



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**IDENTIFICACIÓN DE DOS *SPP* DE *IPOMOEA* Y
EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EXTRACTO METANÓLICO COMO
PROBLEMA DE INTOXICACIÓN EN CABRAS**

ROBERTA MILA ARANGO

**T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

Abril 2013

La presente tesis titulada: **Identificación de dos spp de Ipomoea y evaluación *in vitro* del extracto metanólico como problema de intoxicación en cabras**, realizada por la alumna: **Roberta Mila Arango** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

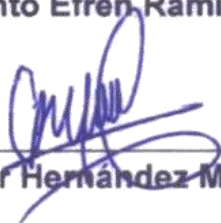
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Jacinto Efrén Ramírez Bribiesca

ASESOR



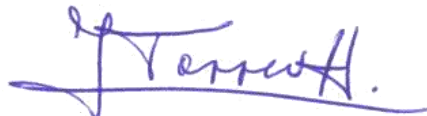
Dr. Omar Hernández Mendo

ASESOR



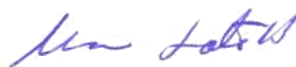
Dr. Miguel Ángel Mellado Bosque

ASESOR



Dr. Glafiro Torres Hernández

ASESOR



Dr. Ramón Marcos Soto Hernández

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril 2013

ESTA TESIS FUE FINANCIADA POR LA LINEA LPI-7 INOCUIDAD, CALIDAD DE ALIMENTOS Y BIOSEGURIDAD DEL COLEGIO DE POSTGRADUADOS.

IDENTIFICACIÓN DE DOS *SPP* DE *IPOMOEA* Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EXTRACTO METANÓLICO COMO PROBLEMA DE INTOXICACIÓN EN CABRAS

Roberta Mila Arango, M.C
Colegio de Postgraduados, 2013

RESUMEN

El desconocimiento de distintas plantas tóxicas y la ingesta de éstas por rebaños caprinos en temporada de sequía, ha provocado que muchos casos de intoxicación no se diagnostiquen o sean confundidos con otras causas, provocando altos índices de morbilidad y mortalidad en rebaños caprinos. El presente estudio tuvo como objetivo principal, la identificación de los metabolitos secundarios presentes en dos especies arbustivas de la Mixteca baja de Oaxaca causantes de intoxicación en cabras. Se evaluó el grado de toxicidad de estas plantas mediante un bioensayo con crustáceos, mismo que sirvió para identificar los metabolitos secundarios más perjudiciales y determinar, mediante la técnica de gas *in vitro*, el grado de afección en el rumen. Se evaluó un agente que pudiera neutralizar los efectos de los metabolitos secundarios identificados. En la primera fase se identificó a las especies como *I. muruoides* e *I. pauciflora* subsp. *pauciflora* y, se realizó un análisis bromatológico y fitoquímico de los extractos de estas plantas. En el análisis bromatológico las hojas de *I. muruoides* presentaron un contenido mas alto ($P < 0.002$) de proteína cruda y extracto etéreo que *I. pauciflora*. Respecto al estudio fitoquímico, ambas especies presentaron un alto contenido de taninos y flavonoides (+++), seguido de una presencia notable (++) de terpenoides y alcaloides libres y liberados. Para la segunda fase, se evaluó el grado de toxicidad de cada extracto mediante un bioensayo con crustáceos, determinando la concentración letal media (CL_{50}), siendo el extracto metanólico (con alto contenido de taninos) quien presentó mayor toxicidad en ambas especies, a una concentración de 3.55 mg/mL para *I. pauciflora* y 1.46 mg/mL para *I. muruoides*. En la última fase se determinó el grado de fermentación *in vitro* del extracto metanólico de ambas especies, corroborando la presencia de taninos mediante la técnica de producción de gas *in vitro* con y sin la adición de PEG. Se evaluaron cuatro concentraciones del extracto metanólico de ambas especies (0.0, 0.2, 0.4 y 0.8 g) sobre distintos parámetros (DIVMS, DIVMO, cinética de producción de gas mL/g en base a MS, MO, MSD, MOD de 6 a 96 h, producción de AGV y CBRT). Siendo *I. muruoides* (cazahuate blanco) el arbusto que presentó mayor contenido de taninos en base a las respuestas de las variables evaluadas.

Palabras clave: Caprinos, *I. muruoides*, *I. pauciflora*, metabolitos secundarios, toxicidad.

IDENTIFICATION OF TWO *IPOMOEA* SPP AND *IN VITRO* EVALUATION OF METHANOL EXTRACT AS A PROBLEM OF POISONING IN GOATS

Roberta Mila Arango, M.C
Colegio de Postgraduados, 2013

ABSTRACT

The lack of knowledge on different toxic plants for goats during the dry season provoke undiagnosed poisoning cases which most of the time are confused with other diseases, causing high rates morbidity and mortality. The main objective of this study was to identify the secondary metabolites present in two shrub species causing poisoning in goats in the Mixteca baja region of Oaxaca. The degree of toxicity was also assessed by bioassay with crustaceans, same as served to identify the most toxic secondary metabolites and determined (by the technique of gas in vitro) the level of affection in the rumen, in turn assessing an agent which would counteract or neutralize the effects of secondary metabolites. A further study was carried out to identified the toxic compound of *I. muruoides* and *I. pauciflora* subsp. *pauciflora*. *I. muruoides* presented higher ($P < 0.002$) crude protein content and crude fat than *I. pauciflora*. Both species a high content of tannins and flavonoids (+ + +), as well as a great content (+ +) of terpenoids and free and liberated alkaloids. The median lethal concentration (LC50), in the methanol extract (with high content in tannins) was 3.55 mg/mL for *I. pauciflora* and 1.46 mg/mL for *I. muruoides*. In the last phase of the study, the degree of in vitro fermentation was determined of the methanol extract of both species, corroborating the presence of tannins using the technique of in vitro gas production with and without the addition of PEG. Four concentrations of methanol extract were evaluated in both species (0.0, 0.2, 0.4 and 0.8 g) on IVDDM, IVDOM, gas production kinetics mL/g based on DM, OM, DDM, DOM of 6 to 96 h, VFA production and CTRB. *I. muruoides* (white cazahuate) higher tannin content compared to based on the responses of the variables evaluated.

Key words: Goats, *I. muruoides*, *I. pauciflora*, secondary metabolites, toxicity.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar presente en todas las etapas de mi vida, guiándome día con día a ser mejor persona en el aspecto laboral y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme otorgado la beca para poder realizar mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados, por haberme dado la oportunidad de ser una estudiante más en su historia.

A mi consejo particular integrado por el Dr. Efrén Ramírez Bribiesca, Dr. Ramón Marcos Soto Hernández, Dr. Omar Hernández Mendo, Dr. Miguel Ángel Mellado Bosque y Dr. Glafiro Torres Hernández; quienes me apoyaron plenamente en la elaboración de la presente investigación y supieron guiarme correctamente en esta etapa profesional.

A la Dra. Maria Magdalena Crosby Galvan y a todo su equipo de trabajo del laboratorio de Nutrición de Ruminates.

Al Dr. Ramón Marcos Soto Hernández, por su apoyo incondicional en esta investigación, brindándome los conocimientos, la confianza y el apoyo necesario en el laboratorio de Fitoquímica junto con su equipo de trabajo.

Al Dr. Mario Antonio Cobos Peralta, quien me permitió realizar diversos análisis en su laboratorio de Microbiología Ruminal.

Al Dr. Stephen D. Koch, por su apoyo incondicional en su herbario-hortorio del Programa de Botánica (CHAPA).

Al Dr. Humberto Vaquera Huerta, por su apoyo incondicional en la parte estadística y a todos aquellos profesores que tuvieron la influencia en mi formación académica, un sincero agradecimiento por los conocimientos proporcionados, los cuales sabré aprovechar en mi desempeño profesional.

A mis amigos (as) y compañeros (as) del Colegio de Postgraduados, en especial a Jeronimo, Marco y Felipe, quienes en todo momento y lugar me brindaron su apoyo y amistad en esta etapa.

En especial a mi querido esposo José Luis Hernández Hernández, quien en todo momento estuvo a mi lado apoyándome, escuchándome y animándome para culminar esta etapa, siendo una parte fundamental en la realización de esta investigación.

DEDICATORIA

A mis padres Clemencia Arango Arango y Efrén Mila Guzman, por ser las personas que me han enseñado a crecer día con día a pesar de las adversidades que se presenten, por su amor y apoyo en cada etapa de mi vida, los quiero mucho.

A mis hermanos Efrén Mila Arango y Francisco Mila Arango, por todo su apoyo y motivación constante, con mucho cariño para ustedes hermanos.

Dedicada a mi esposo José Luis Hernández Hernández, por ser un ejemplo de superación y por su gran amor que me ha demostrado día con día con su paciencia y comprensión en todo momento, con cariño y amor para ti y nuestro (a) bebe que viene en camino.

ÍNDICE

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
LITERATURA CITADA	4
CAPITULO I	6
IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO FITOQUÍMICO DE DOS <i>SPP</i> ARBUSTIVAS CAUSANTES DE INTOXICACIÓN EN CABRAS DE LA MIXTECA OAXAQUEÑA	6
1.1 RESUMEN	6
1.1 ABSTRACT	7
1.2 INTRODUCCIÓN	8
1.3 MATERIALES Y MÉTODOS	10
1.4 RESULTADOS	17
1.5 DISCUSIÓN	24
1.6 CONCLUSIONES	28
1.7 LITERATURA CITADA	29
CAPITULO II	35
BIOENSAYO DE TOXICIDAD SOBRE NAUPLIOS DE <i>ARTEMIA SALINA</i> UTILIZANDO CUATRO EXTRACTOS DE DOS <i>SPP</i> DE <i>Ipomoea</i>	35
2.1 RESUMEN	35
2.1 ABSTRACT	36

2.2	INTRODUCCIÓN	37
2.3	MATERIALES Y MÉTODOS	39
2.4	RESULTADOS	43
2.5	DISCUSIÓN	51
2.6	CONCLUSIONES	54
2.7.	LITERATURA CITADA	55
CAPITULO III		59
EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL EXTRACTO METANÓLICO DE DOS <i>SPP</i> DE <i>Ipomoea</i> CON Y SIN POLIETILENGLICOL		59
3.1	RESUMEN	59
3.1	ABSTRACT	61
3.2	INTRODUCCIÓN	62
3.3	MATERIALES Y MÉTODOS	64
3.4	RESULTADOS	72
3.5	DISCUSIÓN	107
3.6	CONCLUSIONES	115
3.7.	LITERATURA CITADA	116
CAPITULO IV		124
CONCLUSIÓN GENERAL		124

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1.1	Identificación de las dos especies de <i>Ipomoea</i> (cazahuate negro y blanco).	18
1.2	Análisis bromatológico de <i>I. murucoides</i> e <i>I. pauciflora</i> subsp. <i>pauciflora</i> .	18
1.3	Análisis químico del suelo donde crece <i>I. murucoides</i> e <i>I. pauciflora</i> subsp. <i>pauciflora</i> .	19
1.4	Porcentaje de rendimiento obtenido de los cuatro extractos de las dos especies de <i>Ipomoea</i> en 10 g de muestra seca.	20
1.5	Análisis fitoquímico de los extractos obtenidos de las dos especies de <i>Ipomoea</i> .	20
2.1	Gramos de extracto obtenido de las hojas de las dos especies de <i>Ipomoea</i> a partir de 10g de muestra seca.	44
2.2	Materia seca (g) de las dos especies de <i>Ipomoea</i> necesaria para obtener 3.3 g de extracto.	44
2.3	Análisis fitoquímico de los extractos obtenidos de las dos especies de <i>Ipomoea</i> .	45
2.4	Actividad de los extractos (<i>I. pauciflora</i> subsp. <i>pauciflora</i>) sobre la CL ₅₀ de los nauplios de <i>A. salina</i> .	45
2.5	Actividad de los extractos (<i>I. murucoides</i>) sobre la CL ₅₀ de los nauplios de <i>A. salina</i> .	46
2.6	Comparación de la actividad de los extractos y categoría de toxicidad de las dos especies de <i>Ipomoea</i> , sobre la CL ₅₀ de los nauplios de <i>A. salina</i> .	46
3.0	Composición del medio de cultivo usado para medir la producción de gas mL/g (MS, MO, MSD, MOD), degradación de MS y MO, producción de AGV y concentración de bacterias ruminales totales con y sin la adición de PEG.	67
3.1	DIVMS, DIVMO, producción de gas en base a MS, MO, MSD y MOD (mL/g) y sus parámetros cinéticos en cuatro concentraciones de <i>Ipomoea pauciflora</i> sin la adición de PEG.	79
3.2	DIVMS, DIVMO, producción de gas en base a MS, MO, MSD y MOD (mL/g) y sus parámetros cinéticos en cuatro concentraciones de <i>Ipomoea pauciflora</i> con la adición de PEG.	81
3.3	Comparación de <i>Ipomoea pauciflora</i> con y sin PEG en DIVMS, DIVMO, producción de gas en base a MS, MO, MSD, MOD (mL/g) y sus	83

3.4	parámetros cinéticos en cuatro concentraciones de extracto (0, 0.2, 0.4 y 0.8). DIVMS, DIVMO, producción de gas en base a MS, MO, MSD y MOD (mL/g) y sus parámetros cinéticos en cuatro concentraciones de <i>Ipomoea murucoides</i> sin la adición de PEG.	86
3.5	DIVMS, DIVMO, producción de gas en base a MS, MO, MSD y MOD (mL/g) y sus parámetros cinéticos en cuatro concentraciones de <i>Ipomoea murucoides</i> con la adición de PEG.	88
3.6	Comparación de <i>Ipomoea murucoides</i> con y sin PEG en DIVMS, DIVMO, producción de gas en base a MS, MO, MSD, MOD (mL/g) y sus parámetros cinéticos.	90
3.7	Comparación entre <i>Ipomoea pauciflora</i> e <i>Ipomoea murucoides</i> sin la adición de PEG (DIVMS, DIVMO, producción de gas mL/g MS, MO, MSD y MOD) y sus parámetros cinéticos.	93
3.8	Comparación entre <i>Ipomoea pauciflora</i> e <i>Ipomoea murucoides</i> con la adición de PEG (DIVMS, DIVMO, producción de gas mL/g MS, MO, MSD y MOD) y sus parámetros cinéticos.	95
3.9	Efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles, relación acético: propiónico y concentración de bacterias ruminales totales a las 96 h de incubación.	98
3.10	Efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles, relación acético: propiónico y concentración de bacterias ruminales totales a las 96 h de incubación.	99
3.11	Efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles, relación acético: propiónico y concentración de bacterias ruminales totales a las 96 h de incubación.	100
3.12	Efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles, relación acético: propiónico y concentración de bacterias ruminales totales a las 96 h de incubación.	101
3.13	Efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles, relación acético: propiónico y concentración de bacterias ruminales totales a las 96 h de incubación.	102
3.14	Efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles, relación acético: propiónico y concentración de bacterias ruminales totales a las 96 h de incubación.	103
3.15	Efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles, relación acético: propiónico y concentración de bacterias ruminales a las 96	104

h de incubación.

- 3.16** Efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles, relación acético: propiónico y concentración de bacterias ruminales a las 96 h de incubación. 105
- 3.17** Comparación del incremento (%) en la producción de gas mL/g MS, MO, MSD y MOD (96 h) de *I.pauciflora* e *I.murucoides* al adicionar PEG. 106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.1	Ubicación de la comunidad en estudio.	12
1.2	Flor de <i>Ipomoea pauciflora</i> .	21
1.3	Ejemplar botánico <i>Ipomoea pauciflora</i> .	21
1.4	Flor de <i>Ipomoea murucoides</i> .	22
1.5	Ejemplar botánico <i>Ipomoea murucoides</i> .	22
1.6	Identificación de metabolitos secundarios de las dos especies de <i>Ipomoea</i> . (<i>murucoides</i> y <i>pauciflora</i>).	23
2.1	Comparacion de la CL ₅₀ (concentración letal media) del extracto hexánico de <i>I.murucoides</i> e <i>I. pauciflora</i> subsp. <i>pauciflora</i> sobre <i>A.salina</i> .	47
2.2	Comparacion de la CL ₅₀ (concentración letal media) del extracto con diclorometano de <i>I.murucoides</i> e <i>I. pauciflora</i> subsp. <i>pauciflora</i> sobre <i>A.salina</i> .	48
2.3	Comparacion de la CL ₅₀ (concentración letal media) del extracto con agua de <i>I.murucoides</i> e <i>I. pauciflora</i> subsp. <i>pauciflora</i> sobre <i>A.salina</i> .	49
2.4	Comparacion de la CL ₅₀ (concentración letal media) del extracto metanólico de <i>I.murucoides</i> e <i>I. pauciflora</i> subsp. <i>pauciflora</i> sobre <i>A.salina</i> .	50

INTRODUCCIÓN GENERAL

La Mixteca Oaxaqueña es una de las principales regiones semi- áridas y áridas del país. Desde la llegada de los españoles (siglo XVI) hasta la fecha, una de sus principales actividades económicas de esta zona ha sido la crianza de ganado caprino. A pesar de ser una de las regiones con los habitantes más pobres de México, con alto grado de erosión de la tierra, elevada deforestación y escasez de agua, las cabras han sido la única especie capaz de utilizar grandes extensiones de matorrales o pastizales, para reproducirse (Cantú *et al.*, 1989). La Mixteca Oaxaqueña de acuerdo al último censo realizado por el INEGI, se considera como la región del estado de Oaxaca que posee el mayor número de cabezas de ganado caprino, representado el 55.78% (672,217.78 cabezas) de la población caprina a nivel estatal y un 12% a nivel nacional (INEGI, 2010). A nivel nacional, el estado de Oaxaca ocupa el segundo lugar en cuanto a población caprina se refiere, sólo superado por el estado de Puebla. En contraste, a pesar de que el estado de Oaxaca es uno de los más importantes en el país por la población caprina, en lo que respecta a la producción de carne en el 2010, se ubicó en el segundo lugar a nivel nacional con 8,683 toneladas, sólo después de Coahuila, el cual ocupó el primer lugar con 10,240 toneladas y, antes que Zacatecas, el cual se ubicó en el tercer lugar. (SAGARPA, 2010).

La Mixteca Oaxaqueña cuenta con una extensión de 18,759 km², misma que se divide en Mixteca alta y Mixteca baja. La Mixteca baja corresponde a la zona noroeste del estado de Oaxaca y el suroeste de Puebla, región en la cual, más de un 80% de las familias cuenta con rebaños caprinos de 30 a 200 animales, predominando el sistema de pastoreo extensivo; es decir, la alimentación se basa en el ramoneo, pastoreo en agostaderos (en cerros) y en la orilla de los caminos. La producción caprina en la región (Mixteca baja) se lleva a cabo con razas nativas derivadas de la blanca celtibérica, serrana, castellana y cimarrón; las cuales, por varios siglos, se han reproducido y a su vez, han transmitido por generaciones rasgos valiosos como son resistencia a enfermedades, longevidad y adaptación a ambientes de extrema aridez; condiciones en las que otras especies no son capaces de subsistir y en las que algunas más han desaparecido (Arbiza, 1986; Mayen, 1989). Sin embargo, la producción de carne de caprino se encuentra por debajo del 50% de su potencial, manteniendo anualmente el número de cabezas en. En el año 2010 la región contaba con un total de 672,217 cabezas, similar al 2002 con 622,351. En cuanto a la producción de carne, la región alcanzó las 8,683 toneladas en el 2010 contra las 8,631 obtenidas en el 2002 (SAGARPA, 2010). Situación, que a pesar de las características nobles que presenta esta especie,

como bajos costos de inversión inicial, poco espacio necesario para su explotación, altas tasas de desarrollo, alta fertilidad, alta eficiencia alimenticia, capacidad de utilización de alimentos fibrosos y con abundantes aleloquímicos, demanda de estiércol para abono, elevados niveles de producción de leche, alta demanda de carne (cabrito, birria y barbacoa), piel y pelo por el consumidor, ha sido la especie menos atendida por investigadores. Lo anterior trae como consecuencia poca disponibilidad de información técnica relacionada con la explotación eficiente de las cabras, insuficientes avances tecnológicos, parámetros productivos bajos, problemas sanitarios, alimentación inadecuada (arbustos, plantas silvestres, y en ocasiones gramíneas y herbáceas), escasez de forraje en temporada de estiaje, y problemas de intoxicación por plantas de esta zona. Lo anterior propicia que los productores, año con año, se enfrenten a una serie de problemas derivados del consumo de plantas tóxicas que tratan de solucionar por sus propios medios, muchos de ellos sin éxito, en el que finalmente sus rebaños representan una carga o un desembolso monetario fuerte en lugar de una actividad productiva rentable, orillándolos al abandono de la misma (Ramírez, 1994; Silva y Mora, 1989). En la región Mixteca se da el pastoreo trashumante, permitiendo a las cabras desarrollar su carácter oportunista, asegurándose un suministro continuo de alimento a través de las distintas estaciones, consumiendo flores, frutos, y hojas que pueden ser cosechadas directamente por los animales de las ramas accesibles a ellas. Así mismo, las cabras consumen la hojarasca de los árboles (hojas secas que caen al suelo), la cual equivale al heno natural disponible en cierto periodo de época de seca (Virguez y Chacón, 1997; Hernández-Hernández, 2006). Durante la temporada de sequía el 30% de la dieta de las cabras está constituida por plantas arbóreo-arbustivas, pertenecientes a la familia de las leguminosas y fabáceas (Franco, *et al* 2008); es un alimento que aporta alta proteína, pero a su vez representa una amenaza para las cabras por sus compuestos antinutricionales (metabolitos secundarios). La ingesta de estas plantas (árboles y arbustivas) trae como consecuencia intoxicaciones severas que afectan la vida de los animales (Ramana *et al.* 2000, Salem *et al.* 2006). Por ello, es importante hacer investigaciones relacionadas con la identificación de estas especies nocivas para las cabras, debido a que ejercen efectos detrimentales sobre la digestibilidad, el consumo de alimento, y por tanto, sobre el comportamiento animal (Tolera *et al.* 1997), problema que se presenta anualmente en la Mixteca baja de Oaxaca en temporadas largas de sequía. Tales condiciones climáticas, determinan a que estas plantas sean la única alternativa de alimento para los animales. Los caprinocultores de la región han observado que son dos

arbustivas las causantes de problemas severos de intoxicación, identificadas empíricamente como “cazahuate negro y cazahuate blanco”, siendo estas, la única alternativa de forrajes a finales de la temporada de sequía. Ante la ingesta de tal alimento, los animales presentan signos de intoxicación 20 días posteriores a su ingestión, en donde a pesar de una atención médica brindada, es difícil su recuperación, implicando grandes pérdidas en sus rebaños. El problema presente en la región Mixteca baja de Oaxaca motiva a realizar un estudio de las dos especies de cazahuate, desde su identificación taxonómica, presencia y actividad biológica de los compuestos antinutricionales (metabolitos secundarios), hasta conocer sus efectos *in vitro*, con el objetivo de buscar alternativas para inhibir la intoxicación del animal o para evitar su consumo. El presente estudio se enfoca a las dos especies de arbustivas de la Mixteca baja de Oaxaca (causantes de graves problemas de intoxicación en cabras en temporada de sequía), dividiendo la presente tesis en tres capítulos:

1. Identificación y estudio fitoquímico de dos especies arbustivas causantes de intoxicación en cabras de la Mixteca Oaxaqueña.
2. Bioensayo de toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina* utilizando cuatro extractos de dos especies de *Ipomoea*.
3. Evaluación *In vitro* del extracto metanólico de dos especies de *Ipomoea* con y sin polietilenglicol.

El objetivo del primer estudio, es la identificación botánica de las dos principales especies causantes de problemas de intoxicación en cabras en temporada de sequía, realizando, también un análisis de suelo, y un estudio bromatológico y fitoquímico preliminar, siendo este último, el que permite identificar los metabolitos secundarios presentes a partir de la obtención de cuatro extractos (acuoso, hexánico, diclorometano y metanólico).

El objetivo del segundo estudio es evaluar la toxicidad de cada uno de los extractos obtenidos de las dos especies de *Ipomoea spp*, mediante un bioensayo en nauplios de *Artemia salina*, logrando identificar el extracto más tóxico y con ello los metabolitos secundarios presentes.

El objetivo del tercer estudio, es determinar mediante la técnica de producción de gas *in vitro*, el grado de afección en el rumen por el extracto metanólico de las dos especies, evaluando cuatro concentraciones (0.0, 0.2, 0.4 y 0.8 g) con y sin PEG (agente que pudiera contrarrestar o neutralizar los efectos de taninos presentes en este extracto), sobre DIVMS, DIVMO, cinética de

producción de gas mL/ g en base a MS, MO, MSD, MOD de 6 a 96 h, concentración de bacterias ruminales totales (CBRT) y producción de AGV.

LITERATURA CITADA

- Franco, G.F., Sánchez, R. M., Hernández, J.E., Villarreal, O.A., Rodríguez, J.C., Camacho, J.C. y Rojas, V.H. 2008. Identificación botánica y tipo de hábitat de la vegetación arbórea y arbustiva consumida por cabras en pastoreo trashumante en la región Mixteca, México. SEOC, Sociedad Española de Ovinotecnia y caprinotecnia.
- Getachew, G., Blummel, M., Makkar, HPS., Becker, K. 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feed: a review. Anim. Feed Sci. Technol. 72:261-281.
- Hernández, J. 2006. Valoración de la caprinocultura en la Mixteca Poblana: Socioeconomía y recursos arbóreo-arbustivos. Tesis Doctoral. Universidad de Camagüey, Cuba.
- Lepiz, I, H., Sierra, V. A y Bucardo, A. I. 1992. Las matanzas de cabras en los estados de Puebla y Oaxaca. VIII Reunión nacional de caprinocultores, Oaxaca, México. 210-214.
- Makkar, HPS. 2003. Quantification of tannin in tree and shrubs foliage. A Laboratory Manual. Klumer Academic Publisher. Netherlands. p.102.
- Ramana, D.B., Sultan, S., Solanki, K.R., Negi, A.S. 2000 Nutritive evaluation of some nitrogen and non-nitrogen fixing multipurpose tree species. Anim. Feed Sci. Technol. 88(1-2): 103-111.
- Ramirez, L.R.G. 1994. Composición y calidad nutritiva del forraje seleccionando por cabras en pastoreo en los agostaderos del noreste de México. IX Reunión Nacional sobre Caprinocultura. Memorias. U.A.B.C.S., La paz, B.C.S; México. P 52-63.
- Salem, Z.M., Salem, M.Z.M., El Adawy, M.M., Robinson, P.H. 2006 Nutritive evaluations of some browse tree foliage during the dry season: secondary compounds, feed intake and *in vivo* digestibility in sheep and goat. Anim. Feed Sci. Technol. 127: 251-267.
- Silva, P.T. y P, M.M. Mora. 1989 Producción caprina tradicional de la Mixteca Oaxaqueña Reunión Nacional sobre caprinocultura. Memorias. FMVZ-UAZ. Zacatecas, México. P 32-35.
- Theodorus, 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.

