

EXTRACTO DE *Lysiloma acapulcensis* EN LA DIGESTIBILIDAD Y FERMENTACIÓN RUMINAL DE UNA DIETA PARA OVINOS

Lysiloma acapulcensis extract on digestibility and ruminal fermentarion of a diet for sheep

¹Agustín Olmedo Juárez, ^{2*}Rolando Rojo Rubio, ²Javier Arece García, ³Abdel Zeidan Mohamed Salem, ³Ernesto Morales Almaraz, ¹Benito Albarrán Portillo, ⁴Héctor Aarón Lee Rangel, ¹José Fernando Vázquez Armijo

¹Centro Universitario UAEM-Temascaltepec, Universidad Autónoma del Estado de México, km 67.5 Carretera Federal Toluca-Tejupilco, Estado de México, 51300 Temascaltepec, Estado de México, México

²Estación Experimental de Pastos y Forrajes, Indio Hatuey, Matanzas, Cuba
dr_rojo70@yahoo.com.mx

³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México

⁴Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México

Artículo científico recibido: 09 de junio de 2014, **aceptado:** 11 de noviembre de 2014

RESUMEN. Se evaluó *in vitro* e *in vivo* el valor nutricional de una dieta basal para ovinos adicionada con diferentes niveles de taninos condensados libres de *Lysiloma acapulcensis* (TCL) ($T_0=0$; $T_1= 2.5$; $T_2 = 5.0$ y $T_3=7.5$ g d⁻¹). *In vitro* se determinó la cinética de degradación del sustrato mediante la técnica de producción de gas e *in vivo* la concentración de N-NH₃ y población de protozoarios ruminales. Los datos se analizaron mediante diseño completamente al azar y cuadrado latino, respectivamente. La tasa máxima de gas producido hasta alcanzar la asíntota (fase b) fue menor ($p < 0.05$) en el T_1 , mientras que en la tasa fraccional de gas producido (%/h; fase c) los tratamientos T_2 y T_3 fueron los que presentaron los valores más bajos ($p < 0.05$). El contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y la energía metabolizable (EM), se redujo en los tratamientos que contenían TCL ($p < 0.05$). La digestibilidad aparente *in vivo* de la proteína cruda (DAPC) fue mayor en T_2 (79.4 %, $p < 0.05$). La concentración de N-NH₃ mostró un comportamiento cuadrático ($p < 0.05$) durante las primeras horas postprandiales. La población de protozoarios fue mayor ($p < 0.5$) en los animales que recibieron TCL. La adición TCL mejoró la DAPC, aumentaron los niveles de N-NH₃ y disminuyeron los AGCC y la EM, estimulando el crecimiento de protozoarios ruminales.

Palabras clave: Digestibilidad, nutrientes, cinética de fermentación ruminal, taninos condensados libres, ovinos

ABSTRACT. The nutritional value of a basal diet for sheep supplemented with different levels of free condensed tannins (FCT) from *Lysiloma acapulcensis* ($T_0=0$; $T_1= 2.5$; $T_2 = 5.0$ y $T_3=7.5$ g d⁻¹) was evaluated *in vitro* and *in vivo*. The degradation kinetics of the substrate was determined *in vitro* using the technique of gas production, while the concentration of N-NH₃ and the population of ruminal protozoa were established *in vivo*. Data was analyzed with a completely randomized and a Latin square design, respectively. The maximum rate of gas produced to the asymptote (phase b) was lower ($p < 0.05$) in treatment T_1 , while treatments T_2 and T_3 showed the lowest values ($p < 0.05$). The short-chain fatty acid content (SCFAC) and the metabolizable energy (ME) were reduced in the treatments containing FCTL ($p < 0.05$). The apparent digestibility of raw protein (ADRP) *in vivo* was greater in T_2 (79.4 %, $p < 0.05$). The concentration of N-NH₃ showed a quadratic behavior ($p < 0.05$) during the first postprandial hours. The protozoa population was greater ($p < 0.5$) in the animals receiving FCT. The addition of FCT improves ADRP, increases the levels of N-NH₃ and decreases AGCC and ME, stimulating the growth of ruminal protozoa.

Key words: Digestibility, nutrients, ruminal fermentation kinetics, free condensed tannins, sheep

INTRODUCCIÓN

El uso de aditivos en la producción de rumiantes es un tema ampliamente estudiado, se utilizan para mejorar el metabolismo de los nutrientes. Dentro de los más comunes se encuentran los ionoforos, antibióticos, enzimas y extractos de plantas ricas en taninos (Cardozo *et al.* 2004, Busquet *et al.* 2005). El uso de extractos vegetales, ha tenido un creciente interés en los últimos años, debido a que son compuestos químicos naturales de plantas, que se les atribuyen diferentes propiedades benéficas en la nutrición y salud animal; ejemplo de ellos, son los taninos condensados (TC), que mejoran la eficiencia de utilización de la proteína, al convertirla en proteína de sobrepaso e incrementar el pool de proteína metabolizable en el intestino delgado (Hervás *et al.* 2003, Min *et al.* 2003); así como su actividad antihelmíntica en nematodos gastrointestinales (NGI) de ovinos y caprinos (Ademola y Eloff 2011, Olmedo *et al.* 2013).

