UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE PLANTAS EN LA NUTRICIÓN Y SALUD DE ANIMALES HERVIBOROS

TESIS

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

PRESENTA:

ARMANDO MANGLORIO PARRA GARCÍA

Toluca, Estado de México, Junio de 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE PLANTAS EN LA NUTRICIÓN Y SALUD DE ANIMALES HERVIBOROS

TESIS

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

PRESENTA:

ARMANDO MANGLORIO PARRA GARCÍA

COMITÉ TUTORIAL

TUTOR ACADÉMICO.
DR. ABDELFATTAH ZEIDAN MOHAMED SALEM

TUTORES ADJUNTOS.

DRA. MONA MOHAMED MOHAMEED YASSEEN ELGHANDOUR

DR. ALBERTO BARBABOSA PLIEGO

Toluca, Estado de México, Junio de 2019

RESUMEN

Para la nutrición animal, existe una gran variedad de plantas y árboles de los cuales poco se habían estudiado: Y por ello en varias universidades como la Universidad Autónoma del Estado de México se tienen varios proyectos de investigación de interés científico; por ejemplo: en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia se han hecho estudios *in vitro* de extractos de plantas en las siguientes especies: Sauce *(Salix Babylonica),* Moringa *(Moringa oleífera)*, Neem *(Azadirachta indica)*.

La adaptación de árboles, arbustos y plantas puede incrementar la producción animal y disminuir la emisión de gases de efecto invernadero, mejorar las características físicas, químicas y biológicas de los suelos, incrementar la biodiversidad de flora y fauna, mantener las fuentes de agua potable. Las propiedades medicinales y alimenticias de árboles y plantas también mejoran la salud de los animales herbívoros, lo que se comprobó en estudios *in vivo* donde se usó el extracto de Neem como desparasitante.

El experimento1 *in vitro*: consistió en evaluar el comportamiento del Sauce (*Salix babylonica*), en una dieta de equinos donde se incluye harina de nopal en la medición de la producción de gas. Los resultados del primer experimento *in vitro* mostraron que la harina de nopal tiene una potencial eficiencia de fermentación; el perfil de fermentación es superior al del grano de maíz; se puede usar incluso para reemplazar otras fuentes de energía (por ejemplo, maíz, cebada y sorgo) en las dietas de rumiantes. La *Salix Babylonica* tiene la ventaja que se adapta a todos los climas y altitudes donde haya humedad.

En el experimento *2 in vitro***:** se estudiaron los efectos del extracto de hoja de *Moringa oleífera* sobre la producción de metano ruminal y la producción de dióxido de carbono y la cinética de fermentación en un novillo. Como resultado se obtuvo que el reemplazo de grano de maíz por cáscaras de soya (residuo agrícola) en presencia de extracto de *Moringa oleífera* (hojas) podría mejorar las emisiones de gases de efecto invernadero y mejorar la digestión de bovinos.

El experimento 3 se realizó *in vivo*: y se hizo la evaluación de extractos de hojas Neem, (*Azadirachta Indica)* en el comportamiento de la carga parasitaria en ovinos. EL extracto que se preparó fue en una proporción de 1 kilogramo de hojas secas de Neem en 8 litros de agua. Con una dosis de 20 y 40 ml se tiene mejor respuesta con 40 ml de extracto de Neem, se les administró la dosis en la mañana, cada tercer día a ovejas gestantes. Aún cuando la literatura dice que el Neem es abortivo, esta dosis es segura y no se tuvo ningún problema de aborto.

En México se tiene el potencial para sembrar el nopal en varios climas y altitudes, pero desafortunadamente no ha llegado el conocimiento a los campesinos y/o productores. En Etiopía plantaron el nopal mexicano, *Opuntia ficus-Indica* a finales del siglo XlX, para usarlo como forraje en rumiantes y como política sembraron 30,520 hectáreas. En nuestro país se ha despreciado su uso y solo por necesidad lo come el ganado en los estados áridos del norte de la república. En los estados del Sureste de México ni siquiera se tiene sembrado, a pesar de que algunos ranchos tienen grandes extensiones esto es, porque se desconoce su uso benéfico para la nutrición del ganado, por lo que se sugiere fomentar la siembra y uso del nopal con el apoyo de la investigación científica, para la nutrición del ganado.

Ventajas en el uso del nopal para la dieta de los animales.

Los resultados del primer experimento *in vitro* mostraron que la harina de nopal tiene una potencial eficiencia de fermentación; el perfil de fermentación es superior al del grano de maíz. Y se puede usar para reemplazar otras fuentes de energía (por ejemplo, maíz, cebada y sorgo) en las dietas de rumiantes.

Usar el Neem como desparasitante en ovinos tiene grandes ventajas y ahorros.

1.- En primer lugar: es muy fácil su preparación ya que aprovechando la solubilidad de los compuestos del Neem se puede realizar el extracto sin ningún problema.

2.- En segundo lugar es un árbol que se puede sembrar en regiones tropicales y subtropicales, lo que permitirá disponer del desparasitante de Neem sin tener que viajar a los lugares donde los venden, disminuyendo su costo.

3.- Se recomienda sembrar dos árboles de Neem por hectárea para suplir las necesidades.

4.- Además los parásitos no hacen resistencia al extracto de Neem.

5.- No contamina el ambiente.

*Dentro de los productos finales de esta investigación es elaborar un pequeño manual o folleto de cómo usar las hojas de los árboles, motivo de la investigación (el sauce *Salix Babylonica*, la moringa *Moringa oleífera*, Neem *Azadirachta indica)*, para ser usados como: recursos forrajeros y medicinales.

PALABRAS CLAVE: Sauce *(Salix Babylonica),* Moringa *(Moringa oleífera)*, Neem *(Azadirachta indica)*.

ABSTRAC

For animal nutrition, there is a great variety of plants and trees of which little has been studied. And for that reason in several universities like the Autonomous University of the State of Mexico (UAEMex) there are several research projects of scientific interest; for example: in the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science have been done *in vitro* studies of plant extracts in the following species: Willow (*Salix Babylonica*), Moringa (*Moringa oleifera*), Neem (*Azadirachta indica*).

The adaptation of trees, shrubs and plants can increase animal production and reduce the emission of greenhouse gases, improve the physical, chemical and biological characteristics of soils, increase the biodiversity of flora and fauna, maintain sources of drinking water. The medicinal and nutritional properties of trees and plants also improve the health of herbivorous animals, what was proven in *in vivo* studies where Neem extract was used as a dewormer.

The experiment1 *in vitro*: consisted in evaluating the behavior of the willow (*Salix babylonica*), in an equine diet where cactus flour is included in the measurement of gas production. The results of the first *in vitro* experiment showed that nopal flour has a potential fermentation efficiency; the fermentation profile is superior to that of the corn grain; and it can be used to replace other sources of energy (for example, corn, barley and sorghum) in ruminant diets. The *Salix Babylonica* has the advantage that it adapts to all climates and altitudes where there is humidity.

In experiment 2 *in vitro*: the effects of *Moringa oleifera* leaf extract on the production of ruminal methane were studied and the production of carbon dioxide and the kinetics of fermentation in a steer. As a result it was obtained that the replacement of corn grain by soybean husks (agricultural residue) in the presence of *Moringa oleifera* extract (leaves) could improve greenhouse gas emissions and improve the digestion of bovines.

Experiment 3 was carried out *in vivo*: and the evaluation of Neem leaf extracts (*Azadirachta Indica*) was done in the behavior of the parasite load in sheep. The extract that was prepared was in a proportion of 1 kg of dried leaves of Neem in 8 liters of water. With a dose of 20 and 40 ml, better response is obtained with 40 ml of Neem extract, they were administered the dose in the morning, every third

day to pregnant sheep. Even when literature says that Neem is abortive, this dose is safe and there was no abortion problem.

In Mexico there is the potential to plant nopal in several climates and altitudes, but unfortunately knowledge has not reached the farmers and / or producers. In Ethiopia they planted the Mexican cactus, *Opuntia ficus*-Indica at the end of the 19th century, to use it as forage in ruminants and as a policy they planted 30,520 hectares. In our country its use has been disregarded and it is only out of necessity that cattle eat it in the arid states of the north of the republic. In the states of Southeast Mexico, it is not even planted, although some ranches have large extensions, that is, because its beneficial use for livestock nutrition is unknown, so it is suggested to promote the planting and use of cactus with the support of scientific research, for livestock nutrition.

Advantages in the use of cactus for the diet of animals

The results of the first *in vitro* experiment showed that nopal flour has potential fermentation efficiency; the fermentation profile is superior to that of the corn kernel. And it can be used to replace other energy sources (eg, corn, barley and sorghum) in ruminant diets.

Using Neem as a dewormer in sheep has great advantages and savings.

1.- In the first place: it is very easy to prepare it since, taking advantage of the solubility of the Neem compounds, the extract can be made without any problem.

2.- Second, it is a tree that can be planted in tropical and subtropical regions, this will allow the Neem dewormer to be available without having to travel to the places where they are sold, reducing their cost.

3.- It is recommended to plant two Neem trees per hectare to meet the needs.

4.- In addition, the parasites do not resist the Neem extract.

5.- It does not pollute the environment.

Within the final products of this research is to develop a small manual or leaflet on how to use the leaves of trees, the reason for the research (*Salix Babylonica*

willow, *Moringa oleifera* moringa, *Azadirachta indica* Neem), to be used as: forage and medicinal resources.

KEY WORDS: Willow *(Salix Babylonica),* Moringa *(Moringa oleífera)*, Neem *(Azadirachta indica)*.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS iii

DEDICATORIAS v

RESUMEN vi

ABSTRAC ix

ÍNDICE DE TABLAS xiv

ÍNDICE DE FIGURAS xv

I. INTRODUCCION 1

II. REVISION DE LITERATURA 3

2.1 Extractos Vegetales. 3

2.2 Procesos de extracción 7

2.3 descripción de las especies 8

2.4 Metabolitos secundarios y carga parasitaria en rumiantes. 39

3. JUSTIFICACION 43

HIPÓTESIS 44

OBJETIVO GENERAL 45

OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 45

MATERIALES Y MÉTODOS 46

EXPERIMENTO 1: *in vitro* 46

EXPERIMENTO 2: *in vitro* 50

EXPERIMENTO 3: *in vivo* 52

RESULTADOS 58

Evaluación de extracto de Neem sobre la carga parasitaria y bioquimica sanguinea de ovinos. 84

REFERENCIAS 92

VIII. DISCUSIÓN 95

CONCLUSIONES 99

X. LITERATURA CITADA 101

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química y degradación de Leucaena leucocepha 9
Tabla 2. Contenido de nutrientes en hojas verdes de Moringa Oleifera 15
Tabla 3. Contenido de nutrientes en la semilla de Moringa Oleifera..... 16
Tabla 4. Contenido de aminoácidos en las hojas secas de Moringa Oleifera... 17
Tabla 5. Características Biológicas del Azadirachta indica..... 21
Tabla 6. Enfermedades que el Azadirachta indica puede corregir o prevenir... 26
Tabla 7. Contenido de nutrientes en hojas de Morus alba..... 29
Tabla 8. Contenido de nutrientes de Gliricidia sepium..... 31
Tabla 9. Composición química de Cnidoscolus chayamansa..... 33
Tabla 10.Contenido nutricional de Manihot esculenta 36
Tabla 11.Composición de la dieta experimental para el in vitro con el extracto de Salix babilonica..... 47
Tabla 12.Composición de la dieta experimental para el in vitro con extracto de Moringa Oleifera 51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formula estructural del isopreno 6
Figura 2. Estructura de la Vitamina A 7
Figura 3. Huaje usado en cerca (Agua Dulce, Ver.) 8
Figura 4.Sauce o llorón (Metepec, Edo. de México). 11
Figura 5. Síntesis de Aspirina 12
Figura 6. Moringa a tres meses de siembra (Agua Dulce, Ver.) 13
Figura 7. Cama de secado de hojas de Moringa 14
Figura 8. Árbol de Neem 19
Figura 9. Características del árbol de Neem (Agua dulce, Ver.) 20
Figura 10. Sintesis de Nimboloide 27
Figura 11. Estructura de Nimboloide 30
Figura 12. Mora (Metepec Edo. de México) 28
Figura 13 Cocoite en cercas (Agua Dulce, Ver.) 30
Figura 14. Chaya en cercas (Agua Dulce, Ver:) 33
Figura 15. Yuca (Agua Dulce, Ver.) 35
Figura 16. Guamuchil (Agua Dulce, Ver.) 37
Figura 17. Guacimo en Cercas de alambre (Agua Dulce, Ver.) 38
Figura 18. Vertiendo y filtrando el rumen en el laboratorio de bromatología 48
Figura 19. Equipo para medir la presión de gas 49
Figura 20. Frasco con bolsa para filtrado del residuo 49
Figura 21. Posta de la facultad de veterinaria de la UAEMex 53
Figura 22. 0vinas del experimento marcadas 53
Figura 23. Recolección de heces de las ovinas obtenidas del ano 56
Figura 24. Microscopio usado para observar los huevecillos 57

I. INTRODUCCION

El concepto de extracto, se refiere al producto obtenido por concentración de una disolución de sustancias vegetales. Sirve para denominar el extenso y variado conjunto de especies botánicas que forman las plantas medicinales, aromáticas y condimentarías. Buscando las sustancias o principios activos, con propiedades químicas, bioquímicas u organolépticas muy específicas.

El empleo de extractos vegetales para el control de plagas, medicamentos para la salud y nutrición del ganado, constituye una alternativa para una agricultura sostenible debido a su efectividad, bajo costo y no ser contaminantes del medio ambiente. Aproximadamente 3000 compuestos naturales de origen vegetal han sido reportados que tienen propiedades bactericidas, fungicidas, insecticidas, repelente de insectos y nematicidas (Regnault, 2004; Obledo *et al*., 2004; Kagale *et al*., 2004). Otro investigador también argumenta que las plantas y sus derivados tienen efectos controladores contra ácaros, roedores, nematodos, bacterias, virus, hongos e insectos (Grainge y Ahmeds, 1988).

Los aditivos basados en extractos de plantas son considerados como una alternativa para sustituir los antibióticos, promotores de crecimiento, desde el punto de vista técnico y económico. Los extractos de plantas han sido usados como medicamentos en humanos en la historia de la medicina humana, pero su uso en animales es relativamente reciente (Kamel, 2000).

Esto ha hecho valorar el aprovechamiento de varias especies de plantas, árboles nativos y, otros árboles que se han adaptado al clima y suelo en las regiones subtropicales del país con el objetivo de disponer forrajes complementarios de alta proteína. En México se tienen muchos lugares de siembra desperdiciados, en ocasiones árido que no responden a la siembras de temporal por la falta de lluvias sin embargo es factible sembrar árboles con propiedades nutricionales, medicinales con propiedades forrajeras sobre todo para la época de estiaje. Pudiendo ser posible hasta para ser usado en un sistema silvopastoril. Donde no tan solo sirvan para mejorar la nutrición del ganado sino también para mejorar su salud por sus propiedades medicinales por ejemplo desparasitarías (Palma *et al*., 1995; Jiménez *et al*., 2011).

Con la finalidad de disponer de alimentos o complemento alimenticio de más calidad con menor costo que los alimentos comerciales, así como en el uso de plantas o árboles con propiedades alimenticias o medicinales, que puedan ser producidos en las tierras subtropicales, se probó con diferentes especies.

Por ejemplo: el follaje de la *Moringa oleífera* que tiene altas propiedades nutricionales y medicinales, se reporta que tienen hasta un 30 % de proteínas sus hojas secas, con alto contenido de calcio (>20mg/g de hoja seca), vitamina C, hierro, Potasio, actividad antioxidante por su contenido de polifenoles. Su consumo mejora la nutrición e incrementa la respuesta inmune por su contenido de micronutrientes y fenoles, promueve la productividad animal, e incrementa la cantidad de leche, modifica el perfil positivo de ácidos grasos.

Existen otra especies de plantas y arbustos que por sus propiedades pueden ser aprovechados en la nutrición y/o mejoramiento de la salud del ganado, en este este estudio nos centramos en las siguientes especies: Sauce (*Salix babylonica)*, Neem (*Azadirachta indica*) y*,* Moringa (*Moringa oleífera)*, Cocoite (*Gliricidia septium)*, Morera,(*Morus alba),* Chaya (*Cnidoscolus chayamansa),* Yuca (*Manihot esculenta)* mandioca, tapioca, guacamote del náhuatl *cuauhcamohtli* en México, Guamúchil *(Pithecellobium dulce*).

El objetivo de este estudio es: evaluar el comportamiento *in vitro* de hojas de árboles en líquido ruminal de diferentes rumiantes, así como también valorar el comportamiento de las especies vegetales como antihelmíntico.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 Extractos Vegetales.

Los extractos de origen vegetal han sido utilizados desde la antigüedad por los hindúes, chinos, griegos y romanos, con fines insecticidas y conservación de víveres almacenados. Durante muchos siglos, las formulaciones basadas en las plantas se utilizaron para combatir los insectos plaga. En el siglo XIX se utilizaban como fitosanitarios moléculas de origen vegetal, pero fueron sustituidos por pesticidas de síntesis química como el diclorodifeniltricloroetano, organoclorados, organosfosforados y carbamatos. En las últimas décadas, se han intensificado los estudios de plantas en su parte química, con énfasis en los extractos de plantas (metabolitos secundarios), los cuales están implicados en el control biológico contra plagas, y en ciertos casos activando procesos de defensa de la planta y brindando una protección preventiva (Kagale *et al*., 2004). Los metabolitos secundarios aparentemente no tienen una función directa en el metabolismo primario pero sí tienen una respuesta directa como defensa contra herbívoros, virus, hongos, bacterias, como sustancias alelopáticas, fitoalexina o disuasorios nutritivos (Bourgaud *et al*., 2001). Otros compuestos tienen otra función fisiológica, por ejemplo: los alcaloides, las pectinas que pueden servir para el transporte de nitrógeno tóxico y compuestos de almacenamiento, por ejemplo los compuestos fenólicos como los flavonoides realizan la función de protectores contra los rayos ultravioletas (Wink, 2007).

Los metabolitos secundarios contenidos en los extractos de plantas, protegen a las plantas de organismos patógenos, sirven de defensa frente a otras plantas y otros procesos abióticos, que causan estrés como son la desecación y la radiación ultravioleta (Briskin, 2000). La mayoría de estos derivados de isopropenos, flavonoides y glucosinatos, son una fuente importante de principios activos de medicamentos y de valiosos productos químicos (Goossens *et al*., 2003). Existe un alto porcentaje el 44% de medicamentos de productos naturales en el mundo (Haq, 2004), y los países desarrollados cada vez hacen más investigación (Hostettmann *et al*. (2000). La importancia de los productos naturales es muy alta ya que aproximadamente el 60% de compuestos anticancerígenos son de plantas y el 75% de medicamentos contra

enfermedades infecciosas se obtienen de las plantas (Cragg y Newman, 2005). Los glucósidos cianogénicos, son los metabolitos secundarios con mayores funciones de defensa en las plantas (Bennett y Wallsgrove, 1994).

Existen varios extractos obtenidos de plantas (metabolitos secundarios) como: los alcaloides aislados de *Physostigmatis semina* que se usan para contraer la pupila, o los alcaloides aislados de Atropa belladona que la dilatan; glucósidos cardíacos de la especie *Strophantus* reguladores del corazón; del genero *Salix* la aspirina derivado del ácido salicílico, usada como analgésico y para prevenir infartos y trombos.

También las propiedades de la mayor parte de las especies, condimentos, infusiones y bebidas como el café, el té y el chocolate, aromas, saborizantes y estimulantes se les atribuyen a metabolitos secundarios, como los alcaloides cafeína, teofilina, teobromina (Anaya y Espinoza, 2006).

Los compuestos secundarios (metabolitos secundarios) obtenidos de los extractos de las plantas, se dividen en tres categorías (Chinou, 2008).

1).- Los terpenos, son polímeros de unidades de isoprenos y esteroides (Sarin, 2005) y se dividen en seis grupos: monoterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, sesquiterpenos y esteroles (carotenos, glucósidos, cardiotónicos, taxol.) (Shilpa *et al*., 2010).

2).- En compuestos fenólicos se tienen: cumarinas, flavonoides y taninos, tienen aplicaciones médicas como analgésicos antibacterianos, antihepatotóxicos, antioxidantes, inmunoestimulantes, antitumorales.

Los compuestos fenólicos se encuentran en frutas y verduras, por lo que en los últimos años se ha insistido en un consumo abundante de estos productos naturales. Altas ingestas de frutas y verduras están asociadas con el mantenimiento de la salud y la prevención de enfermedades (Gurib, 2006).

3).- Entre los compuestos nitrogenados están los alcaloides y glucósidos cianogénicos. Los alcaloides tienen aproximadamente 4000 estructuras conocidas. Algunos con un gran efecto en humanos por ejemplo (cocaína, nicotina, morfina) por tal motivo hay una gran investigación en sus propiedades farmacológicas (Sajc *et al*., 2000).

Se han clasificados de acuerdo a su aplicación. Por ejemplo:

1. Los alcaloides ajmalicina, atropina, vincristina, vinblastina, berberina, codeina, reserpina, nicotina, camptotecina), cardenólidos (digitoxina, digoxina); diterpenos (paclitaxel).
2. Saborizantes como el estevióside, y flavonoides como la quinina.
3. Productos utilizados como pigmentos y en la perfumería como los antocianinos, betalinos, el aceite de rosas y de jazmín.
4. Productos utilizados con fines químicos y agroquímicos como proteasas, vitaminas, lípidos, aceites, látex (Ramachandra y Ravishankar 2002).

La composición química de los extractos de plantas es muy variada, con efectos bactericidas y bacteriostáticos que pueden llegar a ser selectivos.

Los animales alimentados con raciones ricas de almidón y proteína de calidad, se llega a fermentar rápido causando acidosis ruminal. La descomposición de la proteína produce amoniaco y aumenta las excreciones de nitrógeno, dejando de contribuir a las necesidades de nutrición de animales, por lo que para aumentar el tiempo de degradación de la proteína ruminal, se usan antibióticos como aditivo en alimentos para disminuir las bacterias que actúan rápidamente para fermentar la proteína. Sin embargo los antibióticos dejaban residuos nocivos para el humano (Hoffman *et al*., 2003). En Europa, enero del 2006, se prohibió el uso antibióticos como aditivo en alimentos de animales.

Lo que originó que se incrementara la investigación de aditivos naturales, como los extractos de plantas que disminuyen, la fermentación microbiana en el rumen, se menciona, las saponinas que destruyen los hongos y bacterias que pueden causar fermentación (Hoffman *et al*., 2003), así mismo disminuyen los protozoarios del rumen, aumentan la eficiencia del alimento y mejoran la nutrición animal (Kita *et al*., 1996; Newbold *et al*., 1997).

Las saponinas son compuestos naturales que se encuentran en algunas plantas y tienen propiedades similares a los jabones y detergentes. Tienen sabor amargo, y forman espumas con el agua (Cheeke, 1995).

Los extractos de plantas pueden usarse como antimicrobianos, antioxidantes, y como saborizantes. Además para disminuir el metano CH_4 y bióxido de carbono CO_2 (Makkar *et al*., 1998).

Aceites esenciales.

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios obtenidos de extractos de plantas que originan el olor y color de las plantas (Helander *et al*., 1998: Wenk., 2000). Los aceites esenciales tienen propiedades aromáticas, fungicidas y antimicrobianas por lo que se usan cada vez más en la alimentación animal.

Los aceites son mezclas que contienen muchas sustancias químicas diferentes, de acuerdo a la composición química, el aceite tendrá un sabor y olor característico que puede estimular el apetito. Por ejemplo la cascara de cacao.

El isopreno (Figura 1) es un compuesto orgánico que está presente en los aceites esenciales con formula química C_5H_8 isopreno o 2 – metil -1, 3 – butadieno

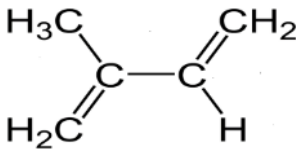


Figura 1. Formula estructurada del isopreno

Los terpentenos son los principales constituyentes de los aceites esenciales de plantas y flores como el naranjo y limonero. Se originan por la polimerización de dos o más unidades de isopreno unidas de muchas formas, estos lípidos son sintetizados por las plantas, los terpentenos forman parte de la clorofila y las hormonas giberelina y ácido abscísico, están presentes en los aromas y sabores de las plantas (Goodwin, 1971)

Un ejemplo de terpenos es la Vitamina A (Figura 2) presente en la zanahoria y menos conocido en la moringa.

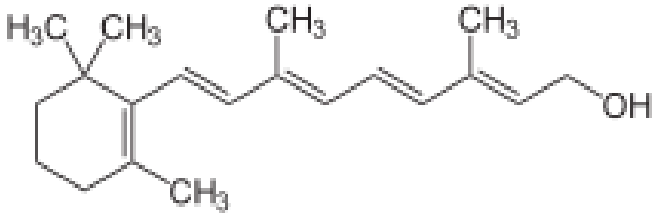


Figura 2. Estructura de la vitamina A

2.2 Procesos de extracción

Para obtener las sustancias activas de una planta o de un árbol se usa un solvente que puede ser agua o solventes orgánicos en frio a temperatura baja o alta, dependiendo sus propiedades solubles del extracto (Stashenko y Combariza, 1998; Gil, 2000; Callejas, 2002).

Extracción con agua

a) La extracción con agua se puede realizar mediante los siguientes mecanismos:

a.1) La infusión es un proceso en el cual el material vegetal es molido al que se le agrega agua (fría o caliente), vino, vinagre, se aplica a productos vegetales en los que los principios activos pueden cambiar por la temperatura a ebullición.

a.2) La decocción o (tisana), es un proceso en el que el material (hojas, corteza o raíz), se hierve al menos por 15 minutos, de preferencia en trozos finos para mayor superficie de contacto, y así extraer los productos solubles que contiene.

b) Extracción con solventes orgánicos: Maceración, lixiviación, percolación, extracción Soxhlet, digestión y por fluido supercrítico.

b.1) La maceración es una extracción en la cual se fragmenta el material vegetal y se remoja en un solvente que puede ser etanol o agua y se realiza temperatura ambiente, en largos periodos de extracción; el agua puede producir mohos. El tiempo depende de la solubilidad del soluto que pude ser desde un día o más.

b. 2) La lixiviación se realiza con solventes orgánicos en frío para preservar compuestos termolábiles en el soluto que con la temperatura se degradan.

b.3) Extracción con fluidos supercríticos; en este proceso se usa el poder disolvente de fluidos a temperaturas y presiones por encima de sus valores críticos.

b.4) La extracción Soxhlet, es un método en el cual se usan solventes con puntos de ebullición bajos, para evitar que los compuestos de las plantas se degraden.

b.5) La digestión es un proceso que se lleva en caliente, en temperaturas no mayores a 50 grados centígrados.

2.3 descripción de las especies

Huaje o guaje (*Leucaena leucocephala*)

Figura 3. Huaje usado en Cerca

La *Leucaena* es un árbol caducifolio o perennifolio de 3 a 6 m (hasta 12 m) de altura, copa redondeada, hojas alternas verdes grisáceas, tronco retorcido, desarrolla muchas ramas, corteza externa lisa a ligeramente fisurada gris-negruzca, flores blancas, su fruto, son vainas oblongadas verdes cuando son tiernas y cafés cuando maduran, conteniendo de 15 a 30 semillas con raíz profunda y extendida. Su sexualidad es hermafrodita (Zárate, 1987).

Este árbol es una especie de amplia distribución en las regiones tropicales y subtropicales del país (Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Oaxaca, Colima, Durango, Guerrero, Jalisco, Edo. De México, Michoacán, Morelos, Coahuila, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Veracruz, Yucatán). Originaria de América Tropical, aparentemente del sur de México (Yucatán). Se extiende de México hasta Nicaragua, incluyendo Guatemala,

Honduras y el Salvador. Los españoles lo llevaron a Filipinas y desde ahí fue introducido a Indonesia, Malasia, Nueva Guinea y sureste de Asia.

También prospera en ambientes adversos, se adapta a las tierras bajas, crece desde sitios secos con 350 mm/año hasta húmedos con 2300 mm/año y temperatura media anual de 22 a 30°C. Es necesario un periodo seco de 4 a 6 meses. Crece en amplia variedad de suelos, desde neutros hasta alcalinos. Suelos ácidos no son recomendables. La altura indicada en la literatura de 0 a 900 metros no es de todo precisa (Zárate, 1987). Ya que hay lugares en Puebla que están a 1650 metros y ahí se cultiva muy bien el guaje rojo.

Tabla 1. Composición química y degradación de *Leucaena leucocephala* (Cruz, 1999).

	Composición química (%)			Degradación (%)	
Especies	PC	FDN	FDA	MS	PC
L. collinsii	29.8	43.7	29.4	72.3	77.8
L. lanceolata	22.3	40.0	27.3	69.6	51.5
L. macrophyllaneisonii	24.9	43.7	31.2	61.2	37.3
L. Pallida	23.7	37.7	26.6	58.4	26.0
L. leucocephala	25.6	31.7	21.9	80.3	52.2
L. leucocephala glabrata	21.1	35.2	22.7	74.6	46.7
L. esculenta paniculta	24.5	36.8	24.9	69.8	37.0

PC = Proteína Cruda, FDN = Fibra detergente neutra, FDA = Fibra detergente ácida, MS Materia seca.

La *Leucaena leucocepha* es una especie investigada (Tabla 1) y utilizada en los sistemas agroforestales a nivel mundial. Debido a su distribución, cultivo y que se ha usado en todo el mundo, se tiene una gran cantidad de nombres particulares en cada localidad; es más conocida en el Sureste de Asia y en África que en Mesoamérica. Actualmente esta especie es estudiada en la Universidad Autónoma del Edo. de México (Hernández *et al*., 2013).

Las hojas y semillas contienen un aminoácido (mimosina) cuya ingesta en grandes cantidades puede producir daños en los mamíferos no rumiantes y aves de corral. Se recomienda que no pase del 30% en la dieta de rumiantes en base

seca. Se ha observado que donde es nativo el Guaje, la mimosina no está presente (Sosa *et al*., 1999).

En África se han desarrollado más de 100 variedades en diferentes climas y suelos, haciendo una clasificación de tres tipos: hawaiano, peruano y salvadoreño.

En estado de Veracruz se sembró hace 10 años *Leucaena leucocepha,* (Figura 3) procedente del estado de México (guaje verde) y (rojo) del estado de Puebla, se sembraron con la finalidad evaluar si se adaptaban al suelo y clima tropical, además de tener semillas para consumo animal y humano. Durante estos años se observó que la especie verde se ha desarrollado sin problema; la especie roja crece bien en clima seco, pero en clima tropical fue atacada por hongos. Lo que abre vertientes nuevas de investigación para identificar las sustancias químicas que protegen a la especie verde.

En el estado de Yucatán y Michoacán se han sembrado parcelas para bancos forrajeros, se tiene la intención de sembrar un banco forrajero de *Leucaena leucocepha,* en el rancho Lucero de la tarde. Puede dejarse como árbol para que se use como cerca viva y arbusto para forraje. Sin perder de vista su aplicación agrosilvícola; frecuentemente se encuentra sembrado en el huerto familiar mezclado con cultivos agrícolas. En las regiones donde se cultiva, la semilla es muy cotizada para la gastronomía, sirve como desparasitante en humanos, los tallos tiernos son consumidos para mitigar el hambre (Benítez *et al,* 2010).

La *Leucaena leucocepha* ha sido uno de los arboles iniciadores del presente proyecto de estudio y el cual ha servido de modelo para considerar otras especies.

Sauce o llorón (*Salix babylonica*)

En el estado de México él árbol del sauce es más conocido como llorón (Figura 4). Es un árbol que pertenece a la familia de las salicáceas llega a una altura de hasta 12 metros, se multiplica por esquejes o injertos, florece en invierno y crece en forma silvestre, se encuentra en el estado de México en Veracruz crece en la zona costera, y en los estados de Tabasco y Chiapas. En el estado de México se ha ido extinguiendo debido a que muchas poblaciones se han convertido en

lugares urbanos, acabando en buena parte con la flora silvestre, como es el caso del sauce o llorón. Se usa para cercas en los potreros, para sombra y leña. Antes del auge del petróleo fue usado para obtener la aspirina (Cedillo *et. al*., 2015).