Tolera, A., Khazaal, K., Orskov, E.R. 1997. Nutritive evaluation of some browses species. *Anim. Feed Sci. Technol.* 67:181-195.

Virgüez, G., y E. Chacon. 1997. Especies arbóreas-arbustivas de potencial forrajero en zonas áridas y semiáridas de Venezuela. III Seminario. Manejo y Utilización de Pastos y Forrajes. Universidad Nacional Experimental de los Llanos de Ezequiel Zamora. Barinas. pp. 99-111.

CAPÍTULO I

IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO FITOQUÍMICO DE DOS *Spp* ARBUSTIVAS CAUSANTES DE INTOXICACIÓN EN CABRAS EN LA MIXTECA OAXAQUEÑA

1.1 RESUMEN

El objetivo del estudio fue identificar y realizar un análisis bromatológico y fitoquímico a dos especies arbustivas que anualmente causan intoxicación a las cabras en temporada de sequía, provocando pérdidas económicas a los productores caprinos en sistemas extensivos de la región Mixteca baja de Oaxaca. Las especies fueron identificadas como *Ipomoea murucoides* (cazahuate blanco) e *Ipomoea pauciflora* subsp. *pauciflora* (cazahuate negro), pertenecientes ambas a la familia Convolvulaceae. El contenido de proteína cruda y extracto etéreo fue mayor en ($P < 0.002$) en *I. murucoides* que en *I. pauciflora*. De los cuatro extractos obtenidos de cada especie, el mejor rendimiento fue el del extracto metanólico, posteriormente el acuoso, hexánico y finalmente el diclorometano en ambas especies, deduciendo que las hojas de estas especies contienen un mayor contenido de compuestos polares o de polaridad intermedia (soluble en metanol y agua) que apolares o de baja polaridad. El estudio fitoquímico de los extractos mostró un alto contenido de taninos y flavonoides (+++), seguido de una presencia notable (++) de terpenoides y alcaloides libres y liberados. Las concentraciones altas de alcaloides y taninos son considerados metabolitos secundarios causantes de intoxicación.

Palabras clave: *I. murucoides*, *I. pauciflora*, metabolitos secundarios, taninos.

1.1 ABSTRACT

The aim of this study was to identify botanically and perform a nutritional analysis and phytochemical of two shrub species that annually cause toxicity in goats in the dry season, which causes economic losses to goat producers in extensive production systems in the Mixteca baja region of Oaxaca. The species were identified as *Ipomoea murucoides* (white cazahuate) and *Ipomoea pauciflora* subsp. *pauciflora* (black cazahuate), both belonging to the family Convolvulaceae. *I. murucoides* had higher ($P < 0.002$) crude protein and crude fat content than *I. pauciflora*. Four extracts were obtained from each species, the most abundant was a methanolic extract followed by the aqueous, the hexane and finally the dichloromethane fraction in both species. It was deduced that the leaves of these species contain a higher content of polar compounds or intermediate polarity compounds (soluble in methanol and water) instead of nonpolar or low polarity. The phytochemical study of the extracts showed a high content of tannins and flavonoids (+ + +), followed by a notable presence (+ +) of terpenoids and free and liberated alkaloids. High concentrations of alkaloids and tannins are considered secondary metabolites that cause poisoning in goats.

Keywords: *I. murucoides*, *I. pauciflora*, secondary metabolites, tannins.

1.2 INTRODUCCIÓN

La región Mixteca se ubica al sur de la República Mexicana cubriendo parte de los estados de Puebla, Guerrero y Oaxaca con una superficie total de 37, 869 km². Una de las principales actividades económicas en esta zona es la cría de ganado caprino bajo el sistema de libre pastoreo trashumante (Franco, 1999; Arias *et al.*, 2004). Frecuentemente la alimentación de las cabras depende de la producción de biomasa de plantas leñosas bien adaptadas a las condiciones edafoclimáticas del lugar con clima semidesértico. En la época de lluvia la vegetación (árboles y arbustos) produce una amplia gama de forrajes que son consumidos por el ganado caprino de la región, como son el huamúchil, mezquite, palo blanco, palo de Brasil, palo palomo, huizache, ahuehuetes, cedro, encino, cubatas, tehuixtle, tlahuixtle, chupandia, laurel, chiltepín y tlaxistles negro y blanco (Hernández, 2006). Sin embargo, la mayor limitante de estos sistemas extensivos es la baja disponibilidad de forrajes en la época de sequía, debido a que la vegetación disminuye drásticamente su crecimiento y en consecuencia los rebaños caprinos enfrenta problemas de falta de alimento e intoxicaciones, debido a la ingestión de rebrotes de plantas tóxicas como el cazahuate (Arroyo, 2007). La intoxicación en los caprinos es ocasionada por sustancias conocidas como factores antinutricionales (FAN) o metabolitos secundarios que interfieren con el aprovechamiento de otros nutrientes como proteínas, carbohidratos, minerales, entre otros (Mello, 1995), siendo sustancias naturales no fibrosas generadas por el metabolismo secundario de las plantas que utilizan como medio de defensa contra herbívoros (Kumar, 1992). Particularmente en la Mixteca baja de Oaxaca durante la época de sequía, los productores se enfrentan con el problema de escasés de forraje y sólo los rebrotes de dos arbustos conocidos como cazahuate blanco y negro, son la única alternativa de alimento en este sistema de producción extensivo. Las cabras se ven forzadas a consumir este forraje por necesidad y aproximadamente dentro de los 20 días de consumo continuo, se presentan signos de intoxicación severa, existiendo incoordinación, dificultad en la incorporación, temblores musculares, movimientos opistótonos, abortos, entre otros. Los productores de diferentes zonas de la Mixteca baja difieren en cuanto a la toxicidad de la planta, mencionando que el cazahuate negro es más tóxico y otros en contradicción afirman que es el blanco. Sin embargo, Dalo y Moussatché (1978) destacan que la toxicidad de los vegetales depende de muchas variables relacionadas con la planta, tales como especie vegetal, estado vegetativo, época del año, condiciones climáticas y edáficas. Por otro lado, el grado de afección en los rebaños depende de la edad, sexo, ciclo

reproductivo, estado sanitario, grado de nutrición y frecuencia de consumo. El desconocimiento sobre las distintas plantas tóxicas que se encuentran en esta zona, provoca que muchos casos de intoxicación queden sin diagnosticar o sean confundidos con otras enfermedades. La identificación regional del lugar, un estudio fitoquímico y la identificación taxonómica de las plantas tóxicas, mejorará el diagnóstico y permitirá el diseño y aplicación de medidas preventivas. Es por ello que el objetivo del presente estudio fue caracterizar la región de estudio a través de un análisis de suelo, colecta e identificación botánica de las plantas consumidas por las cabras, análisis bromatológicos y determinación de los metabolitos secundarios presentes en las dos especies de cazahuate.

1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción de la región

La región Mixteca abarca los estados de Puebla, Guerrero y gran parte del estado de Oaxaca. Esta región es considerada como zona de alta marginación y la mayor parte de sus habitantes son indígenas, con carencias de la alimentación, educación (analfabetismo), vivienda, atención médica, entre otros. Dentro de las principales actividades económicas se encuentra la producción de artesanías principalmente el tejido de la palma, producción de cultivos básicos en temporal y la caprinocultura.

La Mixteca de Oaxaca se divide en Mixteca alta y Mixteca baja, con una división política en 7 distritos: Nochixtlan, Teposcolula, Coixtlahuaca, Tlaxiaco, Huajuapán de León, Silacayoapan, y Juchitán. En la Mixteca baja el grupo predominante es el Mixteco y con menor proporción los triques, nahuas y chochos. El distrito de Huajuapán está conformado por 28 municipios, registrando una población total de 118,534 habitantes, de los cuales el 18 % es considerado como población analfabeta. En cuanto al grado de marginación, se encuentran localizados veinte municipios con un alto grado de marginación entre ellos San Miguel Amatitlán, municipio de la comunidad en estudio, San Jorge el Zapote, ubicado a 17° 54' 49" de latitud norte y 97° 59' 47" de longitud oeste, a una altura de 1460 msnm. El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano. La precipitación promedio anual de esta zona es de 450 a 600 mm, y la temperatura media anual es de 21°C con medias máximas y mínimas anuales de 26 y 16°C. Limita al norte con el Estado de Puebla; al sur con Huajuapán de León, al oriente con Santiago Ayuquillilla; y al poniente con Fresnillo de Trujano y Mariscalá. Su distancia aproximada a la capital del estado (Oaxaca) es de 241 kilómetros (DIGEPO, 2010) (Fig. 1.1).

La superficie total del municipio es de 198.48 km² y en relación al estado abarca el 0.20 %. La vegetación de este municipio es muy variada, predominando la xerofítica semiárida donde hay cactáceas como pitayos, órganos, nopales, magueyes, viznagas, lechuguillas, sábila y cardos, así como cazahuates, mezquites, el colorín, huaje, nanche rojo, sangre de drado, huamúchil, y en las partes más montañosas que se ubican al sur, se encuentran ocotes, sabinos, encinos y nanches amarillos. Por la vegetación, el tipo de suelo y por ser el municipio parte de una región fisiográficamente diversa cuenta con cerros y arroyos secos.

La fauna silvestre es muy escasa debido a la enorme deforestación y a la cacería, pero de los animales que aún se pueden encontrar están los conejos, mapaches, zorros, armadillos, tlacuaches, tejones, venados. Aves como el gavilán, codornices, zopilote, palomas, colibrí, calandrias, chachalacas y correcaminos. Entre los reptiles están las lagartijas, la iguana, serpientes y coralillo.

Dentro de las principales actividades económicas se encuentra la agricultura (maíz, frijol y calabaza), ganadería (caprinocultura) y comercio (tejido de palma y cocida de balón).

El suelo dominante es el regosol (81.79 %), leptosol (12.33 %) y phaeozem (5.88 %). En cuanto al uso potencial de la tierra, se contempla un 3.43 %, para agricultura manual estacional y un 96.57 % no es apta para la agricultura. En el aspecto pecuario, se contempla que un 96.57 % de la vegetación natural es aprovechada únicamente por el ganado caprino (INEGI, 2005).



Fig. 1.1 Ubicación de la comunidad en estudio

Análisis de suelo

En el mes de mayo de 2011, se llevó a cabo la toma de diferentes muestras de suelo (1000 g) con ayuda de una pala y un barreno en la comunidad de San Jorge el zapote, Municipio de San Miguel Amatitlan. La toma de muestra se realizó en el mismo lugar donde se hizo la colecta de las hojas de las especies en estudio. Las muestras de suelos se tomaron a 15 cm de profundidad, éstas fueron depositadas en bolsas de plástico (impermeables por dentro) previamente

identificadas, conservándolas en un lugar fresco para su posterior análisis químico en el Laboratorio de Fertilidad y Química Ambiental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. A las muestras obtenidas de cada especie se les determino el pH (Black, 1968; Chernoe, 1964); conductividad eléctrica (C.E.) (Richard, 1990; Jackson 1982); materia orgánica (M.O.) (Klra y Mainaro, 1991); fosforo (P) (Olsen, 1954, 1965; Hesse, 1971; John, 1970); calcio (Ca), magnesio (Mg), sodio (Na) (Champman, 1965; Schollenberger, 1945); potasio (K), calcio (C), fierro (Fe), cobre (Cu), manganeso (Mn), zinc (Zn) (Lindsay, 1978); nitrógeno (Bremer, 1965) y textura por el método de Boyoucos (Gee, 1986 y Grade, 1982).

Colecta de ejemplares botánicos

En el mes de septiembre de 2011 se realizaron colectas de ejemplares botánicos (por triplicado) de los cuales se obtuvieron diferentes partes vegetativas (raíz, tallo y hojas) así como reproductoras (flor y fruto) de las dos especies de cacahuete para su posterior identificación botánica. La colecta se realizó en la comunidad de San Jorge el zapote, Municipio de San Miguel Amatitlan, durante la colecta se tomaron diferentes ejemplares, depositándolos en bolsas de papel de manera íntegra, evitando con ello su exposición al calor, mismas que fueron prensadas (3 h después de la colecta) para ser trasladadas y secadas en el laboratorio.

Antes de realizar el prensado, el material vegetal fresco se colocó en medio de un papel periódico, tratando de que sus órganos reproductivos quedaran visibles, permitiendo que el haz de las hojas quedara hacia arriba y algunas con el envés visible. En seguida se realizó el prensado con una prensa botánica portátil de madera (60 x 40 cm) y finalmente se trasladó al herbario-hortorio del Programa de Botánica del Colegio de Postgraduados (CHAPA) para su identificación taxonómica.

Se tomó nota de la información obtenida al momento de la colecta, y con apoyo de un GPS (Global Position System) se registró la ubicación exacta del lugar. Los habitantes proporcionaron los nombres de los cerros y laderas en donde se llevó a cabo la colecta, información necesaria para el etiquetado de las plantas. En el laboratorio se secó totalmente el material botánico colectado, permitiendo su conservación a largo plazo como elemento de consulta. El secado de los ejemplares botánicos se hizo mediante una deshidratación y un aplanado, con el fin de preservar las estructuras de las plantas para su posterior identificación, haciendo uso de una prensa botánica portátil hecha de madera (60 x 40cm), papel secante, cartón acanalado, lazos y una secadora prefabricada de madera (1.30 x 70 x 80 de alto). Las muestras prensadas se

colocaron entre dos hojas de papel secante (60 x 40 cm) previamente etiquetadas, poniendo en cada dos muestras un cartón acanalado, apilándose de la misma manera los demás ejemplares. Enseguida, se procedió a sujetar la prensa, manteniéndola en el secador prefabricado por cinco días, tiempo suficiente para la deshidratación. El secado, identificación, montaje y etiquetado de los ejemplares botánicos fue realizado en el mismo herbario-hortorio del Programa de Botánica del Colegio de Postgraduados (CHAPA), donde fueron depositados, y los duplicados distribuidos en otros herbarios nacionales.

Colecta de material vegetativo (hojas)

En el mes de mayo de 2011 (temporada de sequía), se colectaron ramas tiernas de las dos especies de cacahuete (negro y blanco), las cuales fueron secadas bajo sombra a temperatura ambiente por un periodo de 20 días. Posteriormente, se separaron las hojas de las ramas y éstas se molieron en un molino Willey (criba de 1mm), almacenándose en recipientes de vidrio para análisis posteriores.

Análisis bromatológico

En el laboratorio de Nutrición Animal del Colegio de Postgraduados campus Montecillo, se determinó, el contenido de materia seca (MS), cenizas (AOAC 2000), extracto etéreo (Nielsen, 2010), lignina (Goering, 1972; Van Soest, 1963); fibra detergente neutro (FDN) y ácida (FDA) de acuerdo a los procedimientos de Goering (1972) y Van Soest *et.al.*, (1991); el contenido de proteína cruda (PC) fue determinado con base en el contenido total de nitrógeno por el método de Kjeldahl (AOAC, 1975).

Descripción de la técnica para la obtención de los extractos

Las muestras seleccionadas e identificadas fueron molidas en un molino Willey con criba de 1mm. Posteriormente en el laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Postgraduados, se obtuvieron cuatro extractos de las dos especies vegetales mediante el equipo Soxhlet y Agitación-Liofilización, técnicas que consisten en usar agua o un disolvente (líquido capaz de disolver otra sustancia) para liberar y solubilizar los metabolitos secundarios. Para la extracción de éstos, se utilizaron cuatro disolventes (hexano, diclorometano, metanol y agua). Las tres primeras extracciones se realizaron con el equipo Soxhlet, el cual permite hacer una extracción de sólido a líquido, y la última extracción se realizó mediante agitación y liofilización.

El disolvente se añadió a la cámara de extracción del equipo Soxhlet en cantidades suficientes para el funcionamiento del sifón, hasta cubrir las dos terceras partes de la cámara de extracción.

Se pasó agua por el refrigerante y se inició el calentamiento del matraz bola hasta la ebullición del disolvente. Los vapores fueron condensados en el refrigerante para caer sobre el material biológico. La extracción de una gota por segundo fue idóneo para la extracción, hasta que la extracción fue agotada, es decir, el líquido (disolvente) queda incoloro cuando pasa por la cámara de extracción. (Roberts, 1974; Harborne, 1991; e Ikan, 1991).

Preparación de las muestras

Se pesaron 10 g de cada muestra y se depositaron en cartuchos diferentes (recipiente cilíndrico) de papel filtro, mismos que fueron colocados en la cámara de extracción del equipo soxhlet (uno por uno). En seguida, se adicionó el disolvente necesario para evitar que el matraz se quedara seco antes de la extracción. El primer disolvente usado fue el hexano (Fermont®), con un punto de ebullición de 60°C, manteniéndolo a esta temperatura durante 12 h, hasta quedar claro el disolvente, indicando con ello que todas las sustancias de la polaridad del disolvente se extrajeron. Posteriormente se evaporó el disolvente con la ayuda de un rotavapor (Buchi, Mod R114). Finalmente, se depositó el extracto sólido en un frasco previamente pesado, y de esta manera se conoció la concentración obtenida en 10 g de muestra. El mismo procedimiento se realizó con los cartuchos utilizados en la extracción anterior, cambiándole únicamente el disolvente (diclorometano R.A., Merck®), con un punto de ebullición de 40°C por 13 h, tiempo necesario para la extracción. El tercer disolvente utilizado con el equipo fue el metanol R.A (Baker®), con un punto de ebullición de 65 °C por 33h, tiempo necesario para extraer las sustancias de esa polaridad.

El extracto acuoso del material vegetal se preparó con la metodología propuesta por Ersus y Yurdagel (2006). Se depositó en un matraz Erlenmeyer 10 g de muestra previamente molida de cada especie, agregándole agua suficiente para cubrirla, se trató con ultrasonido (Baño de Ultrasonido, marca Brandsonic, Mod 220) por 10 min en dos periodos; enseguida, se tapó y se sometió a un proceso de agitación magnética (a temperatura ambiente) durante 6 h y se filtró. El extracto obtenido se liofilizó durante 48 h con el objetivo de eliminar el disolvente (mediante el proceso de sublimación /congelación), en donde la muestra se congeló y se introdujo a una cámara de alto vacío, con el objeto de favorecer que el agua pasara del estado sólido a vapor, permitiendo la concentración del extracto liofilizado.

Estudio fitoquímico

La presencia de metabolitos secundarios en los tejidos vegetales se realizó analizando los extractos mediante agentes cromógenos (sustancias que reaccionan formando precipitados, espuma, cambios de color entre otros) (Raffauf, 1994; Cannon, 2002) y cromatografía en capa fina (CCF), la cual permite analizar moléculas pequeñas y de esta manera conocer el número de compuestos presentes en la muestra (Stahl, 1969; Domínguez, 1988).

Mediante la realización de estas pruebas específicas, se determinó de manera cualitativa la posible presencia o ausencia de diversos metabolitos secundarios (terpenoides, flavonoides, alcaloides, saponinas y taninos), en los cuatro extractos obtenidos de cada especie vegetal (cazahuate negro y blanco), determinándose a partir del nivel de coloración obtenida en la placa de CCF al ser aplicado el revelador específico para cada grupo de metabolitos, siguiendo la metodología descritas por Domínguez (1988), Stahl (1969) y Soto (1998).

Análisis estadístico

Las diferencias de las medias en los análisis bromatológicos entre las dos especies se compararon con la prueba de T-Student (SAS, 2002).

1.4 RESULTADOS

Identificación botánica

Los diferentes estudios realizados a los ejemplares botánicos, mostraron que el Cazahuate negro (nombre común) pertenece al género *Ipomoea*, especie y subespecie *pauciflora* (Martens. and Galeotti, 1845) y el Cazahuate blanco (nombre común) pertenece al mismo género *Ipomoea*, pero diferente especie, *murucoides* (Roemer and Schuites, 1819). Ambas especies pertenecen a la familia Convolvulaceae (Tabla 1.1, Fig. 1.2-1.5).

Análisis del suelo

Los resultados obtenidos en los diferentes parámetros (pH, CE, M.O, N, P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Cu, Mn, Zn) y la textura (arena, limo, arcilla) evaluados del suelo, mostraron ser similares en los suelos donde crecen ambas especies de *Ipomoea* (Tabla 1.3).

Análisis bromatológico

El contenido de MS en las muestras vegetativas se usó como valor de ajuste para los demás componentes de la composición química. Las hojas de las plantas evaluadas en este estudio mostraron diferencia ($P < 0.002$) en la mayoría de fracciones en su composición química (proteína cruda, extracto etéreo, fibra detergente acida (FDA), fibra detergente neutro (FDN) y celulosa), excepto en lignina (Tabla 1.2).

Obtención y rendimiento de los extractos a partir del material vegetal

A partir del proceso de obtención de los cuatro extractos (hexánico, diclorometano, metanol y acuoso), se obtuvieron diferentes rendimientos (Tabla 1.4). El extracto con mayor rendimiento fue el metanólico, posteriormente el acuoso, hexánico y finalmente el diclorometano en ambas especies. Los rendimientos fueron obtenidos a partir del material seco, y se obtuvieron por diferencia de peso con el extracto.

Estudio fitoquímico

Para la valoración de las pruebas realizadas, se utilizó el sistema cualitativo de cruces para especificar la presencia o ausencia de los grupos de metabolitos, mediante los siguientes criterios: Presencia cuantiosa o alta (+++), presencia notable (++) , presencia leve (+) y ausencia (-) (Galindo *et al.* 1989; García, 2003).

Las pruebas preliminares realizadas a los extractos crudos de las dos especies de *Ipomoea*, evidenciaron una presencia alta de flavonoides y taninos. Respecto a terpenoides, alcaloides libres y liberados, se observó una presencia notable; sin embargo, en ninguna de las dos especies hubo presencia de saponinas (Tabla 1.5- Fig. 1.6).

Tabla 1.1. Identificación de las dos especies de *Ipomoea* (cazahuate negro y blanco)

Nombre común	Cazahuate negro	Cazahuate blanco
Familia	Convolvulaceae	Convolvulaceae
Género	<i>Ipomoea</i>	<i>Ipomoea</i>
Especie	<i>Pauciflora</i>	<i>Murucoides</i>
Subespecie	<i>Pauciflora</i>	-

Tabla 1.2. Análisis bromatológico de *I. muruoides* e *I. pauciflora* subsp. *pauciflora*

Análisis (%)	<i>I. pauciflora.</i>	<i>I. muruoides</i>	EEM
Materia seca	92.15 b	92.35 a	0.05
Proteína	18.19 b	18.67 a	0.11
Extracto etéreo	8.68 b	15.81 a	1.62
Fibra Detergente Neutro	35.45 b	46.25 a	2.4
Fibra Detergente Acido	24.76 b	32.61 a	1.75
Cenizas	9.22 b	11.87 a	0.59
Lignina	7.99 a	8.85 a	0.29

ab Medias en la misma fila seguidas por diferentes letras son estadísticamente diferentes (P<0.002).
EEM= error estándar de la media

Tabla 1.3. Análisis químico del suelo donde crece *I. muruoides* e *I. pauciflora* subsp. *pauciflora*

Análisis (%)	Unidades	<i>I. pauciflora</i>	<i>I. muruoides</i>
pH		7.0	7.3
CE	mmhos/cm	1.0	0.4
M.O.	%	3.0	4.8
N	%	0.15	0.44
P	ppm	1.0	1.6
K	meq/100g	2.1	2.2
Ca	meq/100g	11.4	11.2
Mg	meq/100g	4.2	4.9
Na	meq/100g	0.5	0.4
Fe	mg/kg	12	11
Cu	mg/kg	2	1
Mn	mg/kg	27	15
Zn	mg/kg	1	1
Arena	%	66	58
Limo	%	17	31
Arcilla	%	16	10
Clasificación textural		Franco arcillo arenoso	Franco arenoso

Tabla 1.4. Porcentaje de rendimiento obtenido de los cuatro extractos de las dos especies de *Ipomoea* en 10 g de muestra seca

Especie vegetal	Rendimiento extracto (%)			
	Metanol	Acuoso	Hexánico	Diclorometano
<i>Ipomoea pauciflora</i>	20.2	10.2	7.9	1.8
<i>Ipomoea murucoides</i>	12.9	5.9	5.5	1.8

Tabla 1.5. Análisis fitoquímico de los extractos obtenidos de las dos especies de *Ipomoea*

Extracto	Terpenoides		Flavonoides		A.Libres		A.Lib.		Saponinas		Taninos	
	<i>I.p</i>	<i>I.m</i>	<i>I.p</i>	<i>I.m</i>	<i>I.p</i>	<i>I.m</i>	<i>I.p</i>	<i>I.m</i>	<i>I.p</i>	<i>I.m</i>	<i>I.p</i>	<i>I.m</i>
E.H	++	++							-	-		
E.D	++	++			++	++	++	++	-	-		
E.M			+++	+++					-	-	+++	+++
E.A									-	-	-	+

E.H: Extracto hexánico; E.D: Extracto diclorometano; E.M: Extracto metanólico; E.A: Extracto con agua; *I.p*: *Ipomoea pauciflora*; *I.m*: *Ipomoea murucoides*; +++: Presencia cuantiosa o alto contenido; ++: Presencia notable; +: Presencia leve; -: ausencia; A. Lib: Alcaloides liberados; A. Libres: Alcaloides libres.



Fig. 1.2 Flor de *Ipomoea pauciflora*.



Fig. 1.3. Ejemplar botánico *Ipomoea pauciflora*

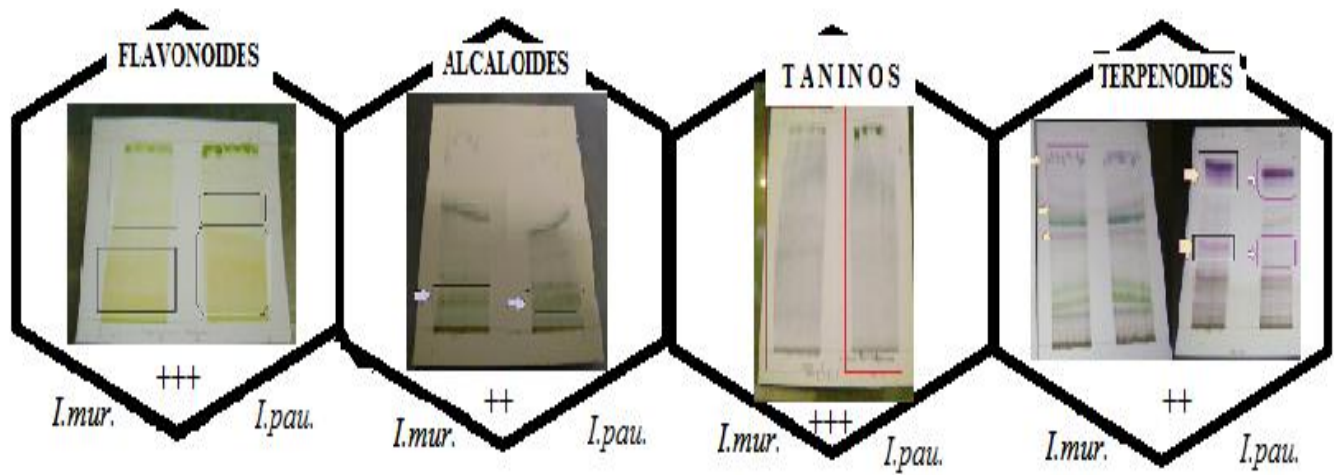


Fig. 1.4 Flor de *Ipomoea murucoides*



Fig. 1.5. Ejemplar botánico *Ipomoea murucoides*

Fig. 1.6 Identificación de metabolitos secundarios de las dos especies de *Ipomoea*.
I.mur.: *Ipomoea murucoides*; *I.pau.*: *Ipomoea pauciflora*.