Desde el punto de vista metabólico, se ha observado que los TC reducen la degradación de los carbohidratos estructurales al disminuir la población de bacterias celulolíticas (Makkar *et al.* 1995). Estudios *in vitro* han demostrado que los taninos en concentraciones superiores a 7 % en la dieta, tienen efecto defaunador, lo que provoca deficiencias en el aprovechamiento de la proteína metabolizable a nivel intestinal (Hess *et al.* 2003a, Cardozo *et al.* 2004, López *et al.* 2004). El principal factor que tienen los TC en el rumen es formar complejos con las proteínas de los alimentos, bacterias y protozoarios; se ha encontrado que concentraciones superiores a 50 g de TC kg⁻¹ MS en el rumen, puede disminuir la concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH₃), ya que secuestran los compuestos nitrogenados, lo que reduce la actividad proteolítica de las bacterias ruminales (Hess *et al.* 2003b, Min *et al.* 2003). En este sentido, debido al contenido de TC en las leguminosas arbóreas, resulta importante evaluarlas a pesar de que se han hecho investigaciones en géneros como *Leucaena* y *Lysiloma*; sin embargo, los resultados son contradictorios debido a factores como la dosis de TC, estado fisiológico de la planta y de los animales, por tal motivo en

esta investigación el objetivo fue evaluar el efecto de los TCL del extracto de *Lysiloma acapulcensis*, en diferentes dosis en ensayos *in vitro* e *in vivo*, sobre la cinética de degradación del sustrato, digestibilidad, concentración de N-NH₃ y la población de protozoarios ruminales en ovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización geográfica del sitio experimental

El estudio se realizó en el laboratorio de bromatología y en el área metabólica de la unidad experimental del Centro Universitario UAEM - Temascaltepec, que se encuentra a una altura sobre el nivel del mar de 1 740 m, con clima cálido sub-húmedo y presencia de lluvias en verano (Aw) (García 1981).

Colección del material vegetal y preparación de los extractos de *Lysiloma acapulcensis*

Las muestras del material vegetal (hojas tiernas y maduras) se colectaron en la zona sur poniente del Estado de México, en el Municipio del Tejupilco, que tiene selva baja subperennifolia; el muestreo se realizó en siete sitios, tomando en cada uno siete árboles para realizar una muestra compuesta. Las hojas se colectaron por la mañana y se depositaron en una hielera, para luego trasladarlas al laboratorio (FAO 2000). Las hojas se secaron en una estufa de aire forzado a 45 °C por cinco días, para luego molerlas y mezclar 10 g en 100 mL de agua destilada e incubar a temperatura ambiente por 48 h (Salem *et al.* 2006), para luego eliminar el contenido de humedad por liofilización (Liofilizadora LABCONCO de 2.5 L), para obtener el extracto de los compuestos secundarios de las hojas.

Análisis químico proximal (AQP) y determinación de taninos condensados

A las muestras liofilizadas de *Lysiloma acapulcensis*, se les realizó análisis (g kg⁻¹) de materia orgánica (MO: 945.9), proteína cruda (PC: 177.0) (AOAC, 1990), fibra detergente neutro (FDN: 607.3), fibra detergente ácido (FDA: 500.8) (Van Soest *et al.* 1991), concentración (g kg⁻¹ MS) de taninos condensados totales (TCT: 187.8) (López *et al.* 2004), usando como patrón interno *L. aca-*

pulcensis, taninos condensados libres (TCL: 116.3) (Porter et al. 1986) y la purificación de taninos condensados adheridos a la proteína (TCP: 67.8) y a la fibra (TCF: 3.7), se realizó con un Sephadex LH-20 (Hedqvist et al. 2000).

Tratamientos

Se expresaron en $g\ d^{-1}$ de $TCL\ kg^{-1}\ MS$, los cuales fueron: control ($T_0=0$), dosis baja ($T_1=2.5$), dosis media ($T_2=5.0$) y dosis alta ($T_3=7.5$). En el experimento *in vitro* las dosis se ajustaron al sustrato que se incubó, se dosificaron en forma liofilizada diluyéndose en agua destilada, previo a ello se prepararon tres soluciones madre. Para el ensayo *in vivo*, el extracto fue aplicado de forma liofilizada al rumen de los ovinos ($T_1: 2.5\ g$, $T_2: 5.0\ g$ y $T_3: 7.5\ g$ de extracto liofilizado kg^{-1} de MS), dosificado en tres tiempos (7:00, 13:00 y 19:00 h) según su concentración por tratamiento, antes de ofrecer el alimento a libre acceso. Para ambos ensayos se utilizó una dieta base para ovinos en crecimiento (NRC,2007), la cual estuvo integrada por los siguientes ingredientes: rastrojo de maíz (15.00 %), heno de avena (15.00 %), grano de maíz molido (40.65 %), salvado de trigo (12.00 %), pasta de soya (5.00 %), melaza (10.36 %), Urea (0.50 %) y premezcla de sales minerales (1.49 %), cuya composición específica fue: fósforo (9.66 %), sodio (2.73 %), potasio (15.33 %), magnesio (2.63 %), azufre (8 %), cobalto (3.66 ppm), yodo (15.33 ppm), hierro (1733.33 ppm), manganeso (566.66 ppm) y selenio (19.33 ppm). Con un contenido de proteína cruda de 15.06 % y energía metabolizable ($Mcal\ kg^{-1}\ MS$) de 2.59.