Es un árbol longevo que puede vivir hasta sesenta años, florece en invierno, se puede sembrar como cortina rompevientos, para retener el suelo y la humedad. Tiene alta necesidad de riego y se encuentra desde el nivel de mar hasta altura de más de 2000 metros sobre el nivel de mar, en el área de Toluca se encuentra ampliamente distribuido sobre una altura de 2667 metros.

Figura 4. Sauce o llorón en Metepec

En varios estados del país como Oaxaca, Guerrero, Michoacán, estado de México, y Jalisco se usa la madera para canastos y huacales por las propiedades de la madera que al secarse no se abre, tiene flexibilidad y resistencia. Desafortunadamente se corta pero poco se siembra a pesar de que puede ser reproducido por esquejes. Lo que ha llevado en el estado de México a que cada día se disminuya su población sobre todo en las manchas urbanas (Niembro, 1986).

Se ha encontrado en sedimentos de muestras fósiles hojas de salicáceas *Salix* y Populus de la época del Oligoceno en el área de Tepexi de Rodríguez, Puebla (Ramírez *et al*., 2000). Sin embargo en esa zona geográfica ya se ha extinguido, por lo que urge que se inicie la reforestación.

Propiedades médicas.

Las infusiones de la corteza del sauce se usa como antinflamatorio, para bajar la fiebre y contra las reumas, su compuesto es el ácido salicílico.

En 1758 el R.P anglicano Edward Stone, después de sufrir un ataque de reuma acompañado de fiebre, por casualidad empezó a masticar un trozo de sauce blanco (*salís alba*), su sabor era amargo, sorprendido alivio su dolor (Goodman y Gilman, 1995). A partir de ese momento planeo la forma para sacar y pulverizar la corteza, así como encontrar la dosis ideal (García *et al*., 1985), sin embargo fue ignorado. En 1835 el químico alemán Karl Jacob Lowig, elaboró un ácido con el extracto de las hojas, al que llamo ¨spisaure¨, más tarde ácido salicílico cuya estructura molecular fue descubierta en 1853 por Kar Friedrich Gerhardt profesor de la Universidad de Montepellier Francia, quien trato de quitarle efectos secundarios como la irritación que provocaba en el estómago, pero como empleo mucho tiempo en la investigación la abandono. Fue hasta 1895 que Felix Hoffman para aliviar la artritis de su padre modifico la estructura del ácido salicílico transformándola en ácido acetilsalicílico (Cedillo *et. al*., 2015).

En 1899 Hoffman y Dreser le asignaron el nombre de ¨Aspirina¨, la ä¨de acetil, ¨spir¨ por Spirea, familia a la que pertenece la planta, e ïna¨, para completar el nombre.

Actualmente la aspirina se produce sintéticamente a partir de fenol o bien de ácido salicílico con anhídrido acético (Figura 5) bajo un proceso químico propuesto por Herman Kolbe.

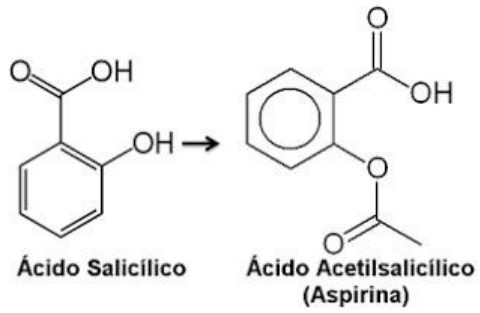


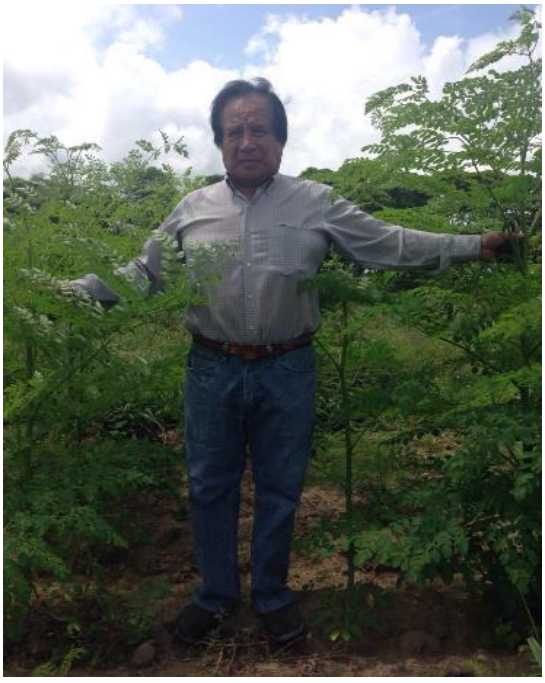
Figura 5. Síntesis de Aspirina (Jeffreys, 2008)

La *Salix babylonica* contiene el principio activo de la salicina, para su obtención son utilizadas la corteza y sus hojas secas para evitar la formación de caspa y evitar la caída del pelo. Se pone a hervir por 10 minutos, 30 g en un litro de agua. (Juscafresa, 1995).

Otro uso de la plantación del *Salix* es que se puede usar como recurso forrajero. Aparte de las propiedades medicinales se puede aprovechar la madera y otra bondad de este árbol que se encuentra en zonas tropicales a nivel del mar y en zonas altas y frías como en el área de Toluca México. Por lo cual este árbol puede ser aprovechado sin límite geográfico y está al alcance de todos los productores de ganado o de los que requieran usar este árbol, además de que puede ser plantado a cualquier altura sobre el nivel del mar y en cualquier clima (Newsholme, 1992).

En Francia se han hecho investigaciones y se dice que estos árboles absorben fosfatos y nitratos por lo que se podrían usar para combatir la contaminación.

Moringa (*Moringa oleífera)*



La *Moringa oleífera* (Figura 6) es un árbol originario del norte de la India. Crece en cualquier tipo de suelo, pero no resiste las heladas, tiene altas propiedades nutricionales y medicinales.

Figura 6. Moringa a los tres meses de siembra (Agua Dulce Ver.)

Su consumo mejora la nutrición e incrementa la respuesta inmune por su contenido de micronutrientes y fenoles, promueve la productividad animal e incrementa la cantidad de leche y modifica el perfil positivo de ácidos grasos (Kholif *et al*., 2015). Las hojas verdes de Moringa tienen el contenido indicado en la Tabla 2.

Se reporta que las hojas secas de Moringa (Figura 7), contienen hasta el 30% de proteínas, calcio (≥20mg/g de hoja seca), vitamina C, hierro, potasio, tienen actividad antioxidante por su contenido de polifenoles, carotenoides, vitaminas, minerales, aminoácidos esteroles, glucósidos, alcaloides y flavonoides.

Figura 7. Cama de secado de hojas de Moringa

Las vainas y semillas son ricas en nutrientes (Tabla 3). El aceite que se extrae de las semillas es de alta calidad y tiene muchas aplicaciones, contiene ácidos grasos insaturados los cuales son usados en ensaladas, se encuentran en el mercado capsulas de aceite para combatir el colesterol (Adisakawattana y Chanathong *et al*., 2011).

Tabla 2. Contenido de nutrientes en hojas verdes de *Moringa Oleifera* (Makkar y Becker 1997).

Componentes	Por cada 100 g de hojas
Agua	75 g
Proteínas	6.7 g
Grasa	1.7 g
Carbohidratos	14.3 g
Fibra	0.9 g
Ceniza	2.3 g
Calcio	440 mg
Fosforo	70 mg
Hierro	7 mg
Cobre	110 µg
Yodo	5.1 µg
Vitamina A	11,300 UI
Vitamina B	120 µg
Ácido nicotínico	0.8 mg
Ácido ascórbico	220 mg
Detocoferol	7.4 mg

Nota: También contiene sustancias con estrógenos, incluyendo el compuesto antitumoral β-sitosterol y una pectín esterasaca.

Tabla 3. Contenido de nutrientes en la semilla de *Moringa Oleifera* (Makkar y Becker 1997).

Componentes	100 g de vaina c/semilla	Núcleo de la semilla	Aceite de la semilla
Agua	86.9g	NR	NR
Proteínas	2.5g	38.4g (cruda)	NR
Grasa	0.1g	NR	NR
Carbohidratos	8.5g	NR	NR
Fibra	4.8g	NR	NR
Ceniza	2.0g	NR	NR
Calcio	30mg	NR	NR
Fósforo	110mg	NR	NR
Hierro	Yodo	1.8 µg	NR
Vitamina A	184UI	NR	NR
Niacina	0.2mg	NR	NR
Ácido ascórbico	120mg	NR	NR
Cobre	310µg	NR	NR
Yodo	1.8 µg	NR	NR
Aceite graso	1.8 µg	34.7%	NR
Ácido palmítico	1.8 µg	NR	9.3%
Ácido esteárico	1.8 µg	NR	7.4%
Ácido benzoico	1.8 µg	NR	8.6%
Ácido oleico	1.8 µg	NR	65.7%

La torta resultante después de la extracción de aceite contiene 58,9% de proteína cruda.* NR (no reportado).

La Moringa tiene todos los amino ácidos esenciales (Tabla 4) (Haq *et al*., 2010), las hojas secas tienen 19 amino ácidos de los cuales 10 son esenciales y tienen proteína de alta calidad y fácil digestión influida por los amino ácidos (Hugo *et al*., 2011).

Tabla 4 Contenido de aminoácidos en las hojas secas de *Moringa Oleifera* (Hugo *et al*., 2011).

Aminoácido	Cantidad %	Efecto
Arginina (e)	1.780	Puede disminuir el colesterol, reduce la grasa corporal, mejora la circulación, estimula la hormona del crecimiento somatropina
Alanina	3.033	
Ácido aspártico	1.430	
Ácido glutámico	2.530	Levanta el sistema inmunológico, el tracto digestivo y las células musculares
Cisteina	0.010	
Glicina	1.533	
Fenilalanina (e)	1.640	
Histidina (e)	0.716	
Isoleucina	1.177	
Leucina (e)	1.960	Proporciona los sustratos para la oxidación en el ejercicio
Lisina (e)	1.637	Mejora la absorción de calcio, y ayuda en la producción de anticuerpos
Metionina (e)	0.297	
Prolina	1.203	
HO-Prolina	0.093	
Serina	1.087	
Tirosina (e)	2.650	Precursor de la dopamina y noradrenalina, es antidepresivo
Treonina (e)	1.357	Sirve para disminuir las grasas en el hígado
Triptófano (e)	0.486	Promueve la liberación de la serotonina la hormona del sueño y el placer
Valina (e)	1.413	Energía para los músculos y reparación de los tejidos

e = esencial

La semilla tiene más contenido de metionina 2.35 % y cisteína 2.01%.

Se reportan rendimientos de semillas de 2500 kilogramos/hectárea en cultivo de Moringa obteniéndose cerca de 1,500 litros de aceite y aproximadamente 1400 litros de biodiesel, se está investigando y aplicando esta alternativa en varios países (Huerta *et al*., 2010). Las vainas y semillas son útiles para purificación del agua, un polielectrolito catiónico que ha demostrado su eficacia en el tratamiento de agua (eliminación de turbidez) además que es completamente biodegradable en sustitución de sulfato de aluminio o de otros floculantes que muchas veces tienen que ser importados (Mera *et al*., 2016).

La madera sirve como leña y para carbón, Su celulosa produce un papel de alta calidad y, sus raíces se utilizan para producir condimento.

En México, ya se cultiva en varios estados, en el Valle del Yaqui y en Nava, Sonora. En Sonora el Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON), ha realizado estudios científicos exhaustivos sobre las propiedades de la planta; dicha universidad tiene convenios de colaboración con el Instituto Nacional de Nutrición de la India. En el ITSON se han realizado innovadores estudios sobre la moringa, entre los que se puede mencionar: Se ha estudiado su poder anticancerígeno (Guevara 1999). Y su efecto antiglucemiante (Adisakwattana *et al.*, 2011). La universidad de Nuevo león también realiza varios estudios en la producción de forrajes y produce capsulas como suplemento alimenticio, otras instituciones como el Instituto de Tierra Blanca en Veracruz están cultivando moringa para ser proveedor de microempresarios que encapsulan moringa como suplemento alimenticio.

La Universidad de Chapingo ha realizado estudios con la moringa como forraje (Petit *et al*., 2012). También la Universidad Autónoma del Estado de México realiza proyectos científicos que implican el uso de hojas Leucaena, *Salix Babylonica*, de Moringa, Neem, entre otras para la evaluación de la digestibilidad en ganado bovino y ovino, cuantificando la cantidad de gas metano, bióxido de carbono, así como algún efecto en la salud de animales.

En el Rancho Lucero de la Tarde ubicado en el Municipio de Agua Dulce, Veracruz, que se localiza en el sur del estado de Veracruz colindando con el estado de Tabasco, se sembró más de un cuarto de hectárea de plantas de moringa, para disponer de hojas y no limitar estudios por falta de ellas. Se tienen considerados estudios con semillas para investigaciones futuras, ya que actualmente el costo de hojas y semillas es elevado en el país. CONACYT colaboró con apoyos para hacer investigaciones en varias aplicaciones de la moringa pero los investigadores de la Universidad Autónoma del Estado de México, se enteraron tarde de la convocatoria y no se pudo participar del beneficio.

Neem *(Azadirachta indica*)

El Neem tiene como nombre científico *Azadirachta indica* y pertenece a la familia Meliacea a la cual también pertenece el “cedro”, la “caoba” y el “paraíso”. El Neem es una planta perenne arbórea originaria de la India conocido como “la farmacia del pueblo”, se adapta y crece bien en zonas de clima tropical en Latinoamérica le llaman Margosa, crece en regiones tropicales y subtropicales, no soporta el frio (Cruz y Sánchez, 2004).

En el rancho Lucero de la Tarde ya mencionado, también se tienen árboles de Neem (Figura 8) de ahí se recolectaron hojas frescas con márgenes dentados. Durante los meses de Julio y Agosto tienen flores blancas y fragantes, dispuestas axialmente, el fruto se parece a la aceituna que varían, desde un óvalo hasta ligeramente redondo.

Figura 8. Árbol de Neem

El árbol de Neem puede alcanzar de 10 a 20 metros de altura, tiene abundante follaje todas las temporadas del año pero en condiciones severas se pude deshojar casi completamente. Tiene resistencia a la sequía, sobrevive en zonas

con condiciones subáridas a subhúmedas, con una pluviometría entre 400 y 1200 mm. Puede desarrollarse en regiones con una precipitación inferior a los 400 mm, pero en ambos casos el desarrollo depende de la cantidad de agua subterránea. El Neem puede desarrollarse en diferentes tipos de suelo, pero sobrevive mejor en sustratos bien drenados, profundos y arenosos (con un pH de 6,2 a 7). Vive en regiones con una temperatura anual de entre 21 y 32 ^{0}C, puede tolerar muy altas temperatura, pero no tolera temperaturas menores de 4 ^{0}C, porque se deshoja y puede morir. Como especie oriunda de zonas tropicales y subtropicales, el árbol demanda mucha luz y temperaturas entre 26 y 36 ^{0}C, prefiriendo suelos profundos y arenosos, soporta cierto grado de salinidad. En México fue introducido en 1989 y ha sido objeto de estudio donde se ha cultivado. Se siembra en lugares cálidos de nuestro País como Veracruz, San Luis Potosí, Coahuila, Oaxaca, y se está introduciendo al estado de Morelos (Cruz y Sánchez, 2004).

En el sur del estado de Veracruz donde se ha sembrado después de 10 años, ha alcanzado 8 metros de altura aproximadamente (Figura 9), sus hojas jóvenes son de color rojo o púrpura, y las hojas maduras color verdoso, las cuales fueron secadas en la sombra sin que le afectaran los rayos solares para evitar el daño en los compuestos del Neem.

Figura 9. Árbol de Neem (Agua Dulce Ver.)

Las características biológicas del Neem se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Características Biológicas del *Azadirachta indica* (Cruz y Sánchez, 2004).

Subreino	Tracheophyta
Subreino	Vegetal
División	Embriofitas
Subdivisión	Angiospermas
Clase	Dicotiledónea
Orden	Geraniales
Familia	Meliácea
Genero	*Azadirachta*
Especie	*Azadirachta indica*

Características químicas

Las propiedades médicas del Neem se atribuyen a sus principales componentes químicos, los cuales son una mezcla de 3 o 4 compuestos relacionados entre sí, que corresponden a una clase general de productos naturales llamados triterpenos, específicamente limonoides. Los limonoides son fitoquímicos en frutos cítricos y otras plantas de las familias Rutácea y Meliácea como es el Neem, y al menos nueve limonoides del Neem han demostrado su capacidad para bloquear el crecimiento de insectos, que afectan a algunas de las especies de plagas más nocivas para la agricultura y la salud humana. Los limonoides más importantes son:

Azadiractina

Es el compuesto que presenta una mayor bioactividad, y de amplio espectro. Su estructura corresponde a un tetranortriterpenoide (Reyes et al., 2012).

Meliantriol

Compuesto que en concentraciones bajas, es capaz de inhibe el apetito en los insectos. Se ha demostrado gran funcionamiento al repeler plagas de insectos en los cultivos (Reyes et al., 2012)

Nimbin

Este compuesto es un aceite de propiedades amargas, pertenece al grupo de los tetranortriterpenoides. A este componente junto con la nimbina, se les ha demostrado tener actividad antiviral. Afecta el Virus de la Viruela Aviar.

Tiene propiedades insecticidas, controla plagas de campo y almacén; además de su uso medicinal, forestal y farmacológico. Debido a estas características muchos países han hecho esfuerzo de sembrar los árboles de Neem.

Toxicidad

Los extractos del Neem tienen efectos toxicológicos en distintas especies, como en: ratones, pollos y monos. En evaluaciones realizadas con infusiones de Neem se ha logrado conocer su poder antioxidante y antibacteriana contra algunos patógenos (SaiRam *et al*., 2000) el resultado fue que la mayor liberación de compuestos activos de Neem es a partir de las hojas secas a los 8 minutos de infusión (Reyes *et al*, 2017). Con las hojas frescas fue a los 12 minutos. Este resultado es importante porque permite conocer los tiempos de liberación de compuestos activos en las hojas secas y en las hojas frescas.

Se observó que los extractos no acuosos son los más tóxicos con una dosis estimada de seguridad de 0.002 y 12.5 µg/kg de peso corporal, mientras que el aceite de semilla sin procesar y el extracto acuoso con una dosis da de seguridad de 0.3 mg/kg y 2 µl/kg de peso corporal respectivamente, fueron menos tóxicos. En seres humanos se demostró que el polen del Neem ocasiona reacciones

alérgicas, esto ha sido confirmado mediante pruebas cutáneas y ensayos de inmunoblot.

Sin embargo el manejo en general del Neem no es tóxico al humano, no contamina el ambiente y es de fácil elaboración y aplicación a través de procesos rústicos.

Valores Hematológicos

Los valores hematológicos reportados a partir de la ingesta de extracto o harina de Neem han sido normales, demostrando que no altera la Concentración Media de Hemoglobina Celular. Se ha señalado que los valores de Media de Hemoglobina Celular son los valores más precisos y absolutos que indican una condición anémica en los animales, la nutrición con Neem afecta los perfiles sanguíneos de animales de acuerdo con Ogbuewu (2010).

El extracto acuoso de hoja y corteza de Neem reduce el nivel de glucosa en sangre y la peroxidación lipídica y aumenta las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa, y glutatión peroxidasa en tejidos de hígado y riñón según estudios realizados en ratas, sugiriendo que el extracto de hoja de Neem tiene antidiabéticos y potenciales antioxidantes (Arivazhagan *et al*., 2004).

Se ha demostrado que el extracto acuoso de la planta de Neem es un útil protector hepático, contra el daño producido por paracetamol en ratas. Dicha actividad hepatoprotectora es atribuida a la presencia de polifenoles en la planta. Para aprovechar el potencial antioxidante su consumo debe ser en forma de infusión con Neem seco (Reyes M. *et al*., 2007).

Usos del Neem

Al Neem tiene uso ancestral, pero las investigaciones científicas de sus propiedades médicas se están realizando apenas hace algunos años. Estos estudios están encaminados a conocer la eficacia del Neem, donde se han encontrado nuevos usos medicinales para este árbol (Tabla 6), sus semillas, su corteza y sus hojas, tienen compuestos con usos antisépticos, antivirales, antipiréticos, antiinflamatorios, con gran actividad biológica. Se han demostrado

efectos positivos como antioxidante y antimicrobiano en algunos agentes patógenos (Adrien, 1830).

El principal interés de los científicos es investigar su propiedad insecticida. Muchos de los metabolitos secundarios del árbol de Neem tienen actividad biológica, pero la azadiractina es considerada de mayor importancia ecológica. Los estudios han demostrado que afecta las actividades de numerosas especies, actúa interrumpiendo el ciclo vital del insecto, el Neem se está probando en el control de plagas. Existe evidencia de su efectividad en sarna, en la eliminación de piojos, aunque no en sus huevos (liendres), y en nematodos y gusanos. Su aplicación se está extendiendo cada día más debido a la creciente resistencia de insectos a los productos químicos tradicionales. Las principales utilidades económicas del compuesto de la azadiractina se comportan como antinutrientes para los insectos (Cruz y Del Ángel, 2004). Este antiparasitario natural puede sustituir plaguicidas químicos que inducen la resistencia a insectos, incrementa el costo de producción (Cruz y Del Ángel, 2004). Las hojas son usadas como fertilizante orgánico y es superior al estiércol vacuno, porcino, son valiosas por sus propiedades insecticidas y repelentes, contra ciertos insectos como las termitas o comejenes y los nematodos. Se puede mezclar con urea para abonar el suelo con buenos resultados y actúa como biocida. Las hojas verdes son un buen fertilizante económico.

El aceite de las semillas de Neem se usa medicinalmente y para cosméticos. Los árboles de Neem se cultivan para disminuir la desertificación, para cercas vivas y para madera, aunque falta educación ecológica para que se use como cerca viva, la semilla aun es escasa y cara (Cruz y Del Ángel, 2004).

Las hojas y el aceite de las semillas son antihelmíntico, antiséptico, antiparasitario. Se usan la corteza, las hojas y los frutos. La crema de Neem al 5% o aceite de Neem al 0.5-2% también es seguro cuando se aplica en la piel como repelente de mosquitos (Cruz y Del Ángel, 2004).

La actividad biológica que tienen los polifenoles radica en las acciones antihelmínticas, antihepatotóxicas, antiinflamatorias, antidiarreicas, anti úlceras, antivirales, antialérgicas y vasodilatadoras. Se ha verificado que inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana y del virus simplex humano,

inhiben las glucosiltransferasas del Streptococcus mutans (caries dental), inhiben la autoxidación del ascorbato, inhiben efectos citotóxicos, la promoción del crecimiento tumoral y la enzima xantina monoamina oxidasa (Ju-Fang Liu *et al*., 2015).

Otra de las propiedades atribuidas al Neem es la ganancia de peso en el ganado (Ogbuewu, 2010) se menciona que la harina de hoja tiene alto contenido de proteína cruda, en específico este árbol. Se ha demostrado que el olor, sabor y textura disminuye el consumo voluntario. Una solución sería mezclarlo con melaza y otros aditivos como cacao. Se emplea en la industria para jabones con mejores propiedades que los aceites de coco, palma africana, ricino y maní. Su aceite contiene ácidos mirístico y láurico, los jabones fabricados con dicho aceite tendrán más espuma y más detergencia que aquellos fabricados con aceites comestibles (Cruz y Del Ángel, 2004).

En la India la pulpa se usa como generador de gas metano. La distribución y aprovechamiento del árbol de Neem como insecticida en México, representa una alternativa viable de uso para el control de plagas agrícolas, principalmente en comunidades rurales de bajo nivel tecnológico (Leos y Salazar 1992). Los extractos de Neem actúan, en los insectos, como antinutrientes e inhibidores hormonales de la metamorfosis; disminuyen los niveles de proteínas y aminoácidos en la hemolinfa e interfieren en la síntesis de quitina, lo que disminuye o anula la fecundidad al impedir a los insectos alcanzar la madurez, prolongando los estados larvarios o causándoles la muerte al no poder realizar las mudas (NRC, 1992).

Tabla 6. Enfermedades que el *Azadirachta indica* puede corregir o prevenir (Conrick, 1994).

Acné	Hemorroides	Mal aliento
Alergias	Herpes	Malaria
Ardores	Hepatitis	Migrañas
Arritmias	Indigestión	Pie de atleta
Artritis	Infecciones	Piel reseca
Bronquitis	Inflamaciones	Picazón
Cáncer	Infecciones de Garganta	Piojos
Candidiasis	Infecciones el trato urinario	Psoriasis
Caries	Intoxicación alimenticia	Quemaduras
Caspa	Insomnio	Raspaduras
Chagas	Lombrices intestinales	Resfrío
Clamidia	Magulladuras	Reumatismo
Colesterol	Enfermedades del corazón	Ronquera
Conjuntivitis	Dolor de cabeza	Sarna
Cruda	Dolor de oído	Salpullido
Diabetes	Dolor de muela	Sida
Eczema	Problemas de riñón	Tiña
Encefalitis	Problemas de la presión	Torceduras
Epilepsia	Sistema inmunológico	Tuberculosis
Fatiga	Control natal	Sífilis
Fiebre	Granos	Ulcera péptica
Gastritis	Gripe	Urticaria
Gonorrea	Sangrado de encías	Varicela
	Gingivitis	

Neem contra Cáncer

Dentro de los compuestos descubiertos, se encontró en las hojas y flores del Neem, un compuesto que se le denomino Nimbolide que es un tetranortriterpenoide que tiene propiedades anticancerígenas, antinflamatorias, antioxidantes y antiinvasivas, en varias células cancerosas como en células del páncreas y renales humanas (Yi-Hsien Hsieh *et al*., 2015). El osteosarcoma tumor maligno primario del hueso frecuentemente no responde a la quimioterapia común y se encontró que el Nimbolide es un nuevo fármaco aplicándose en esta terapia (Ju-Fang Liu *et al*., 2015), En el cáncer de páncreas el porcentaje de mortalidad y morbilidad es alta por su causa invasiva y metastásica, es la cuarta causa de muerte en EE.UU. Por su diagnóstico tardío y la resistencia a la quimioterapia. El Nimboloide (Figura 10) ha demostrado beneficios terapéuticos

en el cáncer de páncreas, por lo cual puede ser usado como agente quimioterapéutico contra el cáncer de este órgano (Ramadevi *et al*., 2016).

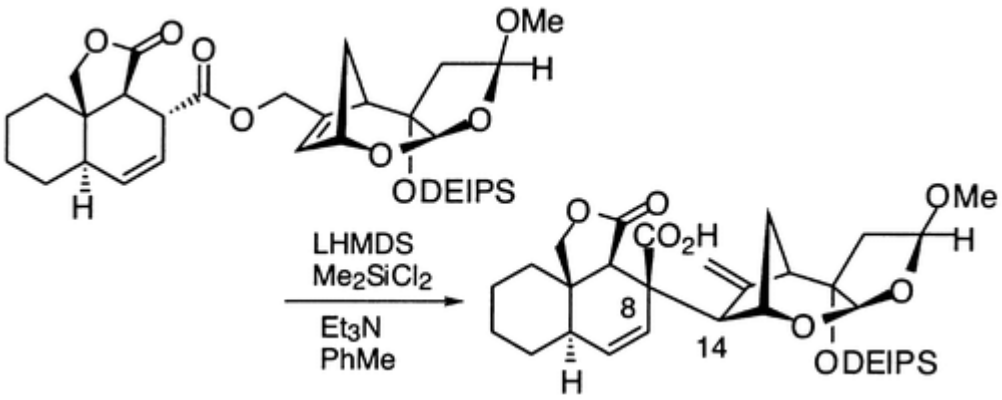


Figura 10 Síntesis de Nimboloide (Takehiro *et. al*., 2016)

En estos estudios se muestra la conexión entre la estructura química derecha e izquierda de la azadiractina (Figura 11). El reordenamiento de Irlanda-Claisen de enolato de Li del éster modelado con diclodimetilsilano en Tolueno, origina el limonoide esperado estéreo selectivamente (Takehiro *et. al*., 2016).

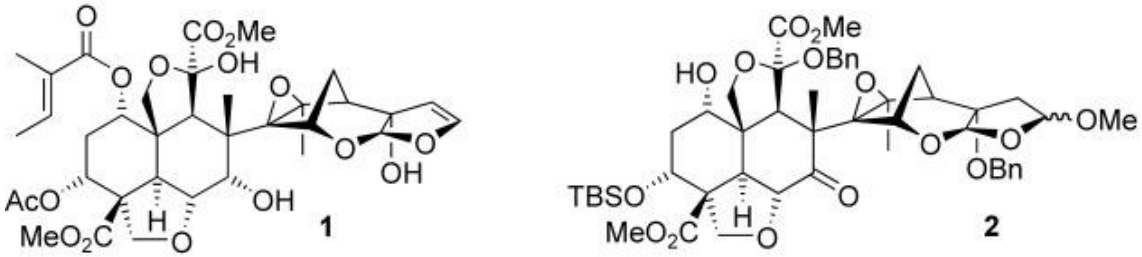


Figura 11. Estructura de Nimboloide (Steven *et al*., 2007).

Para llegar a la publicación de esta estructura molecular se invirtieron 22 años de investigación se publicó este estudio en el año 2007, participando en la investigación la fundación Alexander von Humboldt, y el laboratorio Novartis (Steven *et al*., 2007).

Morera (*Morus alba*)

La Morera (*Morus alba*) es un árbol que tradicionalmente se utilizó para la producción de seda. Pertenece al orden de las Urticales, familia *Moraceae* y género *Morus*. Los rangos climáticos para su cultivo son: temperatura de 18 a 38^0C; precipitación de 600 a 2500 mm; se cultiva desde el nivel del mar hasta 4000 m de altitud en zonas secas y húmedas, puede plantarse en suelos planos o en pendientes, pero no tolera suelos mal drenados o con pastos, requiere altos componentes nutricionales por lo que la fertilización es necesaria. Se reproduce por semilla, estaca, acodo e injerto. Se encuentra distribuido en Puebla, estado de México, en clima tropical el árbol crece con espeso follaje, con escasos frutos.

Figura. 12 Mora en Metepec, Edo. De México

En condiciones muy húmedas puede ser atacada por la fumagina, el tallo puede ser invadido de hongos blancos que pueden ser eliminados con agua jabonosa. Es atacada por las hormigas arrieras y por la cochinilla en la base del tallo. Se puede asociar con la *Gliricidia sepium.*

La Morera se ha destacado por su alto nivel de proteína, entre un 19 a 25% y digestibilidad de su follaje, del 80 al 90%**,** así como por su elevada capacidad de biomasa (Espinosa y Benavides, 1998); (Talamucci y Pardini, 1999). Se

realizaron análisis (Tabla 7), provenientes de la zona alta de Cartago en la Meseta Central de Costa Rica (Domínguez, 2002.).

Tabla 7. Contenido de nutrientes en hoja de *Morus alba* (Domínguez, 2002)

Proteína cruda en base seca	22 %
Fibra cruda	19 %
Extracto etéreo	2.3 %
Proteína sobrepasante	50 %
Morera proteína cruda en base seca	22 %
Alfalfa proteína cruda en base seca	17 %
Orchard grass proteína cruda en base seca	15 %
Pasto pangola proteína cruda en base seca	11 %
Elegante proteína cruda en base seca	9 %
Calcio	3.73 %
Magnesio	0.40 %
Sodio	0.01 %
Potasio	3.13 %
Fósforo	0.58 %
Minerales de azufre	0.06 %

La Morera contiene: Hierro 102.93 ppm; Cobre 7.99 ppm; Zinc 62.46 ppm. El contenido de nutrientes que poseen las hojas de Morera es de alta calidad, y muy similar al de los concentrados con base en granos, por eso se considera un buen suplemento en la dietas de forrajes de ganado (Cifuentes y Son, 1998).
Puede servir como banco forrajero o cerca viva. Se propaga comúnmente por medio de estacas enterrándose de 3 a 4 cm de profundidad. El forraje de la morera tiene un alto valor nutricional ya que los valores de proteína van del 20 al 24% y la digestibilidad es del 75 al 85%, lo que lo hace comparable a los concentrados comerciales para vacas lecheras (Benavides, 1995).