1.5 DISCUSIÓN

Las características fisicoquímicas del suelo donde crecían las dos especies estudiadas *I. murucoides* (Roemer and Schuities, 1819) e *I. pauciflora* subsp. *pauciflora* (Martens. and Galeotti, 1845) no variaron. Sin embargo es importante mencionar las exigencias edafoclimáticas de diferentes especies de la mismo género, tal es el caso de *Ipomoea fistulosa* (Mart.ex Choisy) la cual requiere de zonas parcialmente inundables o húmedas (Hueza, et al, 2003), sin embargo *Ipomoea carnea*, *I. conzzati* (Greenman), *I. elongata* (Choysi), *I.orisabensis* (Ledonois ex Standley) e *I. purpurea* (L.Roth) requieren para su crecimiento lugares secos con condiciones similares a las especies de este estudio (*I.pauciflora* e *I. murucoides*).

Las plantas evaluadas en este estudio fueron seleccionadas con base en varios criterios: 1) Por su existencia única (rebrotos) en el periodo crítico (reposo vegetativo del pastizal natural) en base a la disponibilidad y calidad de forraje, 2) por su distribución en la región de estudio (Solano 1997), 3) por la preferencia de las cabras (Franco et al, 2008) y 4) por los problemas de intoxicación de las cabras después del consumo de las mismas (McDonald, 1992).

Las dos especies de plantas causantes de intoxicación en cabras en la Mixteca baja Oaxaqueña, conocidas comúnmente en la zona como cazahuate blanco y cazahuate negro, fueron identificadas como *I. murucoides* (Roemer and Schuities, 1819) e *I. pauciflora* subsp. *pauciflora* (Martens. and Galeotti, 1845) respectivamente, pertenecientes a la familia convolvuláceae.

Solano (1997) al realizar un estudio florístico en la Mixteca baja Oaxaqueña, identificó la existencia de 6 especies de *Ipomoea*, mencionando entre ellas a *I. murucoides* e *I. pauciflora*. *Ipomoea* es el género que mejor representa a la familia convolvulaceae, con cerca de 500 especies, de las cuales 150 se encuentran en México (Fernández, 1987). Dentro de este género se encuentran especies de hábito arbóreo-arbustivo o de enredaderas leñosas que se han diversificado (McDonald, 1992).

Ipomoea murucoides es una planta originaria de México, crece en climas que van desde semicálido a templado en alturas de los 600 a los 2400 msnm, asociada a bosque tropical caducifolio y a matorral xerófilo, siendo común encontrarla en matorrales secos y espinosos (Pherson, 1981). *I. murucoides* también se le conoce como casahuate (con “s”) en el Estado de México, Oaxaca, Morelos y Querétaro; como cazahuate (con “z”) en Guerrero, y quince formas más de nombrarlo en las distintas lenguas o dialectos mexicanos (Argueta, 1994). Es un especie arbóreo-arbustiva de 3 a 10 m de altura, de madera blanda con presencia de látex, con tallos

floríferos longitudinalmente surcados, densamente lanuginosos de 5 a 8 mm de diámetro, las hojas son alargadas. Presenta grupos de flores blancas que son muy vistosas, los frutos son lisos y en forma de huevo (cuando se encuentran secos tienden abrirse), las semillas están cubiertas con pelos blancos y suaves (Rzedowski, 1985).

Ipomoea pauciflora es una planta que aún se desconoce su origen, sin embargo habita en climas cálido y semicálido entre 400 a 2000 msnm, asociada a la vegetación muy perturbada, derivada de bosque tropical caducifolio y matorral xerófilo. *I. pauciflora* es una planta arbóreo-arbustiva que llega a medir de 3 a 8 m de altura, con flores de color blanco y sus semillas están cubiertas por suaves pelos blancos (Soto, 1987).

En el análisis bromatológico de las dos especies de *Ipomoea*, los valores de proteína cruda fueron altos, con diferencias significativas ($P < 0.002$) entre las dos especies. Estos valores son muy similares a otras especies existentes en temporada de lluvia en la Mixteca, tal es el caso del huamúchil con un contenido de proteína cruda del 18.3 % (Hernández et al. 2002).

Devendrá (1995) y Hernández (2006) mencionan que el valor nutricional de las plantas depende del estado fenológico, la época del año, topografía, clima, madurez vegetal, fertilización; así como la posición de las hojas en las ramas.

En este estudio se resalta que las hojas consumidas por las cabras fueron de los rebrotes de las especies arbóreo-arbustivas presentes como única alternativa en temporada de sequía.

Los contenidos de FDN, FDA y cenizas en *Ipomoea murucoides* reflejaron mayor madurez de la planta en comparación con *I. pauciflora* en la misma región y tiempo de colección. Estos resultados, en consecuencia, sugieren una menor digestibilidad y disponibilidad de energía en el forraje (Galyen y Goetsch, 1993). De igual manera, la lignificación de la pared celular de las plantas ha sido correlacionada con una reducción en la degradabilidad de la materia seca (Ramírez et al, 1998). En referencia al extracto etéreo, el valor más alto lo presentó *Ipomoea murucoides*. En general, estas plantas a pesar de crecer en una temporada crítica y difícil (sequía) presentaron un contenido nutricional aceptable a diferencia de otras especies vegetales reportadas en la literatura (Tobin y Muller, 1998; Paredes-López et al., 2006).

Garduño (2009) y Pedradaza (2000) mencionan que las leguminosas forrajeras son ricas en proteína y minerales, y en especial las especies arbóreas, las cuales poseen altos contenidos de proteína bruta, llegando incluso a triplicar el contenido de los pastos tropicales y concentrados energéticos utilizados en la alimentación de los rumiantes.

Sin embargo, la presencia de metabolitos secundarios en las plantas con actividad antinutricional, influye en el valor nutritivo del follaje. Popí y Norton (1995) los consideran como la mayor limitante para incrementar el uso de las leguminosas tropicales en la nutrición animal.

Los rendimientos de los extractos (acuoso, hexánico, diclorometano y metanólico) obtenidos de las dos especies de *Ipomoea*, mostraron mayor porcentaje en el extracto metanólico (20.2 y 12.9 %), acuoso (10.2 y 5.9 %), seguido del hexánico (7.9 y 5.5 %) y diclorometano (1.8 %), siendo *I.murucoides* la que presentó mayor rendimiento a excepción del extracto con diclorometano, el cual fue similar en ambas especies. A partir de los resultados obtenidos, se demuestra que las hojas de estas especies contienen más compuestos polares (soluble en metanol y agua) que de baja polaridad (hexano y diclorometano). Un estudio similar realizado en Venezuela con *I. quamoclit* (*Convolvulaceae*), realizando extracciones con hexano y metanol de hojas, flor y tallo; obtuvieron mayor rendimiento del extracto metanólico (Shailili, et al, 2007), similar a lo obtenido en el presente estudio con las dos especies de *Ipomoea*.

Respecto al estudio fitoquímico realizado a los cuatro extractos, procedentes de la parte foliar de las dos especies de *Ipomoea*, se encontró una presencia alta (+++) de flavonoides y taninos (extracto metanólico), una presencia notable (++) de alcaloides libre y liberados (extracto con diclorometano) y la presencia notables (++) de terpenoides (extracto hexánico y diclorometano).

En *I. murucoides* hubo presencia leve (+) de taninos y en *I. pauciflora* (-) hubo ausencia (extracto acuoso). En ninguno de los extractos de las dos especies se encontró la presencia de saponinas (Tabla 1.5).

La presencia cualitativa de estos metabolitos secundarios fue muy similar en las dos especies, observándose muy poca diferencia en la cromatografía de capa fina (CCF) realizada. Estas pequeñas variaciones se atribuyen tanto al estado de desarrollo como al estado fisiológico de la planta, los cuales cumplen un papel importante como mecanismos de señalización y defensa ante las agresiones ambientales (estrés abiótico, cantidad de luz, agua, cambios extremos de temperatura, heridas, y las agresiones provenientes de los organismos patógenos o de herbívoros).

Los resultados para alcaloides, coincide con lo reportado por Jenett - Siems et al. (2004) sobre la presencia de este tipo de compuestos en ocho especies de *Ipomoea*, todas provenientes de Alemania. Sin embargo, estos estudios no han demostrado aún la presencia de flavonoides y taninos. Por otro lado, un estudio realizado en Argentina y otro en Mozambique sobre el género

Ipomoea, especie *carnea*, señalan que es una planta toxica, provocando pérdidas económicas en la producción animal, cuando es consumida por las cabras en épocas de escasez de forrajes naturales, debido a que es una de las pocas especies que permanecen verdes todo el año, identificando la presencia de alcaloides “swainsonina y calisteginas” en esta planta. (Riet 2000; Katalin et al, 1999).

Los signos clínicos presentados por el consumo de esta especie (*Ipomoea carnea*), se caracterizán por movimientos oscilatorios laterales de la cabeza, nigmatismos oculares, ataxia, temores, balanceo, caída del tren posterior, dificultad para levantarse, y paresia (Armién et al., 2007; Haraguchi et al., 2003; Stegelmeier et al., 1995; Rios, et al., 2005). Otros signos observados al consumir *Ipomoea carnea* son la pérdida de peso, disminución de la frecuencia de ruidos ruminales, anemia, retardo en el tiempo de llenado capilar y anormalidades del pliegue cutáneo (Daló y Moussatché, 1998). Algunos animales muestran gran apetencia hacia el consumo de esta especie, lo cual posiblemente conduzca a una adicción (Barbosa et al, 2006; Ralph 1990).

Ipomoea fistulosa es otra especie perteneciente a la familia Convolvuláceae en Argentina, en la que en condiciones naturales con oferta suficiente de alimento, los animales no ingieren esta planta. El consumo de ésta *Ipomoea* ocurre en determinadas épocas del año, principalmente por la falta de forraje suficiente, siendo más afectados los animales jóvenes. La toxicidad de esta especie es atribuida a la presencia de alcaloides inhibidores de glucosidasas (swansonina y calisteginas) (Méndez, 2000; Molineux, 1995). Similar signología presentaron las cabras de la región Mixteca baja de Oaxaca al consumir las especies *I. murucoides* e *I. pauciflora*, de la cual no existe información científica.

1.6 CONCLUSIONES

Las dos especies conocidas como cazahuate blanco y negro, causantes de intoxicación en cabras en el periodo de sequía (invierno-primavera) en la región Mixteca baja de Oaxaca, fueron especies identificadas como *murucoides* y *pauciflora* (subsp. *pauciflora*), pertenecientes al género *Ipomoea* de la familia Convolvulácea. Los análisis químicos bromatológicos realizados en las dos especies, mostraron tener un porcentaje de proteína sobresaliente y muy alto extracto etéreo (15.81 y 8.68 %) aceptable, así como un bajo contenido de pared celular.

Se encontró la presencia en ambas especies de metabolitos secundarios, presentando un alto contenido de (+++) taninos y flavonoides, la presencia notable (++) de terpenoides, alcaloides libres y liberados; asumiendo que la intoxicación se debe a la presencia de los taninos y alcaloides encontrados en estas especies arbóreo-arbustivas.

1.7 LITERATURA CITADA

- A.O.A.C. 2000. Official Methods of Analysis of the AOAC International, 17th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD. USA. 1:500.
- A.O.A.C. 1975. Official Methods of Analysis of the Association of official Agricultural Chemists. 12th Edition. Published by the Association of official Agricultural Chemists. Washington, D.C.
- Armién, A.G., Tokarnia, C.H., Vargas, P.P., Frese, K. 2007. Spontaneous and experimental glycoprotein storage disease of goat induced by *Ipomoea carnea* subsp *fistulosa* (convolvulaceae). Vet. Pathol 44:170-184.
- Arroyo, H. S., 2007. Clasificación del potencial forrajero arbóreo arbustivo de importancia para la caprinocultura en el municipio de Piaxtla, en la Mixteca Poblana. Tesis de Licenciatura. FMVZ-BUAP. Tecamachalco, Puebla.
- Barbosa, R.C., Riet, C.F., Medeiros, R.M., Lima, E.F., Barros, S.S., Gimeno, E.J., Molyneux, R.J., Gardner, D.R. 2006. Intoxication by *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelii* in goat in the state of Paraíba, Brazil. Tóxico 47:371-379.
- Black, C.A. 1968. Soil-Plant relationship John Wiley and Sons New York. USA. pp 237-355.
- Bremer J.M. 1965. Total nitrogen. In C.A. Black (ed) Methods of soil analysis part. 2. Agronomy. American Society of Agronomy Madison Wisconsin. pp.1149-1178.
- Cannon, J. D., Wood, S.G., Owen, N.L., Gramova, A., Lutsky, V. 2002. Investigation of secondary metabolites in plants. J, Chem. Ed. 78:1234-1237.
- Chapman, N. H. 1965. Cation exchange capacity. In: C.A Black (ed) Methods of analysis. Part 2. American Society of Agronomy Madison. Wisconsin. (agronomy). P. 891-901.
- Chernou, U.A. 1964. The nature of soil acidity Madison. Wisconsin Soil Sci. Soc. Am. Proc.
- Daló N, Moussatché H. 1998. Acción tóxica de las plantas del género *Ipomoea*. Revista de la Universidad Centro Occidental (Venezuela) 6:25-39.
- Devendra, C. 1995. Composition and nutritive value of brown se legume. In Tropical legumes in animal nutrition. Edited by J.P.F. D'Mello y C.. Devendra. CAB. International. pp. 49-65.
- Diagayete, M., Huss, W. 1981 Tannin contents of African pasture plants: Effects on analytical data and *in vitro* digestibility. Anim. Res. Dev. 15: 79-90.

- D'Mello, J.P.1995. Anti-nutritional substances in legumes seeds. In: Tropical legumes and animal nutrition. D'Mello, J.P.F. Devendra, C. (Eds.). CAB. International. U.K. p 135-165.
- Dominguez, X.A.1988. Métodos de Investigación Fitoquímica. Cuarta Reimpresión Ed.Limusa, México. 281 p.
- Ersus, S.,Yurdagel, U. 2006. Microencapsulation of anthocyanins pigments of black carrot (*Daucus carota*) by spray drier. J. Food Eng. 80: 805-812.
- Franco, G. F., Sánchez,R. M., Hernández, J.E., Villareal, O.A., Rodríguez, J.C, y Rojas, V.H. 2008. Identificación botánica y tipo de hábitat de la vegetación arbórea y arbustiva consumida por cabras en pastoreo trashumante en la región Mixteca, México. Departamento de producción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, 14014. Córdoba España.
- Galindo, W., Rosales, M., Murgueitio E., Larrahondo J. 1989. Sustancias antinutricionales en las hojas de los arboles forrajeros. Livest. Res. Rural Dev. 1(1): <http://www.cipav.org.com/lrrd/lrrd1/1/ Mauricio.htm>.
- García, D. E. 2003. Evaluación de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba* (Linn). Tesis de Maestría, EEPF. Indio Hatuey, Matanzas, Cuba.
- Garduño, P.C.. 2009. Evaluación de polvos y extractos vegetales sobre el desarrollo de *Fusarium oxysporum f.sp. gladioli* (Massey) Snyder y Hansen e identificación de compuestos volátiles. pp.18, 29, 70-80.
- Gastón, C.S., Bendersky, D. Barbera, P. 2008.Plantas tóxicas de la provincia de corrientes. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA. pp 2-5.
- Gee, G.W. Bauder.1986. Particle-size analysis. In A. Klute (ed.). Methods of soil analysis. part 1 American Society of agronomy. Madison, Wisconsin. Usa. pp. 383-411.
- Goering, H.K. y P.J. Van Soest. 1972. Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications). Agricultural Handbook No. 379. Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture. pp 20.
- Haraguchi, M., Gorniak, S.L., Ikeda, K., Minami, Y., Kato, A., Watson, A.A., Nash, R.J., Molyneux, R.J., Asano, N. 2003. Alkaloidal components in the poisonous plants, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). J. Agri Food Chem 51:4995-5000.

- DIGEPO. Dirección General de Población de Oaxaca. Distrito de Oaxaca. 2010.
<http://www.oaxaca.gob.mx/digepo/publicaciones.htm>.
- Harborne, J.B. 1991. *Phytochemical Methods* 3^a ed. Chapman y Hall. Londres. P 288.
- Hernández, H.J., Franco, G.F., Villarreal, E.B., Camacho, R.J., Pedraza, O.R., Juarez, F.C. 2002. Valor Nutricional de 6 especies arbóreas y arbustivas consumidas por los caprinos durante la época de lluvia en la Mixteca Poblana. Departamento de producción Animal FMVZ-BUAP, México. CEDEPA Universidad de Camagüey Cuba.
- Hernández, J. 2006. Valoración de la caprinocultura en la Mixteca Poblana: Socioeconomía y recursos arbóreo-arbustivos. Tesis doctoral. Universidad de Camagüey, Cuba.
- Hesse, P.R. 1971. *A textbook of soil chemical analysis* chemical published.
- Hueza, I.M, Dagli, M.L., Gorniak, S.L., Paulino, C.A. 2003. Toxic effect of prenatal *Ipomoea carnea* K administration to rats. *Vet Hum Toxicol* 45: 298-302.
- Ikan, R. 1991. *Natural products. A laboratory guide*. Academic Press. San Diego.p 360
- Indigenista, México.:1591. 1994.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2005. Marco Geoestadístico Municipal, Prontuario de Información geográfica municipal de los Estados Unidos. Version 3.1.
- Jackson, F. S., Barry, T.N., Lascano, C. y Palmer, B. 1982. The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forages legumes. *J. Sci. Food Agric.*17:103-110.
- Jenett, S. K., Sonja, C., Schimming, T., Siem, K., Muller, F., Hilker, M., Witte, L., Hartmann, T., Austin, D., Eich, E. 2004. *Phytochemistry and Chemotaxonomy of the Convolvulaceae* *Phytochemistry*. 66: 223-231.
- John, M.K. 1970. Colorimetric determination of phosphorus in soil and plant materials with ascorbic.
- Katalin, K. I., M. de Balogh, Alberto P., Dimande, Jaco. J., vander, Lugt., Russell, J., Molyneux, T.W., Naude, W. G.1999. A lysosomal Storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. *Journal of veterinary Diagnostic investigation*. 11:266-272.
- Klra, and D.G. Maynard. 1991. *Methods manual for forest soil and plant analysis*. For. Can; Northwest. Reg; north for. Cent, Edmoton. Alberta Canada.
- Kuklinski, C. 2000. *Farmacognosia*. Ed. Omega S.A. España. pp. 106-109.

- Kumar, R., Singh, M. 1992. Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. *J. Agric. Food Chem.* 32: 447–453.
- Lindsay, W.L., Norvell, W. A. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron manganese, and soil. *Sci. Suc. Am. J.* 42:421-428.
- Martens and Galeotti. 1845. *Bull. Acad. Roy. Sci. Bruxelles* 12:266. 1845. TYPE: Galeotti 1403 (BR, holotype not seen; P, presumed isotype). Pedunculos 3-12mm long; Mexico-Guatemala. Subsp. *Pauciflora*.
- McDonald, A. J. 1992. Evolutionary implications of typical and anomalous secondary growth in arborescent *Ipomoea* (convolvulaceae). *Bull Torrey Bot. Club* 119: 262-267.
- Méndez, M.C., Riet- Correa, F. 2000. Plantas tóxicas e micotoxycosis. Pelotas, Editora e Gráfica Universitaria/UFPel. Laboratorio Regional de diagnostico Facultad de Veterinaria P. 112.
- Miranda, M., Cuéllar, A. 2001. Farmacognosia y productos naturales. Ed. Félix Varela. Ciudad de la Habana. P. 159-161, 168-171, 242-243, 261-265, 273-274, 278-283.
- Molyneux, R.J., McKenzie, R.A., O'Sullivan, B.M., Elbein, A.D. 1995. Identification of the glycosidase inhibitors swansonine and calystegine B2 in weir vine (*Ipomoea* sp) Q6 AFF calobra and correlation with toxicity. *J. Nat. Prod.* 58:878-886.
- Nielsen, S. 2010. Food Analysis Laboratory Manual, Second edition. Kluwer Academic/Plenum Publisher, Nueva York. p. 177.
- Olsen, S.R., Dean, L.A. 1965 . Phosphorus. In C.A Black (ed) *Methods of soil analysis part 2.* American Society of agronomy Madison. Wisconsin Agronomy P. 1035-1040.
- Olsen, S.R., Cole. C.V., Watanab, F.S. Dean, L.A. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. *US Sept Agr. Circ* 939.
- Pedraza, R.M 2000. Valoración nutritiva del follaje de *Gliricidia sepium* (Jacq) Kunth ex Walp. Y su efecto en el ambiente ruminal. Tesis doctoral. Instituto de Ciencias Animal. Universidad agraria de la Habana. La Habana Cuba. P 116.
- Pherson, G. 1981. Studies in *Ipomoea* (Convolvulaceae) I. The arborescens group. pp. 533-538.
- Poppi, D. P., Norton, B.W. 1995. Intake of tropical legumes. In: *Tropical Legumes in Animal Nutrition.* Edited by J.p.F. D'Mello and C. Devendra. CAB International. pp 173-189.
- Ralph, M.H., Panter, K.E., James, L.F. 1990. Feed preferences and habituation of sheep poisoned by locoweed. *J Anim Sci* 68: 1354-1362.

- Reed, J.D. 1995 Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J. Anim. Sci.* **73**: 1516–1528.
- Reed, J.D., Soller, H., Woodward, A. 1990. Fodder tree and straw diets for sheep: intake, growth, digestibility, and the effects of phenolics on nitrogen utilization. *Anim. Feed. Sci. Technol.* **30**: 39–50.
- Riet, C. E., Méndez, M. 2000. Plantas tóxicas e micotoxícoses, Ed. Grafica Universitaria, Pelotas (Brasil), P. 36-37.
- Ríos, J.L., Recio, M.C. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacology.* **100**:80-84.
- Roemer a Schuities. 1819. *Syst. Veg.* **4**:248. Type: not determined (“ e horto valentino”).
- Roberts, R.M., Rodewald, L.B. and Wingrove, A.S. 1974. *An Introduction to Modern Experimental Organic Chemistry.* Holt, Rinehart and Winston, Inc. New York. P.528
- S.A.S. 2002. *User’s guide statistic.* SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- Schollenberger, C.J. Smon, R.H. 1945. Determination of exchange capacity and exchangeable bases in soil. *Sci* **59**:13-25.
- Solano, H. L. 1997. Estudio florístico y descripción de la vegetación del municipio de Asunción cuyotepeji, Distrito de Huajuapán de León, Oax. México Departamento de Botánica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional.P.37-75.
- Shailili, M., Fernando, H., Oscar, C., Helen, V., Miguel, M., Raumaris, M., Yuianny, M. 2007. Evaluación Fitoquímica y actividad antibacteriana de los extractos de *Ipomoea quamoclit* L. (Convolvulaceae). Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Escuela de Ciencias, Departamento de Química. Lab. de Productos Naturales. Cumaná, Venezuela.
- Soto, H.M., Rodríguez, G.1998. Curso Teórico-práctico de Fitoquímica. Especialidad de Botánica. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco, Estado de México, Mexico. p.31-83.
- Soto, J.C. 1987. Las plantas medicinales y su uso tradicional en la cuenca del Río Balsas; destacados de Michoacán Guerrero. Tesis. UNAM. pp. 231.
- Stahl, E. 1969. *Thin Layer chromatography, a Laboratory Handbook.* Springer Verlag, Berlin. p.1041.
- Steel, R.G.,Torrie, J.C. 1988. *Bioestadística, Principios y Procedimientos.* 2ª. Edición. Mc Graw-Hill. pp.179-180.

- Taylor, J.B. 2000. Disposition of swansonine and its effects on nutrient metabolism in ruminants. PhD thesis, New Mexico State University. Las cruces., NM.
- Tobin, G., Muller, H. G. 1988. Nutrición y ciencia de los alimentos. Primera edición. Editorial Acribia, S.A.
- Van Soest, P.J. 1963. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. II A rapid Method for the Determination of Fiber and Lignin. Assoc. Off. Agr. Chem. J. 46:829-835.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition J. Dairy Sci. 74:3583-3597.

CAPÍTULO II

BIOENSAYO DE TOXICIDAD SOBRE NAUPLIOS DE *ARTEMIA SALINA* UTILIZANDO CUATRO EXTRACTOS DE DOS *SPP* DE *Ipomoea*

2.1 RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la toxicidad de cuatro extractos (hexánico, diclorometano, metanólico y acuoso) de dos especies de *Ipomoea* (*I. murucoides* e *I. pauciflora* subsp. *pauciflora*), las cuales anualmente causan toxicidad a las cabras que consumen estos forrajes en temporada de sequía, provocando grandes pérdidas económicas a productores en sistemas de explotación extensiva. La prueba de toxicidad se realizó mediante un bioensayo con nauplios de *Artemia salina*, determinando la concentración letal media (CL₅₀) de los extractos de las plantas. A su vez, se identificaron los metabolitos secundarios presentes mediante un estudio fitoquímico preliminar, observándose un alto contenido de taninos (+++) en el extracto metanólico, y la presencia leve (+) de éstos en el extracto acuoso. El análisis estadístico (Probit) para los extractos evaluados sobre nauplios de *Artemia salina*, mostró al extracto metanólico con más toxicidad en ambas especies, a una concentración de 3.55 mg/mL para *I. pauciflora* (subsp. *pauciflora*) y 1.46 mg/mL para *I. murucoides*, seguido del extracto acuoso (agua) con una concentración de 3.51 mg/mL en *I. murucoides* y 22.16 mg/mL en *I. pauciflora*. La especie que presentó un mayor grado de toxicidad en los cuatro extractos fue *I. murucoides*. Los resultados de la presente investigación son favorables, ante el hecho de que el extracto metanólico mostró extrema toxicidad en este modelo, asumiendo, que la intoxicación se debe a la presencia de los taninos encontrados en ambas especies arbustivas.

Palabras clave: Arbustivas, concentración letal media, sequía, taninos.