Experimento *in vitro*

Se realizó mediante la técnica de producción de gas (Theodorou et al. 1994). El líquido ruminal se obtuvo del rumen de cuatro ovinos fistulados ($60 \pm 3\ kg$ de PV, un año de edad), alimentados con la dieta base. Una vez colectado el líquido, se llevó al laboratorio, el cual se mantuvo bajo gasificación constante con CO_2 , a temperatura de $39^\circ C$. En botellas de vidrio (160 mL), se les depositó 1.002 g de la dieta base (sustrato) para luego añadirles 10 mL de líquido ruminal y 90 mL de solución buffer,

para luego incubar a $39^\circ C$ y registrar el gas producido con la ayuda de un transductor de presión (Extech, Modelo 407910). Para cada tratamiento, se utilizaron 12 botellas y la producción de gas fue monitoreado a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 19, 24, 48, 72 y 96 h, usando tres botellas sin sustrato como blancos para corregir el gas producido a partir del contenido ruminal. Al finalizar la lectura de la hora 96 en cada incubación, el residuo de cada botella se filtró con la ayuda de papel filtro Whatman 541 y de ésta manera determinar por gravimetría la degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y materia orgánica (DIVMO). Para cuantificar la cinética de degradación del sustrato, todas las lecturas de producción de gas se ajustaron al siguiente modelo (France et al. 2000):

$$A = bx [1 - e^{-c(t-L)}]$$

Donde: A= volumen total de gas producido en el tiempo t, b= máxima producción de gas producido hasta alcanzar la asíntota ($mL\ g^{-1}\ MS$), c= tasa fraccional de producción de gas ($\%/ h^{-1}$) y L= fase lag (h).

Para el cálculo de la energía metabolizable (EM) se utilizó el modelo de Menke y Steingass (1988):

$$EM(MJ\ kg^{-1}\ MS) = 2.20 + 0.136 \left(\frac{PG_{24}\ mL}{0.2g\ MS} \right) + 0.057PC$$

Donde: EM= energía metabolizable ($MJ\ kg^{-1}\ MS$), PG= gas producido en la hora 24. PC= proteína cruda. Para determinar el contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), se usó la fórmula de Getachew et al. (2002):

$$mmolAGCC = -0.00425 + 0.0222PG_{24} \left(\frac{PG_{24}\ mL}{0.2g\ MS} \right)$$

Donde: PG₂₄ es producción de gas acumulado a las 24 h de incubación.

Experimento *in vivo*

En este ensayo se determinó la digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS), materia orgánica (DAMO), proteína cruda (DAPC), fibra

detergente neutro (DAFDN), fibra detergente ácido (DAFDA), concentración de nitrógeno amoniacal y población de protozoarios ruminales. Se utilizaron cuatro ovinos fistulados, los cuales se alimentaron a libre acceso con la dieta base. Los ovinos se alojaron en jaulas metabólicas durante 60 d, que se dividieron en cuatro periodos de 15 d, de los cuales 10 fueron para adaptación a la dieta y 5 de colecta de datos, en los primeros periodos se colectaron las heces cada 12 h, colocando arneses individuales a los animales. Del total de heces producidas por cada animal se obtuvo una muestra de la que se tomaron 20 g para determinar la MS, MO, PC (AOAC, 1990); FDN, FDA (Van Soest et al. 1991) para calcular la digestibilidad *in vivo* de los nutrientes, con la siguiente ecuación propuesta (Mc Donald et al. 2006).

$$\text{Digestibilidad}(\%) =$$

$$\frac{\text{Nutriente consumido} - \text{Nutriente ingerido}}{\text{Nutriente consumido}}$$

En el quinto día de muestreo se recolectó líquido ruminal con una bomba de vacío (V-3020), bajo un esquema de muestreo de 24 h, que se dividieron en seis tiempos, considerando al tiempo cero a las 7 h. Se colectaron 100 mL de líquido ruminal, que se filtraron con una manta de cielo en cuatro capas, del líquido filtrado 50 % fue acidificado con ácido clorhídrico al 50 % en una relación de 4 mL de líquido ruminal por 1 mL de ácido clorhídrico, para luego determinar el nitrógeno amoniacal mediante la metodología de McCollough (1967). A un mL de líquido ruminal se le adicionó solución Coleman (1:1) que se acidificó para el conteo de protozoarios. Para su conservación las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta su análisis.