Cocoite (*Gliricidia sepium)*

El Cocoite es un árbol de tamaño medio perteneciente a las leguminosas, también se conoce con los siguientes nombres: Cacahuananche, mata ratón, madre cacao, balo, madero negro, cocoite. Otros nombres en México: (Tamaulipas) palo de sol, (Veracruz) cocoite.

Figura 13. Cocoite en cercas (Agua Dulce, Ver.)

El árbol crece bien en suelos ácidos con un pH de 4, 5, 6. El árbol se encuentra en suelos volcánicos en su área de distribución en América Central y México. Sin embargo, también puede crecer en suelos de arena, arcilla y piedra caliza.
Los agricultores de América Latina a menudo lavan su ganado con una pasta hecha de hojas trituradas de *Gliricidia sepium* para alejar los tórsalos.
De acuerdo con el World Agroforestry Centre, esta especie se está convirtiendo en una parte importante de las prácticas agrícolas en África. Porque la *Gliricidia sepium* fija el nitrógeno en el suelo, aumenta rendimientos de los cultivos, sin el costo de los fertilizantes químicos. Además, tolera que se recorte su altura en los cultivos año tras año. Esta planta, además de proveer nitrógeno, activa la absorción y recirculación de los macro minerales (Tabla 8) mediante su capacidad de extracción del suelo (Gómez & Preston 1996), a 1,020 m.s.n.m. con una temperatura promedio de 24 ^{0}C, una precipitación de 1,130 mm anuales, observaron que la *Gliricidia sepium* favorece el ciclaje y reciclaje del fósforo, potasio, calcio y magnesio, hecho que según los autores, explica por qué la

producción de forraje se mantiene hasta por siete años sin necesidad de fertilizante.

Tabla 8. Contenido de nutrientes de *Gliricidia sepium* (Gómez *et al*., 2002).

Nutriente	Cantidad (%)
Proteína bruta	23
Fibra bruta	47
Calcio	1.7
Fosforo	0.2
Potasio	NR
Magnesio	NR

*NR (no reportado)

De acuerdo con algunos autores (Vollink 1993) los niveles de macro minerales son altos y suficientes para atender los requerimientos del ganado vacuno, lo que lo convierte en un excelente alimento durante el período seco, cuando la proteína y los minerales por lo general son deficientes.

Se utiliza en muchos países tropicales y sub-tropicales para diversos fines, tales como cercas vivas, forraje, sombra de cafetales, leña, abono verde y veneno para ratas. *Gliricidia sepium* puede ser intercalada con maíz. Su efecto es el de un fertilizante potente.

Chaya (*Cnidoscolus chayamansa*)/ (*Cnidoscolus aconitifolius*)

La Chaya recibe diferentes nombres científicos de acuerdo a algunos autores *Cnidoscolus chayamansa* (*Mc Vaugh*) o Cnidoscolus aconitifolius (Milles), ambos aceptados como sinónimos.

La Chaya (Figura 14) es una planta originaria de Meso América, crece en América Central: Belice, Guatemala, Honduras y en lugares calientes de México, como Veracruz, Tabasco y la península de Yucatán, así como en Nigeria, y África.

Figura 14. Chaya en cercas (Agua Dulce, Ver.)

El crecimiento inicial requiere de hasta 2 años, tiempo que igualmente necesitan las raíces de las estacas nuevamente plantadas para su desarrollo. Después del segundo año, las hojas pueden cosecharse continuamente, siempre y cuando la planta conserve más del 50% de sus hojas, lo cual garantiza un crecimiento vegetal sano.

Produce grandes cantidades de hojas por muchos años. Se considera muy productiva, puede producir 8 a 10 Toneladas de hojas por hectárea. Se adapta muy bien a regiones tropicales húmedas y secas con distintas clases de suelo, desde el nivel del mar hasta 1300 m de alturas. Se propaga preferentemente por estaca.

La hoja de Chaya es comestible, fresca contiene una rica composición química (Tabla 9) de nutrientes reportado por Universidad del Valle de Guatemala.

Tabla 9. Composición Química de *Cnidoscolus chayamansa* (INCAP, 1961).

Nutrientes en 100 g.	Cantidad
Calorías	64 Kcal
Carbohidratos	10.7 g
Proteínas	5.2 g
Humedad	80 %
Lípidos	1.9 g
Calcio	244 mg
Hierro	71 mg
Fósforo	22 mg
Fibra	2.4 g
Ceniza	1.9 g
Vitamina A	25 mg
Vitamina C	350 mg
Vitamina B1 (tiamina)	0.2 mg
Vitamina B3 (Riboflavina)	0.4 mg
Niacina	1.6 mg

Tradicionalmente las hojas de chaya se sumergen en agua hirviente por 5 minutos y se sirven con aceite o mantequilla. El líquido que sueltan las hojas al ser cocinadas puede también ser consumido con total seguridad, debido a que el cianuro que contenían se escapa al aire volatilizado como cianuro de hidrógeno, durante el periodo de cocción. Es preferente no hervir las hojas de chaya en utensilios de aluminio, pues en éstos se puede producir una reacción que puede resultar tóxica, causando diarrea.

Los extractos de chaya son comestibles en forma de té, poniendo las hojas frescas, secas o tallos a hervir durante cinco minutos en agua. Ésta es la forma en que la mayoría de la población consume la chaya.

Sin embargo, los científicos han probado otras sustancias para hacer la extracción, que no se disuelven en agua. Entre las usadas está el alcohol etílico (extractos etanólicos) y el alcohol metílico (extractos metanólicos), (Miranda, 2010). El principal efecto terapéutico atribuido a estos extractos es su poder hipoglucemiante, funciona como auxiliar en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, ya que es capaz de disminuir los índices de glucosa en sangre, según lo reportado por Figueroa y colaboradores (2009), demostraron que el efecto de extractos acuosos de chaya es similar al obtenido por el tratamiento con dos de los medicamentos más usados: Glibenclamida y Metformina. Kulathuran y

colaboradores (2009) también estudiaron varios grupos de ratas diabéticas de laboratorio administrándoles extracto de Chaya.

En Nigeria se demostraron las propiedades antioxidantes de la chaya en un estudio en ratas albinas (Florence *et. al*., 2009). Los estudios se realizaron en extractos con etanol y metanol, los extractos acuosos parecen ser los más adecuados para obtener resultados benéficos. En los experimentos con ratas se logró disminuir hasta 40% la concentración de triglicéridos, además de demostrar un efecto protector al riñón.

Otro de sus beneficios es la regulación de la presión arterial, el mejoramiento de la circulación sanguínea y la desinflamación de las venas y hemorroides. También reduce el nivel del colesterol y del ácido úrico, ayuda a reducir el peso y aumenta la retención de calcio en el organismo, con lo que se fomenta el crecimiento de la masa ósea. Previene la tos, descongestiona y desinfecta los pulmones.

A pesar de que algunos de los reportes encontrados no siempre gozan de total credibilidad, demuestran, con bases científicas, una diversa gama de propiedades curativas, no sólo para controlar la diabetes (por ser hipoglucemiante), sino también como auxiliar para disminuir colesterol, triglicéridos y combatir tumores cancerosos.

Se ha comprobado, con base en estudios toxicológicos, que el consumo de chaya es seguro, aunque se consuma de manera cotidiana.

Yuca (*Manihot esculenta)*

La Yuca o guacamote (del náhuatl *cuauhcamohtli*en México), es un arbusto perenne de la familia de las euforbiáceas extensamente cultivado en Sudamérica, África y el Pacífico por sus raíces con almidones de alto valor alimentario.

Fue introducida con gran éxito en naciones africanas, hay variedades del arbusto en el aislamiento geográfico de la selva (casabe, que es altamente venenosa) y en los altiplanos (yuca, mínimamente venenosa). Alcanza los dos metros de altura, no resiste las heladas. Requiere altos niveles de humedad pero no excesos y de sol para crecer.

La yuca o mandioca (Figura 15) es originaria del centro de América del Sur, se ha cultivado en la mayor parte de las áreas tropicales y subtropicales del continente americano.

Figura 15. Yuca (Agua Dulce, Ver.)

Se reproduce mejor de esquejes que por semilla en las variedades actualmente cultivadas. En condiciones óptimas la yuca puede producir más calorías alimenticias por hectárea que la mayoría de los demás cultivos alimenticios tropicales. En pruebas de laboratorio se ha determinado que la cáscara seca de yuca sumergida en agua se re-hidrata hasta 160 por ciento de su peso en 25 minutos.

Se ha demostrado que la cáscara seca de yuca absorbe en promedio 120 por ciento de su peso de agua de mar. Esta agua no es salobre y es apropiada para uso agrícola. La cáscara seca de la yuca puede ser un modelo estructural para obtener un producto que absorba agua de mar para uso agrícola.

Las hojas de yuca tienen un alto valor nutricional (Tabla 10), han sido utilizadas desde antes de la colonia por los indígenas de algunas regiones del mundo, pueden utilizarse en la preparación de sopas o guisos, ya sea en pequeños trozos, picadas o la producción de comprimidos de hojas de yuca y retoños tiernos como fuente de proteína digerida, además de calcio, fósforo y potasio (González *et al*., 1999).

Tabla 10. Contenido nutricional de *Manihot esculenta (*Díaz y Vecchionacce, 1999)

Nutrientes	Cantidad
Proteína	22.7 %
Cenizas	10.9%
Grasa	6.3 %
Fibra	11 %
Humedad	7.8%
Hierro	3.9 mg
Vitamina C*	58 mg
Calcio, fosforo y potasio.	NR (no reportado)

* Vitamina C por cada 100g de proteína

La yuca contiene cantidades pequeñas pero suficientes para causar posibles molestias de sustancias llamadas linamarina y lotaustralina. Estos son glucósidos cianogénicos que se convierten en ácido prúsico (cianuro de hidrógeno), por la acción de la enzima linamarasa, que también se encuentra presente en los tejidos de la raíz. Las raíces de yuca también contienen cianuro libre, hasta el 12% del contenido total de cianuro. La dosis letal de cianuro de hidrógeno no combinado para un adulto es de 50 a 60 mg, sin embargo la toxicidad del cianuro combinado no es muy conocida. Los glucósidos se descomponen en el tracto digestivo humano, lo que produce la liberación de cianuro de hidrógeno. Si se hierve la yuca fresca, la toxicidad disminuye. El glucósido linamarina es resistente al calor, y la enzima linamarasa se inactiva a 75 °C. La yuca es la séptima mayor fuente de alimento básico del mundo.

El follaje de la yuca (*Manihot esculenta*) es usado como fuente de proteína para la alimentación animal en sistemas agroforestales.

Actualmente este arbusto se cultiva con altas expectativas para la producción de etanol.

Guamúchil, (*Pithecellobium dulce*)

Es una planta perteneciente al género *Pithecellobium*, de la familia de las leguminosas, nativa de México, Centroamérica y Sudamérica. El Guamúchil es un árbol de crecimiento rápido, originario de los trópicos americanos, por lo que se reproduce sin problema en clima subtropical y tropical, de seco a semi-árido,

con precipitación anual promedio que fluctúa entre 500 y 1000 mm. Ha sido plantada con éxito en áreas con precipitación anual inferior a 400 mm., con estación seca de un máximo de 4 a 5 meses. La especie se considera resistente al calor y la sequía.

El guamúchil crece bien en regiones semi-áridas. Se desarrolla sin problema en Puebla, Sonora, Coahuila, Veracruz estado de México (Figura 16). Es común encontrar las frutas a la venta en los mercados de los pueblos por sus frutos dulces y carnosos. La especie se conoce también como una buena fuente de alimento para las abejas de miel.

Los árboles maduros miden de 5 a 22 m de altura, con un tronco corto de 30 a 75 cm en diámetro, copa amplia y esparcida, de corteza lisa de color gris claro. Las ramas delgadas y lánguidas presentan hojas compuestas bipinnadas con cuatro hojillas oblongas, en la mayoría de los especímenes se pueden encontrar espinas apareadas en la base de las hojas.

Figura 16. Guamúchil en cercas (Agua Dulce Ver.)

Se han detectado esteroles en varias partes de la planta. El espinasterol se encuentra en la flor, corteza y duramen del tallo, el glucósido en las hojas y corteza; campesterol, estigmasterol y sitosterol en el duramen y en la raíz donde también se localiza el daucosterol. La corteza del tallo contiene los triterpenos lupenona y lupeol y el aceite de la semilla beta-amirina y el beta-citosterol. Se le

considera antiparasitario y astringente. (Arriaga *et al*., 1994). Ha sido extensamente utilizado con propósitos ornamentales para la reforestación, la producción de leña, forraje y numerosos productos.

Guácimo (*Guazuma ulmifolia*)

Árbol forrajero, maderero con propiedades medicinales crece en ambientes tropicales y subtropicales, deja abierto un extenso campo de investigación en la línea nutricional y medicinal ganadera (Figura 17).

Las hojas y frutos son comestibles para el ganado. Las hojas contienen 17% de proteína bruta, con una digestibilidad *in vitro* de 40-60% (Silvoenergía, 1986).

Figura. 17 Guacimo en cercas de alambre (Agua Dulce Ver.)

2.4 Metabolitos secundarios y carga parasitaria en rumiantes.

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de simples, o para degradar las complejas y obtener las simples. Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario reciben el nombre de metabolitos secundarios, se distribuyen en grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes, colorantes, entre otros. Reciben también el nombre de Productos Naturales de las Plantas (PNP) (Avalos y Pérez, 2009).

Los productos naturales de plantas (PNP), también llamados metabolitos secundarios, desempeñan funciones de protección de las plantas contra organismos herbívoros, microorganismos y plagas (Bodas *et al.*, 2012). Comprende un grupo de compuestos biológicos, que residen en las plantas con potenciales bioquímicos relacionados con el crecimiento y la reproducción (Patra y Saxena, 2010). Los PNP han sido estudiados a lo largo de los años con técnicas especializadas, la mayoría tienen alto peso molecular e incluyen saponinas, taninos, terpenoides, flavonoides, glucósidos, alcaloides, fenoles y aceites esenciales.

Una aplicación de gran importancia de los metabolitos secundarios (o PNP) es que pueden contrarrestar las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), metano CH_4, Nitritos ($NO_{2)}$, Bióxido de carbono CO_2. Los GEI contribuyen significativamente en el calentamiento global causando efectos en el cambio climático y la degradación ambiental (IPCC, 2007 y Sexena 2010). La producción ganadera se ubica entre uno de los principales emisores de GEI (Audsley y Wilkinson, 2014). La Organización Americana de Alimentos (FAO) en su informe del 2006, indica que la producción animal es responsable del 18% de CH_4 y del 9% de producción de CO_2 de todas las emisiones de GEI (Gases de efecto

invernadero). El CH_4, afecta aproximadamente 23 veces más que el CO_2 en el calentamiento global (Rira *et al*., 2015) y representa del 50-60% de GEI emitido durante la producción de rumiantes (Mirzaei-Aghsaghali *et al*., 2012).

Estudios realizados han demostrado que el desperdicio de nutrientes por el exceso de excreción, digestibilidad ineficiente o deficiente de los alimentos y las emisiones de CH_4 y CO_2 que contaminan el medio ambiente, causan una pérdida de energía del 2 al 12% del alimento (Hristov *et al*., 2015). Ante estos desafíos, nutricionistas, bioquímicos y microbiológicos de los animales, han encontrado como alternativa la aplicación de metabolitos secundarios o (PNP) (Elhandour *et al*., 2018), enzimas (Hernández *et al*., 2017; Vallejo *et al*., 2018) y levaduras (Shurson 2018), como aditivos para mejorar o manipular los ecosistemas microbianos y la cinética de fermentación de los rumiantes. El uso de aditivos en la producción ganadera mejora la digestibilidad de alimentos fibrosos, reducen la degradación de las proteínas (Salem, *et al*., 2012), inhiben la proliferación de bacterias patógenas en el tracto intestinal (Arowolo y He, 2018), aumentan el rendimiento del animal, disminuyendo la perdida de energía alimentaria durante la fermentación del rumen y reduce las producciones de CH_4 y CO_2, contribuyendo a mejorar el medio ambiente.

Los metabolitos secundarios son aditivos naturales y seguros que se pueden explotar reduciendo las emisiones de CH_4 y CO_2 durante la producción de rumiantes sin afectar negativamente la fermentación del rumen (Patra y Saxena 2010). Estudios recientes realizados por Elghandour indican que las hojas de *Pistacia vera, Dalbergia retusa, Crescentia alata, Azadirachta indica*, *Eichhornia crassipes, Cnidoscolus chayamansa, Guazuma ulmifolia, Vitex mollis* y *Moringa oleifera* disminuyen las emisiones de CH_4 y CO_2 en las terneras (Elghandour *et al*., 2017). También reporto que el cactus espinoso y el extracto de *Moringa oleifera* en dietas para rumiantes disminuyeron significativamente la producción de CH_4 y CO_2 (Elghandour *et al*., 2018). En 2018, Halmemies-Beauchet-Filleau y otros informaron que la camelina rica en lípidos (*Camelina sativa*) tiene potencial para enriquecer la leche de rumiantes y la grasa de la carne con ácidos

grasos trans-11 18: 1 y cis-9, trans-11 18: 2 y también mitigar las emisiones de CH_4. Estas reducciones significativas se deben probablemente a la presencia de metabolitos secundarios en las hojas de la planta.

Los metabolitos secundarios específicamente la saponina, los taninos y los aceites esenciales son sustancias naturales que mejoran la fermentación del rumen, reducen la perdida de energía en la alimentación, aumentan el rendimiento de la vida animal y muy importante reducen, los GEI durante la producción animal. Es importante mencionar que no se ha aclarado totalmente la metanogénesis del rumen y se han documentado los efectos negativos de los metabolitos secundarios en la ingesta de alimentos. Sin embargo se ha encontrado que tanto los efectos positivos como negativos dependen de la composición y la dosis administrada de metabolitos secundarios, composición dietética, pH y especies metanogénicas (Ugbogu *et al*., 2019).

Actualmente se utilizan compuestos bioactivos específicamente plantas que contienen taninos y saponinas que ayudan a mejorar la productividad, potencia reproductiva animal, calidad de la carne y sobre todo el control de la infestación de parásitos gastrointestinales (Rochfort e*t al*., 2008). Existe un gran número de plantas y sus constituyentes bioactivos con actividad antihelmíntica (Salem *et al*., 2017). Se han realizado investigaciones encaminadas hacia el estudio de las plantas bioactivas y sus metabolitos en funciones de animales seleccionados y su impacto en la eliminación de parásitos gastrointestinales en rumiantes.

La helmintiasis gastrointestinal es un problema en la salud, bienestar y economía en el sistema de producción ganadera, especialmente en los países en vías de desarrollo (Waller 1997; Mendonca *et al*., 2014) como el nuestro.

Los principales factores de riesgo de la helmintiasis son:

- factores del huésped (edad y estado fisiológico del huésped).
- factores parásitos (epidemiología de diferentes parásitos).
- factores ambientales (tasa de almacenamiento, atmósfera circundante, nutrición y protocolos de manejo) (Tariq *et al*. 2008).

Carga Parasitaria

Los nematodos gastrointestinales son cada vez más resistentes a los productos comerciales utilizados para controlarlos. El costo de las aplicaciones rutinarias de vermífugos en los rebaños y el problema de los residuos en los productos animales y el medio ambiente han impulsado la investigación sobre la actividad antihelmíntica de los extractos de plantas (Chagas *et al*., 2007).

En un sistema de producción animal, el impacto económico tras una parasitosis se ve reflejado en; baja conversión alimenticia, disminución de la tasa de crecimiento, elevados costos en desparasitantes gastrointestinales, aunado a esto el daño hepático causado por la farmacodinamia de los mismos y la contaminación al medio ambiente, este problema hace indispensable la búsqueda de antiparasitarios naturales. Los diferentes parásitos de géneros Tricostrongilidos tienen asentamiento geográfico cosmopolita; sin embargo, algunos estudios señalan que existen zonas con ciertas especies: *Trichostrongylus* sp. y *Cooperia* sp., predominan en regiones templadas, a diferencia de *Ostertagia* sp. y *Nematodirus* sp. se producen en regiones templadas, nórdicas y regiones subpolares; Los nematodos *Haemonchus* sp. *Mecistocirrus* sp. *Trichostrongylus* sp, *Cooperia* sp. y *Oesophagostomum* sp., son considerados importantes desde el punto de vista patológico y epidemiológico en diversas zonas geoecológicas, templadas y cálidas. México cuenta con grandes áreas geoecológicas que presentan condiciones favorables para la proliferación de parásitos. En regiones con subtrópico húmedo, se han registrado: *Haemonchus placei*, *Haemonchus similis*, *Haemonchus contortus*, *Mecistocirrus digitatus*, *Cooperia punctata*, *Cooperia pectinata*, *Trichostrongylus axei* y Oesophagostomum mientras que en bovinos del subtropical seco, los nematodos registrados corresponden a: *Haemonchus similis*, *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus axei* y *Oesophagostomum radiatum* (Liébano, 2005).

3. JUSTIFICACION

Los países se enfrentan cada día al problema que representa producir alimentos a bajo costo para una población en constante crecimiento, por lo que resulta muy útil el aprovechamiento de recursos naturales en forma integral de manera sostenible en la ganadería.

En México tenemos la ventaja de poseer varios ecosistemas, por lo que es viable cultivar árboles de Sauce, Moringa, Neem, Morera, Guacimo y otros arbustos que sirven para proveer alimento al ganado bovino, ovino y, equino reduciendo los costos de producción para su manutención, nutrición, sin olvidar el aspecto medicinal de las especies vegetales. La gran mayoría de arbustos y especies vegetales se cultivan en regiones tropicales húmedas y áridas, tienen propiedades nutricionales y medicinales, situación que hasta el día de hoy no ha sido aprovechada.

En México las zonas áridas y semiáridas ocupan más de la mitad del territorio, y poseen una gran cantidad de recursos naturales que se podrían explotar en la industria, la medicina y otros ámbitos como ganadería, sin embargo son regiones poco estudiadas. Por otro lado la flora al sur de la nación es muy variada por sus condiciones de humedad y temperatura. Existe gran número de plantas en el país con propiedades nutricionales y medicinales, pero sólo se ha tenido la oportunidad de contar con suficiente materia de tres árboles, razón por la cual; este proyecto de investigación solo se planteó la investigación de los árboles de Sauce, Moringa y Neem, con la finalidad de aportar información en beneficio de productores de ganado.

HIPÓTESIS

La utilización de hojas de árboles o arbustos de Sauce (*Salix babylonica*), Moringa (*Moringa oleífera*) y Neem (*Azadirachta indica*), mejorará la nutrición y salud de ovinos, y se podrán usar como complemento alimenticio.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el comportamiento de los extractos de plantas Sauce (*Salix Babylonica),* Moringa *(Moringa oleífera),* y como estudio preliminar Neem *(Azadirachta indica)*. En estudios *in vitro e in vivo* en la nutrición y salud de ovinos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Evaluar los efectos de reemplazar el grano de maíz por cactus (nopal s/espinas) en la dieta de un caballo, a diferentes concentraciones, mezclado en diferentes concentraciones el extracto de *Salix babylonica* en la producción de gas *in vitro*, metano (CH_4) y fermentación cecal cinética.

2. Evaluar la cinética de fermentación y los valores nutricionales de diferentes dietas *in vitro*, al reemplazar cantidades de grano de maíz por soya, en presencia y ausencia de diferentes cantidades de extracto de hojas de M. *oleífera* evaluando la producción de gas ruminal en bovinos: dióxido de carbono (CO_2) y metano (CH_4).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos utilizados en el manejo de los animales fueron realizados siguiendo la Norma Oficial Mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

En este estudio, se realizaron 2 experimentos *in vitro* en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UAEMex y un experimento *in vivo*, en la posta, teniendo un artículo científico por cada uno de los *in vitro*, la metodología se describe a continuación:

EXPERIMENTO 1: *in vitro*

Evaluar el comportamiento del Sauce (*Salix babylonica*), *in vitro* en equinos para la producción de gas.

Se recolectaron al azar hojas de plantas de *Salix. Babylonica* (SB), de varios árboles jóvenes y maduros durante el verano de 2015. Las hojas se cortaron en 1-2 cm. De longitud, e inmediatamente extraídas a 1 g de hoja / 8 ml. de agua. Los materiales vegetales se empaparon individualmente y se incubaron en agua en el laboratorio a 25-30 ºC, durante 72 h en una jarra. Después de la incubación, el recipiente se calentó a 39 ºC, durante 1 hr., se filtró de inmediato y el filtrado recogido se almaceno a 4 ºC para su uso posterior.

Tres raciones mixtas totales fueron preparadas donde el grano de maíz fue reemplazado por proteína cruda (PC) a tres porciones: 0 g (Control), 75 g (PC75) o 150 g (PC150) (Tabla 11). El extracto de SB se agregó a cuatro por: 0, 0.6, 1.2 y 1.8 mL / g materia seca de sustratos. La composición química y los ingredientes se muestran en la Tabla 8. Fermentación *In vitro* y biodegradación cecal. Los contenidos cecales (la fuente del inóculo) fueron colectados de 4 caballos criollos (3–4 años de edad y peso 300 ± 15 kg), del rastro local de Toluca, Estado de México. Los caballos tenían sobre ocho horas de pastoreo y se les dio agua dos veces al día.

Tabla 11.Composición de la dieta experimental. Para el *in vitro* con el extracto de *Salix Babilónica*, adaptado de (Elghandour *et al*., 2016).

Ingredientes (g / kg MS)	CONTROL	PC 75	PC150
Paja de avena	249	248	248
Maíz rolado al vapor	250	175	100
Residuos de soya	250	250	250
Cebada rolada al vapor	120	110	120
Salvado de trigo	30	30	30
Gluten de maíz	30	30	20
Nopal	0	75	150
Melaza	70	80	80
Vitaminas / minerales	1	2	2
Composición química g/kg MS			
Materia orgánica	964	940	957
Proteína cruda	130	119	113
Fibra detergente neutra	356	428	340
Fibra detergente ácido	121	130	122
Extracto de éter	24	22	23
Carbohidratos no estructurados	455	371	481

La harina de nopal fue incluida a 75 y 150 g/kg de materia seca en la ración de la mezcla total. Contenido de vitaminas y minerales: Vitamina A (12,000,000 UI), Vitamina D3 (2,500,000 IU), Vitamina E (15,000 IU), Vitamina K (2.0 g), Vitamina B1 (2.25 g), Vitamina B2 (7.5 g), Vitamina B6 (3.5 g), Vitamina B12 (20 mg), ácido pantoténico (12.5 g), ácido fólico (1.5 g), Biotina (125 mg), Niacina (45 g), Fe (50 g), Zn (50 g), Mn (110 g), Cu (12 g), I (0,30 g), Se (200 mg), Co (0,20 g).

Sin suplemento alimenticio los caballos pastaron predominantemente en el prado que contiene dos gramíneas nativas (*Festuca arundinacea* y ryegrass). Las muestras cecales individuales se obtuvieron del ciego de cada caballo, y luego se mezcló para obtener una muestra homogeneizada de contenidos fecales. Después se agregó la solución Buffer sin tripticasa en la relación de 1: 4 v / v. (Goering y Van Soest, 1970).

Los medios de incubación fueron mezclados y filtrados a través de cuatro capas de gasa (Figura 18), en un matraz libre de oxigeno (O_2), y las tres series idénticas de incubación fueron puestos en frascos 120 mL, agregando 0,5 g. de sustrato (MS) en presencia de diferentes dosis de extracto de SB.

Figura 18. Laboratorio de bromatología.

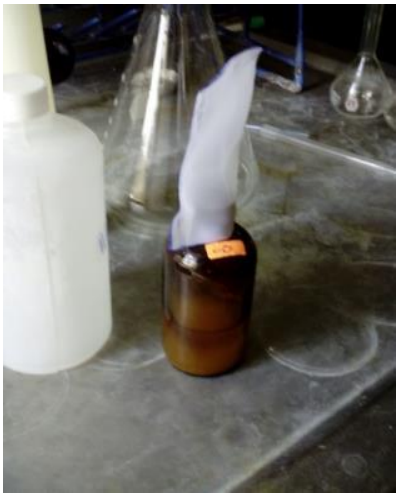
Se llenaron frascos con sustratos, más tres botellas control sin extractos de SB, se gasificaron con CO_2 inmediatamente, se sellaron con tapones de goma, se agitaron y colocaron en una incubadora a 39 ^{0}C. La producción de gas se registró a 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24, 36, 48, 54, 60 y 72 horas, usando el transductor de presión (instrumento Extech, Waltham, EE. UU.), con la técnica de Theodorou *et al.* (1994).

Análisis de Laboratorio.

La producción de CH_4 se registró a los 2, 6, 10, 14, 24, 36, 48, 54, 60 y 72 horas de incubación (Figura 19). Al final de la incubación, después de 72 h, los frascos fueron destapados y se midió el pH, utilizando un pH metro digital (Conductronic pH15, Puebla, México).

Detector Gas-Pro (analizador de gas CROWCON Modelo Tetra 3, Abingdon, Reino Unido), utilizado para medir metano

Figura. 19 Equipo para medir la presión de gas



El residuo de la fermentación de cada botella se vació y se filtró en bolsas de tela porosa (Figura 20).

Figura 20. Frasco con bolsa para filtrado del residuo.

La bolsa con el sólido se puso en crisoles de vidrio, secando a 65 °C durante 72 horas para medir el consumo de la materia.

EXPERIMENTO 2: *in vitro*

Efectos del extracto de hoja de *Moringa oleífera* sobre la producción de metano ruminal y la producción de dióxido de carbono y la cinética de fermentación en un novillo.

Producción del extracto fotogénico

En el estado de Veracruz (México) se recolectaron hojas frescas al azar, de árboles jóvenes y maduros de *M. Oleífera*. Las hojas fueron trituradas y 1 g se sumergieron en 8 ml. de agua. La extracción se realizó en frascos cerrados en un periodo de 72 h a 28ºC, seguido de una segunda extracción a 39ºC durante 1h. Posteriormente los extractos se clarificaron por filtración a través de una gasa y se almacenaron a 4ºC hasta su uso posterior.

Preparación del sustrato.

Los sustratos para la fermentación *in vitro* se obtuvieron reemplazando 75g/kg de grano de maíz y 150 g/kg (materia seca) de grano de maíz por la misma cantidad de cascaras de soya (SH). También se incluyó un sustrato de control en el estudio. Los tres sustratos se evaluaron en ausencia (0 ml/g de sustrato de materia seca) y en presencia de (0.6, 1.2, 1.8 ml/g de sustrato materia seca).

Fermentación *in vitro*

Se preparó una mezcla en concentración de peso 1:1 de heno de alfalfa y concentrado de alimento comercial, al libre consumo a dos bovinos Holstein canulados con un peso corporal de 450 ± 20 kg según NRC (2001). Después de recolectaron los contenidos del rumen de ambos bueyes, se mezclaron completamente y se les inyectó bióxido de carbono. Se filtró a través de una tela de gasa (cuatro capas) eliminando cualquier partícula grande. Para la incubación se agregaron 10 ml del filtrado diluido en una proporción 1: 5 (v / v)

con una solución tampón descrita por Goering y van Soest (1970) a 0.5 g del sustrato. Además, se incluyeron frascos en blanco sin sustrato en el estudio. La fermentación se realizó durante 72 h a 39°C en matraces cerrados con agitación y se terminó colocando los matraces de incubación en hielo. Posteriormente, se midieron los valores de pH de los caldos de fermentación. Los caldos de fermentación se filtraron al vacío usando una crisol de vidrio para obtener los residuos no fermentados. Los residuos secos obtenidos por secado, filtrados durante la noche a 65°C se usaron para cuantificar el sustrato fermentado. Todas las fermentaciones se realizaron por triplicado.

Tabla 12. Composición de la dieta experimental.