2.1 ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the toxicity of four extracts (hexane, dichloromethane, methanol and aqueous) from two species of *Ipomoea* (*I. murucoides* and *I. pauciflora* subsp. *pauciflora*), which annually negatively affect goats in the dry season, causing important economic losses due to toxicosis to producers in extensive farming systems. Toxicity was assessed using a bioassay with *Artemia salina nauplius*, determining the median lethal concentration (LC₅₀) of plant extracts. Secondary metabolites content of these shrubs had been previously identified. Shrubs a high tannin content (+ + +) in methanol extract, and a slight presence (+) of these in the aqueous extract. Statistical analysis (Probit) for the evaluated extracts on *Artemia salina nauplius*, showed the methanol extract with greater toxicity in both species at a concentration of 3.55 mg/mL for *I. pauciflora* (subsp. *pauciflora*) and 1.46 mg/mL for *I. murucoides*, followed by aqueous extract (water) at a concentration of 3.51 mg/mL in *I. murucoides* and 22.16 mg/mL in *I. pauciflora*. The species showing the greatest toxicity in the four extracts was *I. murucoides*. The results of this investigation proved to be reliable, because the methanol extract showed extreme toxicity in this model, assuming that the poisoning is due to the presence of tannins found in both shrubs.

Keywords: drought, median lethal concentration, tannins, shrubs.

2.2 INTRODUCCIÓN

Las plantas son una importante fuente para obtener diversos fármacos a través de sofisticados sistemas de cultivo y extracción. Sin embargo, el estudio de las sustancias de origen natural para uso y beneficio del hombre, no ha ido paralelamente con la evolución del mismo, encontrando aún muchas plantas tóxicas sin estudiar (Roig, 1974; Sarukhán, 1995).

La industria farmacéutica somete todos los compuestos químicos a pruebas para detectar toxicidad; la mayoría de éstas involucran protocolos que trabajan sobre células humanas específicas, células de animales o bien, en animales de laboratorio con cepas de ratones, ratas, conejos, chimpancés, etc. Este tipo de bioensayos son muy costosos en términos de tiempo, dinero e infraestructura sofisticada, sin mencionar las habilidades propias de manejo de las técnicas (Yajes, 1997).

McLaughlin (1998), desarrolló un bioensayo de bajo costo, rápido y fácil de realizar. El objetivo de realizar la búsqueda y fraccionamiento de extractos de plantas fisiológicamente activas, utilizando un bioensayo en el que hace uso de un pequeño crustáceo para la detección y aislamiento de productos naturales bioactivos, conocido como “letalidad de los nauplios de *Artemia salina*”. Para disminuir todo tipo de costos sin demeritar la efectividad de los análisis de toxicidad, se utiliza este bioensayo confiable, económico y reproducible, el cual no requiere de condiciones extremas de asepsia ni habilidades de manejo específicas (Molina, 2004).

Artemia salina, pertenece a la familia de crustáceos Artemiidae, invertebrados de hábitats salinos, que forman parte de la cadena trófica de su ecosistema.

El bioensayo con nauplios de *A. salina*, consiste en la determinación de la concentración letal media (CL₅₀) de los extractos de plantas. Aquellos que presentan una CL₅₀ < 1000 mg/L, es muy probable que contengan uno o varios compuestos activos, por lo que es necesario fraccionarlos para repetir el bioensayo a menores concentraciones (Meyer et al. 1982; Lewan.1992).

Las especies *Ipomoea murucoides* e *Ipomoea pauciflora* (subsp. *pauciflora*), pertenecientes a la familia Convolvulaceae, son plantas de tipo arbóreo o arbustivo que se desarrollan en climas cálidos subhúmedos con precipitaciones bajas (450 a 600 mm). Estas especies son propias de la región Mixteca baja de Oaxaca, las cuales son consumidas en forma abundante por caprinos en temporada de sequía, ya que estos arbustos constituyen el único forraje disponible en esta época del año (especies capaces de rebrotar en esta temporada, con una sola lluvia). Después de su

consumo estos arbustos suelen causar intoxicación, presentando diferentes signos clínicos, que conllevan a presentar altos índices de mortalidad y morbilidad.

En investigaciones previas se ha encontrado que el consumo de hojas de este género (*Ipomoea*), ha provocado grandes pérdidas en rebaños caprinos, principalmente en temporada de sequía. En un trabajo preliminar se encontró la presencia de diversos metabolitos secundarios (terpenoides, flavonoides, alcaloides y taninos) derivados de diferentes extractos de las hojas de estas especies (*I. murucoides* e *I. pauciflora* subsp. *pauciflora*). Sin embargo, hasta ahora no se han realizado bioensayos para determinar en primera instancia, los metabolitos secundarios causantes de la toxicidad.

El objetivo del estudio fue, evaluar la toxicidad de los extractos (hexánico, diclorometano, metanólico y acuoso) aislados de las especies *I. murucoides* e *I. pauciflora* (subsp. *pauciflora*), mediante el bioensayo sobre larvas de *Artemia salina*.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta e identificación de las especies

Los extractos fueron obtenidos de la colecta de ramas tiernas (con hojas) de las dos especies de *Ipomoea* en mayo de 2011 (temporadas de sequía) en la comunidad de San Jorge el Zapote, Municipio de San Miguel Amatitlan, perteneciente a la región Mixteca baja de Oaxaca. La localidad se ubica a 17° 54' 49" de latitud norte y 97° 59' 47" de longitud oeste, a una altura de 1460 msnm. El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano, la precipitación promedio anual es de 450 a 600 mm, y la temperatura media anual es de 21°C con medias máximas y mínimas anuales de 26 y 16°C, respectivamente.

La identificación de las especies (ejemplares botánicos) se realizó en septiembre de 2011 en el herbario-hortorio (CHAPA) del Programa de Botánica, del Instituto de Recursos Naturales del Colegio de Postgraduados, campus Montecillos, Texcoco, Estado de México; las cuales fueron identificadas como *Ipomoea murucoides* e *Ipomoea pauciflora* (subsp. *pauciflora*), conocidas comúnmente como caahuate blanco y negro respectivamente, pertenecientes a la familia Convolvulaceae.

Obtención de los extractos

Las ramas tiernas de las especies de *Ipomoea*, fueron secadas en sombra a temperatura ambiente por un periodo de 20 días. Posteriormente, se separaron las hojas de las ramas y se molieron en un molino Willey con criba de 1mm.

La obtención de los cuatro extractos (hexánico, diclorometano, metanólico y acuoso) de cada planta se obtuvo a partir del material previamente seco y molido. Para la extracción de éstos, se recurrió a la utilización de cuatro disolventes (hexano, diclorometano, metanol y agua). Los tres primeros extractos se obtuvieron mediante el equipo Soxhlet y el último, se obtuvo a través de agitación y liofilización (Ersus y Yurdagel, 2006), técnicas que consisten en usar agua o un disolvente (líquido capaz de disolver otra sustancia) para liberar y solubilizar los metabolitos secundarios. Los materiales insolubles tales como fibra y otros precipitados (extracto acuoso) fueron removidos mediante filtración (Cannel, 1998).

Finalmente, los extractos sólidos se depositaron en un frasco previamente pesado, y de esta manera, se conoció la concentración obtenida en 10 g de muestra seca. El procedimiento descrito

fue repetido con el propósito de obtener las concentraciones de extractos necesarios para el bioensayo de toxicidad.

Estudio fitoquímico

La prueba fitoquímica que se aplicó a los extractos fue cromatografía en capa fina (CCF), la cual permitió hacer separaciones de las fracciones de metabolitos secundarios presentes en un extracto (Stahl, 1969; Domínguez, 1988) y mediante la realización de esta prueba específica, se determinó de manera cualitativa la posible presencia o ausencia de terpenoides, flavonoides, alcaloides, saponinas y taninos en los cuatro extractos obtenidos de cada especie (*I. murucoides* e *I. pauciflora* subsp. *pauciflora*), siguiendo las metodologías descritas por Domínguez (1988), Stahl (1969) y Soto (1998).

Bioensayo de toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*

Se emplearon nauplios (crías) de *A. salina* expuestos a diferentes concentraciones de las muestras durante un periodo de 48 horas. Como resultado de dicha exposición, fue posible determinar la concentración de la muestra que produce la muerte al 50% (concentración letal media o CL₅₀) de la población de nauplios, con un nivel de confiabilidad del 95%.

Incubación de quistes de *A. salina*

Los quistes de *Artemia salina* (Azul[®]) fueron obtenidos de un acuario comercial. Se incubaron en agua de mar artificial (solución salina) de la siguiente manera: En un litro de agua potable se disolvieron 34g de sal marina libre de fosfatos y nitritos (Oceanic[®]), ajustando el pH de 7.8. La incubación se realizó en dos vasos de precipitado con 200 mL de solución salina (resguardando los 600 mL restantes para el bioensayo). Posteriormente se le agregó 0.05 g de quistes de *A. salina*, infundiendo oxígeno desde el momento que se agregaron los quistes hasta su eclosión, y manteniendo una temperatura promedio de 28 °C con la ayuda de una lámpara de 100 watts (Meyer et al. 1982; Solís et al, 1993).

La eclosión de los nauplios se alcanzó a las 24 h e inmediatamente se transfirieron con una pipeta Pasteur, a varios depósitos de una placa de ensayo, las cuales contenían las diferentes concentraciones del extracto (previamente preparadas), y se mantuvieron en condiciones similares de temperatura durante 48 h (tiempo de duración del bioensayo).

Preparación de las concentraciones de los extractos

Debido a la falta de estudios previos de toxicidad de las muestras del género *Ipomoea*, se realizó una prueba preliminar, se prepararon 8 concentraciones sin replica (0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/mL y

1, 10, 20 mg/ mL), colocadas en vasos de precipitado con 10 mL de solución salina, transfiriendo diez nauplios y registrando el número de organismos muertos a las 12, 24, 36 y 48 horas.

A partir de los resultados de la prueba preliminar, se estableció el intervalo de concentración en el cual se puede esperar del 0 al 100% de mortalidad de nauplios. Tal prueba permitió definir las concentraciones a utilizar para encontrar la concentración letal media (CL₅₀).

La evaluación definitiva de la toxicidad de los extractos se valoró de manera *in vitro* (Carballo, 2002), evaluando veinte diferentes concentraciones (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 mg/mL), con tres repeticiones de cuatro extractos (acuoso, hexano, diclorometano y metanol) de las especies (*I. muruoides* e *I. pauciflora* subsp. *pauciflora*).

La actividad letal de los distintos extractos contra nauplios se evaluó mediante el bioensayo descrito por Meyer et al. (1982), preparando una solución madre a una concentración de 200mg/mL (200 mg de extracto por 1 mL de solución salina), siendo necesario la utilización de Tween 20 (Merck ®) y dimetilsulfóxido al 1% (DMSO- Merck ®), según la solubilidad de los extractos. A partir de esta solución madre, en una placa de ensayo con varios depósitos, se realizaron diluciones para obtener las veinte diferentes concentraciones (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 mg/mL), aforándolas a 10 mL con solución salina. En cada depósito de la placa de ensayo preparada, se depositaron 10 nauplios de *A. salina*, cada depósito de la placa se consideró una réplica, preparándose tres réplicas por concentración ensayada.

Se utilizaron como control dos testigos negativos y uno positivo. La preparación del primer testigo negativo fue a base de solución salina, y la del segundo a base de solución salina, DMSO y Twenn, ambos sin extracto alguno. En el testigo positivo, únicamente se sustituyó el extracto por el alcaloide “β-erytroidina” (extraído de *Erythrina americana*) a una concentración de 1mg/mL.

Conteo de nauplios de *A. salina*

La cuantificación de la mortalidad de los nauplios se llevó a cabo a las 12, 24,36 y 48 horas; sin embargo, para el análisis estadístico, sólo se consideró la mortalidad de estos a las 48 horas. El conteo de los nauplios muertos y sobrevivientes se observó a simple vista y, en ocasiones, se apoyó con un microscopio estereoscópico.

Análisis estadístico

Este método se basó en la cuantificación de la vulnerabilidad de los individuos ante efectos físicos de una magnitud determinada que se suponen conocidos. El método consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas, para estimar las consecuencias desfavorables sobre la población u otros elementos vulnerables para los distintos niveles o dosis de los estímulos. La respuesta de una población ante un fenómeno físico se distribuye según una ley log-normal (Finney, 1971; Stephan, 1977; Ferrán, 2001). El modelo es aplicable sólo para aquellos fenómenos de los que se dispone de la “ecuación Probit” (Mercado-Hernández, 1998).

El valor de la variable Probit se determinó por la expresión siguiente:

$$Y = \beta_1 + \beta_2 \ln X$$

Donde X es la variable física representativa del estímulo, β_1 y β_2 son unas constantes (Ferrán, 2001).

2.4 RESULTADOS

Colecta de hojas e identificación de las especies

Los ejemplares fueron identificados como *Ipomoea murucoides* (Roemer and Schultes, 1819) e *Ipomoea pauciflora* subsp. *pauciflora* (Martens. and Galeotti, 1845), conocidos comúnmente como cazahuate blanco y negro, respectivamente, pertenecientes a la misma familia (Convolvulaceae).

Obtención y rendimiento de los extractos

Se obtuvieron cuatro extractos (hexánico, diclorometano, metanólico y acuoso) de las especies *I. murucoides* e *I. pauciflora*. El extracto con mayor rendimiento fue el metanólico, seguido por el acuoso, hexánico y diclorometano en ambas especies (Tabla 2.1). Los rendimientos fueron obtenidos a partir del material seco y se obtuvieron por diferencia de peso con el extracto.

El bioensayo de toxicidad sobre nauplios de *A. salina* fue determinado en 20 concentraciones y tres réplicas; fue necesario contar con 3.3 g de cada extracto, para realizar diferentes extracciones a partir del material vegetal previamente molido y seco (Tabla 2.2).

Estudio fitoquímico

Se utilizó el sistema cualitativo de cruces para especificar la presencia o ausencia de los grupos de metabolitos, mediante los siguientes criterios: Presencia cuantiosa o alto contenido (+++), presencia notable (++) , presencia leve (+) y ausencia (-) (Galindo et al. 1989; García, 2003).

En la prueba fitoquímica preliminar realizada a los extractos de las dos especies de *Ipomoea*, se encontró la presencia cuantiosa de flavonoides y taninos. Respecto a terpenoides y alcaloides, se observó una presencia notable; sin embargo, en ninguna de las dos especies hubo presencia de saponinas (Tabla 2.3).

Bioensayo de toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*

En la tabla 2.4 y 2.5 se muestran los valores de la CL_{50} (mg/mL) de los extractos evaluados sobre *A. salina* de las especies *I. murucoides* e *I. pauciflora* (subsp. *pauciflora*), obtenidos mediante el modelo estadístico Probit (SAS, 2002), mostrando el valor de la X^2 (Chi-cuadrada) y P (significancia) de los resultados obtenidos.

El grado de toxicidad del extracto, se definió en función del rango en que se encontraron los valores de la CL_{50} , de acuerdo con las categorías siguientes: Extremadamente tóxico ($CL_{50} \leq 5$ mg/mL), muy tóxico ($5 < CL_{50} \leq 10$), moderadamente tóxico ($10 < CL_{50} \leq 20$) y no tóxico ($CL_{50} > 20$ mg/mL) (Valdés et al. 2003).

Los resultados mostraron que en ambas especies el extracto metanólico fue extremadamente tóxico ($CL_{50} \leq 5$ mg/mL), a una concentración de 3.55 mg/mL para *I. pauciflora* y 1.46 mg/mL para *I. murucoides*. Sin embargo, *I. murucoides* fue más tóxico sobre *I. pauciflora* en los 4 extractos evaluados (hexánico, diclorometano, metanólico y acuoso) (Tabla. 2.6).

La comparación de los extractos según su grado de toxicidad (CL_{50}) de cada especie, se representan en las Figuras 2.1: Extracto hexánico, 2.2: Extracto con diclorometano, 2.3: Extracto acuoso y 2.4: Extracto metanólico.

Tabla 2.1. Gramos de extracto obtenido de las hojas de las dos especies de *Ipomoea* a partir de 10g de muestra seca

Disolvente	<i>Ipomoea pauciflora</i>	<i>Ipomoea murucoides</i>
	(g)	(g)
Metanol	2.02	1.29
Agua	1.02	0.59
Hexano	0.79	0.55
Diclorometano	0.18	0.18

Tabla 2.2 Materia seca (g) de las dos especies de *Ipomoea* necesaria para obtener 3.3 g de extracto

Disolvente	Especie vegetal	
	<i>Ipomoea pauciflora</i>	<i>Ipomoea murucoides</i>
	(g)	(g)
Metanol	16.33	25.58
Agua	32.35	55.00
Hexano	41.77	60.00
Diclorometano	183.33	183.33

Tabla 2.3. Análisis fitoquímico de los extractos obtenidos de las dos especies de *Ipomoea*

Extracto	Terpenoides		Flavonoides		Alcaloides		Saponinas		Taninos	
	<i>I.p</i>	<i>I.m</i>	<i>I.p</i>	<i>I.m</i>	<i>I.p</i>	<i>I.m</i>	<i>I.p</i>	<i>I.m</i>	<i>I.p</i>	<i>I.m</i>
E.H	++	++					-	-		
E.D	++	++			++	++	-	-		
E.M			+++	+++			-	-	+++	+++
E.A							-	-	-	+

E.H: Extracto hexánico; E.D: Extracto diclorometano; E.M: Extracto metanólico; E.A: Extracto con agua; *I.p*: *Ipomoea pauciflora*; *I.m*: *Ipomoea murucoides*; +++: Presencia cuantiosa; ++: Presencia notable; +: Presencia leve; -: ausencia.

Tabla 2.4. Actividad de los extractos (*I. pauciflora* subsp. *pauciflora*) sobre la CL₅₀ de los nauplios de *A. salina*

Extractos	<i>Ipomoea pauciflora</i>		
	CL ₅₀ (mg/mL)	X ²	P
Acuoso	22.16	24.85	0.0001
Diclorometano	19.8	61.32	0.0001
Hexánico	20.44	50.95	0.0001
Metanólico	3.55	96.07	0.0001

Valor de la CL₅₀ de los extractos contra *Artemia salina*, mediante el modelo estadístico Probit, mostrando el valor de la X² (Chi-cuadrada) y P (la significancia) de los resultados obtenidos.

Tabla 2.5. Actividad de los extractos (*I. murucoides*) sobre la CL₅₀ de los nauplios de *A. salina*

Extractos	<i>Ipomoea murucoides</i>		
	CL ₅₀ (mg/mL)	X ²	P
Acuoso	3.51	89.87	0.0001
Diclorometano	13.68	76.45	0.0001
Hexánico	10.94	164.93	0.0001
Metanólico	1.46	30.56	0.0001

Valor de la CL₅₀ de los extractos contra *Artemia salina*, mediante el modelo estadístico Probit, mostrando el valor de la X² (Chi-cuadrada) y P (la significancia) de los resultados obtenidos.

Tabla 2.6. Comparación de la actividad de los extractos y categoría de toxicidad de las dos especies de *Ipomoea*, sobre la CL₅₀ de los nauplios de *A. salina*

Extractos	<i>Ipomoea pauciflora</i> <i>subsp. pauciflora</i>		<i>Ipomoea murucoides</i>	
	CL ₅₀ (mg/mL)	CATEGORIA DE TOXICIDAD	CL ₅₀ (mg/mL)	CATEGORIA DE TOXICIDAD
Acuoso	22.16	No tóxico	3.51	Extremadamente tóxico
Diclorometano	19.8	Moderadamente tóxico	13.68	Moderadamente tóxico
Hexánico	20.44	No tóxico	10.94	Moderadamente tóxico
Metanólico	3.55	Extremadamente tóxico	1.46	Extremadamente tóxico

Valor de la CL₅₀ mg/mL de los extractos contra *Artemia salina*, mediante el modelo estadístico Probit.

CL50-Hexano (I. murucoides e I. pauciflora)

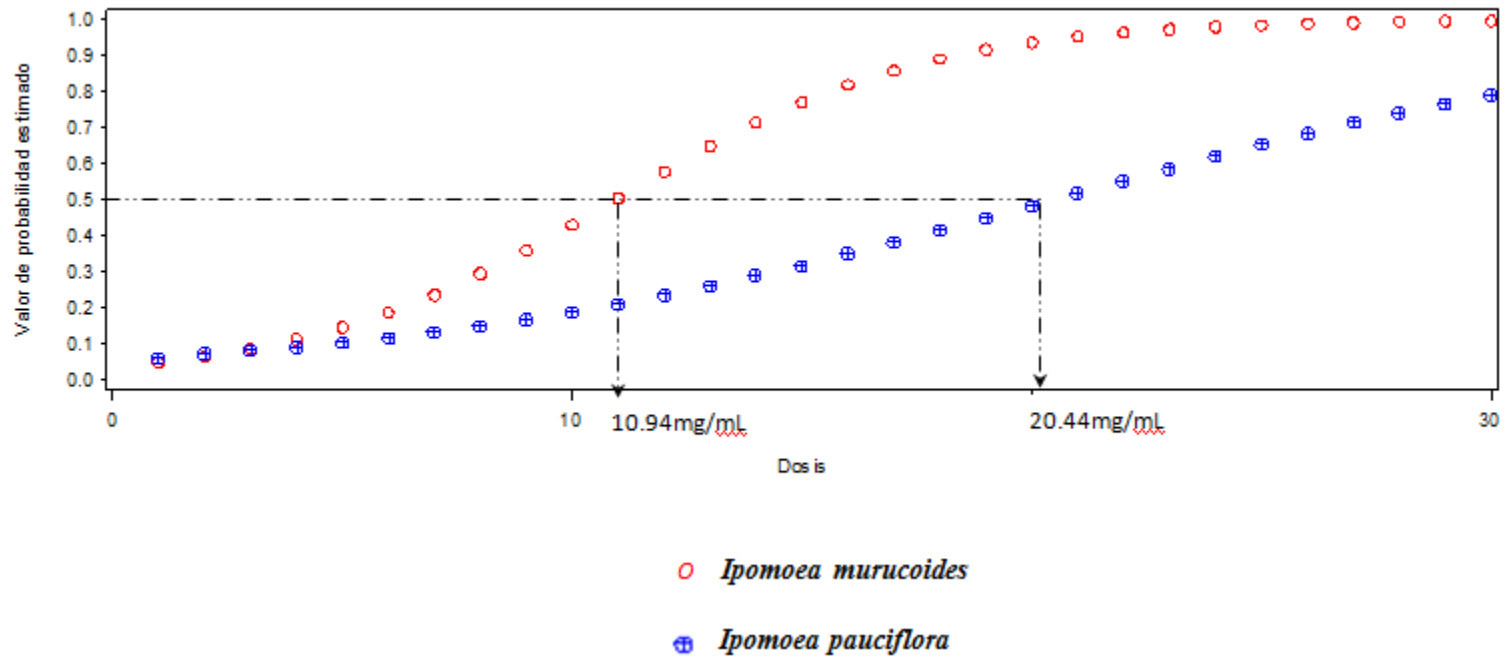


Figura 2.1. Comparación de la CL₅₀ (concentración letal media) del extracto hexánico de *I. murucoides* e *I. pauciflora* subsp. *pauciflora* sobre *A. salina*.

CL50-Diclorometano (I. murucoides e I. pauciflora)

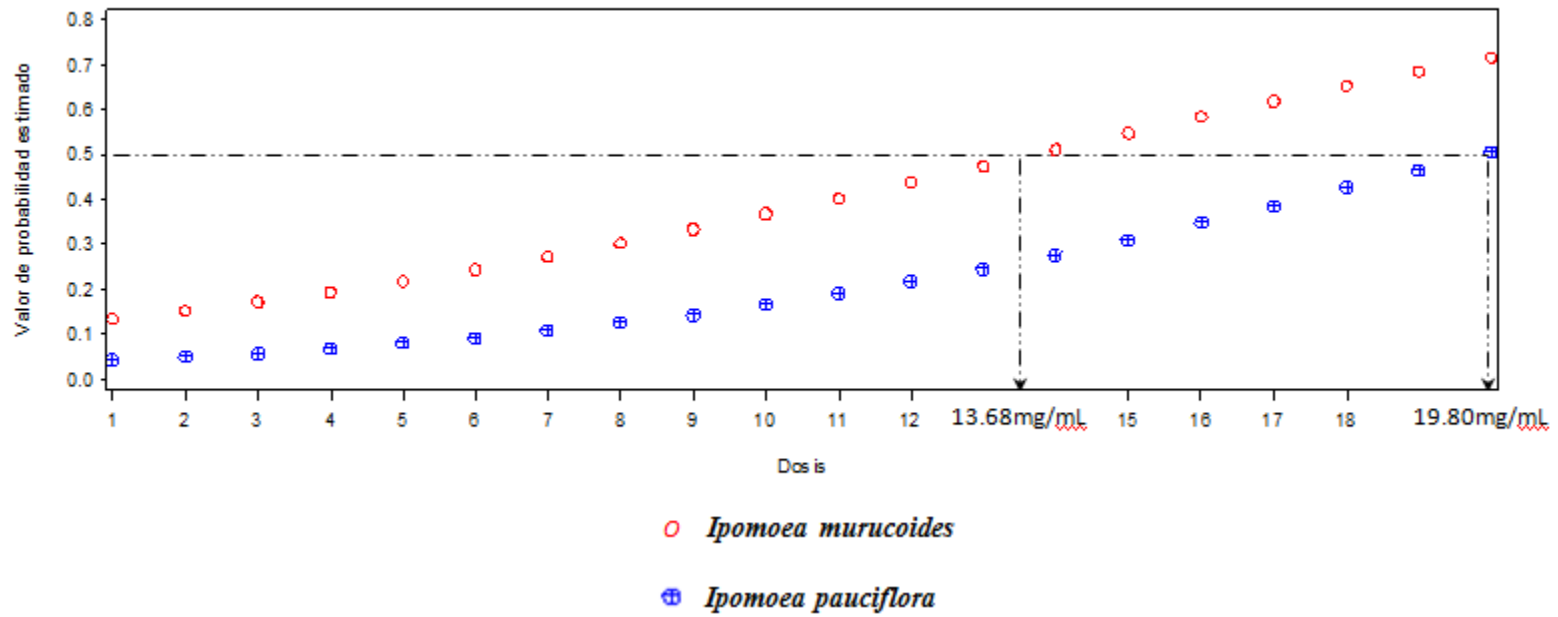


Figura 2.2. Comparación de la CL₅₀ (concentración letal media) del extracto con diclorometano de *I. murucoides* e *I. pauciflora* subsp. *pauciflora* sobre *A. salina*.