Diseño experimental y análisis estadístico

En el experimento *in vitro* se utilizó un diseño de bloques completos al azar, considerando la incubación como criterio de bloqueo, con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + E_{ij}$$

Donde: Y_{ij} = variable respuesta, μ = media general, T_i = efecto del tratamiento, B_j = efecto del bloque y E_{ijk} = error experimental.

El experimento *in vivo* se analizó bajo un diseño de cuadro latino con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + A_j + T_k + E_{ijk}$$

Donde: Y_{ijk} = variable respuesta, P_i = efecto del periodo, A_j = efecto del animal, T_k = efecto de los tratamientos y E_{ijk} = error experimental.

Toda la información se analizó con el paquete estadístico SAS (2006), cuando hubo diferencias entre tratamientos, la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ($p = 0.05$), mientras que en el ensayo *in vivo* se realizó análisis de contrastes ortogonales (Steeley Torrie 1988).

RESULTADOS

Experimento *in vitro*

Parámetros de fermentación y cinética de degradación. El tratamiento T_1 fue el que menor volumen produjo de gas ($p < 0.05$, 412.25 mL g^{-1} MS), mientras que la tasa fraccional de producción de gas (parámetro c) fue mayor ($p < 0.05$) en los tratamientos T_0 y T_1 , al compararlos con los tratamientos T_2 y T_3 . En la fase *Lag* no se observó efecto ($p > 0.05$) de las dosis de extracto de *L. acapulcensis*. La síntesis de AGCC, fue mayor ($p < 0.05$) en la dieta sin extracto (T_0) con 2.97 mmol L^{-1} de líquido ruminal. La producción de gas en la hora 24 fue mayor ($p < 0.05$) en el tratamiento control (267.91 mL g^{-1} MS) y en la hora 48 el tratamiento que presentó menor producción de gas fue el T_1 (Tabla 1) El total del gas producido a las 96 h de fermentación fue mayor en el T_2 . No se encontraron diferencias ($p > 0.05$) entre tratamientos sobre la degradabilidad de la materia orgánica.

Ensayo *in vivo*

Digestibilidad aparente de los nutrientes. En la Tabla 2 se observan diferencias significativas (p

Tabla 1. Degradabilidad de la materia seca y orgánica, cinética de fermentación y producción de una dieta basal para ovinos en crecimiento adicionada con diferentes niveles de taninos condensados libres de *Lysiloma acapulcensis*.

Table 1. Degradability of dry and organic matter, fermentation kinetics and production of a basal diet for growing sheep with different levels of free condensed tannins from *Lysiloma acapulcensis*.

| Variable | Tratamientos (gTCL d ⁻¹) | | | | EEM |
|-----------|--------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------|
| | T ₀ (0.0) | T ₁ (2.5) | T ₂ (5.0) | T ₃ (7.5) | |
| DIVMS (%) | 807.20 | 808.81 | 806.38 | 811.17 | 7.31 |
| DIVMO (%) | 871.98 | 875.14 | 872.53 | 877.91 | 8.11 |
| Fase b | 442.00a | 412.25b | 464.25a | 441.73a | 6.00 |
| Fase c | 0.04a | 0.04a | 0.03b | 0.03b | 0.001 |
| Fase Lag | 2.30 | 2.96 | 2.60 | 2.96 | 0.17 |
| EM | 10.35a | 9.84b | 9.81b | 9.61b | 0.09 |
| AGCC | 2.97 a | 2.76b | 2.74 b | 2.66 b | 0.03 |
| Gas24 | 267.91 a | 249.31 b | 248.09 b | 240.76 b | 3.57 |
| Gas48 | 373.27 a | 347.79c | 363.42 ab | 349.63bc | 3.64 |
| Gas96 | 431.21 ab | 402.13 c | 442.10 a | 422.01 b | 4.77 |

Fase b, Producción de gas hasta alcanzar la asíntota (mL g⁻¹ MS); Fase c, tasa fraccional de producción de gas (ml h⁻¹); Fase lag (h); DIVMS, degradabilidad *in vitro* de la materia seca; DIVMO, Degradabilidad *in vitro* de la materia orgánica; EM, Contenido de energía metabolizable (MJ kg⁻¹ MS); AGCC, Ácidos grasos de cadena corta (mmol L⁻¹); Gas24, Gas48, Gas96, producción de gas acumulado (mL g⁻¹ MS) a las 24, 48 y 96 h, respectivamente; TCL, Taninos condensados libres (g d⁻¹). Medias en la misma fila con diferente literal son diferentes (p < 0.05).

Tabla 2. Digestibilidad aparente (%) *in vivo* de los nutrientes de una dieta basal para ovinos en crecimiento adicionada con diferentes dosis de taninos condensados libres de *Lysiloma acapulcensis*.