Ingredientes (g/kg materia seca)	CONTROL	SH 75	SH150
Pasta de soya	250	250	250
Paja de avena	249	248	248
Salvado de trigo	30	30	30
Cebada rolada al vapor	120	110	120
Maíz rolado al vapor	250	175	100
Cascara de soya	0	75	150
Gluten de maíz	30	30	30
Melaza	70	80	80
Vitaminas / minerales[1]	1	2	2
Composición química g/kg (Materia Seca)			
Materia orgánica	964	940	957
Extracto de éter	24	22	23
Fibra detergente ácida	121	130	122
Fibra detergente neutra	356	428	340
Carbohidratos no estructurados	455	371	481
Proteína cruda	130	119	113

[1]12 x 10^3 IU/g vitamina A, 2.5 x 10^3 IU/g vitamina D_3, 15 IU/g vitamina E, 2mg/g Vitamina K, 2.25 mg/g vitamina B_1, 7.5mg/g vitamina B_2, 3.5 mg/g vitamina B_6, 20mg/g vitamina B_{12}, 12.5 mg/g ácido pantoténico, 1.5 mg/g ácido fólico, 45 mg/g niacina, 50 mg/g Fe, 50mg/g Zn, 110mg/g Mn, 12 mg/g Cu, 300 mg/g I, 200 mg/g Se, 200 mg/g Co.

Determinación de metano, dióxido de carbono y biogás.

La producción de biogás se determinó utilizando un transductor de presión EXTECH INSTRUMENTS (Waltham, EE. UU.) Según Theodorou *et al* (1994). La producción de dióxido de carbono y metano se cuantificó con un analizador de gas Tetra3 (CROWCON, Abingdon, Reino Unido). Para el ajuste de los volúmenes de gas registrados se usó el procedimiento NLIN de SAS (2002)

(France *et al*., 2000) para estimar la cinética de producción de metano, dióxido de carbono y biogás.

Análisis de sustrato

La composición del sustrato se determinó según los métodos AOAC (1992) (materia seca, ceniza, nitrógeno, extracto de éter, lignina, fibra detergente ácida) o según van Soest *et al* (1991) (fibra detergente neutra).

Cálculos

La energía metabolizable *in vitro* (EM) y la digestibilidad de la materia orgánica (DOM) se calcularon según lo descrito por Menke et al (1979). Las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta se obtuvieron según lo descrito por Getachew *et al* (2002) y la producción de biomasa microbiana (mg / g de MS) según lo descrito por Blümmel *et al* (1997). El factor de partición, la proporción de degradabilidad de la materia seca *in vitro* (mg), y la producción de biogás (ml) después de 24 h de fermentación, se usó como una medida de la eficiencia de la fermentación. El rendimiento de gas representa el volumen de gas (ml gas / g MS) obtenido después de un tiempo de fermentación de 24 h por digestibilidad de materia seca (DMS, g).

EXPERIMENTO 3: *in vivo*

Evaluación de extractos de hojas Neem, (*Azaradirachta Indica)* en la salud de ovinos.

Localización

El experimento se realizó en la posta (figura 21) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, Unidad Cerrillo Toluca Edo. de México.

Figura 21. Posta de la facultad de veterinaria de la UAEMex

Animales

La unidad de producción es semi- intensiva, de la cual al mediodía salen a pastoreo y por la tarde regresan, su alimentación es a base de sorgo y ensilado de maíz; dentro de las instalaciones cuentan con cama de rastrojo picado y agua a libre acceso.

Se utilizaron 30 ovinas en gestación de distintas razas, como son; Texel, Suffolk, Hampshire y Dorset con una edad promedio de 3.5 años y un peso promedio de 88 kg (Figura 22).

Figura 22. 0vinas del experimento marcadas

Tratamiento

Preparación del sustrato.

Se secaron 2 Kg. de hojas de Neem en una estufa del Centro de Investigación en estudios de salud animal (CIESA), secadas a 39ºC durante 24h para eliminar humedad. Las hojas se trituraron manualmente hasta pulverizarse. Posteriormente se preparó una mezcla en un garrafón de plástico de 20L con 1Kg de hojas pulverizadas y 8L de agua destilada, dejando reposar por 48h. El extracto de Neem se filtró con una tela de algodón porosa, se transvaso en dos galones opacos, protegiendo al extracto de los rayos solares.

Muestreo

Las heces fueron obtenidas del recto para el estudio coprológico y se programaron análisis de parásitos, antes de suministrar el extracto de Neem a los ovinos, a los 30 días de dosificación.

Tratamiento

Preparación del sustrato.

Se recolectaron hojas de Neem en el sur del estado de Veracruz, se secaron y se preparó el extracto acuoso por la infusión de hojas trituradas de Neem mezclando 1 kg de hojas de Neem en 8 litros de agua destilada y se dejó en reposo por 24 h. El extracto de Neem se filtró y se cuidó de la oxidación por rayos solares.

Dosificación del extracto

El total de animales se dividió en 3 grupos de 10 ovinos tomados al azar, para evaluar el efecto del extracto de Neem en la salud de los animales. La dosis que se les suministro oralmente con una jeringa con cánula.

Grupo 1: Es el grupo Control al que no se le aplicó el extracto, sin embargo, participó en los muestreos.

Grupo 2: Se le aplicó una dosis de 20 ml de extracto de Neem en el alimento en las mañanas por 30 días.

Grupo 3: Se le aplicó una dosis de 40 ml de extracto de Neem en las mañanas por 30 días.

Los animales en estudio fueron dosificados a las 8 am cada tercer día y su alimentación fue a base de ensilado de maíz adicionado con sorgo y agua a libre acceso.

En el manejo de las ovinas se les aplicó una dosis de 0, 20, y 40 ml de extracto de Neem cada tercer día, por las mañanas en ayunas, durante 30 días.

Muestreo

Las muestras identificadas individualmente usando numeración del 1-30, con las especificaciones marcadas por el laboratorio, como son; de 50 a 100 gramos (frescas o en refrigeración) para análisis coproparasitoscópico (método de flotación).

Se determinó la carga parasitaria realizando dos muestreos:

El primer muestreo se realizó en el día cero en ayunas, la toma de muestra se realizó conforme a los especificaciones del laboratorio de parasitología. También se extrajo muestra de sangre.

El segundo muestreo se realizó en el día 30, mediante la recolección de heces directamente del ano (Figura 23), almacenadas con refrigerante en bolsas plásticas nuevas.

Figura 23. Recolección de heces de las ovinas obtenidas del ano

Descripción de la técnica Mc. Master

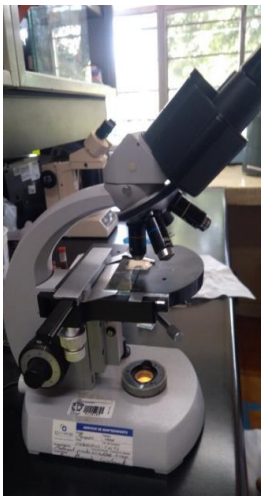
La técnica Mc Master (Whitlock 1948) fue utilizada para cuantificar la carga parasitaria de equinos. Esta técnica coproparasitoscópica permite establecer la gravedad de una infestación provocada por un parásito o más, mediante el recuento de huevecillos. Aprovechando los principios de dilución, flotación y gravitación se pueden suspender huevecillos de parásitos utilizando una solución saturada de glucosa o bien de cloruro de sodio, haciendo la lectura en una cámara Mc. Master.

La cámara Mc. Master consiste en dos laminillas de vidrio juntas, la laminilla de la base es más ancha que la de arriba, lo que proporciona una plataforma que facilita la introducción del fluido entre ambas. El espacio entre las laminillas está dividido en dos cámaras rayadas de 1 cm cuadrado con una profundidad de 0.15 cm cada una, lo que alberga 0.15 ml de suspensión.

Método.

En un recipiente se suspende perfectamente 2 g de heces en 60 ml de solución saturada de azúcar o de cloruro de sodio, se filtra a través de un colador de malla

fina para eliminar las partículas grandes. Se mezcla la suspensión tratando de homogenizar los componentes, con un gotero se llenan los compartimientos de la cámara sin que queden burbujas de aire.



Se deja reposar por espacio de dos minutos para que los huevecillos floten y puedan ser observados en el microscopio (Figura 24).

Figura 24. Microscopio usado en la técnica de Mc Master.

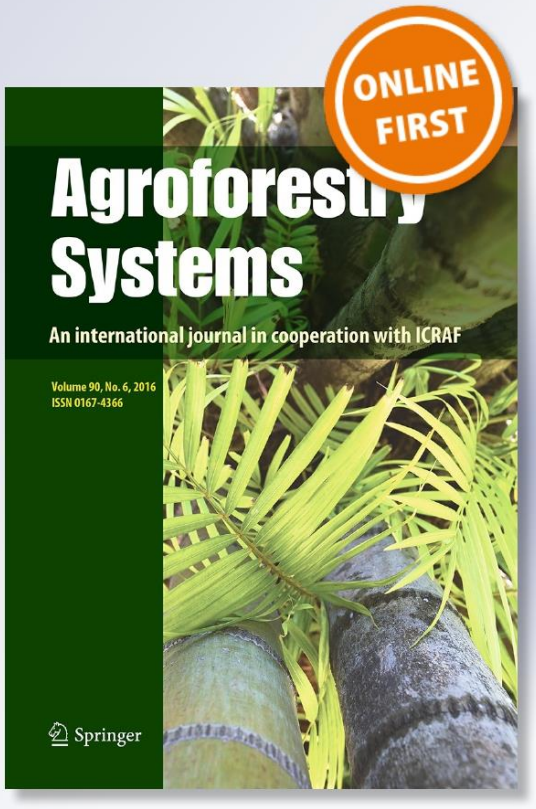
Potential impact of prickly pear cactus flour and Salix babylonica *extract on cecal fermentation and methane production in horses*

A. Parra-Garcia, A. Z. M. Salem, M. M. Y. Elghandour, L. M. Camacho & N. E. Odongo

Agroforestry Systems
An International Journal incorporating Agroforestry Forum

ISSN 0167-4366

Agroforest Syst
DOI 10.1007/s10457-016-0051-8



Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media Dordrecht. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Author's personal copy

Agroforest Syst
DOI 10.1007/s10457-016-0051-8

Potential impact of prickly pear cactus flour and *Salix babylonica* extract on cecal fermentation and methane production in horses

A. Parra-Garcia · A. Z. M. Salem · M. M. Y. Elghandour · L. M. Camacho · N. E. Odongo

Received: 15 April 2016 / Accepted: 15 November 2016
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

Abstract The cecal gas (GP) and methane (CH_4) production and cecal fermentation kinetics when corn grain (CG) was replaced with prickly cactus (PC) in a horse's diet at different levels of *Salix babylonica* (SB) extract was investigated. Three total mixed rations where CG was replaced with PC at three levels (/kg): 0 g (Control), 75 g (PC75) or 150 g (PC150) were prepared and SB extract added at four levels: 0, 0.6, 1.2 and 1.8 mL/g dry matter (DM) of substrates. No ration type × SB extract dose interaction was observed ($P > 0.05$) for GP kinetics and CH_4 production. Increasing the level of PC in the ration quadratically increased ($P < 0.01$) the asymptotic GP and decreased ($P < 0.01$) the rate and lag time of GP. Increasing the level of PC in the ration, increased GP values ($P < 0.05$). Increasing the level of SB extract linearly decreased ($P = 0.001$) the lag time of GP of all diets without affecting the asymptotic GP or the rate of GP. Ration type and SB level had no effect ($P > 0.05$) on CH_4 production; however, at 36 h of incubation, SB extract decreased CH_4 production. The rations PC75 and PC150 increased cecal pH compared with the control ration. The PC150 ration had the highest ($P < 0.05$) DM degradability, short chain fatty acids production, and gas yield after 24 h of incubation, with no effect ($P > 0.05$) of SB inclusion on all investigated fermentation kinetic parameters. It is concluded that increasing the level of PC in the diet of horse and replacing CG up to 60%, increased GP and improved cecal fermentation kinetics without affecting CH_4 production. Inclusion of *S. babylonica* extract in the tested rations had weak effects on fermentation kinetics although it decreased the lag time of GP.

Keywords Cecal fermentation · Corn grain · Horse nutrition · Prickly pear cactus · *Salix babylonica* extract

A. Parra-Garcia · A. Z. M. Salem (✉) · M. M. Y. Elghandour
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Mexico
e-mail: asalem70@yahoo.com

L. M. Camacho
Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Guerrero, Cd. Altamirano-Iguala, Chilpancingo, Guerrero, Mexico

N. E. Odongo
Department of Animal Sciences, School of Agriculture, Pwani University, P. O. Box 195-80108, Kilifi, Kenya

Published online: 23 November 2016

Introduction

Agricultural byproducts produced worldwide during different agricultural practices are nutrients-rich feed ingredients with a huge potential to be used in ruminant nutrition (Ahmed et al. 2015; Elghandour et al. 2016a). However, in many developing countries,

Author's personal copy

agriculture byproducts are not adequately utilized cause environmental problems resulting in their burning in the field. Such materials can be used as a cleaner product of animal feed and environmental conservation (Elghandour et al. 2016b, c). The livestock sector is suffering from feed shortages and rising prices of conventional feed such as grains, legumes, etc. for animal production. Moreover, the soaring prices of cereals (e.g., barley, wheat and corn), which are the major energy sources in ruminant diets force nutritionists to search and explore inexpensive alternatives that can partially substitute for the expensive grains. Feeding of unconventional feedstuffs and in some cases agricultural byproducts, which are of no food value to humans, can be one of the solutions to overcome the problem of feed shortages and rising prices.

Cacti (*Opuntia* spp.) has been recognized as one of the most widely used low cost alternative feeds in many parts of the world, especially in semi-arid regions, due to their adaptation to different environmental conditions (Stintzing and Carle 2005; Elghandour et al. 2016c). Cacti has become an important source of green fodder which ensures several livestock species survival in the semi-arid and arid regions of the world with frequent periods of prolonged droughts (Costa et al. 2009). The chemical composition and nutritive value of spineless prickly pear cactus (PC) species differ from region to region depending on many factors including the environment and genotype. The PC is a rich source of non-fibrous carbohydrates (617 g/kg DM), and is an excellent energy source with high dry matter (DM) digestibility (Wanderley et al. 2002). Replacement of energy feedstuff such as corn grain (CG) with PC may require some form of supplementation with other feed additives to improve its fermentation potential and utilization.

Rumen and cecal modifiers such as exogenous fibrolytic enzymes (Kholif et al. 2016a; Morsy et al. 2016), *Saccharomyces cerevisiae* (Rodriguez et al. 2015; Salem et al. 2016a) have been used as ration ingredients for ruminants and horses. Little is known about the nutritive value of *Salix babylonica* (SB) extract in equine nutrition; however, some information is available on ruminant nutrition (Rivero et al. 2016). Extracts of SB have been evaluated as feed additives in ruminant nutrition due to its anti-microbial effects and its ability to modulate ruminal fermentation and improve nutrient utilization (Valdes et al. 2015). The antimicrobial activity of SB extracts has been attributed to its content of a number of plant secondary metabolites such as alkaloids, saponins and phenolics (Cedillo et al. 2014) which rumen microorganisms have the ability to degrade and utilize as an energy source at low and moderate concentrations without negative effects on rumen fermentation (Salem et al. 2014a, 2016b). In ruminants, SB extract enhanced feed intake (Salem et al. 2014b), daily gain (Cedillo et al. 2014), and milk production (Salem et al. 2014b). It has also been reported to have natural anthelmintic activity (Cedillo et al. 2015; Salem et al. 2016c). To the best of our knowledge, this is the first study to include the extract of SB in the diet of horses. The aim of the current study was to investigate the effects of replacing CG in a horse's diet with PC at different levels in the presence of different levels of *S. babylonica* extract on cecal in vitro gas (GP) and methane (CH_4) production and cecal fermentation kinetics.

Materials and methods

Extract, substrates and treatments

Plant leaves of *S. babylonica* were collected randomly from several young and mature trees during summer of 2015. Leaves were freshly chopped into 1–2 cm lengths and immediately extracted at 1 g leaf/8 mL of water. Plant materials were individually soaked and incubated in water in the laboratory at 25–30 °C for 72 h in jar. After incubation, the jar was heated to 39 °C for 1 h and then immediately filtered and the filtrate collected and stored at 4 °C for further use.

Three total mixed rations were prepared where CG was replaced with PC at three levels (/kg): 0 g (Control), 75 g (PC75) or 150 g (PC150). The extract of SB was added at four levels: 0, 0.6, 1.2 and 1.8 mL/g DM of substrates. The chemical composition and ingredients is shown in Table 1.

In vitro cecal fermentation and biodegradation

Cecal contents (the inoculum source) were collected from 4 Criollo horses (3–4 years of age and weighing 300 ± 15 kg) from the local slaughterhouse of Toluca, Mexico State, Mexico. Horses had about eight hours grazing and were given water twice a day

Author's personal copy

Table 1 Composition of the experimental diets[a]. Adapted from Elghandour et al. 2016b, c

	Control	PC75	PC150
Ingredients (g/kg DM)			
Oats straw	249	248	248
Steam rolled corn	250	175	100
Soybean hulls	250	250	250
Steam rolled barley	120	110	120
Wheat bran	30	30	30
Corn gluten feed	30	30	20
Prickly pear cactus	0	75	150
Molasses	70	80	80
Vitamins/minerals[b]	1	2	2
Chemical composition (g/kg DM)			
Organic matter	964	940	957
Crude protein	130	119	113
Neutral detergent fiber	356	428	340
Acid detergent fiber	121	130	122
Ether extract	24	22	23
Non-structural carbohydrates	455	371	481

[a] PC75 prickly pear cactus was included at 75 g/kg DM of total mixed ration; PC150, prickly pear cactus was included at 150 g/kg DM of total mixed ration

[b] Contained: Vitamin A (12,000,000 IU), Vitamin D_3 (2,500,000 IU), Vitamin E (15,000 IU), Vitamin K (2.0 g), Vitamin B_1 (2.25 g), Vitamin B_2 (7.5 g), Vitamin B_6 (3.5 g), Vitamin B_{12} (20 mg), Pantothenic acid (12.5 g), Folic acid (1.5 g), Biotin (125 mg), Niacin (45 g), Fe (50 g), Zn (50 g), Mn (110 g), Cu (12 g), I (0.30 g), Se (200 mg), Co (0.20 g)

without feed supplementation. The horses had grazed predominantly on pasture containing two native grasses (*Festuca arundinacea* and ryegrass). Individual cecal samples were equally collected from the cecum of each horse and then mixed and homogenized to obtain a homogenized sample of fecal contents which were mixed with the Goering and Van Soest (1970) buffer solution without trypticase in the ratio of 1:4 v/v. The incubation media was subsequently mixed and strained through four layers of cheesecloth into a flask with an O_2-free headspace, and used to inoculate three identical runs of incubation in 120-mL serum bottles containing 0.5 g DM of substrate in presence of different doses of SB extract.

Bottles with substrates plus three bottles without substrate and SB as blanks were used. After filling all bottles, they were flushed with CO_2 and immediately closed with rubber stoppers, shaken and placed in an incubator set at 39 °C. Gas production was recorded at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24, 36, 48, 54, 60, and 72 h using the Pressure Transducer Technique (Extech instruments, Waltham, USA) of Theodorou et al. (1994). The production of CH_4 was recorded using Gas-Pro detector (Gas Analyzer CROWCON Model Tetra 3, Abingdon, UK) at 2, 6, 10, 14, 24, 36, 48, 54, 60, and 72 h of incubation.

At the end of incubation after 72 h, bottles were uncapped and the pH was measured using a digital pH meter (Conductronic pH15, Puebla, Mexico), and the residual of each bottle was filtered under vacuum through glass crucibles with a sintered filter and the fermentation residues dried at 65 °C for 72 h to estimate DM disappearance (DMD).

Chemical analyses and calculations

Samples of the rations were analyzed for DM (#934.01), ash (#942.05), N (#954.01) and ether extract (#920.39) according to AOAC (1997) and the ration's contents for neutral detergent fiber content (NDF, Van Soest et al. 1991), acid detergent fiber (ADF) and lignin (AOAC 1997; #973.18) analyses were carried out using an ANKOM^{200} Fiber Analyzer Unit (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY, USA) with the use of an alpha amylase and sodium sulfite.

For estimation of GP kinetic, recorded gas volumes (mL/g DM) were fitted using the NLIN procedure of SAS (2002) according to France et al. (2000) model as:

$$y = b \times [1 - e^{-c(t-Lag)}]$$

where y is the volume of GP at time t (h); b is the asymptotic GP (mL/g DM); c is the fractional rate of fermentation (/h), and *Lag* (h) is the discrete lag time prior to any gas release.

Metabolizable energy (ME, MJ/kg DM) was estimated according to Menke et al. (1979) as:

ME = 2.20 + 0.136 GP (mL/0.5 g DM) + 0.057 CP (g/kg DM)

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

The partitioning factor at 24 h of incubation (PF_{24}; a measure of fermentation efficiency) was calculated as the ratio of DM degradability in vitro (mg) to the volume (mL) of GP at 24 h [i.e., DMD/total GP (GP_{24})] according to Blümmel et al. (1997). Gas yield (GY_{24}) was calculated as the volume of gas (mL gas/g DM) produced after 24 h of incubation divided by the amount of DMD (g) as:

Author's personal copy

Table 2 In vitro cecal gas kinetics of three levels of prickly pear cactus (PC) at different levels (mg/g DM) of *Salix babylonica* (SB) extract inclusion

Ration[a]	SB extract	Gas production parameters[b]			Gas production (mL/g DM) at:											
		b	*c*	*Lag*	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	14 h	24 h	36 h	48 h	54 h	60 h	72 h
Control	0	381	0.083	8.85	58	107	149	185	214	240	261	329	361	374	377	379	380
	0.6	369	0.125	7.45	80	143	192	231	261	284	303	350	365	368	369	369	369
	1.2	473	0.104	7.32	88	160	218	266	304	335	361	432	461	469	472	471	472
	1.8	463	0.093	7.02	79	144	198	243	280	311	337	412	446	457	459	461	462
PC75	0	414	0.059	8.35	46	86	122	154	183	208	230	310	361	387	394	400	407
	0.6	421	0.072	7.71	54	102	142	177	208	235	258	336	381	402	408	412	417
	1.2	437	0.067	7.34	54	100	141	177	208	235	259	341	391	414	421	425	431
	1.8	472	0.059	3.21	52	98	139	176	208	237	263	355	414	442	451	457	465
PC150	0	548	0.052	3.92	53	102	145	184	219	250	279	384	457	497	509	519	531
	0.6	458	0.059	4.48	51	96	136	172	203	232	257	345	402	430	438	444	451
	1.2	502	0.055	3.34	51	98	139	176	209	239	266	363	428	463	473	481	490
	1.8	538	0.051	2.98	52	99	141	179	213	244	272	376	449	488	501	510	523
Pooled SEM		32.6	0.0067	0.837	5.2	9.3	12.5	15.0	17.0	18.6	19.9	23.9	26.8	28.8	29.6	30.2	31.1
Ration effect																	
Linear		0.536	<0.001	0.103	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.014	0.265	0.787	0.991	0.863	0.692
Quadratic		0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.003	0.007	0.017	0.044	0.101	0.210	0.537	0.036	0.005	0.002	0.002	0.001
Dose effect																	
Linear		0.118	0.643	0.001	0.061	0.057	0.054	0.052	0.049	0.049	0.048	0.050	0.062	0.076	0.083	0.089	0.098
Quadratic		0.968	0.070	0.644	0.045	0.054	0.065	0.080	0.097	0.117	0.140	0.305	0.538	0.714	0.774	0.820	0.881
Ration × dose		0.4479	0.448	0.284	0.129	0.132	0.147	0.160	0.171	0.180	0.189	0.196	0.238	0.303	0.363	0.386	0.404

SEM standard error of the mean

[a] PC75, prickly pear cactus was included at 75 g/kg DM of total mixed ration; PC150, prickly pear cactus was included at 150 g/kg DM of total mixed ration

[b] *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)

Author's personal copy

GY_{24} = mL gas/g DM/g DMD

Short chain fatty acid concentrations (SCFA) were calculated according to Getachew et al. (2002) as:

SCFA (mmol/200 mg DM) = 0.0222 GP − 0.00425

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

Statistical analyses

Data from each of the three runs within the same sample of each of the three individual samples of rations were averaged prior to statistical analysis, then mean values of each individual sample were used as the experimental unit. Results of in vitro GP and cecal fermentation parameters were analyzed as a factorial experiment using the PROC GLM option of SAS (2002) as:

$Y_{ijk} = \mu + R_i + D_j + (R \times D)_{ij} + E_{ijk}$

where Y_{ijk} = is every observation of the *i*th ration type (R_i) with *j*th SB extract dose (D_j); μ is the general mean; $(R \times D)_{ij}$ is the interaction between ration type and SB extract dose; E_{ijk} is the experimental error. Linear and quadratic polynomial contrasts were used to examine responses of different PC rations (levels) to increasing addition levels of SB extract. Statistical significance was declared at $P < 0.05$.

Results

Gas production kinetics

No ration type × SB extract dose interaction was observed ($P > 0.05$) for all investigated parameters of GP kinetics (Table 2). Ration type affected ($P \leq 0.001$) the asymptotic GP, the rate of GP and the lag time of GP. Ignoring the effect of SB addition (i.e. 0 mL SB/g DM), increasing the level of PC in the ration increased the asymptotic GP (quadratic effect, $P = 0.001$), decreased both of the rate of GP (linear and quadratic effect, $P < 0.001$) and the lag time of GP (quadratic effect, $P < 0.001$). Besides, GP at different incubation hours were affected ($P < 0.05$) by different rations i.e. increasing the level of PC in the ration increased GP values.

The level of SB extract did not affect the asymptotic GP or the rate of GP. Increasing the level of SB extract linearly decreased ($P = 0.001$) the lag time of GP of all diets. However, increasing level of SB extract tended to decreased (quadratic effect, $P = 0.07$) the rate of gas production. The extract of SB linearly affected ($P < 0.05$) GP at some incubation hours.

Methane production

No interaction was observed ($P > 0.05$) between ration type and SB extract level for CH_4 production. No CH_4 was released before 24 h of incubation (Table 3). With the exception of CH_4 at 36 h of incubation, ration type had no effect ($P > 0.05$) on CH_4 production. The ration with PC75 had the highest ($P = 0.022$) CH_4 production at 36 h of incubation compared with the other rations.

No effect was observed ($P > 0.05$) on CH_4 production with the inclusion of SB extract in the rations at all incubation hours, with the exception of CH_4 at 36 h of incubation; where SB extract addition decreased CH_4 (linear effect, $P = 0.006$; quadratic effect, $P = 0.001$) compared with rations without SB inclusion.

Cecal fermentation kinetics

Interactions were observed between ration type and SB level for cecal pH ($P < 0.001$) and DMD ($P = 0.01$) (Table 4). At the level of 0 mL SB/g DM, the PC75 and PC150 rations increased cecal pH compared with the control ration. The PC150 ration had the highest ($P < 0.05$) DMD, SCFA, and GY_{24}. The inclusion of SB extract had no effect ($P > 0.05$) on all investigated fermentation kinetic parameters.

Discussion

Gas production

No ration type × SB extract dose interaction was observed ($P > 0.05$) for GP kinetics. Therefore, the effect of ration type and SB extract dose will be individually discussed. Gas production is generally a good indicator of digestibility, fermentability and rumen microbial protein production (Rodriguez et al. 2015; Vallejo et al. 2016). Gas production is dependent on nutrient availability for rumen micro-organisms (Elghandour et al. 2015a, b). The quadratic increases in asymptotic GP and lower rate and lag time of GP with increasing level of PC replacement for CG reveals increased fermentation of the insoluble but

Author's personal copy

Table 3 Proportional in vitro methane (CH_4) productions of three levels of prickly pear cactus (PC) at different levels (mg/g DM) of *Salix babylonica* (SB) extract inclusion

Ration[a]	SB extract	Methane production[b] (ml/g DM) at:					
		24 h	36 h	48 h	54 h	60 h	72 h
Control	0	ND	3.29	3.40	4.65	8.28	8.31
	0.6	0.84	0.88	0.89	3.08	3.08	4.41
	1.2	ND	ND	2.03	6.18	6.19	8.04
	1.8	ND	ND	2.99	4.41	4.99	7.22
PC75	0	0.82	4.21	4.86	5.65	5.73	6.48
	0.6	ND	0.53	0.57	1.16	1.17	1.18
	1.2	ND	0.52	1.15	2.51	2.53	2.56
	1.8	0.82	4.16	5.83	5.95	7.50	8.17
PC150	0	1.04	2.76	5.61	5.76	8.54	8.72
	0.6	1.13	1.29	1.91	4.15	4.19	4.25
	1.2	0.59	1.16	5.77	5.90	8.82	8.98
	1.8	ND	0.58	0.64	1.31	1.34	1.38
Pooled SEM		0.430	0.754	1.346	1.454	2.002	2.162
Ration effect							
Linear		0.518	0.022	0.422	0.467	0.332	0.130
Quadratic		0.161	0.590	0.362	0.928	0.526	0.980
Dose effect							
Linear		0.332	0.006	0.193	0.230	0.088	0.215
Quadratic		0.422	0.001	0.350	0.815	0.882	0.902
Ration × dose		0.892	0.925	0.050	0.057	0.129	0.144

SEM standard error of the mean, *ND* not detected (i.e. 0 mL CH_4/g DM)

[a] PC75, prickly pear cactus was included at 75 g/kg DM of total mixed ration; PC150, prickly pear cactus was included at 150 g/kg DM of total mixed ration

[b] No CH4 was produced at 2, 6, 10, 14 h of incubation

degradable fraction (Elghandour et al. 2016b). These results suggest a steady increasing availability of carbohydrate fractions to the microbial population growth and activity, in agreement with previous studies (Elghandour et al. 2015a, b). Blümmel and Ørskov (1993) showed that the asymptotic GP can be used to predict feed intake because 88% of variance in intake was due to GP implying the PC75 and PC150 rations had the propensity to induce feed intake and growth rate in cattle (Blümmel and Ørskov 1993). The decreased rate with increasing the level of PC in the ration indicate that the time necessary for degradation was longer than for PC rations, thus less gas was produced in the short term. Microbial growth and accessibility of microbial enzymes to feed particles are reflected by the rate at which different chemical constituents are degraded. Since fractional rate of GP was correlated with feed intake (Khazaal et al. 1995), PC150 ration would likely enhance feed intake and performance of ruminants. This is because performance is largely a function of feed intake, which is a better indicator of nutritive value of feed than apparent digestibility (Okunade et al. 2014). The discrete lag time prior to GP was decreased with the PC75 and PC150 ration suggesting faster microbial adaptation to the ration, in agreement with previous reports (Elghandour et al. 2015a, b, 2016c).

The inclusion of SB extract did not affect the asymptotic GP or the rate of GP; however, it decreased the lag time of GP. This effect indicates positive effects on ruminal fermentation (Salem et al. 2014a; Elghandour et al. 2015b), and ruminal microorganisms activity possibly due to the ability of rumen microorganisms to degrade secondary metabolites in SB extract and utilize them as an energy source (Hart et al. 2008).

Author's personal copy

Table 4 Degradation and in vitro cecal fermentation profile of three levels of prickly pear cactus (PC) at different levels (mg/g DM) of *Salix babylonica* (SB) extract inclusion

Ration[a]	SB	pH	ME	DMD	SCFA	PF_{24}	GY_{24}
Control	0	5.43	13.1	861	8.3	4.81	208
	0.6	5.10	12.9	930	8.2	4.86	206
	1.2	6.55	15.6	885	10.4	4.66	215
	1.8	6.57	15.3	879	10.1	4.67	214
PC75	0	7.00	13.4	849	8.6	4.79	209
	0.6	6.96	13.8	848	8.9	4.76	210
	1.2	7.01	14.1	861	9.2	4.75	211
	1.8	6.86	14.9	857	9.8	4.70	213
PC150	0	7.07	16.4	877	11.0	4.63	216
	0.6	6.09	14.6	862	9.5	4.72	212
	1.2	6.32	15.4	861	10.2	4.67	214
	1.8	6.19	16.1	859	10.8	4.64	216
Pooled SEM		0.187	0.78	10.5	0.64	0.054	2.3
Ration							
Linear		<0.001	0.776	<0.001	0.784	0.949	0.984
Quadratic		0.894	0.005	0.316	0.005	0.014	0.010
Dose							
Linear		0.796	0.076	0.764	0.076	0.128	0.116
Quadratic		0.415	0.714	0.480	0.714	0.742	0.746
Ration × dose		<0.001	0.363	0.010	0.364	0.486	0.456

DMD, the in vitro dry matter digestibility (mg/g DM); GY_{24}, gas yield at 24 h (mL gas/g DMD); ME is the metabolizable energy (MJ/kg DM); PF_{24}, partitioning factor at 24 h of incubation (mg DMD/mL gas); pH, fermentation pH; SCFA, short-chain fatty acids (mmol/g DM)

SEM standard error of the mean

[a] PC75, prickly pear cactus was included at 75 g/kg DM of total mixed ration; PC150, prickly pear cactus was included at 150 g/kg DM of total mixed ration

Methane production

Without the occurrence of ration type × SB extract dose interaction, ration type and SB level did not affect CH_4 production. Methane emission from ruminants depends on diet degradability and chemical composition (Elghandour et al. 2016c, d). Ruminant livestock is one of the sources responsible for greenhouse gas (e.g. CH_4 emission from animal production sector is responsible for about 18% of all greenhouse gas emissions) emission (Intergovernmental Panel on Climate Change 2008). Methane is produced as a result of ruminal fermentation of feed in the rumen causing a loss of digested energy (Johnson and Johnson 1995). With the same rations used in the present experiment, Elghandour et al. (2016c) observed that increasing PC level in the ration linearly increased the asymptotic CH_4 production; however, in another experiment, the same research team (Elghandour et al. 2016b) observed that replacing CG with soybean hulls did not affect CH_4 production. The different response between soybean hulls and PC may be due to different chemical composition. Besides, the different inoculum source (rumen contents vs cecal contents) can be another reason.