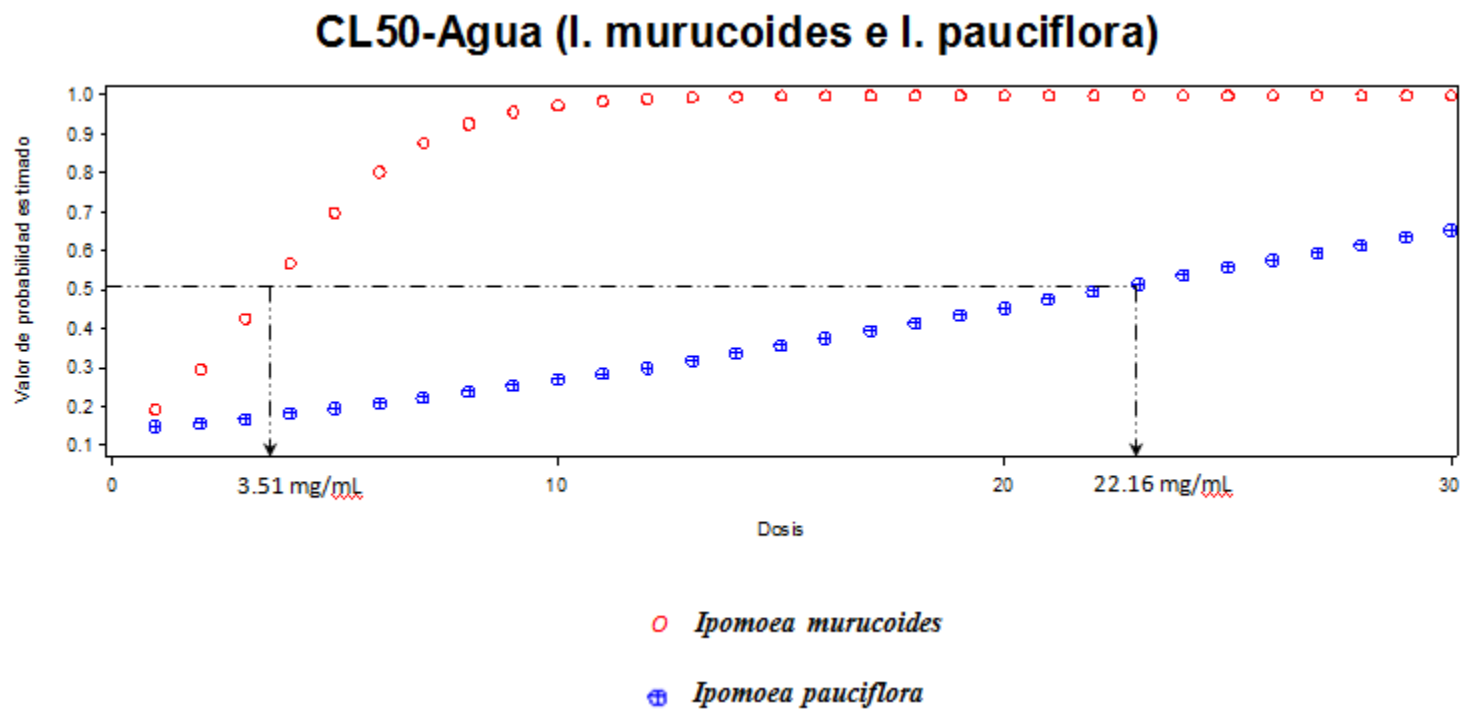


Figura 2.3. Comparacion de la CL₅₀ (concentración letal media) del extracto con agua de *I.murucoides* e *I. pauciflora* subsp. *pauciflora* sobre *A.salina*.

CL50-Metanol (I. murucoides e I. pauciflora)

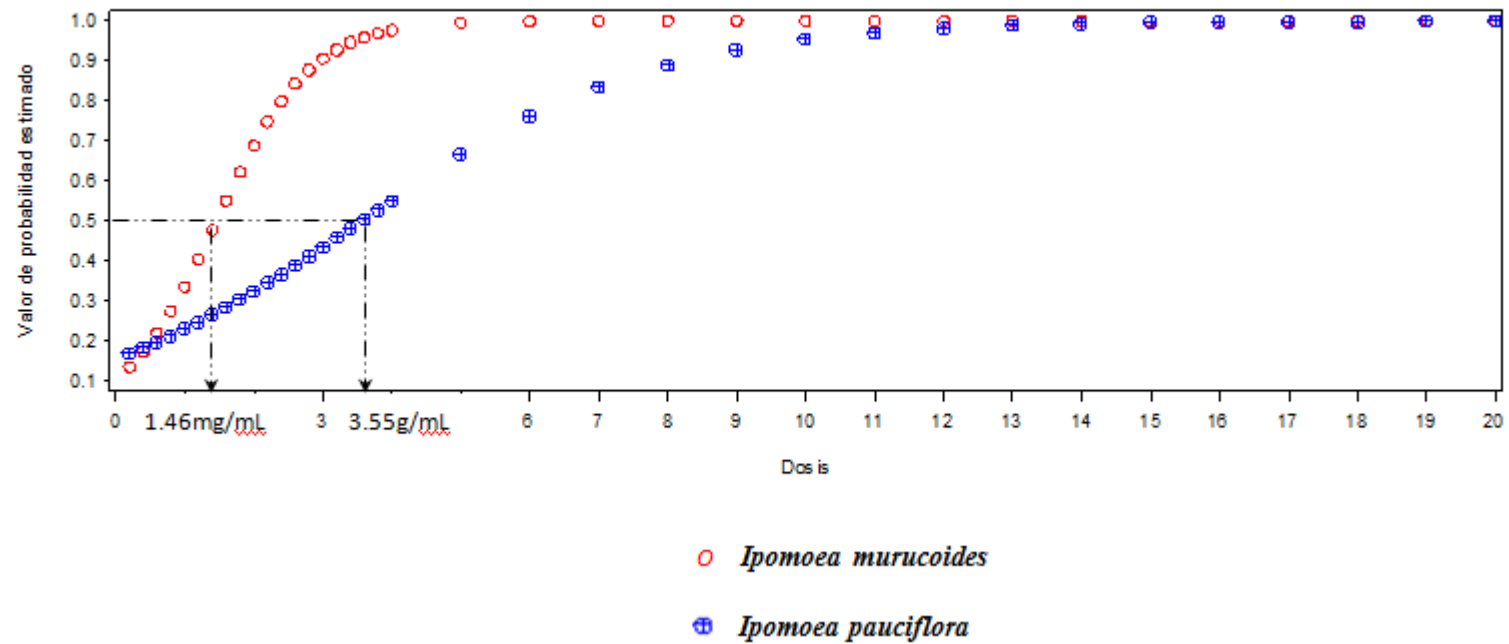


Figura 2.4. Comparacion de la CL₅₀ (concentraci3n letal media) del extracto metan3lico de *I. murucoides* e *I. pauciflora* subsp. *pauciflora* sobre *A.salina*.

2.5 DISCUSIÓN

El bioensayo de letalidad de nauplios de *Artemia salina* ha sido utilizado con eficiencia para detectar componentes con acción tóxica de un extracto vegetal (Solís, 1993 y Mackeen, 2000).

Lagarto (2001) utilizó como bioensayo alternativo para determinar la toxicidad de productos químicos y naturales, al crustáceo *A. salina*, con el objetivo de relacionar los resultados con los valores DL_{50} en ratones, donde se evaluaron tres concentraciones (10, 100, 1000 g/mL) para cada extracto. Encontrando una buena correlación estadística entre la prueba *in vivo* y la *in vitro*, siendo el bioensayo, una herramienta útil para predecir la toxicidad de extractos de plantas.

El principal efecto observado sobre *A. salina* en el presente estudio, fue la extrema toxicidad con el extracto metanólico, a una concentración letal media (CL_{50}) de 3.55 mg/mL para *I. pauciflora* subsp. *pauciflora* y 1.46 mg/mL para *I. muruoides*, a diferencia de los otros extractos (acuoso, hexánico y diclorometano) que presentaron una menor y en ocasiones nula toxicidad (Tabla. 2.6). La especie *I. muruoides* presentó una CL_{50} extremadamente tóxica con el extracto metanólico (1.46 mg/mL), y con el extracto acuoso (3.51 mg/mL).

Bustos *et al.* (2012) realizaron un estudio relacionado con los efectos tóxicos del extracto metanólico de semillas de *Ipomoea pauciflora* e *Ipomoea carnea*, en el que se utilizaron los extractos como alimentación *in vitro* sobre el peso del gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), causando a una concentración de 2 mg/mL la disminución en el peso en un 50 y 40 % sobre las larvas sobrevivientes, mencionando que la composición química de los extractos de estas especies provocó que las larvas del *S. frugiperda* fueran probablemente incapaces de eliminar los compuestos tóxicos, con presencia de pérdida de apetito y baja producción de excremento (biomasa necesaria para la desintoxicación).

Vera (2005) realizó un cultivo *In vitro* de callos morfogénicos (masas de células no diferenciadas, siendo aquellas que cubren la herida) de *Ipomoea muruoides* en diversos estados de diferenciación, relacionados con la actividad biológica tóxica contra determinadas plagas de insectos, encontrando actividad biológica significativa en callos de 30, 60 y 90 días; el efecto tóxico (mortalidad por toxicidad aguda) en callos fue a los 30 días con extractos clorofórmicos (200 ppm) y, las larvas sobrevivientes mostraron reducción significativa en cuanto al tamaño y peso.

Rauha *et al.* (2000), mencionan síntesis de metabolitos secundarios en las plantas, estos pueden ser constitutivos o generarse como respuesta al estrés, se incluyen terpenoides, flavonoides, alcaloides, taninos, ácidos grasos, entre otros (Holley y Patel, 2005).

Respecto al estudio fitoquímico realizado a los extractos en la presente investigación, se encontró en ambas especies una presencia cuantiosa o alto contenido (+++) de flavonoides y taninos (extracto metanólico), una presencia notable (++) de alcaloides (extracto con diclorometano) y la presencia notable (++) de terpenoides (extracto hexánico y diclorometano); existiendo diferencia en ambas especies en lo que se refiere al extracto acuoso, ya que en *I. pauciflora* subsp. *pauciflora* hubo ausencia (-) de taninos a diferencia a *I. murucoides* la cual presentó presencia leve (+) de estos. En ninguno de los extractos de las dos especies se encontró la presencia de saponinas.

Los resultados obtenidos para alcaloides en esta investigación coincide con lo reportado por Jenett Siems *et al.* (2004) sobre la presencia de este tipo de compuestos en ocho especies de *Ipomoea* provenientes de Alemania. Sin embargo, en su estudio no se reportó la presencia de flavonoides y taninos.

Otra investigación realizada por Moreno y López (2011) en hojas de *Ipomoea murucoides*, se detectó la presencia de alcaloides, taninos, glucósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas; mientras que para el tallo de esta especie, las pruebas fueron positivas para saponinas, alcaloides, flavonoides, glucósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas. Obteniéndose resultados similares a los del presente estudio en cuanto a las pruebas positivas de taninos, alcaloides, y ausencia de saponinas en hojas.

Respecto a la actividad biológica de *I. murucoides*, se han reportado efectos antimicrobianos contra *S. aureus* a una concentración de 5-25 µg/mL de la serie de murocoidinas (Chérigo *et al.*, 2008), observándose en un estudio posterior, que la dosis mencionada anteriormente es capaz de modificar la resistencia que tiene *S. aureus* a los diferentes antibióticos (Cherigo *et al.*, 2009).

Estudios realizados en Argentina y Mozambique sobre *Ipomoea carnea*, señalan que es una planta tóxica que provoca pérdidas económicas en la producción de cabras, al ser consumida en épocas de escasez de pastura (estación invernal), encontraron en la planta la presencia de los alcaloides “swainsonina y calisteginas” (Katalin *et al.* 1999; Riet, 2000).

En otros estudios relacionados con *Ipomoea carnea*, se observó la presencia de diferente signología clínica tiempo después del consumo de la planta, iniciando con problemas de

movimientos oscilatorios laterales de la cabeza, nigmatismos oculares, ataxia, temores, balanceo, caída del tren posterior y dificultad para levantarse, conduciéndolos a la muerte (Taylor, 2000; Haraguchi et al. 2003; Ríos, et al. 2005; Armién et al. 2007;). Por otro lado, Méndez (2000) y Molineux (1995) al estudiar la especie *Ipomoea fistulosa*, coincidieron con la signología clínica presentada en *Ipomoea carnea*, atribuyendo esta toxicidad a la presencia de alcaloides (swainsonina y calisteginas) inhibidores de glucosidasas.

Una similar signología presentan las cabras de la región Mixteca baja de Oaxaca al consumir *I. muruoides* e *Ipomoea pauciflora* subsp. *pauciflora*, especies ingeridas normalmente en temporada de escasez de pastura (primavera-verano), siendo unas de las especies que rebrotan rápidamente con las primeras lluvias, ocasionando el consumo con avidez de estas especies por los animales, al haber sufrido por varios meses la carencia de forraje.

Esta investigación aporta información nueva sobre el nivel de afección de los taninos en nauplios de *A. salina*; encontrándose de manera cuantiosa (+++) en el extracto metanólico de ambas especies. La importancia de este estudio radica en el hecho de que no se tienen estudios previos del género *Ipomoea*, que muestren a los taninos como los metabolitos secundarios causantes de toxicidad.

2.6 CONCLUSIONES

En los extractos de las hojas de cada especie de *Ipomoea* (*I. murucoides* e *I. pauciflora* subsp. *pauciflora*), se encontró un alto (+++) de taninos y flavonoides, seguido de una presencia notable (++) de terpenoides y alcaloides. El análisis de los extractos evaluados sobre nauplios de *Artemia salina*, mostró que el extracto metanólico fue el más tóxico en ambas especie a una concentración de 3.55 mg/mL para *I. pauciflora* subsp. *pauciflora* y 1.46 mg/mL para *I. murucoides*, en comparación con los otros extractos. La especie *I. murucoides* presentó un grado de toxicidad mayor en los cuatro extractos (hexánico, diclorometano, metanólico y acuoso) que *I. pauciflora* subsp. *pauciflora*; tal es el caso del extracto acuoso, el cual presentó una CL₅₀ de 3.51 mg/mL en *I. murucoides* contra 22.16 mg/mL en *I. pauciflora* subsp. *pauciflora*. Los resultados de la presente investigación son confiables ante el hecho de que dos de los extractos evaluados (metanólico y acuoso), mostraron extremada toxicidad en este modelo, asumiendo que la intoxicación se debe a la presencia de los taninos encontrados en las especies.

2.7 LITERATURA CITADA

- Argueta, A. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo I, II y III. Instituto Nacional Indigenista. México. p.1786.
- Armién, A.G., Tokarnia, C.H., Vargas, P. P., Frese, K. 2007. Spontaneous and experimental glycoprotein storage disease of goat induced by *ipomoea carnea* subsp *fistulosa* (convolvulaceae). Vet Pathol 44:170-184.
- Bustos, Zaga. G E., Guzmán, P.E, Hernández, V. V. 2012. Efecto del extracto metanólico de semillas de *Ipomoea carnea* e *Ipomoea pauciflora* en la alimentación *iv vitro* del gusano cogollero del Maíz (*Spodoptera frugi perda* SMITH). Rev. LatinoAm.Quím. p.117
- Cannel, R. J.P., 1998. Methods in Biotechnology. Natural Products Isolation. Glaxo Welcome & Development, Stevenage, UK. Humana Press Inc. Totowa, N.J. Vol. 4:1-18
- Carballo, J.L., Hernández, I.Z.L., Pérez, P. García-Grávalos MD. 2002 A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. BMC Biotechnol. 2:17-21.
- Cherigo, L., Pereda-Miranda R.; Fragoso- Serrano M., Jacobo-Herrera N., Kaatz, G., Gibbons, S. 2008. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps from the resin glycosides of *Ipomoea murucoides*. J. Nat. Prod. 71:1037-1045.
- Cherigo, L., Pereda-Miranda R., Gibbons, S. 2009. Bacterial resistance modifying tetrasaccharide agents from *Ipomoea murucoides*. Phytochemistry 70:222-227.
- Colín, H., Monroy, R. 1997. Prontuario de árboles de selva baja caducifolia. Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. (S.E.M.A.R.N.A.P), Programa de las naciones unidas para el desarrollo (P.N.U.D), Acción y Desarrollo Ecológico (A.D.E) y Univesidad del Estado de Morelos (U.A.E.M) 1a edición. p.79
- Domínguez, X.A.1988. Métodos de Investigación Fitoquímica. Cuarta Reimpresión Ed.Limusa, México. 281 p.
- Ferrán, Aranaz, M. 2001. SPSS para Windows. Análisis Estadísticos. Editorial Mcgraw-Hill Interamericana de España. Impreso en España. pp. 255-264.
- Finney, D.J. 1971. Probit Analysis. 3rd. ed. Cambridge University Press, London.
- Galindo, W., Rosales, M., Murgueitio, Larrahondo, J. 1989. Sustancias antinutricionales en las hojas de los árboles forrajeros. Livest Res, Rural Dev.1 (1): <http://www.cipav.org.com/lrrd/lrrd1/1/ Mauricio.htm>.

- García, D. E. 2003. Evaluación de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus. alba* (Linn). Tesis de Maestría, EEPF. Indio Hatuey, Matanzas, Cuba.
- Haraguchi, M., Gorniak, S.L., Ikeda, K., Minami, Y., Kato, A., Watson, A.A., Nash, R.J., Molyneux, R.J., Asano, N. 2003. Alkaloidal components in the poisonous plants, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). J. Agric Food Chem 51:4995-5000.
- Holley, A.R., Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiol. 22:273-292.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2005. Marco Geoestadístico Municipal, Prontuario de Información geográfica municipal de los Estados Unidos. Version 3.1.
- Jenett, Siems. K., Sonja, C., Schimming. T., Siem. K., Muller, F., Hilker, M., Witte, L., Hartmann, T., Austin, D., Eich, E. 2004. Phytochemistry and Chemotaxonomy of the Convolvulaceae Phytochemistry. 66: 223-231.
- Lagarto, A. Silva, R. Guerra, I., Iglesias, L. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extract. Phytomedicine 8:395-400.
- Lewan, L.M., Andersson and P. Morales- Gómez. 1992. ATLA 20, 297-301.
- Mackeen, M.M., Ali, A.M., Lajis, N.H., Kawazu, K., Hassan, Z., Amran, M., Mooi, LY, Mohamed, S.M. 2000. Antimicrobial, antioxidant, anti-tumour promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* Griff. Ex T. Ander. J Ethnopharmacol.72: 395-402.
- Martens, Galeotti,. 1845. Bull. Acad. Roy. Sci. Bruxelles 12:266. 1845. TYPE: Galeotti 1403 (BR, holotype not seen; P, presumed isotype). Pedunculos 3-12mm long; Mexico-Guatemala. Subsp. *Pauciflora*.
- Mc Laughlin, J.L., Chang, C.H., Smith, D.L.1998. Simple bioassay for the detection and isolation of bioactive natural products. Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy , School of Pharmacy and Pharmacal Sciences, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA.
- Méndez, M.C., Riet- Correa F. 2000. Plantas tóxicas e micotóxicosis. Pelotas, Editora e Gráfica Universitaria/UFPel. Laboratorio Regional de diagnostico Facultad de Veterinaria P. 112.
- Mercado-Hernández, R. y Santoyo-Stephano, M. 1998. Apuntes de Estadística II. Capítulo III-VI. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas.

- Meyer, B.M., Ferrigni, J.E., Putman, L.B., Jacobsen, D.E., Nichols, McLaughlin J.L. 1982. *Planta Médica* 45, 31-34.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N. R., Putman, J.E., Jacobsen, L.B., Nichol, D.E., McLaughlin, J.L. 1982. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica* 45:31-34.
- Molina-Salinas, G.M., 2001. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos metanólico y hexánico del clavo (*Eugenia caryophyllata*). UANLA. Fac. de Medicina Escuela de Graduados.
- Molyneux, R.J., McKenzie, R.A., O'Sullivan, B.M., Elbein, A.D. 1995. Identification of the glycosidase inhibitors swansonine and calystegine B2 in weir vine (*Ipomoea* sp) Q6 AFF calobra and correlation with toxicity. *J. Nat. Prod.* 58:878-886.
- Moreno, Chamú. E.; López, P. A. 2011. Uso medicinal del cazahuate (*Ipomoea murucoides* Roem. et Schult) Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Tlahui- Medic N. 32:
- Rauha, J.P., Remes, S., Heinone, M., Hopia, A., Kahkonen. M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P. 2000. Antimicrobial effects of finish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 56:3-12.
- Ríos, J.L., Recio, M.C. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 100: 80-84.
- Roemer, Schuites,. 1819. *Syst. Veg.* 4:248. Type: not determined (“ e horto valentino”).
- Roig, J.T.1974. *Plantas medicinales, aromaticas o venenosas de Cuba*. 2da edición. La Habana: Editorial Científico- Técnica.
- S.A.S. 2002. *User's guide statistics*. SAS Institute Inc., Cary. N.C, USA.
- Sarukhán, J. 1995. Diversidad biológica. *Revista de la Universidad Nacional Autónoma de México*, UNAM 536-537:3-10.
- Schultes, R.E., Von Reis, S. 1997. *Ethnobotany. Evolution of discipline*. Diocorides Press. Portland. p. 414.
- Solís, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P., Phillipson, J.D. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Plan. Méd.* 59:250-252.
- Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P, Phillipson, J.D. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. *Plant Med.* 59:2-250.

- Soto, J.C. 1987. Las plantas medicinales y su uso tradicional en la cuenca del Río Balsas; destados de Michoacán Guerrero. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 231.
- Stahl, E. 1969. Thin Layer chromatography, a Laboratory Handbook. Springer Verlag, Berlin. P.1041.
- Stephan, C.E. 1977. Methods for calculating in LC50, p. 65-84. In F. Mayer & J. Hamelink (eds). American society for testing and material (ASTM) aquatic toxicology and hazard evaluation. American Society for Testing and Materials (ASTM). Filadelfia, Pensilvania. EEUU.
- Taylor, J.B. (2000). Disposition of swansonine and its effects on nutrient metabolism in ruminants. PhD thesis, New México State University. Las cruces NM.
- Toledo, V.M., Becerra, R., Martínez E., Batis, A. I., Ramos, C.H. 1995. La selva útil; etnobotánica cuantitativa de los grupos indígenas el trópico húmedo de México. Interciencia. 20: 177-186.
- Valdés, I. O., Díaz, N. Cabranes y. Acevedo, M.E., Areces, A.J., Graña, L. 2003 Macroalgas de la plataforma insular cubana como fuente de extractos bioactivos. Aviccenia 16: 36-45.
- Vera curcio, L.G., Aranda, E.E.; Castillo, E.P., 2005. Estudio de la citodiferenciación y las respuestas morfogénicas de callos de *Ipomoea murucoides* Roem. et Schult (convulvaceae) y su potencial en la actividad insecticida. Centro de Investigación en Biotecnología. p. 1-3
- Yajes, R. 1997 Animal ethics committees and the implementation of the Three Rs. Animal alternatives, welfare and ethics. In: Van Zutphen, L.F.M., Balls, M., editors. Developments in Animal and Veterinary Sciences. Elsevier; p.367-371

CAPÍTULO III

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EXTRACTO METANÓLICO DE DOS *SPP* DE *Ipomoea* CON Y SIN POLIETILENGLICOL

3.1 RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar el grado de fermentación *in vitro* del extracto metanólico de dos especies de *Ipomoea* (*I. pauciflora* subsp. *pauciflora* e *I. murucoides*) y corroborar la presencia de taninos, mediante la técnica de producción de gas *in vitro* con y sin la adición de polietilenglicol (PEG), sobre distintas variables (DIVMS, DIVMO, cinética de producción de gas mL/g en base a MS, MO, MSD, MOD de 6 a 96 h, producción de AGV y concentración de bacterias ruminales totales). En el estudio se evaluaron cuatro concentraciones de cada extracto (0.0, 0.2, 0.4 y 0.8 g) agregándoles rastrojo de maíz para obtener una concentración total de 8.0 g de sustrato en cada tratamiento. La DIVMS y DIVMO presentaron un efecto lineal ascendente (positivo), es decir, hubo una mayor degradación de MS conforme la concentración de extracto incrementaba. La cinética de producción de gas mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) en las concentraciones evaluadas (0.2, 0.4 y 0.8 g), presentándose baja producción de gas conforme el extracto aumentaba. El ácido acético disminuyó en la concentración 0.8g de extracto, presentando diferencias ($P < 0.05$) en comparación con las otras concentraciones, situación contraria con el ácido butírico, el cual presentó un aumento en la concentración de 0.8 g. En la CBRT se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los diferentes tratamientos, disminuyendo la concentración de bacterias conforme los niveles de extracto aumentaban, resultados similares se obtuvieron en ambas especie de *Ipomoea*. En la comparación de las especies sin adicionar PEG, *I. pauciflora* presentó mayor producción de gas en las tres concentraciones (0.2, 0.4 y 0.8 g), así como un aumento en la producción de ácido acético en dos de las concentraciones (0.4 y 0.8 g), siendo similar con *I. murucoides* en los demás parámetros. Con la adición de PEG disminuyó la DIVMS y DIVMO en ambas especies, sin embargo la especie *I. murucoides* presentó un incremento en la producción de gas (en la concentración de 0.4 g) al comparar los porcentajes de incremento sin y con la adición de PEG, así como un aumento en la CBRT en comparación con *I. pauciflora*. Se determinó que ambas especies contienen taninos, sin embargo *I. murucoides* fue la que presentó mayor contenido en base a las respuestas de las variables evaluadas. Se concluye que los taninos están presentes en ambas especies de *Ipomoea*, responsables de afectar a los rebaños caprinos en temporada de

sequía causando diferentes signos clínicos que conllevan a presentar altos índices de morbilidad y mortalidad en la Mixteca baja de Oaxaca.

Palabras clave: AGV, CBRT, DIVMO, DIVMS, PEG, producción de gas, rumen.

3.1 ABSTRACT

The aim of this study was to determine *in vitro* fermentation of methanol extract in two species of *Ipomoea* (*I. pauciflora* subsp. *Pauciflora* and *I. murucoides*) and corroborate the presence of tannins, using the technique of *in vitro* gas production with and without the addition of polyethylenglycol (PEG), on different variables (IVDDM, IVDOM, gas production kinetics mL/g based on DM, OM, DDM, DOM of 6 to 96 h, VFA production and total rumen bacteria concentration). Four concentrations of each extract (0.0, 0.2, 0.4 and 0.8 g) were evaluated, adding corn stubble to obtain a total concentration of 8.0 g of substrate in each treatment. IVDDM and IVDOM showed an upward linear effect (positive), ie there was a greater degradation of DM as the extract concentration increased. The kinetics of gas production showed significant differences ($P<0.05$) in the tested concentrations (0.2, 0.4 and 0.8 g), with low gas production as the extract increased. The acetic acid decreased at concentration of 0.8 g, showing differences ($P<0.05$) compared to the other concentrations. The opposite situation occurred with butyric acid, which increased at concentration of 0.8 g. In the TRBC were significant differences ($P<0.05$) in the different treatments, reducing the concentration of bacteria as extract levels increased, similar results were obtained in both species of *Ipomoea*. When comparing both species without adding PEG, *I. pauciflora* showed higher gas production in the three concentrations (0.2, 0.4 and 0.8 g) and increased production of acetic acid in two concentrations (0.4 and 0.8 g), being similar to *I. murucoides* in others variables. IVDDM and IVDOM decreased with the addition of PEG in both species, however *I. murucoides* increased gas production (in concentration of 0.4 g) comparing percentages of increase with and without the addition of PEG and a TRBC compared to *I. pauciflora*. It was determined that both species contain tannins, however *I. murucoides* presented higher content of this allelochemical based on the responses of the variables evaluated. It was concluded that tannins are present in both species of *Ipomoea*, and this secondary metabolite is responsible for severe intoxication affecting goats in the dry season, causing different clinical signs leading to present high rates of morbidity and mortality in the Mixteca baja, Oaxaca.