Table 2. Apparent digestibility (%) *in vivo* of nutrients of a basal diet for growing sheep supplemented with different doses of free condensed tannins from *Lysiloma acapulcensis*.

| Variable | Tratamientos (gTCL d ⁻¹) | | | | EEM ¹ | Contraste | |
|----------|--------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| | T ₀ (0.0) | T ₁ (2.5) | T ₂ (5.0) | T ₃ (7.5) | | EL ² | EC ³ |
| MS | 77.78 | 76.11 | 77.34 | 75.48 | 0.11 | 0.92 | 0.36 |
| MO | 78.97 | 77.54 | 78.72 | 76.77 | 0.11 | 0.96 | 0.32 |
| PC | 72.24b | 74.95ab | 79.40a | 76.40ab | 0.11 | 0.07 | 0.05 |
| FDN | 50.72 | 42.71 | 47.82 | 41.78 | 0.33 | 0.31 | 0.46 |
| FDA | 56.66 | 50.04 | 56.23 | 50.73 | 0.42 | 0.32 | 0.68 |

TCL, Taninos condensados libres, ¹Error estándar de la media, ²Efecto lineal, ³Efecto cuadrático. Medias en la misma fila con diferente literal son diferentes (p < 0.05).

< 0.05) en la digestibilidad aparente de la proteína cruda. Se aprecia un efecto cuadrático, observándose la mayor digestibilidad en la dosis de 5.0 g de TCL con 79.40 g kg⁻¹ de MS.

Nitrógeno amoniacal (N-NH₃). En la Tabla 3 se observó un efecto cuadrático (p < 0.05) en la hora cero, siendo el tratamiento de 7.5 g d⁻¹ de TCL

(T₃) que tuvo la más baja concentración (9.25 mg dL⁻¹ de líquido ruminal). A las 4 y 20 h se observaron efectos lineales (p < 0.05), en el tratamiento control (0.0 g de TCL) con 4.67 y 6.91 mg dL⁻¹ de líquido ruminal, respectivamente.

Protozoarios. En la Tabla 4 se muestran los resultados de la concentración de protozoarios ruminales

Tabla 3. Concentración de nitrógeno amoniacal (mg dL^{-1}) en ovinos recibiendo una dieta base adicionada con diferentes dosis de taninos condensados libres de *Lysiloma acapulcensis*.

Table 3. Concentration of ammoniacal nitrogen (mg dL^{-1}) in sheep on a basal diet supplemented with different doses of free condensed tannins from *Lysiloma acapulcensis*.

| Tiempo (h) | Tratamientos (gTCL d^{-1}) | | | | EEM ¹ | Contraste | |
|------------|---------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| | T ₀ (0.0) | T ₁ (2.5) | T ₂ (5.0) | T ₃ (7.5) | | EL ² | EC ³ |
| 0 | 4.63b | 10.56ab | 14.01a | 9.25b | 0.09 | 0.14 | 0.02 |
| 4 | 4.67b | 9.13a | 6.70ab | 7.51ab | 0.09 | 0.03 | 0.07 |
| 8 | 9.37 | 10.64 | 10.67 | 7.10 | 0.16 | 0.90 | 0.96 |
| 12 | 10.28 | 8.01 | 10.59 | 9.42 | 0.22 | 0.58 | 0.45 |
| 16 | 10.67 | 13.11 | 10.44 | 15.38 | 0.21 | 0.40 | 0.13 |
| 20 | 6.91b | 13.26a | 11.48a | 10.67a | 0.15 | 0.03 | 0.20 |
| 24 | 6.89b | 9.95a | 9.61ab | 9.57ab | 0.05 | 0.29 | 0.08 |

TCL, Taninos condensados libres, ¹Error estándar de la media, ²Efecto lineal, ³Efecto cuadrático. Medias en la misma fila con diferente literal son diferentes ($p < 0.05$).

en diferentes tiempos. Se observó un efecto lineal ($p < 0.05$), en los tiempos 0, 4, 8 y 12 h y un efecto cuadrático ($P < 0.05$) en la hora 24, encontrándose efectos estimulatorios con las tres dosis de TCL.

DISCUSIÓN

Parámetros de fermentación y cinética de degradación.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró que las diferentes dosis del extracto no tuvieron efecto en la degradabilidad *in vitro* de la materia seca y orgánica, respuesta que puede estar relacionada con la cantidad de TCL utilizados en los tratamientos (Tabla 1), las cuales se consideran bajas para tener una interferencia sobre la degradabilidad de la fracción potencialmente digestible del sustrato (Camacho *et al.* 2010). Efectos negativo, se han observado cuando la ingestión de taninos condensados totales supera los 50 g kg^{-1} de MS (Hervás *et al.* 2003). El no encontrar efecto de los taninos condensados libres utilizados se puede deber a que no formaron complejos con el grupo carboxilo de los carbohidratos estructurales, debido a su baja concentración en rumen. Lo cual es favorable, ya que no interfiere con la microbiota ruminal en la síntesis enzimática responsable de la degradación de la fracción potencialmente digestible. Por el contrario McSweeney *et al.* (2001) han encontrado que extractos con alto contenido de

taninos condensados ($>6 \text{ \% kg}^{-1}$ MS) tiene efecto negativo sobre la degradación de la MS y MO.