Fermentation kinetics

The rations PC75 and PC150 increased cecal pH. However, Elghandour et al. (2016c) observed a declining pH with increasing level of PC. The difference maybe related with the inoculum source. In their experiment, Elghandour et al. (2016c) used rumen liquor compared with inoculum from cecal

Author's personal copy

contents in the present experiment. Higher pH is required for the activity of microorganisms presented in the cecum of horses, for their activity and ability to degrade fiber of the diet. The PC150 ration increased DMD, SCFA, and GY_{24}. Feed degradation and fermentation rate has been reported to be directly proportional to GP (Dhanoa et al. 2000). The higher GP is a good indicator of the higher potential degradability of the substrate (i.e. PC150 ration). Higher GP with PC based rations compared to CG ration (control ration) indicates a higher content of highly fermentable constituents of PC than CG. The increased DMD with increasing GP as the level of PC increased confirms the hypothesis that increasing DMD or substrate fermentability ought to be accompanied by increased GP. The improvements of fermentation parameters observed with the replacement of CG by PC could be due to additional availability of the fermentable carbohydrates which possibly promoted microbial growth (Forsberg et al. 2000) and also enhanced the incubation environment. It has been shown that availability of nutrients for rumen microorganisms will stimulate the degradability of different nutrients (Paya et al. 2007). Besides, increased SCFA production and ME are associated with high activities of microbes in the rumen. It can therefore be inferred that PC will supply more fermentable carbohydrates, promote degradability, digestibility and microbial protein synthesis relative to CG. Increasing SCFA with increased PC level was consistent with the increased OMD and ME, in agreement with earlier reports (Elghandour et al. 2013). Increased SCFA is important in terms of enhanced lactose production, milk volume and overall energy balance (Kholif et al. 2015, 2016b). The increases of fermentation profiles with increasing level of PC may be due to increased fiber digestion and enhanced ruminal fermentation (Nsereko et al. 2002) and improved attachment and colonization of PC rations by ruminal micro-organisms (Nsereko et al. 2002; Elghandour et al. 2013). In confirmation of highly positive correlation between ME and GP at 24 h (Menke et al. 1979), both ME and GY_{24} increased with increasing PC level in the ration indicating an improved incubation environment and thus fermentability. The SB extract addition to the ration was not effective in improving all the ruminal fermentation parameters probably due to its inefficiency in improving fermentation efficiency, fermentation kinetics and GP.

Results reported in the present experiment suggest that prickly pear cactus flour has a potential fermentation efficiency and fermentation profile superior to that of corn grain. It can therefore be used to replace corn grain in concentrate ration to replace conventional energy sources (e.g., maize, barley and sorghum) in ruminant diets. The inclusion of *S. babylonica* extract in the tested rations had a weak effect on their fermentation. The best level of dietary inclusion of prickly pear cactus was 150 g PC/kg DM (replacement of CG at 60%). Further research in which CG is replaced with PC flour with or without SB extract inclusion should be conducted in in vivo trials to validate current findings.

Acknowledgements Authors would like to thank the Universidad Autónoma del Estado de México (project # UAEM 4120/2016SF).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest All authors declare that there are no present or potential conflicts of interest among the authors and other people or organizations that could inappropriately bias their work.

References

Ahmed MH, Elghandour MMY, Salem AZM, Zeweil HS, Kholif AE, Klieve AV, Abdelrassol AMA (2015) Influence of *Trichoderma reesei* or *Saccharomyces cerevisiae* on performance, ruminal fermentation, carcass characteristics and blood biochemistry of lambs fed *Atriplex nummularia* and *Acacia saligna* mixture. Livest Sci 180:90–97

AOAC (1997) Association of official analytical chemists. Official methods of analysis, 16th edn. AOAC, Arlington

Blümmel M, Ørskov ER (1993) Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. Anim Feed Sci Technol 40:109–119

Blümmel M, Steingss H, Becker K (1997) The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and ^{15}N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. Br J Nutr 77:911–921

Cedillo J, Vázquez-Armijo JF, González-Reyna A, Salem AZM, Kholif AE, Hernández-Meléndez J, Martínez-González JC, de Oca Jiménez RM, Rivero N, López D (2014) Effects of different doses of *Salix babylonica* extract on growth performance and diet in vitro gas production in Pelibuey growing lambs. Ital J Anim Sci 13(3):609–613

Author's personal copy

Cedillo J, Kholif AE, Salem AZM, Elghandour MMY, Vázquez JF, Alonso MU, Barbabosa A, Chagoyán JCV, Reyna AG (2015) Oral administration of Sauce llorón extract to growing lambs to control gastrointestinal nematodes and Moniezia spp. Asian Pac J Trop Med 8(7):520–525

Costa RG, Filho EMB, de Medeiros AN, Givisiez PEN, Queirogac RCRE, Silva Melo AAS (2009) Effects of increasing levels of cactus pear (*Opuntia ficus*-indica L. Miller) in the diet of dairy goats and its contribution as a source of water. Small Rumin Res 82:62–65

Dhanoa MS, Lopez S, Dijkstra J (2000) Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: comparison of models. Br J Nutr 83:131–142

Elghandour MMY, Salem AZM, Gonzalez-Ronquillo M, Bórqueza JL, Gado HM, Odongo NE, Penuelas CG (2013) Effects of exogenous enzymes on in vitro gas production kinetics and ruminal fermentation of four fibrous feeds. Anim Feed Sci Technol 179:46–53

Elghandour MMY, Kholif AE, Bastida AZ, Martínez DLP, Salem AZM (2015a) *In vitro* gas production of five rations of different maize silage and concentrate ratios influenced by increasing levels of chemically characterized extract of *Salix babylonica*. Turk J Vet Anim Sci 39(2):186–194

Elghandour MMY, Kholif AE, Marquez-Molina O, Vazquez-Armijo JF, Puniya AK, Salem AZM (2015b) Influence of individual or mixed cellulase and xylanase mixture on in vitro rumen gas production kinetics of total mixed rations with different maize silage and concentrate ratios. Turk J Vet Anim Sci 39(4):435–442

Elghandour MMY, Kholif AE, Hernández J, Mariezcurrena MD, López S, Camacho LM, Márquez O, Salem AZM (2016a) Influence of the addition of exogenous xylanase with or without pre-incubation on the in vitro ruminal fermentation of three fibrous feeds. Czech J Anim Sci 61(6):262–272

Elghandour MMY, Kholif AE, Salem AZM, de Oca RM, Barbabosa A, Mariezcurrena M, Olafadehan OA (2016b) Addressing sustainable ruminal methane and carbon dioxide emissions of soybean hulls by organic acid salts. J Clean Prod 135:194–200

Elghandour MMY, Kholif AE, Salem AZM, Olafadehan OA, Kholif AM (2016c) Sustainable anaerobic rumen methane and carbon dioxide productions from prickly pear cactus flour by organic acid salts addition. J Clean Prod 139:1362–1369

Elghandour MMY, Vázquez JC, Salem AZM, Kholif AE, Cipriano MM, Camacho LM, Márquez O (2016d) *In vitro* gas and methane production of two mixed rations influenced by three different cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. J Appl Anim Res 45(1):389–395

Forsberg C, Forano E, Chesson A (2000) Microbial adherence to the plant cell wall and enzymatic hydrolysis. In: Cronje PB (ed) Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. CABI Publishing, Wallingford, pp 79–97

France J, Dijkstra J, Dhanoa MS, López 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. Br J Nutr 83:143–150

Getachew G, Makkar HPS, 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. J Agric Sci Camb 139:341–352

Goering MK, Van Soest PJ (1970) Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Agriculture handbook, No. 379. Agricultural Research Service, USDA, Washington, DC

Hart KJ, Yanez-Ruiz DR, Duval SM, McEwan NR, Newbold CJ (2008) Plant extracts to manipulate rumen fermentation. Anim Feed Sci Technol 147:8–35

Intergovernmental Panel on Climate Change (2008) Climate change, 2007. Synthesis report. Contribution of working group I, II, and III to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. IPCC, Geneva

Johnson KA, Johnson DE (1995) Methane emissions from cattle. J Anim Sci 73:2483–2492

Khazaal K, Dentinho MT, Ribeiro JM, Ørskov ER (1995) Prediction of apparent digestibility and voluntary feed intake of hays fed to sheep: comparison between using fibre component, in vitro digestibility or characteristics of gas production or nylon bag degradation. Anim Sci 61:521–538

Kholif AE, Gouda GA, Morsy TA, Salem AZM, Lopez S, Kholif AM (2015) *Moringa oleifera* leaf meal as a protein source in lactating goat's diets: feed intake, digestibility, ruminal fermentation, milk yield and composition, and its fatty acids profile. Small Rumin Res 129:129–137

Kholif AE, Baza-García LA, Elghandour MMY, Salem AZM, Barbabosa A, Dominguez-Vara IA, Sanchez-Torres JE (2016a) In vitro assessment of fecal inocula from horses fed on high-fiber diets with fibrolytic enzymes addition on gas, methane, and carbon dioxide productions as indicators of hindgut activity. J Equine Vet Sci 39:44–50

Kholif AE, Morsy TA, Abd El Tawab AM, Anele UY, Galyean ML (2016b) Effect of supplementing diets of Anglo-Nubian goats with soybean and flaxseed oils on lactational performance. J Agric Food Chem 64(31):6163–6170

Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W (1979) 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 Agric Sci Camb 93:217–222

Morsy TA, Kholif AE, Kholif SM, Kholif AM, Sun X, Salem AZM (2016) Effects of two enzyme feed additives on digestion and milk production in lactating Egyptian buffaloes. Ann Anim Sci 16:209–222

Nsereko VL, Beauchemin KA, Morgavi DP, Rode LM, Furtado AF, McAllister TA, Iwaasa AD, Yang WZ, Wang Y (2002) Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. Can J Microbiol 48:14–20

Okunade SA, Olafadehan OA, Isah OA (2014) Fodder potential and acceptability of selected tree leaves by goats. Anim Nutr Feed Technol 14:489–498

Paya H, Taghizadeh A, Janmohammadi H, Moghadam GA (2007) Nutrient digestibility and gas production of some tropical feeds used in ruminant diets estimated by the in vivo and in vitro gas production techniques. Am J Anim Vet Sci 2:108–113

Author's personal copy

Rivero N, Salem AZM, Ayala M, Elghandour MMY, Kholif AE, Barbabosa A, Camacho LM, Rojas S, Olivares J, Cipriano M (2016) Influence of *Salix babylonica* extract, exogenous enzyme of xylanase and their combination on blood hematological and biochemical profile in sheep and goats. Indian J Anim Sci 86(10):1140–1144

Rodriguez MP, Mariezcurrena MD, Mariezcurrena MA, Lagunas BC, Elghandour MMY, Kholif AM, Kholif AE, Almaráz EM, Salem AZM (2015) Influence of live cells or cells extract of *Saccharomyces cerevisiae* on in vitro gas production of a total mixed ration. Ital J Anim Sci 14:590–595

Salem AZM, Kholif AE, Elghandour MMY, Buendía G, Mariezcurrena MD, Hernandez SR, Camacho LM (2014a) Influence of oral administration of *Salix babylonica* extract on milk production and composition in dairy cows. Ital J Anim Sci 13(1):10–14

Salem AZM, Ryena AC, Elghandour MMY, Camacho LM, Kholif AE, Salazar MC, Domínguez IA, Jiménez RM, Almaraz EM, Martínez AGL, Mariezcurrena MA (2014b) Influence of *Salix babylonica* extract in combination or not with increasing levels of minerals mixture on in vitro rumen gas production kinetics of a total mixed ration. Ital J Anim Sci 13:873–879

Salem AZ, Elghandour MM, Kholif AE, Barbabosa A, Camacho LM, Odongo NE (2016a) Influence of feeding horses a high fiber diet with or without live yeast cultures supplementation on feed intake, nutrient digestion, blood chemistry, fecal coliform count, and in vitro fecal fermentation. J Equine Vet Sci 39:12–19

Salem AZM, Elghandour MMY, Kholif AE, López S, Pliego AB, Cipriano-Salazar M, Chagoyán JCV, de Oca Jiménez RM, Alonso MU (2016b) Tree leaves of *Salix babylonica* extract as a natural anthelmintic for small-ruminant farms in a semiarid region in Mexico. Agrofor Syst. doi:10.1007/s10457-016-9909-z

Salem AZM, Kholif AE, Elghandour MMY, Hernández J, Limas A, Cipriano M, Camacho L, Rojas S, Olivares J (2016c) Influence of *Salix babylonica* extract addition on in vitro rumen gas production and degradability of ryegrass silage harvested in different cutting days. Indian J Anim Sci 86(9):1030–1035

SAS (2002) Statistical analysis system. User's guide: statistics. Ver 9.0. SAS Institute, Cary

Stintzing G, Carle R (2005) Cactus stems (*Opuntia* spp.): a review on their chemistry and uses. Mol Nutr Food Res 49:175

Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J (1994) A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim Feed Sci Technol 48:185–197

Valdes KI, Salem AZM, López S, Alonso MU, Rivero N, Elghandour MMY, Domínguez IA, Ronquillo MG, Kholif AE (2015) Influence of exogenous enzymes in presence of *Salix babylonica* extract on digestibility, microbial protein synthesis and performance of lambs fed maize silage. J Agric Sci Camb 153:732–742

Vallejo L, Salem AZM, Kholif AE, Elghangour M, Fajardo R, Rivero N, Bastida A, Mariezcurrena M (2016) Influence of cellulase or xylanase on the in vitro rumen gas production and fermentation of corn stover. Indian J Anim Sci 86(1):70–74

Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and non-starch carbohydrates in relation to animal nutrition. J Dairy Sci 74:3583–3597

Wanderley WL, Ferreira MA, Andrade DKB, Véras ASC, Farias I, Lima LE, Dias AMA (2002) Replacement of forage cactus (*Opuntia ficus* indica Mill) for sorghum silage (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in the dairy cows feeding. Rev Bras Zootec 31:273–281

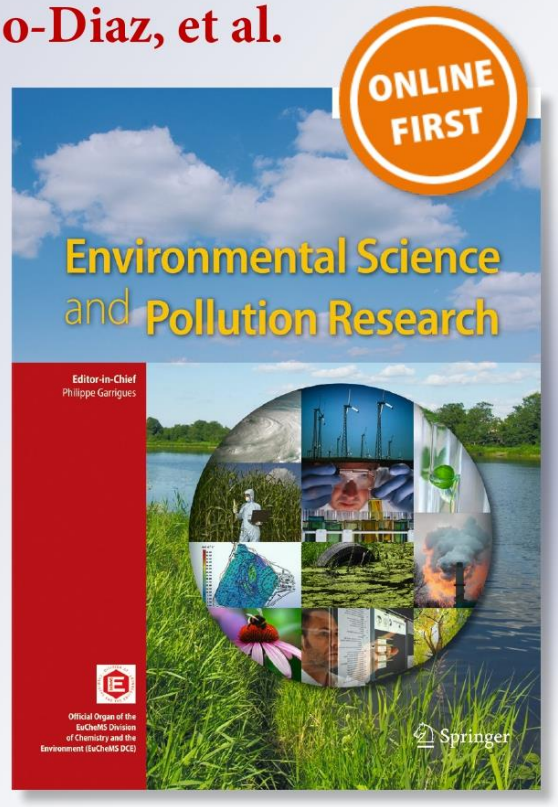
Effects of Moringa oleifera *leaf extract on ruminal methane and carbon dioxide production and fermentation kinetics in a steer model*

Armando Parra-Garcia, Mona Mohamed Mohamed Yasseen Elghandour, Ralf Greiner, Alberto Barbabosa-Pliego, Luis Miguel Camacho-Diaz, et al.

Environmental Science and Pollution Research

ISSN 0944-1344

Environ Sci Pollut Res
DOI 10.1007/s11356-019-04963-z



Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".

Author's personal copy

Environmental Science and Pollution Research
https://doi.org/10.1007/s11356-019-04963-z

RESEARCH ARTICLE

Effects of *Moringa oleifera* leaf extract on ruminal methane and carbon dioxide production and fermentation kinetics in a steer model

Armando Parra-Garcia[1] · Mona Mohamed Mohamed Yasseen Elghandour[1] · Ralf Greiner[2] · Alberto Barbabosa-Pliego[1] · Luis Miguel Camacho-Diaz[3] · Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem[1]

Received: 27 December 2018 / Accepted: 22 March 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract
Ruminal fermentation produces greenhouse gases involved in global warming. Therefore, the effect of nutrient combinations on methane, carbon dioxide, and biogas production as well as ruminal fermentation kinetics was evaluated in in vitro studies. In total mixed rations, dietary corn grain was partially replaced by two levels of soybean hulls (a highly reusable residue), and a *Moringa oleifera* extract (a natural extract) at three concentration levels was added. Higher levels of both soybean hulls and *M. oleifera* extract delayed the initiation of methane production and resulted in a lower methane and carbon dioxide production. Thus, total biogas production was also lower. Replacement of corn grain by soybean hulls tended to lower methane production rates and asymptotic carbon dioxide production, and a delay in biogas and methane formation was observed. Asymptotic biogas and carbon dioxide production, however, were increased. The presence of *M. oleifera* extract tended to delay methane formation and to decrease methane production rate as well as asymptotic methane production. Higher *M. oleifera* extract levels decreased asymptotic biogas production with the control and the highest soybean hull levels. In the presence of *M. oleifera* extract, asymptotic carbon dioxide production was shown to be quadratically increased with the control and lowest soybean hull levels, but quadratically decreased with the highest soybean hull level. With the exception of fermentation pH, the interaction of substrate type and *M. oleifera* extract level was shown to have an effect on all fermentation parameters. Most fermentation parameters were shown to be higher when replacing corn grain by soybean hulls, including fermentation pH. Thus, the conclusion could be drawn that corn grain replacement by soybean hulls (an agricultural residue) in the presence of *M. oleifera* extract (a sparing leaf product) could ameliorate greenhouse gas emissions and improve digestion.

Keywords Biogas · *Moringa oleifera* extract · Ruminal fermentation · Soybean hulls

Introduction

Sustainable ruminant husbandry requires diminished impacts on natural vegetation (using residual agricultural products), improved animal well-being (improving digestion when free-range husbandry in the wilderness is restrained), and regulation of the abundance of rumen fermentation gases (methane and carbon dioxide) emitted to the atmosphere. By simultaneously meeting these requirements, animal nutritionists and microbiologists may sustainably improve animal performance, i.e., increasing milk yield or body weight gain for a given amount of feed.

About 18 and 9% of the global methane and carbon dioxide emissions were attributed to the livestock industry (FAO-Food and Agriculture Organization of the United Nations 2006). Methane and carbon dioxide production during fermentation in ruminants were reported to cause a loss in dietary energy of 2 to 12% (Johnson and Johnson 1995). Thus, an improvement of animal performance could be expected by reducing methane production.

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem
salem@uaemex.mx; asalem70@yahoo.com

[1] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Mexico

[2] Department of Food Technology and Bioprocess Engineering, Federal Research Institute of Food and Nutrition, Max Rubner-Institut, Karlsruhe, Germany

[3] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Guerrero, Ciudad Altamirano, Guerrero, Mexico

Published online: 30 March 2019

Author's personal copy

Modification of ruminant feeds is seen as one option to reduce greenhouse gas emission in ruminant production (Kholif et al. 2015). Especially, at least, a partial replacement of traditional feed components by agricultural by-products is gaining interest because of shortages and high prices in grain and protein feeds.

Soybean hulls are an unconventional feed constituent which has been successfully evaluated as a low-cost substitute in ruminant diets in vitro and in vivo (Costa et al. 2012; Elghandour et al. 2016). Replacing corn grain with soybean hulls in ruminant diets was shown to exhibit a good fermentation characteristic and resulted in a decrease in methane and carbon dioxide production (Elghandour et al. 2016). A complete substitution of corn grain is impossible, because of the fibrous nature and the low-energy density of soybean hulls. Furthermore, feed additives such as phytogenic extracts were already reported to have a positive effect on feed utilization and animal performance in ruminants (Cedillo et al. 2014; Kholif et al. 2015) and might, therefore, also decrease greenhouse gas production. Leaves and their extracts contain biologically active compounds such as tannins, saponins, and phenolics capable of affecting fermentation in a ruminal in vitro model (Salem et al. 2014).

However, information about the impact of simultaneously replacing feed constituents by agricultural by-products and supplementing feeds with phytogenic extracts on ruminal fermentation, animal performance, and the production of greenhouse gases is scarce. Nonlinear responses are often due to dose-dependent effects and interactions, so that multiple fermentation kinetic parameters need to be compared in statistical models. Accordingly, ruminal gas, carbon dioxide, and methane production in a ruminal in vitro model after replacing different amounts of corn grain in a steer diet by soybean hulls in the absence and presence of different amounts of an extract of *Moringa oleifera* leaves were assessed. Furthermore, fermentation kinetics and the nutritional values of the different diets were evaluated.

Materials and methods

Production of the phytogenic extract

Freshly cut leaves randomly collected from young and mature *M. oleifera* trees in the state of Veracruz (Mexico) were crushed, and 1 g of the crushed leaves was immediately immersed in 8 mL of water. Extraction was performed in closed jars for 72 h at 28 °C, followed by a second extraction at 39 °C for 1 h. Thereafter, the extracts were immediately clarified by filtration through a gauze and stored at 4 °C until further use.

Substrate preparation

Substrates for in vitro fermentation were obtained by replacing 75 (soybean hull (SH)75) and 150 (SH150) g/kg DM corn grain by the same amount of soybean hulls (Table 1). A control substrate without substitution was also included in the study. All three substrates were evaluated in absence (0 mL/g substrate DM) or presence (0.6, 1.2, 1.8 mL/g substrate DM) of an extract obtained from *Moringa oleifera* leaves.

In vitro fermentation

A 1:1 (*w*/*w* DM) mixture of alfalfa hay and a commercial feed concentrate was fed ad libitum to two cannulated Holstein steers with a body weight of 450 ± 20 kg according to NRC (2001). After collecting the rumen contents from both steers, they were thoroughly mixed and flushed with carbon dioxide. Any particles were removed by filtration through a cheesecloth (four layers). For incubation, 10 mL of the filtrate diluted 1:5 (*v*/*v*) with a buffer solution described by Goering and van Soest (1970) was added to 0.5 g of the substrate. Furthermore, blanks without substrate were included in the study. Fermentation was performed for 72 h at 39 °C in closed flasks under agitation and terminated by putting the incubation flasks on ice. Thereafter, the pH values of the fermentation broths were measured. The fermentation broths were filtered

Table 1 Composition of experimental diets

	Control	SH75	SH150
Ingredients (g/kg DM)			
Soybean hulls	250	250	250
Oats straw	249	248	248
Wheat bran	30	30	30
Steam rolled barley	120	110	120
Steam rolled corn	250	175	100
Soybean hulls	0	75	150
Corn gluten feed	30	30	20
Molasses	70	80	80
Minerals/vitamins[1]	1	2	2
Chemical composition (g/kg DM)			
Organic matter (OM)	964	940	957
Ether extract (EE)	24	22	23
Acid detergent fiber (ADF)	121	130	122
Neutral detergent fiber (NDF)	356	428	340
Nonstructural carbohydrates	455	371	481
Crude protein	130	119	113

[1] 12×10^3 IU/g vitamin A, 2.5×10^3 IU/g vitamin D_3, 15 IU/g vitamin E, 2 mg/g vitamin K, 2.25 mg/g vitamin B_1, 7.5 mg/g vitamin B_2, 3.5 mg/g vitamin B_6, 20 μg/g vitamin B_{12}, 12.5 mg/g pantothenic acid, 1.5 mg/g folic acid, 125 μg/g biotin, 45 mg/g niacin, 50 mg/g Fe, 50 mg/g Zn, 110 mg/g Mn, 12 mg/g Cu, 300 μg/g I, 200 μg/g Se, 200 mg/g Co

Author's personal copy

using a glass frit under vacuum in order to obtain the nonfermented residues. The dry residues obtained by drying the filtrates overnight at 65 °C were used for quantifying the fermented substrate. All fermentations were performed in triplicate.

Methane, carbon dioxide, and biogas determination

Biogas production was determined using an Extech Instruments Pressure Transducer (Waltham, USA) according to Theodorou et al. (1994). Carbon dioxide and methane production were quantified with a Tetra3 Gas Analyzer (CROWCON, Abingdon, UK). Fitting the recorded gas volumes using the SAS (2002) NLIN procedure (France et al. 2000) was used to estimate methane, carbon dioxide, and biogas production kinetics.

Substrate analysis

Substrate composition was determined either according to the AOAC (1997) methods (dry matter, ash, nitrogen, ether extract, lignin, acid detergent fiber) or according to van Soest et al. (1991) (neutral detergent fiber).

Calculations

In vitro metabolizable energy (ME) and organic matter digestibility (OMD) were calculated as described by Menke et al. (1979). Short-chain fatty acid concentrations (SCFA) were obtained as described by Getachew et al. (2002), and the microbial biomass produced (MCP) (mg/g DM) as described by Blümmel et al. (1997). The partitioning factor (PF_{24}), the ratio of in vitro dry matter degradability (mg) and biogas production (mL) after 24 h of fermentation, was used as a measure for fermentation efficiency. Gas yield (GY_{24}) represents the gas volume (mL gas/g DM) obtained after a fermentation time of 24 h per dry matter digestibility (DMD, g).

Statistical analyses

Trends in in vitro biogas production and ruminal fermentation parameters were assessed in a factorial design with SAS (2002) PROC GLM as:

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + D_j + (R \times D)_{ij} + (E_{ijk})$$

where μ represents the general mean, R_i the type i substrate, D_j the level of *M. oleifera* extract j, $(R \times D)_{ij}$ the interaction of substrate type and *M. oleifera* extract level, and E_{ijk} the experimental error. Responses of a certain substrate to increasing levels of the *M. oleifera* extract were examined using linear and quadratic polynomial contrasts. $P < 0.05$ was used as a threshold of significance.

Results

Significant interaction at higher levels of SH and *M. oleifera* extract delayed the initiation of methane production by almost a factor of 2 (Table 2). In addition, methane production was observed to be lower (Table 2). At higher levels of soybean hulls and *M. oleifera* extract, asymptotic biogas and methane production were found to be lower, while asymptotic carbon dioxide production was still in a quite low range (Figs. 1, 2, and 3). Furthermore, higher soybean hull and *M. oleifera* extract levels resulted in a lower methane production during the entire fermentation (Fig. 1).

Significant trends identified after replacing corn grain by soybean hulls were lower asymptotic methane production ($P < 0.024$, linear effect) (Table 2), a shorter lag time for methane production ($P < 0.001$, quadratic effect), a longer lag time for biogas production ($P < 0.004$), and lower carbon dioxide production rates ($P < 0.001$, quadratic effect). However, both the asymptotic production of biogas and carbon dioxide ($P < 0.001$) were found to be higher.

The addition of *M. oleifera* extract tended to lower asymptotic methane production ($P < 0.001$, quadratic effect) and resulted in a prolonged lag time for the production of methane and a lower production rate of methane ($P < 0.008$, linear effect). From *M. oleifera* extract levels of 1.2 mL/g DM, a decrease in asymptotic biogas production with the control and the SH150 substrate was found. It is worth mentioning that in the presence of the *M. oleifera* extract, asymptotic carbon dioxide production with the control and the SH75 substrate was observed to be quadratically increased ($P < 0.007$), whereas carbon dioxide production of the SH150 substrate was found to be quadratically decreased ($P < 0.007$).

The interaction of soybean hulls and *M. oleifera* extract levels ($P < 0.001$) resulted in a lower methane production during the entire fermentation and in a lower proportional methane production after 6 h of fermentation (Table 3). When corn grain was replaced by soybean hulls, a decrease in methane production after 48 h of fermentation ($P < 0.011$, quadratic effect) and a reduced dry matter digestibility ($P < 0.046$, linear effect) were observed. Furthermore, a lower proportional methane production was found during the entire fermentation ($P < 0.05$, linear and quadratic effects). Supplementation with an extract from *M. oleifera* resulted in a lower production of methane per incubated and degraded dry matter as well as in a lower proportional methane production ($P < 0.01$, linear and quadratic effects).

At higher levels of *M. oleifera* extract, carbon dioxide production was observed to be lower after replacing corn grain by soybean hulls when compared with low levels of

Author's personal copy

Table 2 Kinetics of in vitro rumen gas (BG), methane (CH_4), and carbon dioxide (CO_2) production in dependence of soybean hull (SH) and *Moringa oleifera* extract (mL/g DM) levels

Substrate[1]	*M. oleifera* extract	BG production (mL/g DM)[2]			CH_4 production (mL/g DM)[2]			CO_2 production (mL/g DM)[2]		
		b	*c*	Lag	*B*	*c*	Lag	*b*	*c*	Lag
Control	0	281	0.030	1.92	59		12.6	91	0.080	5.72
	0.6	281	0.035	1.97	52	0.020	11.2	113	0.065	5.71
	1.2	270	0.040	1.98	43	0.018	11.3	105	0.070	5.47
	1.8	265	0.036	1.95	46	0.026	11.5	104	0.060	5.75
SH75	0	277	0.033	2.17	46	0.022	15.4	103	0.055	5.80
	0.6	389	0.035	2.84	56	0.024	13.8	151	0.060	5.19
	1.2	359	0.033	3.38	40	0.024	13.7	155	0.055	5.64
	1.8	336	0.033	3.04	40	0.022	13.5	137	0.035	5.92
SH150	0	367	0.033	2.05	46	0.027	29.1	152	0.040	4.86
	0.6	472	0.035	1.78	50	0.034	17.5	203	0.035	5.89
	1.2	339	0.025	2.59	36	0.020	18.4	136	0.040	5.95
	1.8	252	0.028	2.09	46	0.012	19.9	109	0.055	5.87
Pooled SEM		9.0	0.0033	0.307	2.4	0.0023	1.11	7.2	0.0068	0.380
Ration effect										
Linear		< 0.001	0.502	0.004	0.024	0.878	0.026	< 0.001	0.003	0.924
Quadratic		< 0.001	0.051	0.153	0.051	0.859	< 0.001	< 0.001	0.001	0.981
Dose effect										
Linear		0.003	0.902	0.225	0.010	0.008	0.006	0.850	0.158	0.236
Quadratic		0.001	0.868	0.050	0.001	0.252	0.010	0.007	0.865	0.899
Ration × dose		< 0.001	0.214	0.499	0.047	0.001	0.002	0.003	0.078	0.423

SEM, standard error of the mean

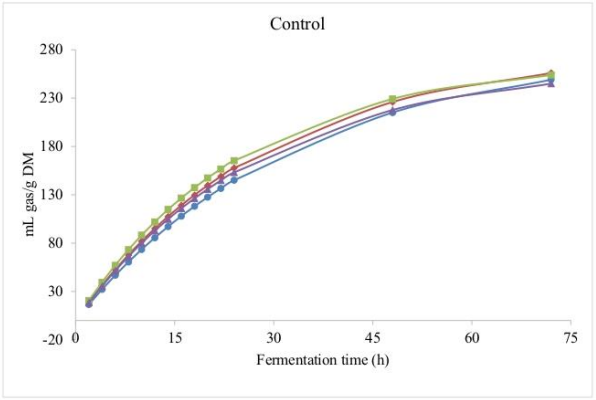
[1] Control: no replacement of corn grain by soybean hulls; SH75: replacement of 75 g/kg DM of corn grain by the same amount of soybean hulls; SH150: replacement of 150 g/kg DM of corn grain by the same amount of soybean hulls

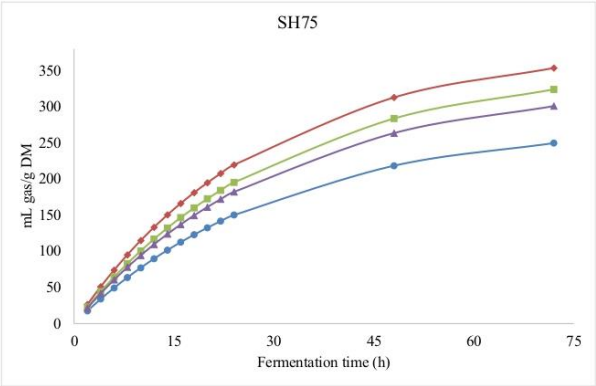
[2] *b* represents the asymptotic gas production (mL/g DM) of either rumen gas, methane, or carbon dioxide; *c* the rate of gas production (/h); *Lag* the time (h) elapsed until gas production starts

M. oleifera extract (Table 4). Moreover, at high soybean hull and *M. oleifera* extract levels, carbon dioxide production was only slightly higher than that with the control. Thus, the trend of increasing carbon dioxide production with increasing levels of soybean hulls was significantly slowed down in the presence of high *M. oleifera* extract levels. Lower soybean hull levels, however, increased carbon dioxide production per incubated and degraded dry matter after 24 and 48 h of fermentation as well as proportional carbon dioxide production after 48 h of fermentation, and lower *M. oleifera* extract levels increased carbon dioxide production and proportional carbon dioxide production per incubated and digested dry matter after 48 h of fermentation (Table 4).