Keywords: gas production, IVDDM, IVDOM, PEG, rumen, TRBC, VFA.

3.2 INTRODUCCIÓN

La utilización de arbustos y árboles forrajeros en la alimentación animal ha recibido considerable atención, ya que pueden constituir un potencial nutricional alternativo para los rumiantes, sobre todo en zonas áridas y semiáridas (Devendra, 1990). Sin embargo, esta ventaja se ve limitada debido a que las plantas han evolucionado, pero no para servir de alimento a los animales, más bien para asegurar su supervivencia y la diseminación de sus diferentes especies, adquiriendo la capacidad de sintetizar sustancias conocidas como factores antinutricionales (FAN) o también denominadas metabolitos secundarios (Lowry, 1990; Ramos *et al.*, 1998). Estos FAN abarcan numerosos compuestos químicos, elaborados por las plantas para prevenir su consumo por herbívoros, insectos, hongos, bacterias, virus (Van Soest, 1994); como protección contra la luz ultravioleta, desecación, entre otros (Ramos *et al.*, 1998). Las plantas concentran estos factores en sus diferentes tejidos vegetales de acuerdo a una estrategia de defensa, dependiendo de cuán importante es ese tejido para la planta en ese estado fisiológico, encontrándose mayores concentraciones en las hojas jóvenes, órganos reproductores y de dispersión (Ramos *et al.*, 1998; Harbone, 1999). La respuesta de los animales a la presencia de estos compuestos es variable y depende de la naturaleza de su sistema digestivo (rumiante o no rumiante), especie animal, edad, sexo, tamaño corporal, estado fisiológico (lactante, gestante), potencial genético y el ambiente (Barnes y Gustine, 1973). Las intoxicaciones de origen vegetal son muy frecuentes, en especial en zonas de cría extensiva, tal es el caso de la región Mixteca Baja de Oaxaca, en donde es común este tipo de explotación, principalmente con rebaños caprinos, donde la disponibilidad de alimentos varía con la época del año. La temporada de sequía (primavera-verano) es una época muy difícil ya que la escasez de la oferta de alimentos obliga a los caprinos a ingerir el rebrote de dos plantas tóxicas, identificadas en un estudio previo como *Ipomoea murucoides* e *Ipomoea pauciflora* subsp *pauciflora*, así como la presencia de diversos metabolitos secundario (taninos, alcaloides, flavonoides y terpenoides) en las hojas de estas plantas a partir de cuatro extractos (metanólico, hexánico, diclorometano y acuoso).

Los taninos se clasifican en dos grupos hidrolizables TH y condensados CT y sus efectos sobre los animales van desde benéficos a tóxicos, incluyendo la muerte (Nguyen *et al.*, 2005). Los hidrolizables son potencialmente tóxicos para rumiantes debido a las sustancias que originan cuando se degradan en el rumen, y aunque los condensados son considerados no tóxicos para este tipo de animales, pueden producir lesiones en la mucosa intestinal disminuyendo la absorción de

nutrientes, a la vez que forman complejos con carbohidratos, proteína endógena y productos microbianos, reduciendo de esta manera su absorción y asimilación; además, reducen la absorción de aminoácidos esenciales como la metionina y la lisina (Kumar and Singh, 1984; Reed, 1995). Unas de las metodologías aplicadas para contrarrestar el efecto de los taninos e identificar su actividad biológica es añadiendo PEG (Carulla *et al.*, 2001; Salem *et al.*, 2006; Silanikove *et al.*, 2006). El PEG es un polímero que posee gran cantidad de átomos de oxígeno capaces de formar enlaces de hidrogeno con los grupos hidroxil de los taninos. Los enlaces PEG-taninos son irreversibles en un amplio rango de pH, reemplazando la proteína y reduciendo la formación de nuevos complejos proteína-tanino (Silanikove *et al.*, 2006), obteniendo con ello un incremento en el consumo de MS al suministrar PEG a ovinos y caprinos (Salem *et al.*, 2006).

La técnica de producción de gas *in vitro* permite determinar los efectos de los compuestos secundarios (taninos) en la actividad microbiana ruminal, describir la cinética de fermentación, analizar efectos asociativos de diversos alimentos, examinar el efecto de aditivos en la fermentación ruminal (PEG) e identificar la composición de gases de la fermentación (Getachew *et al* 2005; Posada y Noruega, 2005). En este sentido y dado a que no se han encontrado referencias de estudios realizados con *Ipomoea murucoides* e *Ipomoea pauciflora* subsp *pauciflora* en la región de la Mixteca baja de Oaxaca, es necesario estudiar estas especies dada las recurrentes intoxicaciones de las cabras que consumen estos arbustos. El objetivo de esta investigación fue determinar el grado de afección *in vitro* por el extracto metanólico de dos especies de *Ipomoea* (*I. pauciflora* subsp. *pauciflora* e *I. murucoides*) y corroborar la presencia de taninos, mediante la técnica de producción de gas *in vitro* con y sin la adición de PEG, sobre distintos parámetros de degradación *in vitro* y cinética de producción de gas.

3.3 MATERIALES Y METODOS

Obtención del extracto y determinación de los metabolitos secundarios

Colecta e identificación de las especies

En mayo de 2011 (temporadas de sequía), se llevó a cabo la colecta de ramas tiernas (con hojas) de las dos especies de *Ipomoea* (*I. murucoides* e *I. pauciflora*, subsp. *pauciflora*). Los especímenes fueron colectados en su hábitat natural (cerros y orillas de carretera) en la comunidad de San Jorge el Zapote, Municipio de San Miguel Amatitlan, perteneciente a la región Mixteca baja de Oaxaca, ubicada a 17° 54' 49" de latitud norte y 97° 59' 47" de longitud oeste, a una altura de 1460 msnm. El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano, la precipitación promedio anual es de 450 a 600 mm, y la temperatura media anual es de 21°C con medias máximas y mínimas anuales de 26 y 16°C, respectivamente.

La identificación de las especies (ejemplares botánicos) se realizó en septiembre de 2011 en el herbario-hortorio (CHAPA) del Programa de Botánica, del Instituto de Recursos Naturales del Colegio de Postgraduados, campus Montecillos, Texcoco, Estado de México. Éstas fueron identificadas como *Ipomoea murucoides* e *Ipomoea pauciflora* (subsp. *pauciflora*), conocidas comúnmente como cazahuate blanco y negro respectivamente, pertenecientes a la familia Convolvulaceae.

Obtención de los extractos

En el laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Postgraduados se procedió a la obtención del extracto metanólico de las hojas de las dos especies de *Ipomoea*, mediante el siguiente procedimiento: Las ramas colectadas (mayo 2011) se secaron bajo sombra a temperatura ambiente por un periodo de 20 días. Posteriormente, se separaron las hojas de las ramas y se molieron en un molino Willey a una criba de 1mm. A partir del material previamente seco y molido se procedió a obtener el extracto metanólico de las dos especies de *Ipomoea*, utilizando como disolvente el metanol mediante el uso de una extracción en continuo en un equipo Soxhlet. Técnica que consiste en usar un disolvente (líquido capaz de disolver otra sustancia) para liberar y solubilizar los metabolitos secundarios de la misma polaridad del disolvente. Finalmente, el extracto sólido se depositó en un frasco previamente pesado, y de esta manera, se conoció la concentración obtenida en 10 g de muestra seca. Del procedimiento anterior se partió para

obtener las concentraciones del extracto necesario para llevar a cabo la técnica de producción de gas *in vitro*.

Estudio fitoquímico

La presencia de taninos en este extracto (metanólico) se realizó con un estudio fitoquímico mediante cromatografía en capa fina (CCF), la cual permitió hacer separaciones de las fracciones de metabolitos secundarios presentes en este extracto, mostrando alto contenido de taninos (+++) (Stahl, 1969; Domínguez, 1988).

Fermentación ruminal *in vitro*

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Nutrición Animal, perteneciente al programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados campus Montecillo, Texcoco, Estado de México.

Tratamientos

Para determinar el grado de afección del extracto metanólico (presencia de taninos) en el rumen de las dos especies de *Ipomoea* (*I. murucoides* e *I. pauciflora*, subsp *pauciflora*), se procedió a utilizar la técnica de producción de gas *in vitro* (Getachew *et al.* 2005), en conjunto con un agente inhibidor (Polietilenglycol 6000) (Theodorus *et al.* 1994; Makkar *et al.* 1995; Getachew *et al.* 1998). Se evaluaron cuatro concentraciones de cada extracto (0.0, 0.2, 0.4 y 0.8 g), agregando lo equivalente de rastrojo de maíz (previamente molido) para obtener una concentración total de 8.0 g de sustrato en cada tratamiento, sin y con la adición de PEG, depositándolos en viales serológicos (capacidad de 100 mL).

La concentración de PEG que se agregó a cada vial fue una proporción doble al extracto. Quedando los tratamientos de la siguiente manera tanto para la especie *I. pauciflora* e *I. murucoides*.

Extracto (g): Rastrojo de maíz (g) = (0 0: 0.8) – (0.2: 0.6) – (0.4: 0.4)- (0.8: 0.0)

Extracto (g): Rastrojo de maíz: PEG = (0 0:0.8:0.0) – (0.2:0.6:0.4) – (0.4: 0.4:0.8)- (0.8: 0.0:1.6)

Cada uno de los tratamientos se repitió cuatro veces en cuatro periodos realizados con sus respectivos blancos (12 blancos por periodo).

Preparación de la solución mineral reducida (tampón)

Los componentes principales para la preparación del medio de cultivo fueron: solución buffer, solución de macrominerales, solución microminerales, solución reductora, resarzurina, agua destilada y líquido ruminal (Menke y Steingass 1988). Antes de llevar a cabo el método de infusión en los viales de 100mL, se realizó de manera homogénea la mezcla de los compuestos previamente preparados del medio de cultivo en un matraz bola (6000 mL), el cual se mantuvo bajo flujo continuo de CO₂ en una placa de calentamiento a 39°C y en constante agitación mediante un agitador magnético (Thermo). La composición exacta del medio de cultivo se describe en la tabla 3, la cual está calculada para la preparación de 100 viales (40mL de medio para cada vial).

Tabla. 3. Composición del medio de cultivo usado para medir la producción de gas mL/g (MS, MO, MSD, MOD), degradación de MS y MO, producción de AGV y concentración de bacterias ruminales totales con y sin la adición de PEG.

Cantidad 4000 mL de medio		
Compuesto	Unidad	Cantidad
Agua destilada	mL	1,331.45
Líquido ruminal ⁽¹⁾	mL	1,333.33
Rumen buffer ⁽²⁾	mL	665.73
Macromineral ⁽³⁾	mL	665.73
Solución reductora ⁽⁴⁾	mL	133.33
Micromineral ⁽⁵⁾	mL	0.34
Resarzurina	mL	3.43
Rastrojo de maíz	-	-
<i>Ipomoea murucoides</i>	-	-
<i>Ipomoea pauciflora</i>	-	-
PEG	-	-

⁽¹⁾Líquido ruminal previamente filtrado en una gasa triple; ⁽²⁾ Conteniendo 2.6gNH₄HCO₃; 23.3 g NaHCO₃; 665.7 mL agua destilada. ⁽³⁾3.79g Na₂HPO₄;4.12g KH₂PO₄;0.39gMgSO₄.7H₂O. ⁽⁴⁾0.76g Na₂SO₄;5.33mLNaOH;133.33mL agua destilada.

⁽⁵⁾CaCl₂.2 H₂O;MnCl₂.4H₂O;CoCL₂.6H₂O;FeCl₃.

Obtención del líquido ruminal

El líquido ruminal “fresco” se obtuvo de cuatro cabras, cruce de Alpino francesa y Saanen canuladas en el rumen, destinadas a la producción de leche, las cuales fueron alimentadas 30 días con rastrojo de maíz , simulando de esta manera la alimentación que consumen las cabras en la región Mixteca baja de Oaxaca en temporada de sequía. La extracción del líquido ruminal se realizó de 8:00 a 9:00 am a través de las cánulas con ayuda de una manguera de 1.5 cm de diámetro y 80 cm de largo en forma de Y. El líquido ruminal se filtró en una tela de manta de cielo, doblada en cuatro para eliminar partículas grades de alimento depositándolo en un termo precalentado a 39°C para ser transportado al laboratorio.

El líquido ruminal fresco se adicionó inmediatamente al medio de cultivo (solución mineral reducida) previamente elaborado, mantenida a temperatura de 39°C con infusión de CO₂,

logrando con ello una mezcla homogénea (Menke and Steingass 1988). Con la preparación del inóculo ruminal (mezcla del líquido ruminal y solución mineral reducida) se administró 40 mL de inóculo ruminal en los viales serológicos, conteniendo los diferentes tratamientos.

Método de infusión

En los viales serológicos con los tratamientos y repeticiones, se adicionaron 40 mL del medio de cultivo bajo flujo de CO₂, incluyendo doce viales como blancos con inóculo ruminal (líquido ruminal + solución mineral reducida) sin tratamiento. Antes de sellar los viales con tapones de goma y arillo de aluminio se continuó con el flujo de CO₂ para asegurar la anaerobiosis. Cada uno de los viales fueron incubados a baño maría a 39°C, para optimizar el control de la temperatura y la pérdida de agua, el baño maría se cubrió con un plástico color negro. Al momento de colocar las muestras en baño maría, se empezó a contar el tiempo cero de incubación.

Mediciones de la producción de gas *in vitro*

Los tiempos de medición post-incubación fueron en seis horarios, a las 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas mediante la medición de gas por desplazamiento de agua (Fedorak y Hruday, 1983), a través de un equipo integrado por soporte universal, embudo de vidrio y una bureta (50 mL) de manera inversa, conectados por una manguera de latex de 1.5 m de largo por 9 mm de diámetro, los cuales contenían agua destilada manteniéndose en equilibrio para que el agua de la bureta se encontrara en la línea cero.

Cinética de producción de gas

Se evaluó la cinética de producción de gas *in vitro* (desde las 6 hasta las 96 h de incubación) ajustándola a la ecuación exponencial $y = a + b(1 - \exp^{-ct})$ (Orskov y McDonald, 1979) donde:

y = Producción de gas en el tiempo t

a, b = Constantes de la ecuación

c = tasa de producción de gas

Concentración de ácidos grasos volátiles (AGV)

La concentración de AGV a las 96 h de incubación se midió por cromatografía de gases. De cada vial con 96h de incubación, se tomaron muestras de fluido y se depositaron en tubos ependorf (5 mL), para mezclarse con ácido metafosfórico (al 25%) en proporción 4:1 mL (muestra: ácido metafosfórico). Las muestras se centrifugaron 15 mn a 12 000 rpm y del sobrenadante se tomaron alícuotas de 1.5 mL para depositarse en viales para cromatografía, siendo almacenados en refrigeración (3°C) hasta su análisis.

La concentración de AGV de las muestras se determinó con un cromatógrafo marca Hewlett Packard, modelo HP3398A series GC Chemstation con automuestrador y conductor de ionización de flama. El gas nitrógeno fue usado como acarreador con flujo de aire de 400mL min⁻¹ e hidrógeno 35 mL min⁻¹ con una temperatura de inyector y detector de 210°C de horno inicial a 95°C y final 155°C; dando un tiempo total de corrida de 6 min. Con dichas condiciones se caracterizaron tres picos, con un tiempo de retención de 3.25, 3.75 y 4.28 para los ácidos acético, propiónico y butírico, respectivamente. El proceso de calibración del estándar de AGV se realizó por triplicado.

Conteo de bacterias ruminales totales

La concentración de bacterias ruminales totales se midió a las 96 h de incubación, por medio de diluciones en tubos de ensaye, una cámara Petroff-Hausser (Halisser Scientific®) y un microscopio marca Olympus® (modelo BX51) a una magnificación de 100x con PH3. El conteo se realizó en la cuadrícula central de la cámara con un área de 0.05mm² y profundidad de 0.02 mm, para determinar la concentración de bacterias mL⁻¹ se consideró el promedio de bacterias observado en la cuadrícula, el factor de dilución de la muestra y el factor de la cámara de 2×10^7 (Madigan et al., 2002). La fórmula para estimar la concentración de bacterias ruminales totales por mL de medio de cultivo fue la siguiente:

$$\text{Bacterias totales mL}^{-1} = (X) (FD) (2 \times 10^7)$$

Donde:

X: Promedio de bacterias de los cuadros de la cámara Petroff-Hausser

FD: Valor inverso de la dilución usada

2×10^7 : Volumen de la cámara Petroff-Hausser

Degradación *in vitro* de la MS

Al término de la incubación, se depositó el medio de cultivo de cada uno de los viales en tubos ependorf de 50 mL (previamente pesados), los cuales se centrifugaron dos veces por 15 min a 12,000 rpm, enjuagándose bien con agua destilada. El sobrenadante de los tubos se decantó sin eliminar la parte sólida, colocándolos en una estufa de secado a 60°C por 48 h para eliminar el contenido de humedad. Finalmente, se pesaron los tubos con la materia seca residual (estabilizando previamente a peso constante cada tubo en un desecador) y por diferencia de peso inicial y final (del tubo y la muestra) se determinó la degradación de la materia seca (Argyle and Hespell, 1987). La fórmula utilizada para calcular el % de degradación *in vitro* de la MS fue la siguiente: % de DIVMS = (peso inicial – peso final / peso inicial) x 100

Análisis estadístico

Para la producción de gas *in vitro* se usó un diseño completamente al azar con 16 repeticiones por tratamiento, realizado en 4 periodos. Las unidades experimentales fueron los biodigestores a los cuales se les midió la producción de gas, distribuyéndolos en forma aleatoria a los tratamientos.

El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \delta_i + d_{ij} + t_k + (\delta t)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta del i-ésimo tratamiento, en la j-ésima repetición, en el K-ésimo periodo

μ = Media general

δ_i = Efecto fijo del i-ésimo tratamiento

d_{ij} = Efecto aleatorio asociado con el j-ésimo biodigestor en el i-ésimo tratamiento

t_k = Efecto fijo del k-ésimo periodo

$(\delta t)_{ij}$ = Efecto fijo de la interacción del i-ésimo tratamiento en el k-ésimo periodo

ϵ_{ijk} = Error aleatorio con el j-ésimo biodigestor en el i-ésimo tratamiento al k-ésimo periodo.

El desplazamiento (para medir la producción de gas) se analizó considerando el efecto del tiempo y tratamiento, mediante el procedimiento GLM de SAS (2002), usando la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) (Steel y Torrie, 1988) para la comparación de medias.

Para efectos de comparar los incrementos (%) en la producción de gas en las especies tratadas con PEG respecto a las no tratadas a las 96 horas de incubación se utilizó la fórmula propuesta por Khazaal *et al.* (1994):

$$\text{Incremento (\%)} = \frac{\text{Volumen de gas con PEG} - \text{Volumen de gas sin PEG}}{\text{volumen de gas sin PEG}} \times 100$$

La comparación de medias que se realizó fue mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) (Steel y Torrie, 1988)

La producción de AGV, concentración de bacterias ruminales totales y degradación de MS -MO (medidas a las 96 h de incubación) se analizaron con el procedimiento GLM de SAS (2002) y la comparación de medias se hizo mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) (Steel y Torrie, 1988).

La cinética de producción de gas (desde las 6 horas de incubación) fue descrita ajustándose a la ecuación exponencial (Orskov y Mc Donald, 1979) donde:

$$y = a + b(1 - \exp(-ct))$$

y = Producción de gas en el tiempo t

a, b = Constantes de la ecuación

c = Tasa de producción de gas

3.4 RESULTADOS

DIVMS, DIVMO y producción de gas (mL/g MS, MO, MSD y MOD)

(Ipomoea pauciflora sin la adición de PEG)

(Tabla 3.1).

La degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y materia orgánica (DIVMO), presentaron un efecto lineal ascendente, es decir, hubo una mayor degradación de la materia, conforme se incrementó la concentración del extracto (0, 0.2, 0.4 y 0.8 g). La producción de gas en base a materia seca (mL/g MS) y materia orgánica (mL/g MO), presentaron a las 6 y 12 h un efecto lineal ascendente en las primeras tres concentraciones del extracto (0, 0.2 y 0.4 g), a excepción de la última concentración (0.8 g), la cual se mantuvo al mismo nivel que la concentración 0.4 g. Sin embargo, a las 24, 48, 72 y 96 h se observó en las primeras tres concentraciones (0, 0.2 y 0.4 g) una producción de gas constante, disminuyendo en la última concentración (0.8 g). La producción de gas en materia seca degradable (mL/g MSD) y materia orgánica degradable (mL/g MOD) se observó a las 6 y 12 h un efecto lineal ascendente en las tres primeras concentraciones de extracto (0, 0.2, 0.4 g), disminuyendo la producción en la última concentración (0.8 g), sin embargo a las de las 24 a 96 h disminuyó la producción de gas conforme la concentración del extracto aumentó. La cinética de producción de gas *in vitro* mL/g MS (desde 6 a 96 h), presentó diferencias ($P < 0.05$) entre los tratamientos, mostrando a la concentración más alta de extracto (0.8 g) con menor producción de gas y la concentración más baja (0.2 g) mostró una mayor producción de gas. No hubo diferencias ($P > 0.05$) entre el testigo y la concentración 0.4 g de extracto. La cinética de producción de gas *in vitro* mL/g MO, mL/g MSD 3) y mL/g MOD desde 6 a 96 h, mostraron las mismas diferencias significativas en los tratamientos, con menor producción de gas ($P < 0.05$) en la concentración más alta de extracto (0.8 g) y una mayor producción ($P < 0.05$) en la concentración más baja de extracto (0.2 g) y el testigo (0 g).

DIVMS, DIVMO y producción de gas (mL/g MS, MO, MSD y MOD)

(Ipomoea pauciflora con la adición de PEG)

(Tabla 3.2).

La degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y materia orgánica (DIVMO), presentaron un efecto lineal ascendente, presentando una mayor degradación de la materia, conforme se incrementaba la concentración del extracto (0, 0.2, 0.4 y 0.8 g).

La producción de gas en base a materia seca (mL/g MS) y materia orgánica (mL/g MO), presentaron un efecto lineal ascendente a las 6 y 12 h en las cuatro concentraciones del extracto (0, 0.2 y 0.4 y 0.8g). Sin embargo a las 24, 48 y 72 h se observó en las tres últimas concentraciones un efecto lineal descendente. En lo que respecta a las 96 h se presentó un efecto lineal ascendente en las tres primeras concentraciones de extracto (0, 0.2, 0.4 g) a excepción de la última concentración (0.8 g) la cual mostró una baja producción. En la producción de gas en materia seca degradable (mL/g MSD), se observó un efecto lineal ascendente a las 6 h en las cuatro concentraciones de extracto (0, 0.2, 0.4 y 0.8 g), similar efecto se presentó a las 12 h a excepción de la última concentración (0.8 g), la cual se mantuvo uniforme. A las 24, 48, 72 y 96 h la producción de gas presentó un efecto lineal descendente en las últimas tres concentraciones (0.2, 0.4 y 0.8 g), se incrementó la concentración de extracto y la producción de gas disminuyó. Referente a la producción de gas en materia orgánica degradable (mL/g MOD) se presentó un efecto lineal ascendente a las 6 h en las primeras tres concentraciones, manteniéndose uniforme en la última (0.8 g), similar fue a las 12 h con respecto a las primeras tres concentraciones a excepción de la última (0.8 g), en la cual la producción de gas disminuyó. El comportamiento de la producción de gas a las 24, 48, 72 y 96 fue similar a la materia seca degradable (mL/g MSD) descrita anteriormente. La cinética de producción de gas *in vitro* mL/g MS, mL/g MO, mL/g MSD y mL/g MOD presentaron (desde 6 a 96 h), diferencias ($P < 0.05$) entre los tratamientos, mostrando que el testigo (0 g) y la concentración más alta de extracto (0.8 g) tuvieron la menor producción de gas, situación contraria a la concentración 0.2 y 0.4 g.

DIVMS, DIVMO, producción de gas mL/g MS, MO, MSD y MOD

(*Ipomoea murucoides* sin la adición de PEG)

(Tabla 3.4)

La degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y materia orgánica (DIVMO), presentaron efecto lineal ascendente, con mayor degradación de la materia, conforme se incrementaba la concentración del extracto (0, 0.2, 0.4 y 0.8 g). La producción de gas en base a materia seca

(mL/g MS) presentó un efecto lineal ascendente a las 6 h en las primeras tres concentraciones del extracto (0, 0.2 y 0.4).seguido de una producción baja en la última concentración (0.8 g), observándose a las 12 h un efecto lineal ascendente en las cuatro concentraciones (0, 0.2, 0.4 y 0.8 g), contrariamente a las 24 h hubo efecto lineal descendente en las últimas concentraciones, sin embargo, de las 48 a 96 h hubo efecto lineal en las últimas tres concentraciones (0.2, 0.4 y 0.8 g). La producción de gas en base a materia orgánica (mL/g MO), presentó el mismo efecto que en base a materia seca a las 6 h, sin embargo a las 12 h la producción de gas se mantuvo uniforme en las cuatro concentraciones y a las 24, 48, 72 y 96 h la producción de gas tuvo un efecto lineal descendente en las cuatro concentraciones.

Respecto a la producción de gas en materia seca degradable (mL/g MSD) y materia orgánica degradable (mL/g MOD) se observó un efecto lineal ascendente a las 6 h en las tres primeras concentraciones de extracto (0, 0.2, 0.4 g) a excepción de la última concentración (0.8 g) la cual mostró una producción menor de gas. Se observó un efecto lineal descendente a las 12, 24, 48,72 y 96 h en las cuatro concentraciones (0, 0.2, 0.4 y 0.8), es decir con el incremento en la concentración de extracto, disminuyó la producción de gas. La cinética de producción de gas *in vitro* mL/g MS (fig. 13) y mL/g MO, mostraron diferencias significativas ($P<0.05$) en las tres concentraciones de extracto (0.2, 0.4 y 0.8 g), presentándose menor producción de gas conforme la concentración de extracto aumentaba, siendo la concentración 0.8 g de extracto la que reflejó menor producción de gas. Situación similar se presentó en la cinética de producción de gas *in vitro* mL/g MSD y mL/g MOD, con diferencias significativas ($P<0.05$) en las diferentes concentraciones de los extractos (0.0, 0.2, 0.4 y 0.8 g), presentando menor producción de gas la concentración más alta de extracto (0.8 g) y mayor producción el testigo seguida de la concentración 0.2 g.