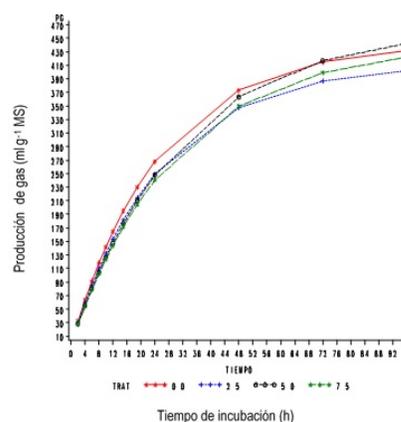


Figura 1. Cinética de degradación de una dieta basal para ovinos adicionada con diferentes niveles de taninos condensados libres de *Lysiloma acapulcensis*.

Figure 1. Degradation kinetics of a basal diet for sheep supplemented with different doses of free condensed tannins from *Lysiloma acapulcensis*.

La producción de gas a las 72 h (Figura 1), fue mayor en el tratamiento sin extracto (T₀), lo que significa que estas dosis tienen un efecto negativo sobre la producción de gas acumulado. Algunas investigaciones han encontrado que diferentes extractos disminuyen la concentración de bacterias productoras de metano con efecto protector de la proteína (Hess *et al.* 2003, Wina *et al.* 2005). En el presente estudio los tratamientos con TC

Tabla 4. Concentración de protozoarios ruminales ($\times 104 \text{ mL}^{-1}$) en ovinos recibiendo una dieta basal adicionada con diferentes niveles de taninos condensados libres de *Lysiloma acapulcensis*.

Table 4. Concentration of ruminal protozoa ($\times 104 \text{ mL}^{-1}$) in sheep on a basal diet supplemented with different doses of free condensed tannins from *Lysiloma acapulcensis*.

| Tiempo (h) | Tratamientos (gTCL d^{-1}) | | | | EEM ¹ | Contraste | |
|------------|---------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| | T ₀ (0.0) | T ₁ (2.5) | T ₂ (5.0) | T ₃ (7.5) | | EL ² | EC ³ |
| 0 | 71.1 | 78.0 | 86.3 | 127.0 | 0.69 | 0.05 | 0.17 |
| 4 | 80.7 | 91.1 | 93.5 | 144.0 | 2.59 | 0.01 | 0.79 |
| 8 | 85.6 | 86.9 | 84.9 | 107.0 | 2.23 | 0.04 | 0.92 |
| 12 | 59.5 | 100.0 | 71.6 | 144.0 | 3.46 | 0.03 | 0.72 |
| 16 | 48.1 | 76.4 | 64.8 | 85.6 | 1.99 | 0.76 | 0.07 |
| 20 | 52.2 | 66.3 | 59.9 | 97.4 | 0.91 | 0.48 | 0.42 |
| 24 | 62.8 | 83.9 | 59.3 | 98.9 | 0.53 | 0.24 | 0.05 |

TCL, Taninos condensados libres, ¹Error estándar de la media, ²Efecto lineal, ³Efecto cuadrático.

disminuyeron la concentración de AGCC, al respecto Cardozo *et al.* (2004) en un estudio con diferentes dosis de extractos de *Yucca schidigera*, *Allium sativa* y *Cinnamomum cassia*, encontraron efectos positivos en el contenido de AGCC; fenómeno que puede relacionarse con la cantidad y tipo de componentes moleculares de estos extractos. Mientras que Busquet *et al.* (2005) encontraron que dosis mayores de 3000 mg L^{-1} , disminuyen la concentración de AGCC. En el presente estudio las dosis del extracto de *L. acapulcensis* fueron menores, pero tienen mayor cantidad de taninos condensados totales, por lo que se infiere que tienen mayor afinidad de adherencia sobre las partículas de los alimentos y microorganismos ruminales (Van Soest *et al.* 1991). En lo que se refiere, al contenido de EM los resultados obtenidos, en este ensayo, presentaron un efecto similar a los AGCC, lo cual se puede deber al efecto de los TCL (Tabla 1) sobre el secuestro de los carbohidratos, en específico en las fracciones de fibra; los cuales forman complejos que podrían presentar mayor resistencia a la degradabilidad por las enzimas de los microorganismos ruminales. Lo que genera una menor producción de AGCC, como ocurrió en el presente estudio con el extracto de TCL en las dosis evaluadas (Tabla 1), por lo que se infiere que dietas con TCL pueden afectar la energía disponible para el animal en forma de AGV de cadena corta. Sin embargo, no se debe obviar que a mayor cantidad de gas acumulado, se tendrá mayor disponibilidad de energía, aunque también se

producen productos inservibles como CH_4 y CO_2 (Van Soest 1982), que contribuyen a la ineficiencia energética en el metabolismo de los nutrientes en la dieta de los rumiantes.

