., Wilkes, E., Jacobson, C., Hughes, K. J., El-Hage, C., O'Handley, R., Hurley, J., Cudmore, L., Carrigan, P., Walter, L., Tennent-Brown, B., Nielsen, M. K., & Jabbar, A. (2019). Systematic review of gastrointestinal nematodes of horses from Australia. *Parasites and Vectors*, *12*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/S13071-019-3445-4/TABLES/3

Salem, A. Z. M., Olivares, M., Lopez, S., Gonzalez-Ronquillo, M., Rojo, R., Camacho, L. M., Cerrillo, S. M. A., & Mejia, H. P. (2011). Effect of natural extracts of Salix babylonica and Leucaena leucocephala on nutrient digestibility and growth performance of lambs. *Animal Feed Science and Technology*, *170*(1–2), 27–34. https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2011.08.002

Sarkar, S., Singh, R. P., & Bhattacharya, G. (2021). Exploring the role of Azadirachta indica (neem) and its active compounds in the regulation of biological pathways: an update on molecular approach. *3 Biotech*, *11*(4). https://doi.org/10.1007/S13205-021-02745-4

Saumell, C., Lifschitz, A., Baroni, R., Fusé, L., Bistoletti, M., Sagües, F., Bruno, S., Alvarez, G., Lanusse, C., & Alvarez, L. (2017). The route of administration drastically affects ivermectin activity against small strongyles in horses. *Veterinary Parasitology*, *236*, 62–67. https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2017.01.025

Sharma, K., Kumar, V., Kaur, J., Tanwar, B., Goyal, A., Sharma, R., Gat, Y., & Kumar, A. (2021). Health effects, sources, utilization and safety of tannins: a critical review. *Toxin Reviews*, *40*(4), 432–444. https://doi.org/10.1080/15569543.2019.1662813

Shewale, S., & Rathod, V. K. (2018). Extraction of total phenolic content from Azadirachta indica or (neem) leaves: Kinetics study. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *48*(4), 312–320. https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1431784

Singh, R., Kharsyntiew, B., Sharma, P., Sahoo, U. K., Sarangi, P. K., Prus, P., & Imbrea, F. (2023). The Effect of Production and Post-Harvest Processing Practices on Quality Attributes in Centella asiatica (L.) Urban—A Review. *Agronomy 2023, Vol. 13, Page 1999*, *13*(8), 1999. https://doi.org/10.3390/AGRONOMY13081999

Spiegler, V., Liebau, E., & Hensel, A. (2017). Medicinal plant extracts and plant-derived polyphenols with anthelmintic activity against intestinal nematodes. *Natural Product Reports*, *34*(6), 627–643. https://doi.org/10.1039/C6NP00126B,

Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2016). Veterinary helminthology: Superfamily Filarioidea. *Veterinary Parasitology*, *4th edition*, 666–668. https://www.researchgate.net/publication/289505102_Veterinary_Parasitology_Fourth_Edition

The Brooke. (2024). *Datos sobre équidos de trabajo | Brooke*. https://www.thebrooke.org/our-work/data-working-equids

Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, *48*(3–4), 185–197. https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6

Tiwari, S., & Talreja, S. (2022). Thin Layer Chromatography (TLC) VS. Paper Chromatography: A Review. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*, 05–09. https://doi.org/10.31080/ASPS.2022.06.0894

Troyo, E., León, J. L., & Ortega, M. M. (1999). *Fenología y usos potenciales de Cnidoscolus angustidens Torr. del semidesierto del sur de Baja California, México*. https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19990700421

Vega, C. (2014). Identificación de metabolitos bioactivos de Neem (Azadirachta indica Adr. Juss.). *La Calera*, *14*(23), 60–66. https://doi.org/10.5377/CALERA.V14I23.2659

World Health Organization. (2011). *Quality control methods for herbal materials*.

Zaragoza, J. M., García, G. M., Independiente, I., Beatriz, M., Salmerón, G., & Cardeño, Y. C. (2024). Evaluación de las Propiedades Químicas y Funcionales, Actividad Antioxidante y Cuantificación de Flavonoides de la Pulpa de Yaca Liofilizada (Artocarpus Heterophyllus). *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, *8*(2), 5142–5159. https://doi.org/10.37811/CL_RCM.V8I2.10930

Zárate, W., González, S., Ramírez, F., Robledo, A., & Juárez, A. (2021). Efecto de los ácidos fenólicos en el sistema antioxidante de plantas de tomate (Solanum lycopersicum Mill.). *Agronomía Mesoamericana, ISSN-e 2215-3608, ISSN 1021-7444, Vol. 32, Nº. 3, 2021, Págs. 854-868*, *32*(3), 854–868. https://doi.org/10.15517/am.v32i3.45101