DIVMS, DIVMO y producción de gas (mL/g MS, MO, MSD y MOD)

(Comparación de *Ipomoea pauciflora* con y sin la adición de PEG)

(Tabla 3.3).

La degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y materia orgánica (DIVMO), presentaron diferencias ($P<0.05$) en la última concentración (0.8 g), mostrando mayor degradación de materia en el tratamiento sin PEG. La concentración más alta de extracto (0.8 g) con PEG (6, 12, 48,72 y

96 h) presentó mayor producción de gas ($P<0.05$), similar situación se presentó en producción de gas en base a materia orgánica (mL/g MO) a las 6, 12, 24, 48 y 96 h de incubación. La producción de gas en materia seca degradable (mL/g MSD) y materia orgánica degradable (mL/g MOD) el tratamiento con PEG presentó mayor producción de gas ($P<0.05$), únicamente en la concentración más alta de extracto (0.8 g) en las diferentes horas. La comparación de la cinética de producción de gas entre *I. pauciflora* con y sin PEG, en base a mL/g MS y mL/g MO (fig. 10), hubo diferencias significativas ($P<0.05$) en la concentración 0.4 y 0.8 g de extracto, mostrando mayor producción de gas en los tratamientos con PEG. Respecto a la cinética de producción de gas mL/g MSD y mL/g MOD hubo diferencias significativas ($P<0.05$) en la concentración 0.2, 0.4 y 0.8 g de extracto, reflejando un aumento de producción de gas en los tratamientos con PEG.

DIVMS, DIVMO, producción de gas mL/g MS, MO, MSD y MOD
(*Ipomoea murucoides* con la adición de PEG)

(Tabla 3.5)

La degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y materia orgánica (DIVMO) con la adición de PEG, presentaron un efecto lineal ascendente (positivo), presentando una mayor degradación de la materia, conforme se incrementaba la concentración del extracto (0, 0.2, 0.4 y 0.8 g).

La producción de gas en base a materia seca (mL/g MS) y materia orgánica (mL/g MO), presentaron a las 6 y 12 h un efecto lineal ascendente (positivo) en las cuatro concentraciones del extracto (0, 0.2 y 0.4 y 0.8 g), situación contraria que se presenta a las 24 h con un efecto lineal descendente (negativo) en las primeras tres concentraciones (0, 0.2 y 0.4), manteniéndose este mismo efecto a las 48 h en las cuatro concentraciones y a las 72 y 96 h sólo se presentó el mismo efecto en las últimas tres concentraciones (0.2, 0.4 y 0.8 g).

En cuanto a la producción de gas en materia seca degradable (mL/g MSD), se observó un efecto lineal ascendente (positivo) a las 6 h en las cuatro concentraciones de extracto (0, 0.2, 0.4 y 0.8 g), presentando a las 12 h una producción de gas uniforme en las cuatro concentraciones, sin embargo, a las 24 y 48 h se observó un efecto lineal descendente (negativo) en las mismas concentraciones y a las 72 y 92 h se presentó el mismo efecto pero con las últimas tres concentraciones (0.2, 0.4 y 0.8).

En lo que respecta a la producción de gas en materia orgánica degradable (mL/g MOD) se presentó un efecto lineal ascendente (positivo) a las 6 h en las primeras tres concentraciones (0, 0.2, 0.4 g), manteniéndose uniforme en la última (0.8 g), sin embargo, a las 12, 24, 48, 72 y 96 h la producción de gas presentó un efecto lineal descendente (negativo) disminuyendo la producción de gas conforme aumentaba la concentración del extracto. La cinética de producción de gas *in vitro* mL/g MS (fig. 17), mL/g MO (fig. 18) y mL/g MSD, mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en las tres concentraciones de extracto (0.2, 0.4 y 0.8 g), disminuyendo la producción de gas conforme aumentaba la concentración del extracto, siendo la concentración 0.8 g de extracto la que reflejó menor producción de gas. La cinética de producción de gas *in vitro* mL/g MOD (fig. 20), se observó en las cuatro concentraciones (0.0, 0.2, 0.4 y 0.8 g), diferencias ($P < 0.05$), presentando una mayor producción de gas el testigo y una menor producción la concentración más alta de extracto (0.8 g).

DIVMS, DIVMO y producción de gas (mL/g MS, MO, MSD y MOD)

(Comparación de *Ipomoea murucoides* con y sin la adición de PEG)

(Tabla 3.6).

La degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y materia orgánica (DIVMO), mostraron tener diferencias ($P < 0.05$) en las tres concentraciones (0.2, 0.4, 0.8 g), presentando mayor degradación los tratamientos sin PEG. En cuanto a la producción de gas en base a materia seca (mL/g MS) y materia orgánica (mL/g MO) a las 6 y 12 horas en la última concentración (0.8g) y a las 24, 48, 72 y 96 h en las dos últimas concentraciones (0.4 y 0.8 g) se presentó mayor producción de gas en los tratamientos que se les adicionó PEG ($P < 0.05$).

Referente a la producción de gas en materia seca degradable (mL/g MSD) y materia orgánica degradable (mL/g MOD) mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) a las 6 y 12 h (0.8 g de extracto), 24 y 48 h (0.2, 0.4 y 0.8 g de extracto), 72 y 96 h (0.4 y 08 g de extracto), presentado mayor producción de gas los tratamientos que se les adicionó PEG.

Al realizar la comparación de la cinética de producción de gas entre *I. murucoides* con y sin PEG, en base a mL/g MS (fig. 21), mL/g MO (fig. 22), mL/g MSD (fig. 23) y mL/g MOD (fig. 24), se

observó diferencias ($P < 0.05$) entre las concentraciones (0.2, 0.4 y 0.8 g), presentando mayor producción de gas los tratamientos que se les adiciono PEG.

DIVMS, DIVMO y producción de gas (mL/g MS, MO, MSD y MOD)

(Comparación entre *Ipomoea pauciflora* e *Ipomoea murucoides* sin la adición de PEG)

(Tabla 3.7).

I. murucoides e *I. pauciflora* sin la adición de PEG mostraron en la degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y materia orgánica (DIVMO), tener diferencias ($P < 0.05$) en las concentraciones 0.2 y 0.4 g de extracto, presentando *I. murucoides* una mayor degradación de materia, sin embargo en la concentración 0.8 g de extracto fue *I. pauciflora* quien presentó mayor degradación ($P < 0.05$). En cuanto a la producción de gas en base a materia orgánica (mL/g MO), materia seca degradable (mL/g MSD) y materia orgánica degradable (mL/g MOD) hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) a las 12, 24 (0.2, 0.4 g de extracto), 48, 72 y 96 h (0.4 g de extracto), presentando *I. pauciflora* una mayor producción de gas. Misma situación se presentó en la producción de gas en base a materia seca (mL/g MS), completando que a las 24 h *I. pauciflora* reflejó mayor ($P < 0.05$) producción de gas en la concentración 0.8 g de extracto.

Al realizar la comparación de la cinética de producción de gas entre *I. pauciflora* e *I. murucoides* sin la adición de PEG en mL/g MS (fig. 25) y mL/g MO (fig. 26), se observó que con las mismas concentraciones de cada extracto (0.2, 0.4 y 0.8 g), la producción de gas fue mayor ($P < 0.05$) en *I. pauciflora*. Situación similar se presentó con la producción de gas en mL/g MSD (fig. 27) y mL/g MOD (fig. 28), pero con las concentraciones 0.2 y 0.4g de extracto, reflejándose nuevamente una mayor ($P < 0.05$) producción de gas con la especie *I. pauciflora*, no existiendo diferencias ($P > 0.05$) en la concentración más alta (0.8 g) y en los testigos.

DIVMS, DIVMO y producción de gas (mL/g MS, MO, MSD y MOD)

(Comparación entre *Ipomoea pauciflora* e *Ipomoea murucoides* con la adición de PEG)

(Tabla 3.8).

Las especies *I. muruoides* e *I. pauciflora* ambas con la adición de PEG no presentaron diferencias ($P>0.05$) en la degradación *in vitro* de materia seca (DIVMS) y materia orgánica (DIVMO).

Respecto a la producción de gas en base a materia seca (mL/g MS), materia orgánica (mL/g MO), materia seca degradable (mL/g MSD) y materia orgánica degradable (mL/g MOD) hubo diferencias significativas ($P<0.05$) a las 12, 24 (0.2, 0.4 y 0.8 g de extracto), 48, 72 y 96 h (0.4 y 0.8 g de extracto), presentando *I. pauciflora* una mayor producción de gas. La comparación de la cinética de producción de gas entre *I. pauciflora* e *I. muruoides* con la adición de PEG en mL/g MS, mL/g MO (fig. 30), mL/g MSD (fig. 31) y mL/g MOD (fig. 32), mostraron que con la concentración más baja de extracto (0.2 g), no hubo diferencias ($P>0.05$), sin embargo con las concentraciones 0.4 y 0.8 g si se reflejaron diferencias ($P<0.05$), presentando mayor producción de gas *I. pauciflora*.

Tabla 3.1

DIVMS, DIVMO, producción de gas en base a MS, MO, MSD y MOD (mL/g) y sus parámetros cinéticos en cuatro concentraciones de *Ipomoea pauciflora* sin la adición de PEG

	TRATAMIENTOS					EFECTO			
	Testigo					ESM	Lineal	Cuadrático	Cúbico
	T1s	T2s	T3s	T4s					
<i>Ipomoea pauciflora</i> (g)	0	0.2	0.4	0.8					
Rastrojo de maíz (g)	0.8	0.6	0.4	0					
DIVMS (g)	0.34 d	0.36 c	0.39 b	0.56 a	0.002	< .0001	< .0001	< .0001	
%	42.5	45.0	48.8	70.0					
DIVMO (g)	0.28 d	0.31 c	0.36 b	0.56 a	0.002	< .0001	< .0001	< .0001	
%	35.0	38.8	45.0	70.0					
Producción de gas (mL/g MS)									
6 h	26.07 c	49.59 b	56.54 a	54.20 ab	1.56	< .0001	< .0001	0.3024	
12 h	66.90 b	85.34 a	91.78 a	84.89 a	2.92	< .0001	< .0001	0.9183	
24 h	122.62 a	131.21 a	123.09 a	102.84 b	3.94	0.0003	0.0005	0.7948	
48 h	167.43 a	174.54 a	162.38 a	117.43 b	6.05	< .0001	< .0001	0.6194	
72 h	186.24 a	192.01 a	182.69 a	129.44 b	6.69	< .0001	< .0001	0.3394	
96 h	196.25 a	201.12 a	193.26 a	137.43 b	6.63	< .0001	< .0001	0.2399	
<i>Parámetros cinéticos</i>									
<i>a + b</i>	196.80 b	200.76 a	197.66 b	133.30 c	1.22				
<i>C</i>	0.04	0.04	0.03	0.04					
Producción de gas (mL/g MO)									
6 h	28.358 c	52.710 b	58.836 a	54.20 ab	1.62	< .0001	< .0001	0.3079	
12 h	72.754 b	90.698 a	95.497 a	84.89 a	3.02	0.0038	<.0001	0.8695	
24 h	133.344 a	139.456 a	128.071 a	102.84 b	4.07	< .0001	0.0003	0.8416	
48 h	182.079 a	185.496 a	168.954 a	117.43 b	6.32	< .0001	< .0001	0.5976	

72 h	202.532 a	204.066 a	190.081 a	129.44 b	6.98	< .0001	< .0001	0.3228
96 h	213.416 a	213.754 a	201.086 a	137.43 b	6.91	< .0001	< .0001	0.2243
<i>Parámetros cinéticos</i>								
<i>a + b</i>	214.01 ab	215.99 a	205.66 b	133.30 c	1.37			
<i>C</i>	0.04	0.04	0.06	0.04				
Producción de gas (mL/g MSD)								
6 h	57.54 c	105.42 a	111.18 a	77.45 b	2.96	<.0001	< .0001	0.8435
12 h	147.66 b	181.41 a	180.43 a	121.26 c	5.69	0 .0026	< .0001	0.3599
24 h	270.72 a	278.91 a	242.01 b	146.91 c	7.17	< .0001	< .0001	0.6845
48 h	369.69 a	371.18 a	319.21 b	167.74 c	11.78	< .0001	< .0001	0.3858
72 h	411.23 a	408.33 a	359.09 b	184.88 c	12.96	< .0001	< .0001	0.1802
96 h	433.33 a	427.73 ab	379.90 b	196.32 c	12.80	< .0001	< .0001	0.1075
<i>Parámetros cinéticos</i>								
<i>a + b</i>	434.56 a	432.25 ^a	388.50 b	190.42 c	3.24			
<i>C</i>	0.04	0.04	0.03	0.04				
Producción de gas (mL/g MOD)								
6 h	69.94 b	120.733 a	120.39 a	77.54 b	3.32	< .0001	< .0001	0.5649
12 h	179.48 b	207.75 a	195.38 ab	121.40 c	6.49	< .0001	< .0001	0.4733
24 h	329.04 a	319.47 a	262.06 b	147.07 c	8.00	< .0001	< .0001	0.7867
48 h	449.35 a	425.24 a	345.64 b	167.91 c	13.34	< .0001	< .0001	0.4776
72 h	499.84 a	467.79 a	388.82 b	185.08 c	14.64	< .0001	< .0001	0.2391
96 h	526.71 a	489.99 a	411.36 b	196.53 c	14.44	< .0001	< .0001	0.1497
<i>Parámetros cinéticos</i>								
<i>a + b</i>	528.20 a	495.21 a	420.67 b	190.62 c	4.05			
<i>C</i>	0.04	0.04	0.03	0.04				

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma fila son diferentes (P<0.05); DIVMS =degradación *in vitro* de materia seca; DIVMO= degradación *in vitro* de materia orgánica; MS: materia seca; MO: materia orgánica; MSD: materia seca degradada, MOD: materia orgánica degradada; PEG: Polietilenglycol.

a+b: Potencial de producción de gas (mL/g), c: tasa fraccional de producción de gas por hora.
 ESM: Error estándar de la media.

Tabla 3.2. DIVMS, DIVMO, producción de gas en base a MS, MO, MSD y MOD (mL/g) y sus parámetros cinéticos en cuatro concentraciones de *Ipomoea pauciflora* con la adición de PEG

	TRATAMIENTOS				EEM	EFECTO		
	Testigo					Lineal	Cuadrático	Cúbico
	T1c	T2c	T3c	T4c				
<i>Ipomoea pauciflora</i> (g)	0	0.2	0.4	0.8				
Rastrojo de maíz (g)	0.8	0.6	0.4	0				
PEG (g)	0	0.4	0.8	1.6				
DIVMS (g)	0.34 d	0.35 c	0.39 b	0.44 a	0.002	< .0001	< .0001	0.0602
%	42.5	43.8	48.8	55				
DIVMO (g)	0.28 d	0.31 c	0.36 b	0.44 a	0.002	< .0001	< .0001	0.7159
%	42.5	45.0	48.8	55				
Producción de gas (mL/g MS)								
6 h	27.42 d	50.40 c	61.71 b	69.07 a	1.58	< .0001	< .0001	0.2821
12 h	65.42 c	86.80 b	97.32 a	103.87 a	2.10	< .0001	0.0008	0.4671
24 h	122.57 b	140.72 a	133.25 ab	127.96 b	2.87	< .0001	0.0001	0.035
48 h	157.38 cb	182.16 a	173.74 ab	143.97 c	4.98	0.0328	< .0001	0.5966
72 h	171.18 b	198.09 a	197.09 a	158.65 b	5.48	< .0001	< .0001	0.6983
96 h	180.38 b	205.69 a	213.02 a	168.92 b	5.04	< .0001	< .0001	0.1431
<i>Parámetros cinéticos</i>								
<i>a + b</i>	178.32 b	206.51 a	219.13 a	163.75 b	1.17			
<i>C</i>	0.05	0.04	0.03	0.04				
Producción de gas (mL/g MO)								
6 h	29.81 c	53.57 b	64.22 a	69.07 a	1.65	< .0001	< .0001	0.3277

12 h	71.14 c	92.25 b	101.28 a	103.87 a	2.19	< .0001	< .0001	0.5688
24 h	133.29 b	149.55 a	138.67 ab	127.96 b	3.00	0.0002	< .0001	0.0467
48 h	171.14 b	193.60 a	180.80 ab	143.97 c	5.25	0.0002	< .0001	0.6344
72 h	186.15 b	210.52 a	205.10 ab	158.65 c	5.79	0.0012	< .0001	0.6661
96 h	196.15 b	218.60 a	221.69 a	168.92 c	5.32	0.0016	< .0001	0.1307
<i>Parámetros cinéticos</i>								
<i>a + b</i>	193.92 b	219.48 a	228.03 a	163.75 b	1.17			
<i>C</i>	0.05	0.04	0.03	0.04				
Producción de gas (mL/g MSD)								
6 h	60.40 c	109.12 b	122.26 a	126.15 a	3.29	< .0001	< .0001	0.0792
12 h	144.09 b	187.90 a	192.77 a	189.69 a	4.46	< .0001	< .0001	0.1263
24 h	269.98 b	304.56 a	263.94 b	233.67 c	6.08	< .0001	< .0001	0.0026
48 h	346.66 b	394.23 a	344.17 b	262.92 c	10.56	< .0001	< .0001	0.1649
72 h	377.05 b	428.70 a	390.46 ab	289.74 c	11.7	< .0001	< .0001	0.6027
96 h	397.29 b	445.14 a	422.04 ab	308.51 c	10.88	< .0001	< .0001	0.6907
<i>Parámetros cinéticos</i>								
<i>a + b</i>	392.77 b	446.92 a	434.17 a	299.07 b	1.17			
<i>C</i>	0.05	0.04	0.03	0.04				
Producción de gas (mL/g MOD)								
6 h	73.40 b	124.99 a	132.54 a	125.76 a	3.67	< .0001	< .0001	0.0761
12 h	175.11 b	215.25 a	208.99 a	189.14 b	5.03	0.1167	< .0001	0.1501
24 h	328.11 a	348.90 a	286.14 b	232.96 c	6.81	< .0001	< .0001	0.0034
48 h	421.30 a	451.61 a	373.09 b	262.12 c	12.05	< .0001	< .0001	0.1618
72 h	458.23 ab	491.09 a	423.28 b	288.84 c	13.40	< .0001	< .0001	0.5723
96 h	482.83 ab	509.94 a	457.52 b	307.55 c	12.45	< .0001	< .0001	0.7478
<i>Parámetros cinéticos</i>								
<i>a + b</i>	477.33 b	511.98 a	470.67 a	298.13 b	1.17			

<i>Parámetros cinéticos</i>									
<i>a + b</i>	196.80 b	178.32 bc	200.76 a	206.51 a	197.66 b	219.13 a	133.30d	163.7579 c	0.85
<i>C</i>	0.04	0.05	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	
Producción de gas (mL/g MO)									
6 h	28.36 d	29.82 d	52.71 c	53.57 c	58.84 bc	64.22 ab	54.21 c	69.07 a	1.64
12 h	72.75 d	71.15 d	90.70 bc	92.25 abc	95.50 abc	101.28 ab	84.90 c	103.87 a	2.66
24 h	133.34 b	133.30 b	139.46 ab	149.55 a	128.07 b	138.67 ab	102.85 c	127.96 b	3.58
48 h	182.08 a	171.15 a	185.50 a	193.60 a	168.95 ab	180.80 a	117.43 c	143.967b	5.81
72 h	202.53 a	186.16 ab	204.07 a	210.52 a	190.08 a	205.10 a	158.65 cb	129.446 c	6.41
96 h	213.42 a	196.16 a	213.75 a	218.60 a	201.09 a	221.69 a	137.43 c	168.924 b	6.17
<i>Parámetros cinéticos</i>									
<i>a + b</i>	214.01 bc	193.92 c	215.99 ab	219.48 a	205.66 c	228.03 ab	133.3 e	163.75 d	0.93
<i>C</i>	0.04	0.05	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	
Producción de gas (mL/g MSD)									
6 h	57.55 e	60.40 e	105.42 c	109.12 bc	111.18 bc	122.26 ab	77.45 d	126.15 a	3.13
12 h	147.67 b	144.09 b	181.41 a	187.91 a	180.44 a	192.78 a	121.27 c	189.70 a	5.11
24 h	270.72 bc	269.99 bc	278.91 ab	304.57 a	242.01 dc	263.95 bc	146.91 e	233.67 d	6.65
48 h	369.69 ab	346.66 abc	371.18 ab	394.23 a	319.21 c	344.17 bc	167.74 e	262.92 d	11.19
72 h	411.23 ab	377.05 ab	408.33 ab	428.70 a	359.09 b	390.46 ab	184.88 d	289.74 c	12.35
96 h	433.33 a	397.29 ab	427.73 ab	445.14 a	379.90 b	422.04 ab	196.32 d	308.51 c	11.88
<i>Parámetros cinéticos</i>									
<i>a + b</i>	434.56 b	392.77 bc	432.25 b	446.92 a	388.50 d	434.17 bc	190.42 f	299.07 e	2.10
<i>C</i>	0.04	0.05	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	
Producción de gas (mL/g MOD)									
6 h	69.95 b	73.41 b	120.73 a	124.99 a	120.39 a	132.54 a	77.55 b	125.77 a	3.50

12 h	179.48 c	175.11 c	207.76 ab	215.25 a	195.38 abc	208.99 ab	121.40 d	189.15 bc	5.81
24 h	329.04 a	328.11 a	319.47 a	348.90 a	262.06 bc	286.15 b	147.07 d	232.97 c	7.43
48 h	449.35 a	421.30 ab	425.24 ab	451.61 a	345.64 c	373.09 bc	167.91 e	262.12 d	12.71
72 h	499.84 a	458.23 ab	467.79 ab	491.09 a	388.82 c	423.28 bc	185.08 e	288.84 d	14.03
96 h	526.71 a	482.83 ab	489.99 ab	509.94 ab	411.36 c	457.52 bc	196.53 e	307.55 d	13.48

Parámetros cinéticos

<i>a + b</i>	528.20 ab	477.33 b	495.21 bc	511.98 a	420.67 e	470.67 d	190.62 g	298.13 f	2.61
<i>C</i>	0.04	0.05	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma fila son diferentes (P<0.05); DIVMS =degradación *in vitro* de materia seca; DIVMO= degradación *in vitro* de materia orgánica; MS: materia seca; MO: materia orgánica; MSD: materia seca degradada, MOD: materia orgánica degradada; PEG: Polietilenglycol.

a+b: Potencial de producción de gas (mL/g), c: tasa fraccional de producción de gas por hora.

ESM: Error estándar de la media

Tabla 3.4

DIVMS, DIVMO, producción de gas en base a MS, MO, MSD y MOD (mL/g) y sus parámetros cinéticos en cuatro concentraciones de *Ipomoea murucoides* sin la adición de PEG

	TRATAMIENTOS				EEM	EFECTO		
	Testigo					Lineal	Cuadrático	Cúbico
	T 5s	T 6s	T 7s	T 8s				
<i>Ipomea murucoides</i> (g)	0	0.2	0.4	0.8				
Rastrojo de maíz (g)	0.8	0.6	0.4	0				
DIVMS	0.34 d	0.37 c	0.41b	0.50 a	0.001	< .0001	< .0001	< .0001
%	42.5	46.3	51.3	62.5				
DIVMO	0.27 d	0.32 c	0.38 b	0.50 ^a	0.002	< .0001	< .0001	< .0001
%	33.8	40	47.5	62.5				
Producción de gas (mL/g MS)								
6 h	29.18 c	45.85 b	55.22 a	49.98 ab	1.59	< .0001	< .0001	0.3102
12 h	67.63 b	72.68 ab	74.29 ab	75.91 a	2.07	0.0061	0.4129	0.7110
24 h	122.97 a	111.81 b	85.20 c	88.85 c	2.04	< .0001	0.0006	< .0001
48 h	166.11 a	162.95 a	106.00 b	96.67 b	3.85	< .0001	0.4260	< .0001
72 h	186.67 a	183.58 a	128.20 b	103.61 c	5.14	< .0001	0.009	< .0001
96 h	192.91 a	196.23 a	147.81 b	110.70 c	6.21	< .0001	0.0019	0.027
<i>Parámetros cinéticos</i>								
<i>a + b</i>	193.46 a	208.27 a	227.18 b	105.01 c	1.28			
<i>C</i>	0.04	0.02	0.008	0.07				
Producción de gas (mL/g MO)								
6 h	31.73 c	48.73 b	57.46 a	49.98 b	1.68	< .0001	< .0001	0.2968
12 h	73.55 a	77.25 a	77.31 a	75.91 a	2.22	0.4745	0.2565	0.8268
24 h	133.73 a	118.83 b	88.67 c	88.85 c	2.17	< .0001	0.0010	< .0001

48 h	180.63 a	173.19 a	110.32 b	96.68 b	4.09	< .0001	0.4520	< .0001
72 h	199.64 a	198.40 a	133.50 b	103.61 c	5.43	< .0001	0.0107	< .0001
96 h	209.78 a	208.55 a	153.83 b	110.70 c	6.55	< .0001	0.0022	0.0300
<i>Parámetros cinéticos</i>								
<i>a + b</i>	210.37 a	221.35 a	236.43 b	105.01 c	1.43			
<i>C</i>	0.04	0.02	0.008	0.07				
Producción de gas (mL/g MSD)								
6 h	64.25 c	94.74 a	104.42 a	79.38 b	3.18	0.0003	< .0001	0.3322
12 h	149.00 a	150.20 a	140.47 a	120.61 b	4.38	< .0001	0.0193	0.9684
24 h	271.03 a	231.00 b	161.13 c	141.19 d	4.33	< .0001	0.0239	< .0001
48 h	366.22 a	336.64 a	200.53 b	153.64 c	8.06	< .0001	0.2877	< .0001
72 h	404.72 a	385.68 a	242.67 b	164.67 c	10.52	< .0001	0.0069	0.0002
96 h	425.24 a	405.45 a	279.64 b	175.94 c	12.52	< .0001	0.0014	0.0257
<i>Parámetros cinéticos</i>								
<i>a + b</i>	426.47 a	430.32 b	430.14 c	166.88 d	3.18			
<i>C</i>	0.04	0.02	0.008	0.07				
Producción de gas (mL/g MOD)								
6 h	79.20 b	107.92 a	112.76 a	79.29 b	3.68	0.7581	< .0001	0.3843
12 h	183.76 a	171.10 a	151.69 b	120.48 c	5.16	< .0001	0.0776	0.8274
24 h	334.16 a	263.13 b	174.00 c	141.05 d	5.02	< .0001	0.0004	0.0016
48 h	451.17 a	383.46 b	216.55 c	153.48 d	9.06	< .0001	0.7986	< .0001
72 h	498.66 a	439.32 b	262.06 c	164.50 d	11.76	< .0001	0.1095	0.0004
96 h	524.05 a	461.84 b	301.99 c	175.76 d	13.94	< .0001	0.0252	0.0395
<i>Parámetros cinéticos</i>								
<i>a + b</i>	525.44 a	490.17 b	464.58 c	166.71 d	4.11			
<i>C</i>	0.04	0.02	0.008	0.07				

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma fila son diferentes (P<0.05); DIVMS =degradación *in vitro* de materia seca; DIVMO= degradación *in vitro* de materia orgánica; MS: materia seca; MO: materia orgánica; MSD: materia seca degradada, MOD: materia orgánica degradada; PEG: Polietilenglycol.

a+b: Potencial de producción de gas (mL/g), c: tasa fraccional de producción de gas por hora.