Digestibilidad aparente de los nutrientes.

El efecto de los TC sobre la digestibilidad de la proteína se debe a la capacidad que tienen los TCL para interactuar con el grupo amino de los aminoácidos que constituyen las proteínas (McSweeney *et al.* 2001), formando complejos estables en pH neutros, pero inestables en pH ácidos, con efecto positivo en la digestibilidad de los compuestos nitrogenados en concentraciones mayores de 50 g kg^{-1} MS. Aunque el efecto de los taninos varía de acuerdo al estado fisiológico del animal y la estructura química del tanino (Provenza *et al.* 1990, Hagerman y Butler 1991). En este estudio, se encontró un aumento en la digestibilidad de la proteína cruda con la dosis de 5 g de TCL (Tabla 2), debido a la probable formación de complejos tanino-proteína, que previno el ataque de los microorganismos ruminales, lo cual puede ser benéfico para el aprovechamiento de la proteína a nivel duodenal (Mueller-Harvey 2006). Los resultados de este estudio muestran que la dosis de 5 g de TCL mejoran la digestibilidad de la proteína, lo que se relaciona con la dieta balanceada en forma isóproteica proporcionada a los ovinos. Al respecto, Waghorn (2008) encontró que dietas con exceso de proteína pueden reducir la degradación, sin limitar la disponibilidad de aminoácidos para la

absorción. En contra parte, cuando las concentraciones de proteína en la dieta están por debajo de los requerimientos del animal, los TC son perjudiciales para el metabolismo de las proteínas (Camacho et al. 2010).

Nitrógeno amoniacal (N-NH₃)

Los efectos cuadráticos encontrados en este estudio (Tabla 3) demuestran la disparidad de cambios que tienen los taninos condensados, lo que podría estar relacionado con la capacidad que tienen los microorganismos de adaptarse a los TC (Min et al. 2005). En este estudio se observó mayor concentración de N-NH₃ en el tiempo cero con la dosis de 7.5 g d⁻¹ de TCL (Tabla 3) (T₃; 9.25 mg dL⁻¹). Algunos autores indican que los efectos principales que tienen los taninos condensados libres en el rumen de ovinos, incluyen una reducción en la proteólisis de la proteína del alimento y una pérdida subsecuente en la concentración de nitrógeno amoniacal en el fluido ruminal, lo cual nutricionalmente es benéfico para el animal, debido al efecto de secuestro que tienen los taninos sobre la proteína en el rumen (Min et al. 2003, Waghorn 2008).

Protozoarios

Los efectos estimuladores de la población de protozoos (Tabla 4), probablemente se deban a las dosis utilizadas. En contraste McSweeney et al. (2001) reportaron efectos defaunadores de algunas plantas utilizadas en la alimentación de rumiantes, que contenían taninos, saponinas y alcaloides. Sin embargo la defaunación de extractos de ciertas plan-

tas han mostrado efectos variables, debido a que se reporta un efecto positivo al eliminar la población de protozoarios del rumen (Newbold et al. 1997), mientras que en otros autores reportan un aumento en la concentración ruminal de protozoarios (McSweeney et al. 2001, Galindo et al. 2000). Lo cual depende de la naturaleza de los metabolitos secundarios y la concentración (Makkar et al. 1995). Los efectos estimuladores de las dosis de TCL de ésta investigación podrían estar relacionados con la afinidad que tienen los TC, con las células bacterianas, principalmente con las celulolíticas y proteolíticas; fenómeno que puede explicar el incremento de la población de protozoarios en el líquido ruminal del presente estudio (Min et al. 2005). Al respecto Hess et al. (2003b) mencionan que *Arachis pintoi* a dosis de 2.9 g de TC kg⁻¹ MS tuvo efectos estimuladores de protozoarios ruminales, similar a lo obtenido en el presente estudio con las dosis de *L. acapulcensis*.

CONCLUSIONES

La adición de 5.0 g de taninos condensados libres por día mejora la digestibilidad de la proteína cruda y aumenta los niveles de N-NH₃. Las tres dosis del extracto disminuyen la ácidos grasos de cadena corta y la energía metabolizable, además de que estimulan el crecimiento de los protozoarios ruminales, por lo que podrían utilizarse como aditivo para ovinos en fase de crecimiento. Sin embargo, se requiere realizar estudios posteriores con las dosis de 5.0 y 7.5 g de TCL, sobre parámetros productivos.

LITERATURA CITADA

- Ademola IO, Eloff JN (2011) Anthelmintic activity of acetone extract and fractions of *Veronia amygdalina* against *Haemonchus contortus* eggs and larvae. *Tropical Animal Health and Production* 43: 521-527.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1997) *Official Methods of Analysis*, 16th edition. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C (2005) Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. *Animal Feed Science and Technology* 124: 597-613.
- Camacho LM, Rojo R, Salem AZM, Provenza FD, Mendoza GD, Avilés F, et al. (2010) Effect of season on chemical composition and in situ degradability in cows and in adapted and unadapted goats of three Mexican browse species. *Animal Feed Science and Technology* 155: 206-212.