With the exception of fermentation pH, the interaction of substrate type and *M. oleifera* extract levels was shown to have an effect on all fermentation parameters (Table 5). By replacing corn grain with soybean hulls, higher fermentation pH values ($P < 0.003$, quadratic effect), higher metabolizable energy ($P < 0.003$, linear effect), higher short-chain fatty acid concentrations ($P < 0.001$, linear effect), higher dry matter digestibility ($P < 0.001$, quadratic effect), higher organic matter digestibility ($P < 0.004$, linear effect), higher production of microbial biomass ($P < 0.003$, linear effect), higher GY_{24} ($P < 0.006$, linear effect), and lower PF_{24} ($P < 0.016$, linear effect) were obtained. Inclusion of *M. oleifera* extract resulted in higher metabolizable energy ($P < 0.03$, linear effect; $P < 0.036$, quadratic effect), higher short-chain fatty acid concentrations ($P < 0.02$, quadratic effect), higher production of microbial biomass ($P < 0.027$, linear effect; $P < 0.023$, quadratic effect), and higher organic matter digestibility ($P < 0.02$, quadratic effect) with the control and the SH75 substrate. It is worth mentioning that the favorable effects of the replacement of corn grain by soybean hulls peaked at the lowest *M. oleifera* extract level (metabolizable energy, organic matter digestibility, and production of microbial biomass), while at the highest *M. oleifera* extract level, fermentation pH was substantially raised.

Author's personal copy





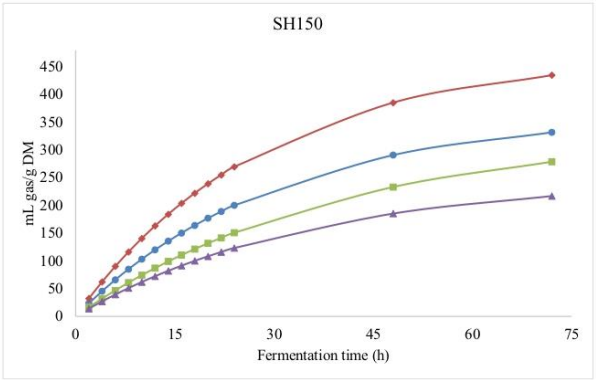
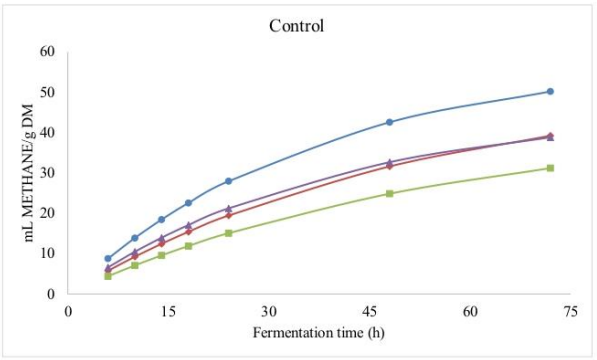
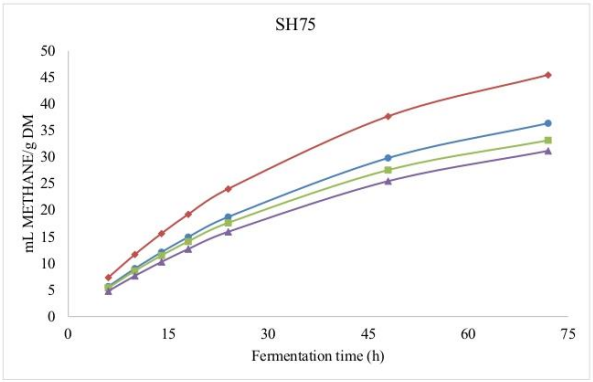


Fig. 1 In vitro rumen gas production (mL/g DM) in dependence of soybean hull and *Moringa oleifera* extract: 0 (circle with solid line), 0.6 (diamond with solid line), 1.2 (square with solid line), and 1.8 (triangle with solid line) mL/g DM. Control: no replacement of corn grain by soybean hulls; SH75: replacement of 75 g/kg DM of corn grain by the same amount of soybean hulls; SH150: replacement of 150 g/kg DM of corn grain by the same amount of soybean hulls

Author's personal copy





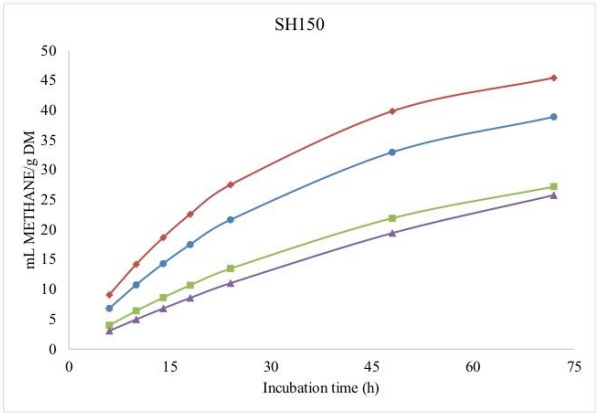


Fig. 2 In vitro methane production (mL/g DM) in dependence of soybean hull and *Moringa oleifera* extract: 0 (circle with solid line), 0.6 (diamond with solid line), 1.2 (square with solid line), and 1.8 (triangle with solid line) mL/g DM. Control: no replacement of corn grain by soybean hulls; SH75: replacement of 75 g/kg DM of corn grain by the same amount of soybean hulls; SH150: replacement of 150 g/kg DM of corn grain by the same amount of soybean hulls

Author's personal copy

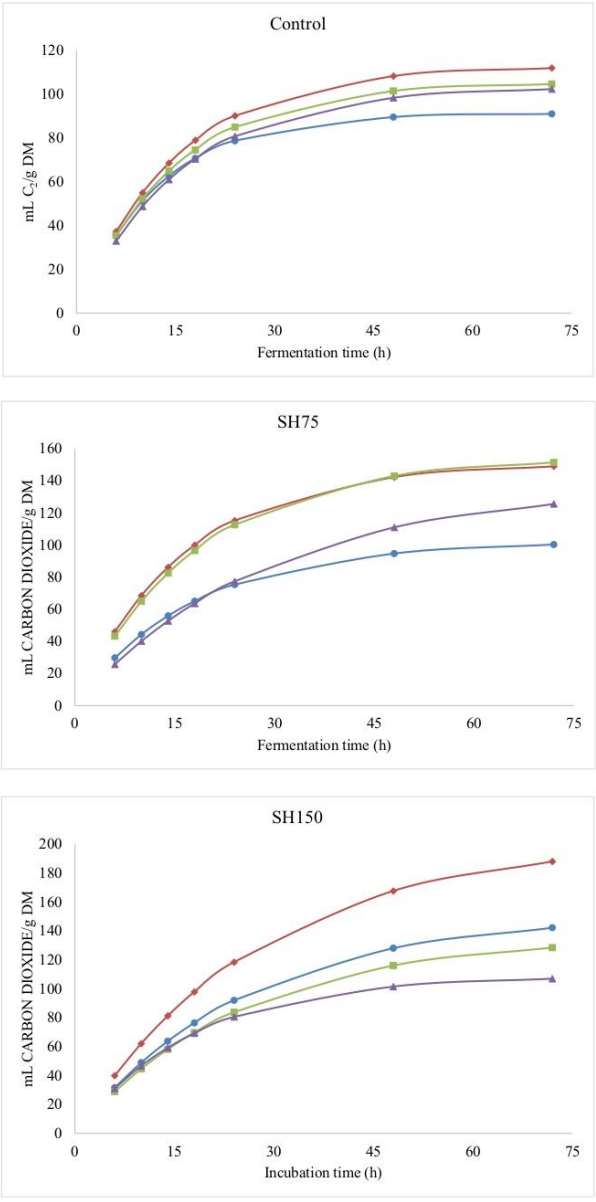


Fig. 3 In vitro carbon dioxide production (mL/g DM) in dependence of soybean hull and *Moringa oleifera* extract: 0 (circle with solid line), 0.6 (diamond with solid line), 1.2 (square with solid line), and 1.8 (triangle with solid line) mL/g DM. Control: no replacement of corn grain by soybean hulls; SH75: replacement of 75 g/kg DM of corn grain by the same amount of soybean hulls; SH150: replacement of 150 g/kg DM of corn grain by the same amount of soybean hulls

Author's personal copy

Table 4 Proportional in vitro carbon dioxide (CO_2) production as a percent of total gas production in dependence of soybean hull and *Moringa oleifera* extract (mL/g DM) levels

Substrate[1]	*M. oleifera* extract	CO_2 production								
		mL/g incubated DM			mL/g degraded DM			Proportional CO_2 production		
		6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
Control	0	36	79	89	55	122	139	75	53	41
	0.6	37	90	108	58	140	168	68	55	47
	1.2	35	85	101	55	131	156	64	52	44
	1.8	33	81	98	49	119	146	63	52	45
SH75	0	30	75	95	46	116	146	64	53	46
	0.6	46	115	142	71	178	219	57	48	43
	1.2	43	113	143	66	172	218	64	55	49
	1.8	26	77	111	40	119	170	49	47	44
SH150	0	32	92	128	49	144	200	50	48	45
	0.6	40	118	168	62	183	259	44	44	44
	1.2	29	84	116	46	133	185	60	54	49
	1.8	31	81	101	51	133	167	74	60	51
Pooled SEM		3.5	6.2	6.4	5.5	10.1	11.0	6.5	3.2	1.2
Ration effect										
Linear		0.722	0.021	0.002	0.705	0.027	0.005	0.081	0.339	0.232
Quadratic		0.200	0.278	0.009	0.421	0.099	0.004	0.162	0.732	0.022
Dose effect										
Linear		0.408	0.634	0.931	0.408	0.650	0.937	0.819	0.529	0.021
Quadratic		0.079	0.012	0.004	0.089	0.017	0.007	0.989	0.492	0.042
Ration × dose		0.102	0.024	0.002	0.119	0.061	0.014	0.076	0.052	0.010

SEM, standard error of the mean

[1] Control: no replacement of corn grain by soybean hulls; SH75: replacement of 75 g/kg DM of corn grain by the same amount of soybean hulls; SH150: replacement of 150 g/kg DM of corn grain by the same amount of soybean hulls

represent an energy source for rumen microorganisms (Hart et al. 2008), whereas higher levels seem to negatively affect rumen microorganisms because of their antimicrobial properties (Bodas et al. 2012). Thus, supplementation of a diet with an extract of *M. oleifera* needs to be optimized in respect to animal performance and environmental protection.

Methane and carbon dioxide production

Lowering methane emission from ruminants is the most important issue in respect to lowering the concentrations of greenhouse gases in the atmosphere. Replacing corn grain by soybean hulls seems to be a way to contribute to this goal. A trend to lower methane production was observed when replacing corn grain by soybean hulls. However, Elghandour et al. (2016) reported recently in a comparable study that methane production was unaffected. This contradictory result might be due to the use of different rumen liquor donors in both studies. Replacing corn grain by soybean hulls certainly changed the types and composition of the carbohydrate fractions of the substrates. Therefore, a reduction in methane production by altering the rumen microbial population seems possible (Johnson and Johnson 1995). In particular, increasing the amount of soluble carbohydrates should have an effect on the production of short-chain fatty acids with the consequence of a decreased production of acetate and an increased production of propionate (Boadi et al. 2004). This limits methanogenesis by a reduced availability of hydrogen (Polyorach et al. 2014) and a reduced population of protozoans (Iqbal et al. 2008), the main ruminal methane producers (Hook et al. 2010).

Methane production was found to be lower in the presence of *M. oleifera* extract. This is in good agreement to the results obtained by Dey et al. (2014) and Soliva et al. (2005) for roughage-based diets. The observed effects were ascribed to the secondary metabolites present in such extracts (Mueller-Harvey 2006; Bodas et al. 2012). Those have already been reported to suppress methane as well as hydrogen production in the rumen. Different mechanisms have been suggested: (a) inhibition of methanogens (Carulla et al. 2005), (b) a reduced fiber digestion (Tiemann et al. 2008), and (c) a reduced protein digestion (Salem et al. 2012).

Author's personal copy

Table 3 Proportional in vitro methane (CH_4) production as a percent of total gas production in dependence of soybean hulls and *Moringa oleifera* extract (mL/g DM) levels

Substrate[1]	*M. oleifera* extract	CH_4 production								
		mL/g incubated DM			mL/g degraded DM			Proportional CH_4 production		
		6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
Control	0	8.8	27.9	42.5	13.6	43.4	66.1	18.4	19.0	19.7
	0.6	5.7	19.4	31.6	8.9	30.1	49.0	10.4	11.9	13.8
	1.2	4.4	15.1	24.8	6.8	23.2	38.2	7.9	9.2	10.9
	1.8	6.6	21.2	32.7	9.8	31.5	48.4	12.6	13.8	15.1
SH75	0	5.7	18.8	29.8	8.7	28.9	46.0	12.4	13.3	14.3
	0.6	7.3	24.0	37.7	11.3	37.0	58.1	9.0	10.1	11.4
	1.2	5.4	17.6	27.6	8.2	26.9	42.0	8.0	8.7	9.5
	1.8	4.8	16.0	25.5	7.4	24.5	39.1	9.2	9.7	10.2
SH150	0	6.8	21.7	33.0	10.7	33.9	51.6	11.0	11.3	11.7
	0.6	9.1	27.5	39.8	14.1	42.5	61.5	10.0	10.2	10.4
	1.2	4.0	13.5	21.9	6.4	21.5	34.9	8.2	8.7	9.2
	1.8	3.1	11.0	19.4	5.0	18.1	31.9	7.5	8.6	10.0
Pooled SEM		0.51	1.30	1.62	0.82	2.09	2.62	1.29	1.11	0.95
Ration effect										
Linear		0.135	0.072	0.032	0.159	0.091	0.046	0.013	0.002	< 0.001
Quadratic		0.291	0.073	0.011	0.545	0.218	0.058	0.042	0.006	< 0.001
Dose effect										
Linear		< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.002	0.001	0.001
Quadratic		0.003	0.001	< 0.001	0.004	0.001	0.001	0.001	0.001	< 0.001
Ration × dose		0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.001	< 0.001	0.001	0.109	0.103

SEM, standard error of the mean

[1] Control: no replacement of corn grain by soybean hulls; SH75: replacement of 75 g/kg DM of corn grain by the same amount of soybean hulls; SH150: replacement of 150 g/kg DM of corn grain by the same amount of soybean hulls

Discussion

Gas production

Replacement of corn grain by soybean hulls resulted in a delay of biogas production reflecting that the rumen microflora needed some time to adapt their metabolism on the soybean hull-rich substrates. This observation might be due to the higher content of fibrous carbohydrates of soybean hulls compared to corn grain. However, a dose-dependent increase with significant nonlinear interactions with *M. oleifera* extract levels was also obtained when corn grain was replaced by soybean hulls. The higher biogas production indicated that soybean hulls provided significant amounts of nutrients and fermentable material for the microbial community present in the in vitro model system, because the availability of nutrients (Kholif et al. 2017) and rapidly fermentable carbohydrates for rumen microorganisms (Elghandour et al. 2015) was reported to increase biogas production. The higher biogas production may indicate enhanced degradability and fermentability of the substrates, and partial replacement of corn grain by soybean hulls might, therefore, increase feed intake and, consequently, animal productive performance (Khazaal et al. 1996). Elghandour et al. (2016), however, did not find any effect on biogas volumes by the same replacement of corn grain by soybean hulls as used in this study, but higher biogas production rate and an extension of the delay of biogas production with the increase in soybean hulls were observed. The use of different animal species and/or the physiological status of the donors of the rumen fluids is often responsible for the variability in the obtained results.

The increase in asymptotic biogas production in the presence of the *M. oleifera* extract was only observed with the SH75 substrate and with low levels of the extract with the SH150 substrate. This observation might be explained by significant interactions between substrate type and *M. oleifera* extract level and indicates that the *M. oleifera* leaf extract had the most significant effect at lower concentrations of fibrous carbohydrates. The content of secondary metabolites such as tannins, saponins, and phenolics has been suggested to be responsible for the observed effects (Bodas et al. 2012). Low levels of plant secondary metabolites were reported to

Author's personal copy

Table 5 In vitro rumen fermentation profile in dependence of soybean hull and *Moringa oleifera* extract (mL/g DM) levels

Substrate[1]	*M. oleifera* extract	pH	ME	DMD	OMD	SCFA	PF_{24}	MCP	GY_{24}
Control	0	5.82	6.87	611	467	3.20	5.97	515	167
	0.6	5.80	7.23	639	490	3.47	5.87	539	171
	1.2	5.91	7.40	652	504	3.63	5.73	555	174
	1.8	5.96	7.10	666	482	3.40	5.87	532	170
SH75	0	6.33	6.97	659	470	3.30	5.93	525	169
	0.6	6.05	8.87	653	594	4.87	5.37	649	187
	1.2	6.09	8.17	652	551	4.33	5.50	605	182
	1.8	6.20	7.83	649	527	4.03	5.60	582	178
SH150	0	6.40	8.40	634	566	4.43	5.47	614	183
	0.6	6.22	10.27	645	690	5.93	5.10	738	196
	1.2	6.55	7.03	624	478	3.33	5.93	523	169
	1.8	6.35	6.27	610	429	2.73	6.43	476	156
Pooled SEM		0.176	0.342	7.3	22.3	0.272	0.141	23.4	4.0
Ration effect									
Linear		0.028	0.003	0.483	0.004	0.001	0.016	0.003	0.006
Quadratic		0.003	0.048	< 0.001	0.037	0.060	0.962	0.095	0.606
Dose effect									
Linear		0.915	0.030	0.644	0.048	0.026	0.137	0.027	0.144
Quadratic		0.972	0.036	0.890	0.020	0.020	0.133	0.023	0.129
Ration × dose		0.903	< 0.001	0.010	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

DMD, DM degraded substrate (mg/g DM); *ME*, metabolizable energy (MJ/kg DM); *OMD*, in vitro organic matter digestibility (mg/g DM); *SCFA*, short-chain fatty acids; PF_{24}, partitioning factor after a fermentation time of 24 h; GY_{24}, gas yield after a fermentation time of 24 h; *SEM*, standard error of the mean

[1] Control: no replacement of corn grain by soybean hulls; SH75: replacement of 75 g/kg DM of corn grain by the same amount of soybean hulls; SH150: replacement of 150 g/kg DM of corn grain by the same amount of soybean hulls

A tendency to a higher carbon dioxide production was observed when replacing corn grain by soybean hulls. Because biogas is the sum of carbon dioxide, methane, nitrogen, and traces of other gases, the higher final biogas volumes found in this study could be explained by the increase in carbon dioxide production. However, Elghandour et al. (2016) did not observe any effect of corn grain replacement by soybean hulls on carbon dioxide production. A decrease in the production of methane might result in higher carbon dioxide concentrations, because carbon dioxide and hydrogen are in general the precursors for methane formation in the rumen (Sirohi et al. 2010). A further source of carbon dioxide in the rumen is formic acid (Fenchel and Finlay 1995). Several methanogens are capable of directly metabolizing formic acid, and therefore, their inhibition will result in an increased use of formic acid for carbon dioxide formation.

In the presence of *M. oleifera* extract, asymptotic carbon dioxide production was increased with the SH75 substrate, but decreased with the SH150 substrate, illustrating again significant interactions between substrate type and *M. oleifera* level. To the best of our knowledge, no information is available on the effects of *M. oleifera* extracts on carbon dioxide production so far.

Fermentation kinetics

Fermentation pH was determined to be between 5.80 and 6.55 and, therefore, within the range suggested by Ørskov and Ryle (1990) for optimal growth and activity of ruminal microorganisms. Replacing corn grain by soybean hulls resulted in higher fermentation pH values making the environment more suitable for cellulolytic activity, since a positive correlation between fermentation pH and readily fermentable carbohydrates (Walsh et al. 2009) as well as fermentation pH and the production of volatile fatty acids has been reported (Ramos et al. 2009).

Higher metabolizable energy, short-chain fatty acid concentrations, and microbial biomass production when replacing corn grain by soybean hulls were consistent with higher organic matter digestibility and dry matter digestibility (Elghandour et al. 2015). Short-chain fatty acids and gases are in general generated by fermentation of dietary organic matter (Blümmel and Ørskov 1993). In addition, the expected increase in microbial biomass due to the conversion of degraded substrate (Blümmel et al. 1999) was confirmed by a lower PF_{24} with both SH75 and SH150 substrates. The improvement of fermentation parameters, for example fermentability,

Author's personal copy

could be explained by a higher content of easily fermentable carbohydrates of soybean hulls compared to corn grain which are required for ruminal microbial activity. A higher availability of nutrients, particularly nitrogen, for microbial activity could explain the linear increase in organic matter digestibility with increasing levels of soybean hulls (Elghandour et al. 2016). The results obtained in this study are in good agreement to those reported by Elghandour et al. (2016). They reported also improved fermentation kinetic parameters when replacing corn grain by soybean hulls at the same levels as in this study.

Inclusion of an extract derived from *M. oleifera* leaves enhanced microbial biomass production, organic matter digestibility, metabolizable energy, and short-chain fatty acid concentrations with the SH75 and the control substrates compared to the SH150 substrates. This observation is in good agreement with the already drawn conclusion that the effects induced by the *M. oleifera* extract were more pronounced at lower levels of fibrous carbohydrates.

Conclusion

Partial replacement of corn grain with soybean hulls enhanced the nutritional value of the substrates and resulted in a decreased methane and an increased carbon dioxide production. The *M. oleifera* extract positively affected fermentation at lower concentrations of fibrous material. However, an extract derived from *M. oleifera* leaves reduced methane production in the highest level of replacement of corn grain by soybean hulls. The results suggest that simultaneous improvements can be made toward sustainable husbandry using optimal levels of soybean hulls and *M. oleifera* extract in order to reduce methane emissions, enhance the nutritional value of feed, and partially replace a staple crop by an agricultural waste product and a perennial plant. Further experiments with different amounts of soybean hulls and different levels of an extract from *M. oleifera* leaves should focus on in vivo methane and carbon dioxide production.

References

AOAC (1997) Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis, 16th ed. AOAC, Arlington

Blümmel M, Ørskov ER (1993) Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. Anim Feed Sci Technol 40:109–119

Blümmel M, Steingass H, Becker K (1997) The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and ^{15}N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. Br J Nutr 77:911–921

Blümmel M, Mgomezulu R, Chen XB, Makkar HP, Becker K, Ørskov ER (1999) The modification of an *in vitro* gas production test to detect roughage related differences in *in-vivo* microbial protein synthesis as estimated by the excretion of purine derivatives. J Agr Sci Cambridge 133:335–340

Boadi D, Benchaar C, Chiquette J, Massé D (2004) Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: update review. Can J Anim Sci 84:319–335

Bodas R, Prieto N, García-González R, Andrés S, Giráldez FJ, López S (2012) Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. Anim Feed Sci Technol 176: 78–93

Carulla JE, Kreuzer M, Machmüller A, Hess HD (2005) Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. Crop Pasture Sci 56:961–970

Cedillo J, Vázquez-Armijo JF, González-Reyna A, Salem AZ, Kholif AE, Hernández-Meléndez J, Martínez-González JC, Jiménez RMDO, Rivero N, López D (2014) Effects of different doses of *Salix babylonica* extract on growth performance and diet in vitro gas production in Pelibuey growing lambs. Ital J Anim Sci 13:609–613

Costa SBM, Ferreira MA, Pessoa RAS, Batista AMV, Ramos AO, da Conceição MG, Gomes LHS (2012) Tifton hay, soybean hulls, and whole cottonseed as fiber source in spineless cactus diets for sheep. Trop Anim Health Prod 44:1993–2000

Dey A, Paul SS, Pandey P, Rathore R (2014) Potential of *Moringa oleifera* leaves in modulating in vitro methanogenesis and fermentation of wheat straw in buffalo. Indian J Anim Sci 84:533–538

Elghandour MMY, Kholif AE, Marquez-Molina O, Vazquez-Armijo JF, Puniya AK, Salem AZM (2015) Influence of individual or mixed cellulase and xylanase mixture on *in vitro* rumen gas production kinetics of total mixed rations with different maize silage and concentrate ratios. Turk J Vet Anim Sci 39:435–442

Elghandour MMY, Kholif AE, Salem AZM, Olafadehan OA, Kholif AM (2016) Sustainable anaerobic rumen methane and carbon dioxide productions from prickly pear cactus flour by organic acid salts addition. J Clean Prod 139:1362–1369

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2006) Livestock a major threat to the environment: remedies urgently needed. [Accessed 15 August 2016]. Available from http://www.fao.org/newsroom/en/news/2006/1000448/index.html

Fenchel T, Finlay BJ (1995) Oxford series in ecology and evolution. Oxford University Press, Ecology and evolution in anoxic worlds.

France J, Dijkstra J, Dhanoa MS, 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. Br J Nutr 83:143–150

Getachew G, Makkar HPS, 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. J Agr Sci Cambridge 139:341–352

Goering MK, van Soest PJ (1970) Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Agriculture handbook, no 379. Agricultural Research Service, USDA, Washington, DC

Hart KJ, Yanez-Ruiz DR, Duval SM, McEwan NR, Newbold CJ (2008) Plant extracts to manipulate rumen fermentation. Anim Feed Sci Technol 147(1):8–35

Hook SE, Wright ADG, McBride BW (2010) Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. Archaea 945785. https://doi.org/10.1155/2010/945785

Iqbal MF, Cheng YF, Zhu WY, Zeshan B (2008) Mitigation of ruminant methane production: current strategies, constraints and future options. World J Microbiol Biotechnol 24:2747–2755

Johnson KA, Johnson DE (1995) Methane emissions from cattle. J Anim Sci 73:2483–2492

Khazaal KA, Parissi Z, Tsiouvaras C, Nastis A, Ørskov ER (1996) Assessment of phenolics-related antinutritive levels using the *in vitro* gas production technique: a comparison between different types of polyvinylpyrrolidone or polyethylene glycol. J Sci Food Agric 71: 405–414

Author's personal copy

Kholif AE, Gouda GA, Morsy TA, Salem AZM, Lopez S, Kholif AM (2015) *Moringa oleifera* leaf meal as a protein source in lactating goat's diets: feed intake, digestibility, ruminal fermentation, milk yield and composition, and its fatty acids profile. Small Rumin Res 129:129–137

Kholif A, Elghandour M, Salem A, Barbabosa A, Márquez O, Odongo N (2017) The effects of three total mixed rations with different concentrate to maize silage ratios and different levels of microalgae *Chlorella vulgaris* on *in vitro* total gas, methane and carbon dioxide production. J Agric Sci 155(3):494–507

Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W (1979) 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 Cambridge 93:217–222

Mueller-Harvey I (2006) Review, unraveling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. J Sci Food Agric 86:2010–2037

NRC (2001) Nutrient requirement of dairy cattle, 7th rev. edn. National Research Council, National Academy Press, Washington, DC

Ørskov ER, Ryle R (1990) Energy nutrition in ruminants. Elsevier, New York

Polyorach S, Wanapat M, Cherdthong A (2014) Influence of yeast fermented cassava chip protein (YEFECAP) and roughage to concentrate ratio on ruminal fermentation and microorganisms using *in vitro* gas production technique. Asian Australas J Anim Sci 27: 36–45

Ramos S, Tejido ML, Martínez ME, Ranilla MJ, Carro MD (2009) Microbial protein synthesis, ruminal digestion, microbial populations, and nitrogen balance in sheep fed diets varying in forage-to-concentrate ratio and type of forage. J Anim Sci 87:2924–2934

Salem AZM, Szumacher-Strabel M, Lopez S, Khalil MS, Mendoza GD, Ammar H (2012) *In situ* degradability of soyabean meal treated with *Acacia saligna* and *Atriplex halimus* extracts in sheep. J Anim Feed Sci 21(3):447–457

Salem AZM, Kholif AE, Elghandour MMY, Hernandez SR, Domínguez-Vara IA, Mellado M (2014) Effect of increasing levels of seven tree species extracts added to a high concentrate diet on *in vitro* rumen gas output. Anim Sci J 85(9):853–860

SAS (2002) Statistical Analysis System. User's guide: statistics. Ver 9.0. SAS Institute, Cary

Sirohi SK, Pandey N, Singh B, Puniya AK (2010) Rumen methanogens: a review. Indian J Microbiol 50:253–262

Soliva CR, Kreuzer M, Foidl N, Foidl G, Machmuller A, Hess HD (2005) Feeding value of whole and extracted *Moringa oleifera* leaves for ruminants and their effects on ruminal fermentation *in vitro*. Anim Feed Sci Technol 118:47–62

Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J (1994) A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim Feed Sci Technol 48:185–197

Tiemann TT, Lascano CE, Wettstein H-R, Mayer AC, Kreuzer M, Hess HD (2008) Effect of the tropical tanninrich shrub legumes *Calliandra calothyrsus* and *Flemingia macrophylla* on methane emission and nitrogen and energy balance in growing lambs. Animal 2:790–799

Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and non-starch carbohydrates in relation to animal nutrition. J Dairy Sci 74:3583–3597

Walsh K, O'Kiely P, Taweel H, McGee M, Moloney AP, Boland TM (2009) Intake, digestibility and rumen characteristics in cattle offered whole-crop wheat or barley silages of contrasting grain to straw ratios. Anim Feed Sci Technol 148:192–213

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Evaluación de extracto de Neem sobre la carga parasitaria y bioquimica sanguinea de ovinos.

Reporte preliminar

Resumen

Este estudio se realizó con 30 ovinos gestantes en las instalaciones de la facultad de veterinaria de la Universidad Autónoma del Estado de México. Se procedió a darles la dosis de 0, 20 y 40 mililitros de extracto de Neem preparada con 1 Kilogramo de hojas secas trituradas de Neem y 8 Litros de agua destilada. La dosis fue suministrada en las mañanas cada tercer día durante un mes. Teniendo como resultado, baja carga parasitaria.

Palabras clave: Neem, desparasitante, ovinos, carga parasitaria.