- Cardozo PW, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C (2004) Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science* 82: 3230-3236.
- Food and Agriculture Organization (2000) www.fao.org. Fecha de consulta 29 de enero de 2015.
- 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. *British Journal of Nutrition* 83: 143-150.
- García ME (1986) Apuntes de climatología. 5 Edición. Enriqueta García de Miranda, México, D.F. 155 p.
- 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. *Journal of Agricultural Science* 139: 341-352.
- Hedqvist H, Mueller-Harvey I, Reed JD, Krueger CG, Murphy M (2000) Characterization of tannins and *in vitro* protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties. *Animal Feed Science and Technology* 87: 41-56.
- Hervás G, Frutos P, Giráldez FJ, Mantecón AR, Álvarez Del Pino MC (2003) Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology* 109: 65-78.
- Hess HD, Monsalve L M, Lascano CE, Carulla JE, Díaz TE, Kreuzer M (2003a) Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research* 54: 703-713.
- Hess HD, Kreuzer M, Diaz TE, Lascano CE, Carulla JE, Soliva CR (2003b) Saponins rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology* 109: 79-94.
- Hagerman AE, Butler L G (1991) Tannins and lignins. In: G.A. Rosenthal and M. R. Berenbaum (Ed.) *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. Vol. I: The Chemical Participants. Academic Press, New York. pp. 355-388.
- López J, Tejada I, Vázquez C, De Dios G, Shimada A (2004) Condensed tannins in humid tropical fodder crops and their *in vitro* biological activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 295-299.
- McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA (2006) *Nutrición animal*. 6th Edición. Prentice Hall. Zaragoza, España. 587 p.
- McCullough H (1967) The determination of ammonia in whole blood: a direct colorimetric method. *Clinical Chemistry Acta* 17: 297-304.
- McSweeney CS, Palmer B, McNeill DM, Krause DO (2001) Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science Technology* 91: 83-93.
- Makkar HPS, Blümmel M, Becker K (1995) *In vitro* effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 69: 481-493.
- Menke KH, Steingass H (1988) Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analyses and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 28: 7-55.
- Min BR, Barry TN, Attwood GT, McNabb WC (2003) The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology* 106: 3-19.

- Min BR, Attwood GT, McNabb WC, Molan AL, Barry TN (2005) The effect of condensed tannins from *Lotus corniculatus* on the proteolytic activities and growth of rumen bacteria. *Animal Feed Science and Technology* 21: 45-58.
- Mueller-Harvey I (2006) Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal Science Food Agricultural* 86: 2010-2037.
- Newbold, JD, Bott TL, Kaplan LA, Sweeney BW, Vannote RL (1997) Organic matter dynamics in White Clay Creek, Pennsylvania, USA. *Journal of the North American Benthological Society* 16: 46-50.
- NRC (2007) Nutrient requirements of small ruminants, sheep, goats, cervids, and New World camelids. *Animal Nutrition Series*. The National Academy Press. Washington, DC, USA. 362 p.
- Olmedo JA, Rojo R, Arece J, Salem AZM, Morales E, Aviles F (2013) In vitro anthelmintic activity of crude aqueous extracts of *Pithecellobium dulce* and *Lysiloma acapulcensis* against gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Journal of Animal Science* 91: 53-54.
- Porter LJ, Hrstich LN, Chan BG (1986) The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25: 223-230.
- Provenza FD, Burritt EA, Clausen TP, Bryant JP, Reichardt PB, Distel RA (1990) Conditioned flavor aversion: A mechanism for goats to avoid condensed tannins in black brush. *American Naturalist* 136: 810-828.
- Salem AZM, Salem MZM, El-Adawy MM, Robinson PH (2006) Nutritive evaluations of some browse tree foliages during the dry season: secondary compounds, feed intake and *in vivo* digestibility in sheep and goat. *Animal Feed Science and Technology* 127: 251-267.
- SAS Institute (2006) SAS User's Guide: Statistics. Ver 9.0. SAS Institute. Cary, N.C. USA. 956 p.
- Steel RGD, Torrie JH (1988) *Bioestadística: Principios y procedimientos*. McGraw-Hill. México. 622 p.
- 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. *Animal Feed Science and Technology* 48: 185-197.
- Van Soest PJ (1982) *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Comstock, Cornell Univ. Press, New York, NY. 488 p.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch carbohydrates in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 583- 597.
- Wina E, Muetzel S, Hoffmann E, Makkar HPS, Becker K (2005) Saponins containing methanol extract of *Sapindus rarak* affect microbial fermentation, microbial activity and microbial community structure *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology* 121: 159-174.
- Waghorn GC (2008) Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology* 147: 116-139.