Introducción

La investigación en la medicina alternativa ha tenido más importancia en los últimos años, conociéndose los principios activos de muchas variedades de plantas para uso medicinal en animales y humanos. Dentro de esta medicina se encuentra el árbol de Neem, que fue introducido en México en 1989 por la Universidad Autónoma de Nuevo León (Leos y Salazar 1992), actualmente se encuentra en varios estados de la República Mexicana como Veracruz, Tamaulipas, Tabasco donde se llevan a cabo investigaciones para el uso y aplicaciones de las hojas, semillas, corteza y raíz. Investigadores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma del Estado de México, tuvieron el interés de probarlo como desparasitante en ovinos.

El árbol de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), en los últimos años ha despertado gran interés por la investigación científica, debido a la divulgación en internet sobre sus propiedades medicinales e insecticidas, desde las hojas, semillas, corteza y madera. Siendo el componente principal la azaradiractina que actúa

como insecticida y que puede funcionar como antiparasitario, fungicida, acaricida, protector de cosechas, sin contaminar el ambiente por ser un producto natural (Cruz y Del Ángel, 2004).

El Neem se usa para el tratamiento de inflamaciones, infecciones, fiebre, enfermedades de la piel, trastornos dentales, antiinflamatorias, antihiperglicémicos, antiulcerosos, antimaláricos, antifúngicos, antibacterianos, antivirales, antioxidantes, y anticancerígenas (Subapriva, 2005)

Los principales compuestos que han sido aislados del Neem son triterpenos y tetranotriterpenoide ejemplo: la azadiractina y limonoides entre otros.

La inclusión de Neem en la dieta de conejos mejoró la nutrición, afecta los perfiles sanguíneos; esto implicó que hasta un 15% de inclusión de Neem tuvo un efecto positivo sobre la cantidad relativa de células sanguíneas y el volumen total de sangre de acuerdo con Ogbuewu (2010).

El extracto de hoja y corteza de Neem reduce el nivel de glucosa en sangre y la peroxidación lipídica y aumenta las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa, y glutatión peroxidasa en tejidos de hígado y riñón el estudio se desarrolló en ratas diabéticas. El tratamiento con extracto acuoso de hoja de Neem en ratas diabéticas inducidas con dieta alta en grasas durante 30 días incrementó significativamente las actividades de antioxidantes enzimáticos en tejidos hepáticos, sugiriendo que el extracto de hoja de Neem tiene antidiabéticos y potenciales antioxidantes (Arivazhagan *et al*., 2004).

En estudios hechos por Chandrawathani (2000-2006) determinaron que había una reducción en los recuentos de huevos fecales y gusanos en las cargas parasitarias de animales alimentados con hojas frescas de Neem, sin embargo, el número de animales utilizado en estos estudios fueron pocos.

Los medicamentos antihelmínticos comerciales han sido los usados en los últimos años como la única forma de controlar la infección parasitaria, pero ellos son caros y no disponibles en las zonas rurales (Chandrawathani *etal*., 1995; Conder y Campbell, 1995; handrawathani *et al*., 2004).

Se mencionan desventajas graves de usar estos antihelmínticos como son problemas de residuos químicos en productos alimenticios de origen animal, toxicidad y resistencia por parte de los parásitos helmintos a los medicamentos farmaceuticos (Nari y Hansen, 1999).

Los nematodos gastrointestinales son cada vez más resistentes a los productos comerciales utilizados para controlarlos. Aunado al costo de los medicamentos que se usan en las aplicaciones rutinarias de vermífugos en los rebaños y ante el problema de los residuos en los productos animales y la contaminación del medio ambiente, esta preocupación ha generado que se investigue sobre la actividad antihelmíntica de los extractos de plantas (Chagas *et al*., 2007).

Estudios realizados en Cuba para evaluar el efecto de las hojas de Neem (*Azadirachtina indica*) en extracto acuoso sobre los nemátodos gastrointestinales en ovinos, plantearon un primer experimento para determinar la dosis efectiva de extracto que se debe suministrar y otro para determinar la frecuencia necesaria para suministrar dicha dosis. El HPG se estableció mediante la técnica de Mc. Master y, mediante análisis estadístico se encontró que 3 aplicaciones con dosis de 30 g/90 mL e intervalos de 48 hrs, es la forma más efectiva para aplicar el extracto lo cual produce disminuciones en los géneros Strongyloides, Haemonchus, Ostertagia y Trichostrongylus en un 100%. (Estrada *et al*., 2012).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en (1993) ha reconocido la necesidad de la investigación de las prácticas medicinales antiguas para cuidado de la salud de los humanos y los animales. El Comité Nacional de Investigación (NRC) de los Estados Unidos (1992) publicó un reporte titulado “Neem*: A Tree for Solving Global Problems*”; el NRC considera el árbol del Neem como el recurso natural más prometedor de todas las plantas por sus amplias propiedades, que beneficiaría a la población.

Los parásitos encontrados por diversos estudios son: *Strongyloides*, *Haemonchus*, *Ostertagia* y *Trichostrongylus;* con la dosis del extracto del *Neem* se podrían controlar estos nematodos, de acuerdo con la literatura (Delmoral, 1994; García y Ruiz, 1994; Pietrosemoli *et al*., 1999; Salazar, 1999 y 2004).

Desafortunadamente no se tiene una dosis específica sobre la administración del extracto de Neem, como Pietrosemoli *et al.* (1999) quien administró en la dieta *ad libitum*; Chandrawathani *et al.* (2000 y 2002) usó las hojas frescas durante un mes *ad libitum* a ovinos. Costa *et al.* (2005) usó 0,1g/Kg durante 3 meses en ovinos, y Khalid *et al.* (2005) trató ovinos con 10% de extracto acuoso de las hojas del *Neem*. Sin hacer estudios sistemáticos

Como se ha descrito; anteriormente a esta investigación no existía una dosis prescrita para los ovinos de acuerdo a su peso; se dice en la literatura que el Neem puede ser abortivo, por esta razón se procedió en el experimento con cuidado ya que los 30 ovinos usados en este estudio estaban gestando.)Gbotolorun 2008).

ANALISIS BROMATOLOGICO DEL NEEM

Las hojas de Neem contienen:

20% de fibra, 50% de carbohidratos, 15% de proteínas, 5% grasas, 8% de cenizas, 2% de calcio y aminoácidos. como: alanina, aspergina, acido aspártico, cistina, acido glutámico, isoleucina fenilanina, prolina, treonina, triptofano.

OBJETIVOS

Evaluar el extracto del Neem (*Azadirachta indica)* en la frecuencia de parásitos gastrointestinales a través del análisis coproparásitoscopico y hematológico, en ovinos**.**

Determinar el tipo de parásitos gastrointestinales más frecuentes en las muestras de los animales en estudio. Evaluar la carga parasitaria en animales expuestos al tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico: 30 ovinos gestantes (3 grupos al azar).

Grupo. 1 = control, 0 ml

Grupo. 2 = 20ml

Grupo. 3 = 40ml.

2 kilogramos de hojas de neem (*Azadirachta indica).*

Agua destilada

Análisis de sangre, coproparasitoscopico (Mc. Master).

Se recolectaron hojas de Neem en el sur del estado de Veracruz, se secaron y se realizó el extracto acuoso de 1 kg. de hojas de Neem en 8 litros de agua destilada por 48hrs. En las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Estado de México.

- MATERIAL:

1. *Azadirachta indica,* hojas maceradas para obtener el extracto con agua purificada en reposo por 24 hrs. En una relación de 1:8
2. Báscula
3. 30 animales identificados del 1-30
4. Corrales
5. Jeringa de 60 ml
6. Rollo de bolsas con capacidad de 1kg

- MÉTODO

Animales:

Se utilizarán 30 ovinos en gestación de distintas razas, como son; Texel, Suffolk, Hampshire y Dorset con una edad promedio de 3.5 años y un peso promedio de 88 kg. La unidad de producción es semi intensiva, en la cual al mediodía salen a pastoreo y por la tarde regresan, su alimentación es a base de sorgo y ensilado de maíz, dentro de las instalaciones cuentan con cama de rastrojo picado y agua a libre acceso.

Tiempo experimento 30 días

Dosis 20 y 40 mililitros cada tercer día por las mañanas.

TRATAMIENTOS Y ANIMALES

La obtención del extracto se realizó por medio de la infusión de hojas trituradas de Neem, se deja en reposo por 24 horas utilizando como solvente agua purificada.

El total de los animales se dividió en 3 grupos al azar, el primero fue el grupo control, al cual no se le administro el extracto, pero participo en los muestreos.

Al segundo grupo se le aplicó una dosis de 20 ml del extracto, mientras que al tercer grupo se administró 40 ml. Los animales serán dosificados a las 8 am cada tercer día y la alimentación cotidiana de los animales no será modificada, teniendo como base ensilado de maíz adicionado con sorgo y agua al libre acceso.

Se administra el extracto de las hojas de *Neem* en una dosis de 20 ml. por animal

Muestreo

Las muestras se identificaron de forma individual usando su numeración del 1-30, con las especificaciones marcadas por el laboratorio. Se determinó la carga parasitaria realizando un muestreo en el día cero en ayunas.

El segundo muestreo se realizó al día 30 para poder comparar los resultados entre los muestreos

Para el estudio de las muestras, se llevó a cabo el examen coproparasitoscópico por la técnica de Mc Master.

Resultados

Tabla 1. Carga parasitaria de huevecillos de parásitos en ovinos

Especie	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
Haemoncus spp.	203 hpgh	51 hpgh
Eimeria spp.	54 hpgh	3 hpgh
Chavertia spp.	9 hpgh	0 hpgh
Trichuris spp.	16 hpgh	0 hpgh
Nematodirus spp.	9 hpgh	0 hpgh
Cooperia spp.	5 hpgh	0 hpgh

Tabla 2. Comparación de algunos valores más relevantes del hemograma y su estado de salud de los ovinos

Grupos.	Eritrocitos	Hematocrito	Hemoglobina	Eosinofilos	Glucosa
Control	9.2	41.6	138.8	5.77	3.00
20ml	10.05	42.8	142.3	0.82	1.75
40 ml	10.20	42.5	141.3	1.22	1.62

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La prevalencia por especie de nematodo mostró similar tendencia a las indicadas en muchos estudios en todo el mundo, donde resalta una elevada existencia de

nematodos gastro intestinales en ovinos en semipastoreo, entre los que destacan: *Haemonchus* spp., T*richuris* spp., *Eimeria* spp., *Chavertia* spp., *Cooperia* spp., y *Strongyloides* spp., en distintas proporciones, de acuerdo con las condiciones climáticas del lugar (Sprenger *et al.,* 2013; González *et al.,* 2010; Rodriguez *et al.,* 2001).

La prevalencia de nematodos gastro intestinales en el estudio de Molina *et al.,* 2016 fue de 77.63%, la eliminación promedio de huevecillos por gramo de heces fue de 595.35±90.50. No se encontró diferencias entre grupos de edad y la mayor prevalencia (78.63) y carga de huevecillos por gramo de heces (598.52 ±119.78) se encontró en ovinos mayores de un año. Los géneros identificados de nematodos gastro intestinales fueron:
Haemonchus spp., con 32%, *Cooperia* spp., con 30%, *Trichostrongylus* spp., con 17.33% y *Oesophogostomun* spp., con 13.67%. Además se encontró el género *strongiloides* spp., en un 7.00%. Se concluye que los ovinos en pastoreo al inicio de la época seca presentan alta prevalencia de nematodos gastro intestinales, siendo los géneros predominantes *Haemonchus* spp., *Cooperia* spp. *y Trichostrongylus* spp.

Conclusiones

De acuerdo a los resultados en los animales tratados con extracto de Neem: la carga de nematodos disminuye y la dosis más efectiva fue la de 40 ml. Y la glucosa en sangre también disminuye,

No hubo ningún problema de aborto con estas dosis. Por lo que se puede inferir que no hay problema de aborto aun con 40 ml. De extracto de Neem.

Sin embargo, se requieren más investigaciones para establecer la eficacia del Neem en ensayos *in vivo* en esta y otras especies.

La ventaja del Neem es que no contamina el ambiente (Cruz y Del Ángel, 2004).

REFERENCIAS

Abu Syed, M.D., Mosaddek, M.D. Mamun, U.R. 2008. A Comparative Study of Anti-Inflammatory Effect of Aqueous Extract of Neem Leaf and Dexamethasone Bangladesh J. Pharmacol., pp: 47-44.

Amer, H., Wafaa, A.H. and Hanan, A.A. 2010. *In vitro* Antitumour activities of seeds and leaves Neem indica) extracts. IJAR., 2(2): 165-171.

Arias D., Vázquez G., Acosta W., Montañez L., Alvarez, R., Pérez, V. 2009. Determinación del Azadiractina de los aceites esenciales del árbol de Neem (*Azadirachta Indica*) *Departamento de Química, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo.*Revista de Ingeniería.

Arivazhagan A., Velmurugan B., Bhuvaneswari V., and Nagini S. 2004 Journal of Medicinal Food.Sep.

Bandoni, A. 2.000. ((Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica)). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

Boeke, S.J., Boersma, M.G., Alink, G.M., Van Loon, J.J., Van Huis, A., Dicke, M, Rietjens, I.M. 2004. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. Journal Of Ethnopharmacology. Vol. 94, Num. 1, pp 25–42.

Bravo, L., 1998. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significanc. Nutr Rev., 56: 317-333.

Cai, Y., Q. Luo,. Sun, M., and Corke, H., 2004. Antioxidant Activity And Phenolic Compounds of 112 Traditional Chinese Medicinal Plants Associated With Anticancer. Life Sci., 74: 2157-218.

Chagas, A.C., Vieira, L.S., Freitas, A.R., Araújo, M.R., Araújo-Filho, J.A., Araguão, W.R., Navarro, A.M. 2007. Anthelmintic efficacy of neem (Azadirachta indica A. Juss) and the homeopathic product Fator Vermes in Morada Nova sheep.

Chandrawathani, P., Chang, K.W., Nurulaini, R., Waller, P. J., Adnan, M., Zaini, C.M., Jamnah, O., Khadijah, S., and Vincent, N. 2006. Daily feeding of fresh Neem leaves (*Azadirachta indica*) for worm control in sheep. Tropical Biomedicine, 1, 23-30., de Malasyan Society of Parasitology and Tropical Medecine.

Chandrawathani, P., Parameswaran, S. y Asiah-Naina, M. 1994. Antiparasitic drugs used in selected sheep and goat farms in West Malaysia. Jurnal Veterinar Malaysia 6(2), 61-64.

Chandrawathani, P., Jamnah, O. and Rajamanickam, C. 1995. Testing potential control programmes for helminthiasis in sheep on open pasture. The 17th Malaysian Society of Animal Production Annual Conference, Penang.

Chandrawathani, P., Adnan M. and Zaini C. 2000. Preliminary study on Neem (*Azadirachta indica*) as an alternative anthelmintic for sheep. En: Proceedings of the 12th Veterinary Association Malaysia Scientific Congress 1-4 Sept. 2000, Kuantan. p. 126-127.

Chandrawathani, P., Brelin, D., NorFasihah, S., Adnan, M., Jamnah, O., Sani, R., Hoglund, J. and Waller, P. 2002. Evaluation of the Neem tree (*Azadirachta indica*) as a herbal anthelmintic for nematode parasite control in small ruminants in Malaysia. Tropical Biomedicine 19(1&2), 41-48.

Chandrawathani, P., Yusoff, N., Wan, L., Ham, A. and Waller, P. 2004. Total anthelmintic failure to control nematode parasites of small ruminants on government breeding farms in Sabah, East Malaysia. Veterinary Research Communication 28: 203-214.

Chandrawathani, P.; Adnan, M.; Waller, P. 1999. Anthelmintic resistance in sheep and goat farms on peninsular Malaysia; Veterinary Parasitology 82: 305- 310.

Conder, G. and Campbell, W. 1995. Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance. PubMed.

Dey, P and Harborne, J. 1997. Methods in Plant Biochemistry, Academic Press, London pp: 387-416.

Estrada, J. (2012). Eficacia del extracto de las hojas del Neem *Azadirachta indica A. Juss* en el control de nematodos gastrointestinales en ovino Pelibuey - Efficiency of the Neem *Azadirachta indica A*. Juss leaf extract in the control of gastrointestinal nematodes in Pelibuey sheep, REDVET Rev. electrón. vet. 2012 Volumen 13 Nº 7

Gbotolorun, S.C., Osinubi, A.A., Noronha C.C. and Okanlawon, A.O. 2008. Antifertility potential of Neem flower extract on adult female sprague dawley rats. Afr. Health Sci. 8(3),168-173.

Hansen, J. and Perry, B. 1994. The epidemiology, diagnosis and control of helminth arasites of ruminants. International Laboratory for Research on Animal Diseases, Nairobi, Kenya, p. 171.

Khalid, S., Amin, M., Mostofa, M., Choudhury, M. y Uddin, B. 2005. Effects of Indigenous Medicinal Plants (Neem and Pineapple) Against Gastro-intestinal Nematodiasis in Sheep. Inter. J. Pharmacol.1 (2), 185-189.

Khan, S.A. and Junaid, A. 2008. Study on The Effect of Neem (*Azhadirachta indica*) Leaves Smoke In Controlling Airborne Bacteria In Residential Premises. Curr. Res. Bacteriol. (2): 64-66.

Mahmood, A.M., Ogbonna O.B. and Raji, M. 2010. The Antibacterial Activity of *Azadirachta indica* (Neem) Associated With Eye And Ear Infections. J. Med. Plant. Res. 4(14), 1414-1421.

Nari, A. y Hansen, J. 1999. Resistance of Ecto- and Endoparasites: Current and Future Solutions, 67th General Session. International Committee. Office International des Epizooties, OIE. Paris. 17-21 May 1999.

NRC. National Research Council, 1992. Neem: a tree for solving global problems. Washington D.C. National Academy Press. p. 70.

Ogbuewu, I.P, Uchegbu, M.C, Okoli, I.C, and Iloeje, M.U. 2010. Assessment of Blood Chemistry, Weight Gain and Linear Body Measurements of Pre-Puberal Buck Rabbits Fed Different Levels of Neem (*Azadirachta indica A. Juss*) Leaf Meals. Chil. J. Agr. Res. 70(3), 515-520.

Pietrosemoli, S., Olavez, R., Plaza, C. y Valera, Z. 2002. Coccidiosis (Eimeria sp) control in grazing calves using aqueous extract of Neem (*Azadirachta indica A. Juss*) seeds. J. Dairy Sci. 85 (Supplement 1), 389

Schmutterer, H. 1995. The Neem Tree *Azadirachta indica A. Juss*. and other meliaceous plants–sources of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes. Edit. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, pp. 696.

Shravan, K.M. and Kannappan, N. 2011. *In vivo* antidiabetic evaluation of neem leaf extract in alloxan induced rats. J. App Pharm Sci. 7,1 00-105.
Sonia, B. and. Srinivasan, B.P. 1999. Investigation Into The Anti-Diabetic Activity of *Azadirachta indica*. Indian J. Pharmacol. 31, 138-141.
Salazar, E. 1999. Manejo sanitario con productos naturales zábila (*Aloe vera*) y Neem (*Azadirachta indica*). Programa Caprino Nacional. Fidel A. Pariacote (ed). Fundacite Falcón. Memoria 2, 20 - 22.

VIII. DISCUSIÓN

En este proyecto doctoral se investigó el uso de extractos vegetales en dietas para rumiantes, específicamente el extracto de *Salix babylonica*, *Moringa oleífera* y su efecto sobre algunas variables de la cinética de fermentación ruminal como: producción de gas y degradabilidad de la dieta alimenticia, así como la digestibilidad de nutrientes. Un estudio preliminar *in vivo* del extracto de *Azadirachta indica,* mostró su efecto antihelmíntico.

En el estudio *in vitro* de *Salix babylonica*, no hubo interacción de la dosis de extracto de *Salix babylonica* (SB) con la ración de dieta suministrada, observado en ($P>0.05$) la cinética de producción de gas (PG). La producción de gas es un buen indicador de digestibilidad, fermentabilidad y producción de proteína microbiana en el rumen (Rodríguez et al., 2015; Vallejo et al., 2016) y dependiente de la disponibilidad de nutrientes para los microorganismos del rumen. (Elghandour et al., 2015a, b).

El incremento cuadrático asintótico en la PG, menor frecuencia, tiempo de PG, y el aumento del nivel de reemplazo de cactus espinoso (CP) por grano de maíz, revelan un aumento de la fermentación de los insolubles pero fracciones degradables. Estos resultados sugieren una disponibilidad mayor de carbohidratos a la actividad y crecimiento de población microbiana de acuerdo a estudios anteriores (Elghandour et al., 2015a, b). Blümmel y Orskov (1993) mostraron que la producción asintótica de la PG puede ser utilizada para predecir el consumo de alimento. En este trabajo el 88% de la varianza en la ingesta se debió a PG, que relacionan las raciones de cactus espinoso 75 g (PC75) y cactus espinoso 150 g (PC150) cuyo propósito era inducir el consumo de alimento y tasa de crecimiento del ganado.

La disminución de la velocidad de PG con el aumento de ración de CP indica que el tiempo necesario para la degradación fue mayor, por lo que se produjo menos gas a corto plazo. El crecimiento microbiano y el acceso de las enzimas

microbianas a las partículas de alimentación se reflejan por la velocidad a la que diferentes productos químicos constituyentes son degradados.

Ya que la velocidad de PG se correlaciona con la ingesta de alimento (Khazaal et al., 1995), la ración PC150 mejoraría la ingesta de alimento y rendimiento de los rumiantes. Esto es porque el rendimiento es en gran parte una función del consumo del alimento y es un mejor indicador del valor nutritivo de la aparente digestibilidad (Okunade et al., 2014). El retraso de tiempo antes de la PG se redujo con la ración PC75 y la PC150 sugiere una adaptación microbiana más rápida para la ración.

La inclusión del extracto de SB no afectó la PG asintótica o la velocidad de PG, sin embargo disminuyó el tiempo de retraso de PG. Este efecto es positivo sobre la fermentación ruminal (Salem et al., 2014a; Elghandour et al. 2015b) y actividad de microorganismo ruminales, posiblemente debida a la capacidad de los microorganismos del rumen para degradar metabolitos secundarios de *SB* y utilizarlos como fuente de energía (Hart et al. 2008).

En el estudio *in vitro* de *Moringa oleífera,* se reemplazó el grano de maíz por cáscaras de soya, dando lugar a un retraso en la producción de biogás, lo que refleja que la microflora del rumen necesita algún tiempo para adaptar su metabolismo a los sustratos ricos en cascara de soya. Esta observación puede deberse al mayor contenido de carbohidratos fibrosos de la cáscara de soya, en comparación con el grano de maíz. Sin embargo, también se obtuvo un incremento dependiente de la dosis con interacciones significativas no lineales, con niveles del extracto de *Moringa oleífera* cuando el grano de maíz fue reemplazado por cáscaras de soya. La mayor producción de biogás, indicó que las cáscaras de soya proporcionan cantidades significativas de nutrientes, y material fermentable para la comunidad microbiana presente en el modelo *in vitro*, debido a la disponibilidad de nutrientes (Kholif et al., 2017), y carbohidratos rápidamente fermentables por microorganismos del rumen (Elghandour et al., 2015), fueron reportados para aumentar la producción del biogás. La mayor

producción de biogás puede indicar una mayor degradabilidad y fermentabilidad de los sustratos y reemplazar parcialmente el maíz por cáscaras de soya podría aumentar el consumo de alimento y, en consecuencia el rendimiento del producto animal (Khazaal et al., 1996). Elghandour et al., (2016). Sin embargo no se encontró ningún efecto en los volúmenes de biogás, por lo mismo se reemplazó el grano de maíz por cáscaras de soya que se usaron en este estudió, se observó un retraso en la producción de biogás con el aumento de cáscaras de soya, pero una mayor tasa de producción de biogás. El uso de diferentes especies animales y/o fisiológico de los donantes de los fluidos del rumen son a menudo responsables de la variabilidad en los resultados obtenidos.

El aumento en la producción asintótica de biogás en presencia de extracto de *M. oleífera,* solo se observó con el sustrato SH75, y con niveles bajos de extracto con el sustrato SH150. Esta observación podría explicarse por las interacciones significativas entre el tipo de sustrato y la dosis del extracto *M. oleífera* e indica que el extracto de *M. oleífera* tuvo el efecto más significativo a concentraciones más bajas de carbohidratos fibrosos. Se ha sugerido que el contenido de metabolitos secundarios tales como taninos, saponinas y fenólicos son responsables de los efectos observados (Bodas et al. 2012). Se informó que los niveles bajos de metabolitos secundarios de las plantas presentan una fuente de energía para los microorganismos del rumen (Hart et al. 2008), mientras que los niveles más altos parecen afectar negativamente a los microorganismos del rumen debido a sus propiedades antimicrobianas (Bodas et al. 2012). Por lo tanto, la suplementación de una dieta con *M. oleífera* debe optimizarse con respecto al rendimiento animal y la protección del medio ambiente.

En lo referente al estudio *in vivo* con extracto de *Azadirachta indica,* se trabajó en ovinas gestantes, que se alimentaban con una dieta mixta de ensilado de maíz y salían a pastar un rato: Les fue suministrado oralmente dosis de extracto de *Azadirachta indica,* en las mañanas, cada tercer día, y se realizó análisis coprológico para determinar la carga parasitaria, al inicio y a los 30 días cuando término del experimento.

El extracto de *Azadirachta indica* presenta propiedades antiparasitarias contra nematodos gastrointestinales cada vez más resistentes y difíciles de controlar con productos comerciales (Chagas et al., 2007), el extracto preparado fue de con 1kg de hojas secas trituradas de *Azadirachta indica* en 8L de agua, con dosis administradas a las ovejas gestantes de 20 y 40 ml. La carga de nematodos disminuyó con ambas dosis, siendo la más efectiva la de mayor volumen, cabe mencionar que es una dosis segura ya que ninguna oveja gestante aborto, pese a lo reportado en Literatura.

CONCLUSIONES

En México se tiene el potencial para sembrar el nopal en varios climas y altitudes, pero desafortunadamente no ha llegado el conocimiento a los campesinos y/o productores. En Etiopía plantaron el nopal mexicano, Opuntia ficus-Indica a finales del siglo XlX, para usarlo como forraje en rumiantes y como política sembraron 30,520 hectáreas.

En país se ha despreciado su uso y solo por necesidad lo come el ganado en los estados áridos del norte de la república. En los estados del Sureste de México ni siquiera se tiene sembrado, a pesar de que algunos ranchos tienen grandes extensiones, y esto es porque se desconoce su uso benéfico en la nutrición del ganado. Por lo que hay que fomentar la siembra y uso del nopal para nutrición del ganado respaldado con la investigación científica.

Ventajas de usar el nopal en la dieta de los animales.

Los resultados del primer experimento in vitro mostraron que la harina de nopal tiene una potencial eficiencia de fermentación; el perfil de fermentación es superior al del grano de maíz y se puede usar para reemplazar otras fuentes de energía (por ejemplo, maíz, cebada y sorgo) en las dietas de rumiantes.

Como resultado preliminar del experimento *in vivo* con las ovejas gestantes se obtuvo que la carga de nematodos bajo. Y que a pesar de estar gestando las ovejas no hubo ningún aborto con las dosis de 20 y 40 ml de extracto en la concentración de 1 kilogramo de hojas secas pulverizadas en 8 litros de agua.

Usar el Neem como desparasitante en ovinos tiene grandes ventajas y ahorros
1.- En primer lugar es muy fácil su preparación ya que aprovechando la solubilidad de los compuestos del Neem se puede hacer muy fácilmente el extracto. Con una dosis de 1 a 8 es decir 1 gramo de hojas secas de Neem en 8 mililitros de agua, o de un kilo de hojas secas en 8 litros de agua.

2.- En segundo lugar es un árbol que se puede tener en las áreas de cualquier predio o rancho donde no haya heladas, lo que permitirá tener el desparasitante de Neem sin tener que viajar a los lugares donde los venden, teniendo ahorros de viaje y por la compra del medicamento.

3.- Se recomienda que al menos se tenga dos árboles de Neem por hectárea para suplir las necesidades

4.- Además a este medicamento no hacen resistencia los parásitos

5.- Y No contamina el ambiente.

Dentro de los productos finales de esta investigación debe elaborarse un pequeño manual o folleto para el uso de las hojas de los árboles forrajeros y medicinales; objeto del estudio el Sauce (*Salix Babylonica*), el Neem, y la Moringa que deben ser usados como forrajes o desparasitantes.

X. LITERATURA CITADA

Abdel-Aziz, N.A., Salem, A.Z.M., El-Adawy, M.M., Camacho, L.M., Kholif, A.E., Elghandour, M. M.Y., Borhami, B.E. 2015. Biological treatments as a mean to improve feed utilization in agriculture animals-An overview. J. Integr. Agri. 14, 534–543.

Adisakwattana, S., Chanathong B. 2011. Alpha-glucosidase inhibitory activity and lipid lowering mechanisms of *Moringa oleifera* leaf extract. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 15(7), 803-8.

Ahmed, M.H., Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Zeweil, H.S., Kholif, A.E., Klieve A.V., Abdelrassol, A.M.A. 2015. Influence of *Trichoderma reesei* or *Saccharomyces cerevisiae* on performance, ruminal fermentation, carcass characteristics and blood biochemistry of lambs fed Atriplex nummularia and *Acacia saligna* mixture. Livest. Sci. 180, 90–97.

Akeel, R. A., Mateen, A., Janardhan, K., Gupta, V.C. 2017. Analysis of anti-bacterial and anti oxidative activity of *Azadirachta indica* bark using various solvent tracts. Saudi Journal of Biological Sciences, 24, 11–14.

Anaya, A.L., Espinoza, F.J. 2006. La química que entreteje a los seres vivos. Ciencias 83:4-13.

AOAC Association of official analytical chemists. 1997. Official methods of analysis, 16th edn.

Arowolo, M. A., He, J. 2018. Use of probiotics and botanical extracts to improve ruminant production in the tropics: A review. Anim. Nutr. 4(3), 241-249.

Audsley, E., Wilkinson, M., 2014. What is the potential for reducing national greenhouse gas emissions from crop and livestock production systems J. Clean. Prod. 73, 263-268.

Benítez,Y., Bernal, A., Cortés, E., Gil,G., Carrillo, F. 2010. Producción de forraje de guaje (Leucaena spp.) asociado con zacate (Brachiaria brizantha) para ovejas en pastoreo. Rev. Mex. Cienc. Agríc vol.1 no.3 Texcoco jul./sep.

Benavides, J.1995. *Agroforestería* de las Américas. Año 2 No 7 Julio -Setiembre

Bennett, R.N., Wallsgrove, R.M. 1994. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. New Phytologist. 127, 617-633.

Berenguer, C., Alfonso, A., Salas, H., Puente, E., Betancourt, J., Mora, Y. 2013. Toxicidad aguda oral de *Azadirachta indica* (árbol del Nim). Revista Cubana de Plantas Medicinales, 18(3), 502-507.

Blummel, M., Steingss, H., Becker, K. 1997. The relationship between in vitro gas production, *in vitro* microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. Br. J. Nutr. 77, 911–921.

Bodas, R., Lopez, S., Fernandez, M., Garcia, R., Rodrıguez, A.B., Wallace, R.J., Gonzalez, J.S. 2008. *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. Anim. Feed Sci. Technol. 145, 245–258.

Bodas, R., Prieto, N., García, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., López, S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. Anim. Feed Sci. Technol. 176, 78–93.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science 161, 839-851.

Briskin, D.P. 2000. Medicinal plants and phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Healt,"*Plant Physiology*, 124, 507-514.

Callejas, T., Pablo, A. 2002. Obtención de extractos de plantas en medios ácidos y/o alcohólicos para aplicaciones medicinales y alimenticias. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Manizales.

Cedillo, J., Kholif, A., Salem, A., Elghandour, M., Vazquez, J., Alonso, M., Barbabosa, A., Chagoyan, J., Reyna, A. 2015. Oral administration of Sauce llorón extract to growing lambs to control gastrointestinal nematodes and *Moniezia* spp. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 8(7), 520-5.

Cedillo, J., Vázquez, J.F., González, A., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E, Hernández, J., Martínez, J.C., Jiménez, R.M., Rivero, N., López, D. 2014. Effects of different doses of *Salix babylonica* extract on growth performance and diet *in vitro* gas production in Pelibuey growing lambs. Ital. J. Anim. Sci. 13(3), 609–613.

Chagas, A.C., Viera, L.S., Freitass, A.R., Araújo, M.R., Araújo, J.A., Araguão, W.R., Navarro, A.M. 2009. Anthelmintic efficacy of neem (Azadirachta indica A Juss) and the homeopathic product Fator Vermes in Morada Nova sheep.

Chandrawathani, P., Chang, K.W., Nurulaini, R., Waller, P. J., Adnan, M., Zaini, C.M., Jamnah, O., Khadijah, S., and Vincent, N., 2006. Daily feeding of fresh Neem leaves (Azadirachta indica) for worm control in sheep. Tropical Biomedicine 1, 23-30.

Chattopadhyay, R. 2003. Possible mechanism of hepatoprotective activity of *Azadirachta indica* leaf extract: part II. Indian Journal Ethnopharmacology 89 (2-3), 217-219.

Cheeke, P. R. 1995. Toxicants of Plant Origin. Volume II Glycosides. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

Chinou, I. 2008. Primary and secondary metabolites and their biological activity. En: WaksmundzkaHajnos M, Sherma J, Kowalska T (Eds) Thin layer chromatography in phytochemistry, pp. 59-76. CRS Press, Boca Raton.

Conrick, J. 1994.The ultimate herb. Hopeful Communications. Alchua, Florida, U.S.A.

Costa, R.G., Filho, E.M.B., Medeiros, A,N., Givisiez, P.E.N., Queirogac, R.C.R.E., Silva, A.A.S. 2009. Effects of increasing levels of cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L. Miller) in the diet of dairy goats and its contribution as a source of water. Small Rumin. Res. 82, 62–65.

Coventry, E. and Allan, E..J. 2001. Microbiological and chemical analysis of neem (*Azadirachta indica*) extracts: new data on antimicrobial activity. Phytoparasitica *, 29* , 1-10.

Cragg, G.M., Newman, D.J. 2005. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. Pure. Appl. Chem. 77, 7-24.

Cruz, F. M., y R. del Ángel S. 2004. El árbol de Nim, Establecimiento y Aprovechamiento de la Huasteca potosina INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Huichichuayán y Campo Experimental Ébano. Folleto Técnico Núm. 3. San Luis Potosí, México. 23p. 2004.

Dhanoa, M.S., Lopez, S., Dijkstra, J. 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: comparison of models. Br. J. Nutr. 83,131–142.

Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Gonzalez, M., Bórqueza, J.L., Gado, H.M., Odongo, N.E., Peñuelas, C.G. 2013. Effects of exogenous enzymes on in vitro gas production kinetics and ruminal fermentation of four fibrous feeds. Anim. Feed. Sci. Technol. 179, 46–53.

Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Bastida, A.Z., Martínez, D.L.P., Salem, A.Z.M. 2015. *In vitro* gas production of five rations of different maize silage and concentrate ratios influenced by increasing levels of chemically characterized extract of Salix babylonica. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 39(2), 186–194.

Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Marquez, O., Vazquez, J.F., Puniya, A.K., Salem, A.Z.M. 2015. Influence of individual or mixed cellulase and xylanase mixture on *in vitro* rumen gas production kinetics of total mixed rations with different maize silage and concentrate ratios. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 39(4), 435–442.

Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Hernández, J., Mariezcurrena, M.D., López, S., Camacho, L.M., Márquez, O., Salem, A.Z.M. 2016. Influence of the addition of exogenous xylanase with or without pre-incubation on the *in vitro* ruminal fermentation of three fibrous feeds. Czech J. Anim. Sci. 61(6), 262–272.

Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Salem, A.Z.M., de Oca, R.M., Barbabosa, A., Mariezcurrena, M., Olafadehan, O.A. 2016. Addressing sustainable ruminal methane and carbon dioxide emissions of soybean hulls by organic acid salts. J. Clean. Prod. 135, 194–200.

Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Salem, A.Z.M., Olafadehan, O.A., Kholif, A.M., 2016. Sustainable anaerobic rumen methane and carbon dioxide productions from prickly pear cactus flour by organic acid salts addition. J Clean Prod 139,1362–1369.

Elghandour, M.M.Y., Vázquez, J.C., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Cipriano, M.M., Camacho, L.M., Márquez, O. 2016. *In vitro* gas and methane production of two mixed rations influenced by three different cultures of Saccharomyces cerevisiae. J. Appl. Anim. Res. 45(1), 389–395.

Elghandour, M. M. Y., Salem, A. Z. M., Khusro, A., Cipriano-Salazar, M., Olivares-Pérez, J., Barros, M. A., Lugo Coyote, R. 2017. Assessment of some browse tree leaves on gas production and sustainable

mitigation of CH_4 and CO_2 emissions in dairy calves at different age. J. Clean. Prod. 162, 1192-1199.

Elghandour, M. M. Y., Kanth Reddy, P. R., Salem, A. Z. M., Ranga, P. P., Hyder, I., Barbabosa, A., Yasaswini, D. 2018. Plant bioactives and extracts as feed additives in horse nutrition. J. Equine Vet. Sci. 69, 66-77.

Elghandour, M.M.Y., Rodríguez, I., Parra, A., Salem, A.Z.M., Greiner, R., Márquez, O., Barros, M., Barbabosa, A. 2018. Biogas production from prickly pear cactus containing diets supplemented with *Moringa oleifera* leaf extract for a cleaner environmental livestock production. J. Clean. Prod. 185, 547-553.

F.A.O. 2006. Livestock's long shadow, environmental issues and options, Rome, Italy.

Ferreira, D., Brandt, E.V., Coetzee, J., Malan, E. 1999. Condensed tannins. Prog. Chemist. Org. Nat. Prod. 77, 22–59.

Foidl, N., Mayorga, L., Vásquez, W. 1999. Utilización del marango (*Moringa oleifera*) como forraje fresco para ganado. En: Agroforestería para la alimentación animal en Latinoamérica (Eds. M.D. Sánchez y M. Rosales). Estudio FAO: Producción y Sanidad Animal No. 143, p. 341.

Forsberg, C., Forano, E., Chesson, A., 2000. Microbial adherence to the plant cell wall and enzymatic hydrolysis. In: Cronje PB (ed) Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. CABI Publishing, Wallingford, pp. 79–97.

Florence, O., Jimoh, A., Yakubu, B.M.T. 2009. Evaluación del potencial antioxidante de *Cnidoscolous chayamansa.* Biologia farmacéutica.

Flores G., Barbabosa, A. 2017. Evaluación del efecto producido en las líneas celulares Hela (Cáncer Cérvico Uterino) y HUH-7 (Hepacarcinoma de higado) por extractos crudos de Neem Azaridachta indica (A. Juss)) mediante cultivo in vitro. Tesis de licenciatura Universidad Autonóma del Estado de México Facultad de Ciencias, licenciatura en Biotenología.

France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., López, 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. Br. J. Nutr. 83,143–150.

García, G.D., y Cols. 1985. Historia del medicamento. Ed. Doyma. Barcelona. España.

Gemma, E. Veitch., Beckmann, E., Burke, B.J., Boyer, A., Maslen, S.L., Steven V. Ley, S.V., 2007. Synthesis of Azadirachtin: A Long but Successful Journe. Angewandte Chemie International Edition 46.

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. J Agric Sci Camb 139:341–352.

Gil, P., Edison. 2000. Diseño y montaje de un equipo para la extracción de aceites esenciales, a escala piloto. Revista Facultad de Ingeniería. Universidad de Antioquia.

Goel, G., Makkar, H.P.S., Becker, K. 2008. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. J. Appl. Microbiol.105, 770–77.

Goering, M.K., Van, P.J. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Agriculture handbook, No. 379. Agricultural Research Service, USDA, Washington, DC.

Goodman and Gilman's. 2001. The Pharmacological Basis of Therapeutics (10 edición). Nueva York: McGraw-Hill. p. 1825.

Goodwin, T.W. 1971. Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry. Academic Press, Londres.

Grainge, M., Ahmed, S. 1998. Handboook of Plants with Pest-Control Properties. John Wiley & Sons, Hoboken, 470 p.

Grainge, M. and Ahmed, S. 1998. Handboook of Plants with Pest-Control Properties. John Wiley & Sons, Hoboken, 470 p.

Guevara, A..P., Vargas, C., Sakurai, H. 1999. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. Mutat. Res. 440,181.

Guevara, A.P.; Vargas, C., Uy, M. 1996. Anti-inflammatory and antitumor activities of seed extracts of malunggay, *M. oleifera* L (Moringaceae). *Philippine J. Sc*. 125:175.

Gurib, A. 2006., Medicinal plants: Tradition of yesterday and drugs of tomorrow. Mol Aspects Med 27:1-93.

Guo, Y.Q., Liu, J.X., Zhu, W.Y., Denman, S.E., Mc-Sweeney, C. S. 2008. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of mcrA gene, in cultures of rumen micro-organisms. Lett. Appl. Microbiol. 47, 421–426.

Halmemies, A., Rinne, M., Lamminen, M., Mapato, C., Ampapon, T., Wanapat, M., Vanhatalo, A. 2018. Review: Alternative and novel feeds for ruminants: nutritive value, product quality and environmental aspects. Animal. 12(2), 295-309.

Haq, N. 2004. In vitro production of bioactive compounds from medicinal and aromatic plants.

Hart. K.J., Yanez, D.R., Duval, S.M., McEwan, N.R., Newbold, C.J. 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. Anim Feed Sci Technol 147, 8–35.

Hernandez, P.M., Salem, A.Z., Elghandour, M.M.Y., Cipriano, M., Cruz, B., Camacho, L.M. 2014. Anthelmintic effects of Salix babylonica L. and Leucaena leucocephala Lam. extracts in growing lambs.Trop Anim Health Prod. 46(1), 173-8.

Hernandez, P., Salem, A.Z.M., López, S., Sun, X.Z., Rojo, R., Camacho, L.M., Elghandour, M.M.Y., Ronquillo, M.G. 2014. Influence of *Salix babylonica* and *Leucaena leucocephala* leaf extracts on ruminal fermentation characteristics, urinary purine derivative excretion and microbial protein synthesis of lambs. Livest. Sci. 163, 80–84.

Hernández, A., Kholif, A. E., Elghandour, M. M. Y., Camacho, L. M., Cipriano, M. M., Salem, A. Z. M., Cruz, H., Ugbogu, E. A. 2017a. Effectiveness of

xylanase and *Saccharomyces cerevisiae* as feed additives on gas emissions from agricultural calf farms. J. Clean. Prod. 148, 616-623.
Helander, I.M., Alakomi, H-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Von Wright, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. J. Agric. Food Chem. 46, 3590-3595.
Hirasa, K., Takemassa, M. 1998. Spice Science Technology. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
Hofmann, E.M., Muetzel, S., Becker, K. 2003. Efects of *Moringa Oleifera* seed extract on rumen fermentation *in vitro*. Arch. Anim. Nutr. 57, 65-81.
Hostettmann, K., Marston, N., Ndjuko, K., Wolfender, J.L. 2000. The potential of african plants as a source of drugs. Curr. Org. Chem. 4, 973-1010.
Hristov, A.N., Ropp, J.K., Zaman, S., Melgar, A. 2008. Effects of essential oils on *in vitro* ruminal fermentation and ammonia release. Anim. Feed Sci. Technol. 144, 55–64.
Hristov, A.N., Oh, J., Giallongo, F., Frederick, T.W., Harper, M.T., Weeks, H.L., Branco, A.F., Moate, P.J., Deighton, M.H., Williams, S.R.O., Kindermann, M., Duval, S. 2015. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 112(34), 10663–10668.
Huang, Q., Liu, X., Zhao, G., Hu, T., Wang, Y. 2018. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. Anim. Nutr. 4(2), 137-150.
Huerta, R. D., Garza, B. L., Vega, V. D. y Omaña, S. J. 2010. La producción de biodiesel en el estado de Chiapas. Rev. Mex. Econ. Agríc. Rec. Nat. 3(2):20-32.
I.N.C.A.P. (Instituto de Nutrición de Centro America y Panama) 1961.
I.P.C.C. 2007. Summary for policymakers. In: Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L. (Eds.), Climate Change 2007: The physical science basis. Contribution of working group i to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
Intergovernmental Panel on Climate Change. 2008. Climatechange. Synthesis report. Contribution of working group I, II, and III to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. IPCC, Geneva.
Jiménez-Peralta, F., Salem, A., Mejía, H., González, R., Albarrán, P., Rojo, R.R., Tinoco, J.J.L. 2011. Influence of individual and mixed extracts of two tree species on *in vitro* gas production kinetics of a high concentrate diet fed to growing lambs. Anim. Feed Sci. Technol. 136(23), 2-8.
Ju-Fang, L., Chun-Han, H., Feng-Ling, L., Ya-Ting, T., Sheng-Mou, H. 2015. Nimbolide Induces ROS-Regulated Apoptosis and Inhibits Cell Migration in Osteosarcoma, International journal of molecular sciences 10-2.
Jeffreys, Diarmuid. 2008. Aspirin: The Remarkable Story of a Wonder Drug, Bloomsbury Publishing USA.

Johnson, D.E., Hill, T.M., Carmean, B.R., Lodman, D.W., Warm, G.M. 1991. New perspective on ruminant methane production. In: Wenk, C., Boessinger, M. (Eds.), Energy Metabolism of Farm Animals. Zurich, Switzerland, pp. 376–379.

Johnson, K.A., Johnson, D.E. 1995. Methane emissions from cattle. J. Anim. Sci. 73, 2483–2492

Khazaal, K., Dentinho, M.T., Ribeiro, J.M., Ørskov, E.R. 1995. Prediction of apparent digestibility and voluntary feed intake of hays fed to sheep: comparison between using fibre component, in vitro digestibility or characteristics of gas production or nylon bag degradation. Anim. Sci. 61, 521–538.

Kumar, S., Suresh, P., Vijayababu M., Arunkumar, A, Arunakaran, J. 2006. Anticancer effects of ethanolic Neem leaf extract on prostate cancer cell line (PC-3). J. Ethnopharmacology 105, 246-250.

Ju-Fang, L., Chun-Han, H., Feng-Ling, L., Ya-Ting, T., Sheng-Mou, H. 2015. Nimbolide Induces ROS-Regulated Apoptosis and Inhibits Cell Migration in Osteosarcoma, International journal of molecular sciences 10-2.

Juscafresa B. S. Guía de la flora medicinal toxica aromática y condimenticia. Editorial AEDOS Mundi – Presa. México, D.F.

Khazaal, K., Dentinho, M.T., Ribeiro, J.M., Ørskov, E.R. 1995. Prediction of apparent digestibility and voluntary feed intake of hays fed to sheep: comparison between using fibre component, *in vitro* digestibility or characteristics of gas production or nylon bag degradation. Anim. Sci. 61, 521–538.

Kholif, A.E., Gouda, G.A., Morsy, T.A., Salem, A.Z.M., López, S., Kholif, A.M. 2015. Moringa oleifera leaf meal as a protein source in lactating goat's diets: feed intake, digestibility, ruminal fermentation, milk yield and composition, and its fatty acids profile. Small Rumin Res 129:129–137.

Kholif, A.E., Baza-García, L.A., Elghandour, M.M.Y., Salem, A.Z.M., Barbabosa, A., Dominguez-Vara I.A., Sanchez-Torres, J.E. 2016a. *In vitro* assessment of fecal inocula from horses fed on high-fiber diets with fibrolytic enzymes addition on gas, methane, and carbon dioxide productions as indicators of hindgut activity. J. Equine Vet. Sci. 39, 44–50.

Kholif, A.E., Morsy, T.A., Abd El Tawab A.M., Anele U.Y., Galyean, M.L. 2016b. Effect of supplementing diets of Anglo-Nubian goats with soybean and flaxseed oils on lactational performance. J. Agric. Food Chem. 64(31, 163–6170.

Kamel, C. 2000. A novel look at a classic approach of plant extracts. Feed Mix-The International Journal on Feed, Nutrition and Technology.

Khillare, B., Shrivastav, T.G. 2003. Spermicidal activity of *Azadirachta indica* (neem) leaf extract. Contraception 68, 225–229.

Kholif, A,, Gouda, G,, Morsy, T., Salem, A., López, S., Kholif, A. M. 2005. *Moringa oleifera* leaf meal as a protein source in lactating goat's diets: Feed intake, digestibility, ruminal fermentation, milk yield and composition, and its fatty acids profile. Small Rumin. Res. 129, 129-137.

Leos-Martinez, J. y Salazar-Saenz, R. 1992. El árbol de neem (*A. indica*) en México FA-UANL. Folleto Técnico No 03 30 p.

Makkar, H.P.S., Becker, K. 1996. Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera* leaves. Anim. Feed Sci. Technol. 63, 211-228.

Makkar, H.P.S., Becker, K. 1997. Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 128, 311-322.

Makkar, H. 2001. Recent advances in *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/007/y5159e/y5159e02.pdf

Makkar, H.P.S., Sen, S., Blümmel, M., Becker, K. 1998. Effects of Fractions Containing Saponins from *Yucca shidigera, Quillaja saponaria*, and *Acacia auriculoformis* on Rumen Fermantation. J. Agric. Food Chem. 46, 4324-4328.

McIntosh, F.M., Newbold, C.J., Losa, R., Williams, P., Wallace, R.J. 2000. Effects of essential oil on rumen fermentation. Reprod. Fermentation. Anim. Feed Sci. Technol. 114,105-112.

McIntosh, F.M. Williams, P., Losa, R., Wallace, R.J., Beever, D.A., Newbold, C.J. 2003. Effects of essential oils on ruminant microorganisms and their protein metabolism. App. Environ. Microbiol. 69, 5011-5014.

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 feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. J. Agric. Sci. Camb. 93, 217–222.

Mera, A., Gutiérrez, S., Montes, R., Paz, C. 2016. Efecto de la *Moringa oleífera* en el tratamiento de aguas residuales en el Cauca, Colombia. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial Vol. 14 No. 2 (100-109) Julio - Diciembre.

Mirzaei-Aghsaghali, A., Syadati, S.A., Fathi, H., Rasouli, S., Sadaghian, M., Tarahomi, M. 2012. Garlic in ruminants feeding. Asian J. Biol. Sci. 5, 328-340.

Morsy, T.A., Kholif, A.E., Kholif, S.M., Kholif, A.M., Sun, X., Salem, A.Z.M. 2016 Effects of two enzyme feed additives on digestion and milk production in lactating Egyptian buffaloes. Ann. Anim. Sci. 16, 209–222.

Nahak, G., y Sahu, R. K. 2010. Antioxidant activity in bark and roots of neem (*Azadirachta indica*) and mahaneem (*Melia azedarach*). Continental Journal of Pharmaceutical Sciences*,* 4, 28- 34.

National Academy of Science. Washington, DC. 1992. Neem, a tree for solving global problems.

National Research Cousil. 1992. Neem A. tree for solving global problems. Report of an Ad Hoc panel of the board on Sci. and Technol.for international development National Academy Press. Whashington D.C. 107 p.

Newbold, C.J., El Hasan, S.M., Wang,J., Ortega, M.E., Wallace, R.J. 1997. Influence of Foliage from African Multipurpose Tress on Activity of Rumen Protozoa and Bacteria. Br. J. Nutr. 78, 237-249.

Niembro, R.A. 1986. Árboles y arbustos de México naturales e introducidos**.** Editorial LIMUSA. México. pp. 163-164.

Nsereko, V.L., Beauchemin, K.A., Morgavi, D.P., Rode, L.M., Furtado, A.F., McAllister, T.A., Iwaasa, A.D., Yang, W.Z., Wang, Y. 2002. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. Can. J. Microbiol. 48,14–20.

Obledo, E., Hernández, A.S., López, M.L. 2004. Extractos vegetales, una opción en el control de la Sigatoka negra XVl Reunión Internacional. ACORBAT. Oaxaca, México.

Ogbuewu, I. P.; Uchegbu, M. C., Okoli, I. C.; Iloeje, M. U. 2010. Toxicological effects of leaf meal of ethnomedicinal plant - neem - on serum biochemistry of crossbred New Zealand white typed rabbit bucks. Report and Opinion, 2 (2), 54-57.

Okunade, S.A., Olafadehan, O.A., Isah, O.A. 2014. Fodder potential and acceptability of selected tree leaves by goats. Anim. Nutr. Feed Technol. 14, 489–498.

Palma, J.M., Delgado, C., Moya, A., Aguirre, M. 1995. Composición química y digestibilidad de tres leguminosas arbóreas. Memorias primer simposio Estatal de ciencia y Tecnología. Universidad de colima. Colima, México. pp. 6.

Patra, A.K., Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. Phytochemistry 71, 1198–1222.

Paya, H., Taghizadeh, A., Janmohammadi, H., Moghadam, G.A. 2007. Nutrient digestibility and gas production of some tropical feeds used in ruminant diets estimated by the in vivo and in vitro gas production techniques. Am J. Anim. Vet. Sci. 2, 108–113.

Pérez, A., Sánchez, T., Armengol N., Reyes, F. 2010. Características y potencialidades de *Moringa oleifera*, Una alternativa para la alimentación animal. Pastos y Forrajes, Vol. 33, No. 4.

Petit, J.; Uribe, G., Casanova, F., Solorio, J., Ramírez, L. 2012. Descomposición y liberación de nitrógeno y materia orgánica en hojas de Leucaena leucocephala (Lam.), Guazuma ulmifolia Lam. Y Moringa oleífera Lam. en un banco mixto de forraje. Rev. Chapingo ser. Cienc. for. Ambient vol.18 no.1 Chapingo ene./abr.

Ramachandra, R., Ravishankar, S. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20, 101-153.

Ramírez J.L. Cevallos-F. 2000. Leaves of Salicaceae (*Salix* and *Populus*) from Oligocene sediments near Tepexi de Rodríguez, Puebla, México. International Journal of Plant Science 161(3).

Ramirez-Restrepo, C.A., Barry, T.N., Marriner, A., Lopez-Villalobos, N., McWilliam, E.L., Lassey, K.R., Clark, H. 2009. Effects of grazing willow fodder blocks upon methane production and blood composition in young sheep. Anim. Feed Sci. Technol. 155(1), 33-43.

Ramírez-Restrepo, C.A., Tan, C., O Neill, C.J., López-Villalobos, N., Padmanabha, J., Wang, J., McSweeney, C.S. 2016. Methane

production, fermentation characteristics, and microbial profiles in the rumen of tropical cattle fed tea seed saponin supplementation. Anim. Feed Sci. Technol. 216, 58–67.

Regnault, R. C., Bernard J.R., Charles, V. 2004. Biospesticidas de origen vegetal. Madrid: Mundi Prensa.

Reyes, M., Reyes. A.; Aguilar G., Carrillo, I. 2017. Propiedades antioxidantes de infusiones de neem (*Azadirachta indica*) encapsuladas con proteína de soya, *Revista Electrónica Nova Scientia*.

Reyes, S. 2006. *Moringa oleifera* and *Cratylia argentea*: potential fodder species for ruminants in Nicaragua. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science Department of Animal Nutrition and Management Uppsala. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.

Rira, M., Chentli, A., Boufenera, S., Bousseboua, H. 2015. Effects of plants containing secondary metabolites on ruminalmethanogenesis of sheep *in vitro.* Energy Procedia 74, 15–24.

Rivero, N, Salem, A.Z.M., Ayala, M., Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.E., Barbabosa, A., Camacho, L.M., Rojas, S., Olivares, J., Cipriano, M. 2016. Influence of *Salix babylonica* extract, exogenous enzyme of xylanase and their combination on blood hematological and biochemical profile in sheep and goats. Indian J. Anim. Sci. 86(10), 1140–1144.

Rochfort, S., Parker, A.J., Dunshea, F.R. 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. Phytochemistry 69, 299–322.

Rodriguez, M.P., Mariezcurrena, M.D., Mariezcurrena, M.A., Lagunas, B.C., Elghandour, M.M.Y., Kholif, A.M., Kholif, A.E., Almaráz, E.M., Salem, A.Z.M. 2015. Influence of live cells or cells extract of Saccharomyces cerevisiae on in vitro gas production of a total mixed ration. Ital. J. Anim. Sci. 14, 590–595.

SaiRam, M., Llavazhagan, G., Sharma, S., Dhanraj, S., Suresh, B., and Parida, M. 2000. Antimicrobial activity of a new vaginal contraceptive NIM-76 from neem oil (*Azadirachta indica*). J. Ethnopharmacology, (71), 377-382.

Salem, A.Z.M., Ronquillo, M., Camacho, L.M., Cerrillo, S.M.A., Domínguez, I.A., Bórquez, J.L. 2012. Beneficial effects of plant extracts in ruminant nutrition: A review. Indian J. Anim. Sci. 82(10), 1117–1121.

Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Olivares, M., Elghandour, M.M.Y., Mellado, M., Arece, J. 2014. Influence of *S. babylonica* extract on feed intake, growth performance and diet in vitro gas production profile in young lambs. Trop. Anim. Health Prod. 46 (1), 213–219.

Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Elghandour. M.M.Y., Buendía, G., Mariezcurrena. M.D., Hernandez, S.R., Camacho, L.M. 2014a. Influence of oral administration of *Salix babylonica* extract on milk production and composition in dairy cows. Ital. J. Anim. Sci. 13(1), 10–14.

Salem, A.Z.M., Ryena, A.C., Elghandour, M.M.Y., Camacho, L.M., Kholif, A.E., Salazar, M.C., Domínguez, I.A., Jiménez, R.M., Almaraz, E.M., Martínez, A.G.L., Mariezcurrena, M.A. 2014b. Influence of *Salix babylonica* extract in combination or not with increasing levels of

minerals mixture on *in vitro* rumen gas production kinetics of a total mixed ration. Ital. J. Anim. Sci. 13, 873–879.

Salem, A.Z., Elghandour, M.M., Kholif, A.E., Barbabosa, A., Camacho, L.M., Odongo N.E. 2016a. Influence of feeding horses a high fiber diet with or without live yeast cultures supplementation on feed intake, nutrient digestion, blood chemistry, fecal coliform count, and in vitro fecal fermentation. J. Equine Vet. Sci. 39, 12–19.

Salem, A.Z.M., Elghandour, M.M.Y., Kholif, A, E., López, S., Pliego, A.B., Cipriano-Salazar, M., Chagoyán, J.C.V., Jiménez, R.M., Alonso, M.U. 2017. Tree leaves of *Salix babylonica* extract as a natural anthelmintic for small-ruminant farms in a semiarid region in Mexico. Agrofor. Syst. 91, 111-122.

Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Elghandour, M.M.Y., Hernández, J., Limas, A., Cipriano, M., Camacho, L., Rojas, S., Olivares, J. 2016c. Influence of *Salix babylonica* extract addition on in vitro rumen gas production and degradability of ryegrass silage harvested in different cutting days. Indian J. Anim. Sci. 86(9),1030–1035.

SAS. 2002. Statistical analysis system. User's guide: statistics. Ver 9.0. SAS Institute, Cary

Satyanarayana, K., Sravanthi, K., Shaker, I. A., Ponnulakshmi, R. 2015. Molecular approach to identify antidiabetic potential of Azadirachta indica. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine, 6(3), 165–174.

Sajc, L., Grubisic, D., Vunjak-Novakovic, G. 2000. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. Biochemical Engineering Journal 4:89-99.

Sarin, R. 2005. Useful metabolites from plant tissue cultures. Biotechnology 4, 79-93.

Silvoenergía (CATIE), 1986. Silvicultura de especies promisorias para la producción de lena en América Central. Serie Técnica. Informe Técnico No 86. Turrialba. Costa Rica.

Schofield, P. 2000. Gas Production Methods. In: Farm Animal Metabolism and Nutrition. Wallingford (UK). CAB International. 450 p.

Shilpa, K., Varun, K., Lakshmi, B.S. 2010. An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. J. Plant. Sci. 5, 222-247.

Shurson, G. 2018. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. Anim. Feed Sci. Technol. 235, 60-76.

Sosa, R., Hagar, J. y Zapata, B. 1999. Huaxin. Manual agroforestal para la península de Yucatan (ed). Inifap/Icraf/Fundación Quintana Roo Produce.

Stashenko, E., Combariza, Y. 1998. Memorias III Seminario y Exposición Nacional de Plantas Aromáticas y Medicinales.

Stintzing, G., Carle, R. 2005. Cactus stems (*Opuntia* spp.): a review on their chemistry and uses. Mol Nutr Food Res 49:175.

Subramani, R., González, E., Arumugam, A., Nandy, S., González, V., Medel, J., Camacho, J., Ortega, A., Bonkoungou, S., Narayan, M., Kumar,

A. and Lakshmanaswamy, R. 2016. Nimbolide inhibits pancreatic cancer growth and metastasis through ROS-mediated apoptosis and inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition, *Scientific Reports* volume 6, Article number: 19819.

Szumacher-Strabel, M., Cieślak, A., 2012. Dietary possibilities to mitigate rumen methane and ammonia production. Greenhouse gases capturing, utilization and reduction. Intech, Rijeka, Croatia.

Takehiro, F., Satoshi, K., Takamasa, H., Yohei, I., Jun, I., Naoki, K., Akio, M. 2002. Studies aimed at the total synthesis of Azadirachtin. a modeled connection of C-8 and C-14 in Azadirachtin Division of Chemistry, Graduate School of Science, Hokkaido University, Sapporo 060-0810, Japan Organic Letters American Chemical Society.

Tariq, K.A., Chishti, M.Z., Ahmad, F., Shawl, A.S. 2009. Anthelmintic activity of extracts of Artemisia absinthium against ovine nematodes. Vet. Parasitol. 160, 83–88.

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. Anim. Feed Sci. Technol. 48,185–197.

Valdes, K.I., Salem, A.Z.M., López, S., Alonso, M.U., Rivero, N., Elghandour MMY, Domínguez, I.A., Ronquillo, M.G., Kholif, A.E. 2015. Influence of exogenous enzymes in presence of *Salix babylonica* extract on digestibility, microbial protein synthesis and performance of lambs fed maize silage. J. Agric. Sci. Camb. 153, 732–742.

Vallejo, L., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Elghangour, M., Fajardo, R., Rivero, N., Bastida, A., Mariezcurrena, M. 2016. Influence of cellulase or xylanase on the in vitro rumen gas production and fermentation of corn stover. Indian J. Anim. Sci. 86(1), 70–74.

Vallejo-Hernández, L.H., Elghandour, M.M.M.Y., Greiner, R., Anele, U.A., Rivas-Cáceres, R.R., Barros-Rodríguez, M., Salem, A.Z.M. 2018. Environmental impact of yeast and exogenous xylanase on mitigating carbon dioxide and enteric methane production in ruminants. J. Clean. Prod. 189, 40-46.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and non-starch carbohydrates in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74, 3583–3597.

Vincken, J.-P., Heng, L., de Groot, A., Gruppen, H. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry 68, 275–297.

Wallace, R.J., 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. Proc. Nutr. Soc. 63, 621–629. Wina, E., Muetzel, S., Hoffmann, E., Makkar, H.P.S., Becker, K. 2005. Saponins containing methanol extract of *Sapindus rarak* affect microbial fermentation, microbial activity and microbial community structure *in vitro*. Anim. Feed Sci. Technol. 121, 159–174.

Wanderley, W.L., Ferreira, M.A., Andrade, D.K.B., Véras, A.S.C., Farias, I., Lima, L.E., Dias, A.M.A. 2002. Replacement of forage cactus (Opuntia ficus

indica Mill) for sorghum silage (Sorghum bicolor (L.) Moench) in the dairy cows feeding. Rev. Bras. Zootec. 31, 273–281

Wink, M. 2007. Bioprospecting: The search for bioactive lead structures from nature. En: Kayser O, Quax W (Eds) Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application, pp. 97-116. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Yanpallewar, S.U., Sen, S., Tapas, S., Kumar, M., Raju, S.S., y Acharya, S.B. 2003. Effect of *Azadirachta indica* on paracetamol induced hepatic damage in albino rats. Phytomedicine, 10 (5), 391-396.

Yi-Hsien, H., Chien-Hsing, L., Hsiao-Yun, C., Shu-Ching, H., Chia-Liang, L., Jen-Pi, Tsai. 2015. Induction of cell cycle arrest, DNA damage, and apoptosis by nimbolide in human renal cell carcinoma cells. Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine 4-29.

Zárate, S. 1987. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit subsp. Glabrata Mimosaceae. Publicado en: Phytologia 63(4), 304-306.