ESM: Error estándar de la media

Tabla 3.5

DIVMS, DIVMO, producción de gas en base a MS, MO, MSD y MOD (mL/g) y sus parámetros cinéticos en cuatro concentraciones de *Ipomoea murucoides* con la adición de PEG

	TRATAMIENTOS				EEM	EFECTO		
	Testigo					Lineal	Cuadrático	Cúbico
	T 5c	T 6c	T 7c	T 8c				
<i>Ipomoea murucoides</i> (g)	0	0.2	0.4	0.8	0.002	< .0001	< .0001	0.3526
Rastrojo de maíz (g)	0.8	0.6	0.4	0				
PEG (g)	0	0.4	0.8	1.6				
DIVMS	0.34 d	0.35 c	0.39 b	0.44 a	0.002	< .0001	< .0001	0.3977
%	42.5	43.8	48.8	55.0				
DIVMO	0.28 d	0.31 c	0.36 b	0.44 a	0.002	< .0001	< .0001	0.3977
%	35.0	38.8	45.0	55.0				
Producción de gas (mL/g MS)								
6 h	30.94 d	45.85 c	55.60 b	62.49 a	1.81	< .0001	0.0312	0.7784
12 h	72.03 b	74.07 b	79.63 ab	88.10 a	2.27	< .0001	0.1633	0.9512
24 h	132.20 a	122.08 a	101.81 b	106.58 b	2.84	< .0001	0.0111	0.0075
48 h	171.86 a	174.92 a	141.83 b	118.76 c	3.60	< .0001	0.0006	0.0058
72 h	188.67 a	196.79 a	173.34 b	128.69 c	3.83	< .0001	< .0001	0.5482
96 h	196.64 a	205.43 a	191.50 a	139.62 b	3.99	< .0001	< .0001	0.3966

<i>Parámetros cinéticos</i>								
<i>a + b</i>	195.86 a	279.21 a	233.14 b	135.00 c	1.25			
<i>C</i>	0.04	0.01	0.01	0.04				
Producción de gas (mL/g MO)								
6 h	33.65 c	48.73 b	57.85 a	62.49 a	1.91	< .0001	0.0084	0.8625
12 h	78.33 b	78.72 b	82.85 ab	88.10 a	2.43	0.0032	0.3229	0.8107
24 h	143.76 a	129.75 b	105.92 c	106.58 c	3.03	< .0001	0.0186	0.014
48 h	186.89 a	185.91 a	147.56 b	118.76 c	3.83	< .0001	0.0006	0.0082
72 h	205.17 a	209.16 a	180.35 b	128.69 c	4.06	< .0001	< .0001	0.5873
96 h	213.84 ab	218.33 a	199.24 b	139.62 c	4.20	< .0001	< .0001	0.3718
<i>Parámetros cinéticos</i>								
<i>a + b</i>	212.99 a	227.69 a	242.56 b	135 c	1.40			
<i>C</i>	0.04	0.03	0.01	0.04				
Producción de gas (mL/g MSD)								
6 h	68.33 c	98.55 b	109.86 ab	113.14 a	3.80	< .0001	0.0008	0.5254
12 h	159.00 a	159.19 a	157.33 a	159.49 a	4.95	0.986	0.8441	0.7847
24 h	291.75 a	262.38 b	201.12 c	192.89 c	6.13	< .0001	0.0897	0.003
48 h	379.25 a	375.96 a	280.13 b	214.97 c	7.66	< .0001	0.0002	0.0007
72 h	416.36 a	422.96 a	342.39 b	232.96 c	8.12	< .0001	< .0001	0.1139
96 h	433.94 a	441.5 a	378.30 b	252.74 c	8.35	< .0001	< .0001	0.8229
<i>Parámetros cinéticos</i>								
<i>a + b</i>	432.21 a	460.42 a	460.67 b	244.41 c	2.98			
<i>C</i>	0.04	0.03	0.01	0.04				
Producción de gas (mL/g MOD)								
6 h	83.10 b	112.98 a	119.00 a	111.99 a	4.33	< .0001	< .0001	0.5788
12 h	193.35 a	182.53 ab	170.42 bc	157.83 c	5.77	< .0001	0.8792	0.9753
24 h	354.77 a	300.83 b	217.85 c	190.84 d	7.11	< .0001	0.063	0.0097

48 h	461.15 a	431.03 a	303.42 b	212.58 c	8.83	< .0001	0.0011	0.0012
72 h	506.28 a	484.92 a	370.86 b	230.29 c	9.29	< .0001	< .0001	0.1164
96 h	527.66 a	506.16 a	409.75 b	249.81 c	9.38	< .0001	< .0001	0.7872
<i>Parámetros cinéticos</i>								
<i>a + b</i>	525.55 a	527.84 b	498.97 c	241.50 d	3.83			
<i>C</i>	0.04	0.03	0.01	0.04				

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma fila son diferentes (P<0.05); DIVMS =degradación *in vitro* de materia seca; DIVMO= degradación *in vitro* de materia orgánica; MS: materia seca; MO: materia orgánica; MSD: materia seca degradada, MOD: materia orgánica degradada; PEG: Polietilenglycol.

a+b: Potencial de producción de gas (mL/g), c: tasa fraccional de producción de gas por hora.

ESM: Error estándar de la media.

Tabla 3.6

Comparación de *Ipomoea murucoides* con y sin PEG en DIVMS, DIVMO, producción de gas en base a MS, MO, MSD, MOD (mL/g) y sus parámetros cinéticos

	TRATAMIENTOS								EEM
	Testigos								
	T 5s	T 5c	T 6s	T 6c	T 7s	T 7c	T 8s	T 8c	
<i>Ipomoea murucoides</i> (g)	0	0	0.2	0.2	0.4	0.4	0.8	0.8	
Rastrojo de maíz (g)	0.8	0.8	0.6	0.6	0.4	0.4	0	0	
PEG (g)		0		0.4		0.8		1.6	
DIVMS	0.34 g	0.34 g	0.37 e	0.35 f	0.41 c	0.39 d	0.50 a	0.44 b	0.002
%	42.5	42.5	46.3	43.8	51.3	48.8	62.5	55.0	
DIVMO	0.27 g	0.28 g	0.32 e	0.31 f	0.38 c	0.36 d	0.50 a	0.44 b	0.002
%	33.8	35.0	40	38.8	47.5	45.0	62.5	55.0	

Producción de gas

(mL/g MS)									
6 h	29.18 d	30.94 d	45.85 c	45.85 c	55.22 ab	55.60 ab	49.98 bc	62.49 a	1.71
12 h	67.64 c	72.04 bc	72.69 bc	74.07 bc	74.30 bc	79.64 ab	75.92 bc	88.10 a	2.18
24 h	122.98 a	132.20 a	111.81 bc	122.08 ab	85.21 d	101.82 c	88.85 d	106.58 c	2.47
48 h	166.12 a	171.86 a	162.96 a	174.93 a	106.02 cd	141.84 b	96.68 d	118.76 c	3.73
72 h	183.59 ab	188.68 ab	186.68 ab	196.80 a	128.29 c	173.35 b	103.62 d	128.69 c	4.53
96 h	192.91 a	196.65 a	196.24 a	205.43 a	147.82 b	191.51 a	110.79 c	139.63 b	5.22
<i>Parámetros cinéticos</i>									
<i>a + b</i>	193.46 b	195.86 ab	208.27 b	279.21 a	227.18 e	233.14 c	105.01 f	135.00 d	0.92
<i>c</i>	0.04	0.04	0.02	0.01	0.008	0.01	0.07	0.04	
Producción de gas									
(mL/g MO)									
6 h	31.74 cd	33.65 c	48.74 c	48.73 c	57.47 ab	57.85 ab	49.99 bc	62.49 a	1.80
12 h	73.55 b	78.34 ab	77.25 b	78.73 ab	77.31 b	82.86 ab	75.92 b	88.10 a	2.33
24 h	133.73 ab	143.76 a	118.84 c	129.75 bc	88.67 e	105.92 d	88.85 e	106.58 d	2.63
48 h	180.64 a	186.89 a	173.20 a	185.92 a	110.33 cd	147.57 b	96.68 d	118.76 c	3.97
72 h	199.64 ab	205.18 a	198.40 ab	209.16 a	133.51 c	180.36 b	103.62 d	128.69 c	4.79
96 h	209.78 a	213.84 a	208.56 a	218.35a	153.83 b	199.25 a	110.71 c	139.63 b	5.50
<i>Parámetros cinéticos</i>									
<i>a + b</i>	210.37 ab	212.99 a	221.35 b	227.69 a	236.43 d	242.56 c	105.01 e	135.00 d	1.02
<i>c</i>	0.04	0.04	0.02	0.03	0.008	0.01	0.07	0.04	
Producción de gas									
(mL/g MSD)									
6 h	64.25 c	68.34 c	94.74 b	98.55 ab	104.43 ab	109.87 ab	79.38 c	113.15 a	3.50
12 h	149.01 a	159.00 a	150.21 a	159.20 a	140.48 ab	157.34 a	120.61 b	159.49 a	4.67
24 h	271.04 ab	291.75 a	231.01 c	262.38 b	161.14 e	201.12d	141.20 e	192.90 d	5.30
48 h	366.22 ab	379.25 a	336.64 b	375.96 a	200.53 d	280.13 c	153.64 e	214.97 d	7.86

72 h	404.72 a	416.36 a	385.68 a	422.96 a	242.67 c	342.39 b	164.67 d	232.96 c	9.40
96 h	425.24 a	433.94 a	405.45 ab	441.50 a	279.64 c	378.30 b	175.94 d	252.74 c	10.64
<i>Parámetros cinéticos</i>									
<i>a + b</i>	426.47 a	432.21 a	430.32 b	460.42 a	430.14 d	460.67 c	166.88 e	244.41 d	2.23
<i>c</i>	0.04	0.04	0.02	0.03	0.008	0.01	0.07	0.04	
Producción de gas (mL/g MOD)									
6 h	79.21 b	83.11 b	107.92 a	112.98 a	112.76 a	119.00 a	79.29 b	111.99 a	4.02
					151.69				
12 h	183.77 a	193.35 a	171.10 ab	182.53 a	b	170.42 ab	120.49 c	157.83 b	5.47
24 h	334.17 a	354.77 a	263.13 c	300.83 b	174.01 e	217.85 d	141.06 f	190.84 e	6.15
48 h	451.17 a	461.15 a	383.46 b	431.03 a	216.55 d	303.42 c	153.48 e	212.58 d	8.94
72 h	498.66 a	506.28 a	439.32 b	484.92 ab	262.06 d	370.86 c	164.50 e	230.29 d	10.59
96 h	524.05 a	527.66 a	461.84 b	506.16 ab	301.99 d	409.75 c	175.76 f	249.81 e	11.88
<i>Parámetros cinéticos</i>									
<i>a + b</i>	525.44 ab	525.55 a	490.17 c	527.84 b	464.58 e	498.97 d	166.71 f	241.50 e	2.85
<i>c</i>	0.04	0.04	0.02	0.03	0.008	0.01	0.07	0.04	

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma fila son diferentes (P<0.05); DIVMS =degradación *in vitro* de materia seca; DIVMO= degradación *in vitro* de materia orgánica; MS: materia seca; MO: materia orgánica; MSD: materia seca degradada, MOD: materia orgánica degradada; PEG: Polietilenglycol.

a+b: Potencial de producción de gas (mL/g), c: tasa fraccional de producción de gas por hora.

ESM: Error estándar de la media

Tabla 3.7. Comparación entre *Ipomoea pauciflora* e *Ipomoea murucoides* sin la adición de PEG (DIVMS, DIVMO, producción de gas mL/g MS, MO, MSD y MOD) y sus parámetros cinéticos

	TRATAMIENTOS								EEM
	Testigo								
	T1s	T 5s	T2s	T 6s	T3s	T 7s	T4s	T 8s	
	<i>I.Pau.</i>	<i>I.mur.</i>	<i>I.Pau.</i>	<i>I.mur.</i>	<i>I.Pau.</i>	<i>I.mur.</i>	<i>I.Pau.</i>	<i>I.mur.</i>	
<i>Ipomoea spp.</i> (g)	0	0	0.2	0.2	0.4	0.4	0.8	0.8	
Rastrojo de maíz (g)	0.8	0.8	0.6	0.6	0.4	0.4	0	0	
DIVMS	0.34 g	0.34 g	0.36 f	0.37 e	0.39 d	0.41 c	0.56 a	0.50 b	0.0019
%	42.5	42.5	45.0	46.2	48.8	51.3	70.0	62.5	
DIVMO	0.28 g	0.27 g	0.31 f	0.32 e	0.36 d	0.38b	0.56 a	0.50 b	0.0022
%	35.0	33.8	38.8	40.0	45.0	47.5	70	62.5	
Producción de gas (mL/g MS)									
6 h	26.07 d	29.18 d	49.59 bc	45.85 c	56.54 a	55.22 ab	54.20 ab	49.98 abc	1.57
12 h	66.90 c	67.63 c	85.34 ab	72.68 c	91.78 a	74.29 bc	84.89 ab	75.91 bc	2.53
24 h	122.62 ab	122.97 ab	131.21 a	111.81 bc	123.09 ab	85.20 d	102.84 c	88.85 d	3.13
48 h	167.43 a	166.11 a	174.54 a	162.95 a	162.38 a	106.02 b	117.43 b	96.67 b	5.07
72 h	186.24 a	183.58 a	192.01 a	186.67 a	182.69 a	128.29 b	129.43 b	103.61 b	5.96
96 h	196.25 a	192.91 a	201.12 a	196.23 a	193.26 a	147.81 b	137.43 bc	110.70 c	6.43
<i>Parámetros cinéticos</i>									
<i>a + b</i>	196.8 b	193.46 b	200.76 a	208.27 b	197.66 b	277.18 c	133.3 c	105.01 d	0.91
<i>c</i>	0.04	0.04	0.04	0.02	0.004	0.008	0.04	0.07	
Producción de gas (mL/g MO)									
6 h	28.35 c	31.73 c	52.71 ab	48.73 b	58.83 a	57.46 a	54.20 ab	49.98 b	1.65
12 h	72.75 c	73.55 bc	90.69 a	77.25 bc	95.49 a	77.31 bc	84.89 ab	75.91 bc	2.67
24 h	133.34 a	133.73 a	139.45 a	118.83 b	128.07 ab	88.67 c	102.84 c	88.85 c	3.26
48 h	182.07 a	180.63 a	185.49 a	173.19 a	168.95 a	110.32 b	117.43 b	96.68 b	5.33

72 h	202.53 a	199.64 a	204.06 a	198.40 a	190.08 a	133.50 b	129.43 bc	103.61 c	6.25
96 h	213.41 a	209.78 a	213.75 a	208.55 a	201.08 a	153.83 b	137.43 bc	110.70 c	6.73
<i>Parámetros cinéticos</i>									
<i>a + b</i>	214.01 ab	210.37 ab	215.99 a	221.35 b	205.66 b	236.43 c	133.30 c	105.01 d	1.01
<i>c</i>	0.04	0.04	0.04	0.02	0.03	0.008	0.04	0.07	
Producción de gas (mL/g MSD)									
6 h	57.55 e	64.25 de	105.42 ab	94.74 b	111.18 a	104.43 ab	77.45 cd	79.38 c	3.07
12 h	147.67 b	149.01 b	181.41 a	150.21 b	180.44 a	140.48 bc	121.27 c	120.61 c	5.07
24 h	270.72 a	271.04 a	278.91 a	231.01 b	242.01 b	161.14 c	146.91 c	141.20 c	5.92
48 h	369.69 a	366.22 a	371.18 a	336.64 ab	319.21 b	200.53 c	167.74 cd	153.64 d	10.10
72 h	411.23 a	404.72 ab	408.33 ab	385.68 ab	359.09 b	242.67 c	184.88 d	164.67 d	11.80
96 h	433.33 a	425.24 a	427.73 a	405.45 a	379.90 a	279.64 b	196.32 c	175.94 c	12.66
<i>Parámetros cinéticos</i>									
<i>a + b</i>	434.55 a	426.47 a	432.25 a	430.32 b	388.5 b	430.14 c	190.42 d	166.88 d	2.30
<i>c</i>	0.04	0.04	0.04	0.02	0.03	0.008	0.04	0.07	
Producción de gas (mL/g MOD)									
6 h	69.94 b	79.20 b	120.73 a	107.92 a	120.39 a	112.76 a	77.55 b	79.29 b	3.51
12 h	179.48 a	183.76 a	207.75 a	171.10 bc	195.38 ab	151.69 c	121.40 d	120.49 d	5.86
24 h	329.035 a	334.16 a	319.47 a	263.13 b	262.05 b	174.00 c	147.06 cd	141.06 d	6.68
48 h	449.35 a	451.17 a	425.24 ab	383.46 bc	345.64 c	216.55 d	167.91 de	153.48 e	11.40
72 h	499.84 a	498.66 a	467.79 ab	439.32 bc	388.82 c	262.06 d	185.08 e	164.50 e	13.27
96 h	526.71 a	524.05 a	489.99 ab	461.84 bc	411.36 c	301.99 d	196.53 e	175.76 e	14.19
<i>Parámetros cinéticos</i>									
<i>a + b</i>	528.20 a	525.44 a	495.21 a	490.17 b	420.67 c	464.58 d	190.62 e	166.71 e	2.92
<i>c</i>	0.04	0.04	0.04	0.02	0.03	0.008	0.04	0.07	

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma fila son diferentes (P<0.05); DIVMS =degradación *in vitro* de materia seca; DIVMO= degradación *in vitro* de materia orgánica; MS: materia seca; MO: materia orgánica; MSD: materia seca degradada, MOD: materia orgánica degradada; PEG: Polietilenglycol.

a+b: Potencial de producción de gas (mL/g), c: tasa fraccional de producción de gas por hora.

ESM: Error estándar de la media.

Tabla 3.8 Comparación entre *Ipomoea pauciflora* e *Ipomoea murucoides* con la adición de PEG (DIVMS, DIVMO, producción de gas mL/g MS, MO, MSD y MOD) y sus parámetros cinéticos

	TRATAMIENTOS								EEM
	Testigos								
	T1c	T 5c	T2c	T 6c	T3c	T 7c	T4c	T 8c	
	<i>I.Pau.</i>	<i>I.mur.</i>	<i>I.Pau.</i>	<i>I.mur.</i>	<i>I.Pau.</i>	<i>I.mur.</i>	<i>I.Pau.</i>	<i>I.mur.</i>	
<i>Ipomoea spp.</i> (g)	0	0	0.2	0.2	0.4	0.4	0.8	0.8	EEM
Rastrojo de maíz (g)	0.8	0.8	0.6	0.6	0.4	0.4	0	0	
PEG (g)	0	0	0.4	0.4	0.8	0.8	1.6	1.6	
DIVMS	0.34 d	0.34 d	0.35 c	0.35 c	0.39b	0.39 b	0.44 a	0.44 a	0.002
%	42.5	42.5	43.8	43.8	48.8	48.8	55	55	
DIVMO	0.28 d	0.28 d	0.31 c	0.31 c	0.36 b	0.36 b	0.44 a	0.44 a	0.002
%	35	35	38.8	38.8	45	45	55	55	
Producción de gas (mL/g MS)									
6 h	27.43 e	30.95 e	50.41 cd	45.85 d	61.72 ab	55.60 bc	69.07 a	62.49 ab	1.70
12 h	65.42 e	72.04 de	86.80 c	74.07 de	97.32 ab	79.64 cd	103.87 a	88.10 bc	2.19
24 h	122.58 b	132.20 ab	140.72 a	122.08 b	133.25 ab	101.81 c	127.96 b	106.58 c	2.86
48 h	171.86 bc	157.38 bc	182.16 a	174.93 ab	173.74 ab	141.84 c	143.97 c	118.76 d	4.34
72 h	171.18 bc	188.68 ab	198.09 a	196.80 a	197.09 a	173.35 bc	158.65 c	128.69 d	4.72
96 h	180.382 cd	196.65 abc	205.67 ab	205.43 ab	213.03 a	191.51 bc	168.92 d	139.62 e	4.54
<i>Parámetros cinéticos</i>									
<i>a + b</i>	178.32 bc	195.86 b	206.51 a	279.21 ab	219.13 ab	233.14 c	163.75 c	135.00 d	0.086
<i>C</i>	0.05	0.04	0.04	0.01	0.03	0.01	0.04	0.04	
Producción de gas (mL/g MO)									

6 h	29.81 e	33.65 e	53.57 cd	48.73 d	64.22 ab	57.85 bc	69.07 a	62.49 ab	1.78
12 h	71.14 e	78.33 de	92.25 bc	78.72 de	101.28 ab	82.86 cd	103.87 a	88.10 cd	2.32
24 h	133.29 bc	143.76 ab	149.55 a	129.75 c	138.67 abc	105.92 d	127.96 c	106.58 d	3.01
48 h	171.14 b	186.89 ab	193.60 a	185.92 ab	180.80 ab	147.57 c	143.97 c	118.76 d	4.60
72 h	186.15 bc	205.18 ab	210.52 a	209.16 a	205.10 ab	180.36 cd	158.65 d	128.69 e	5.00
96 h	196.15 c	213.84 abc	218.60 ab	218.34 ab	221.69 a	199.25bc	168.92 d	139.63 e	4.79

Parámetros cinéticos

<i>a + b</i>	193.92 b	212.99 ab	219.48 a	227.69 a	228.03a	242.56 c	163.75 c	135.00 d	0.95
<i>C</i>	0.05	0.04	0.04	0.03	0.03	0.015	0.04	0.04	

Producción de gas (mL/g MSD)

6 h	60.40 d	68.34 d	109.12 bc	98.55 c	122.26 ab	109.87 bc	126.15 a	113.15 abc	3.55
12 h	144.09 b	159.00 b	187.90 a	159.19 b	192.78 a	157.34 b	189.70 a	159.49 b	4.71
24 h	269.99 bc	291.75 ab	304.56 a	262.38 c	263.95 c	201.12 e	233.67 c	192.90 e	6.10
48 h	346.66 b	379.25 ab	394.23 a	375.96 ab	344.17 b	280.13 c	262.92 c	214.97 d	9.22
72 h	377.05 bc	416.36 ab	428.70 a	422.96 a	390.46 ab	342.39 c	289.74 d	232.96 e	10.07
96 h	397.29 bc	433.94 ab	445.14 a	441.50 a	422.04 ab	378.30c	308.51 d	252.74 e	9.7

Parámetros cinéticos

<i>a + b</i>	392.77 c	432.21 bc	446.92 a	460.42 ab	434.16 bc	460.67 d	299.07 d	244.41 e	1.99
<i>C</i>	0.05	0.04	0.04	0.03	0.03	0.01	0.04	0.04	

Producción de gas (mL/g MOD)

6 h	73.41 c	83.11 c	124.99 ab	112.98 b	132.54 a	119.00 ab	125.76 ab	111.99 b	4.02
12 h	175.11 cd	193.35 abc	215.25 a	182.53 c	208.99 ab	170.42 cd	189.15 bc	157.83 d	5.41
24 h	328.11 ab	354.77 a	348.90 a	300.83 bc	286.15 c	217.85 de	232.97 d	190.84 e	6.96
48 h	421.30 a	461.15 a	451.61 a	431.03 a	373.09 b	303.42 c	262.12 c	212.58 d	10.56
72 h	458.23 ab	506.28 a	491.09 a	484.92 a	423.28 b	370.86 c	288.84 d	230.29 e	11.53
96 h	482.83 ab	527.66 a	509.94 a	506.16 a	457.52 bc	409.75 c	307.55 d	249.81 e	11.02

Parámetros cinéticos

<i>a + b</i>	477.33 b	525.55 ab	511.98 ab	527.84 b	470.67 d	498.97 e	298.13 f	241.50 g	2.52
<i>C</i>	0.05	0.04	0.04	0.03	0.03	0.01	0.04	0.04	

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma fila son diferentes (P<0.05); DIVMS =degradación *in vitro* de materia seca; DIVMO= degradación *in vitro* de materia orgánica; MS: materia seca; MO: materia orgánica; MSD: materia seca degradada, MOD: materia orgánica degradada; PEG: Polietilenglycol.

a+b: Potencial de producción de gas (mL/g), c: tasa fraccional de producción de gas por hora.

ESM: Error estándar de la media

Producción de ácidos grasos volátiles, relación acético: propiónico y concentración de bacterias ruminales totales a las 96 h de incubación

***Ipomoea pauciflora* sin la adición de PEG**

Los resultados de la producción de ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) así como la relación acetato:propionato y concentración de bacterias ruminales totales incubados a las 96 h de la especie *Ipomoea pauciflora* sin la adición de PEG, mostró diferencias ($P < 0.05$) en la concentración más alta de extracto (0.8g) reflejando una menor producción de ácido acético, sin embargo, a esta misma concentración el ácido butírico presentó la mayor producción ($P < 0.05$), sin existir diferencias ($P > 0.05$) en ácido propiónico ni en la relación acetato:propionato (Tabla 3.9). Respecto a la concentración de bacterias ruminales totales a las 96 h de incubación, éstas mostraron diferencias ($P < 0.05$) en dos de los tratamientos (0.4 y 0.8 g) en comparación con el testigo, presentando menor concentración de bacterias conforme el nivel de extracto incrementaba (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles, relación acético: propiónico y concentración de bacterias ruminales totales a las 96 h de incubación.

<i>Ipomoea pauciflora</i> sin la adición de PEG					
	Tratamiento				
	Testigo	T2s	T3s	T4s	EEM
	T1s				
<i>Ipomoea pauciflora</i> (g)	0	0.2	0.4	0.8	
Rastrojo de maíz (g)	0.8	0.6	0.4	0	
<u>AGV (mol/ 100 mol)</u>					
Acético	71.14 a	70.96 a	70.37 a	65.29 b	0.69
Propiónico	19.77 a	18.97 a	17.67 a	17.48 a	0.80
Butírico	9.07 b	10.06 b	11.94 b	17.23 a	0.68
Acético : Propiónico	3.62 a	3.76 a	4.00 a	3.76 a	0.18
<u>Concentración de bacterias ruminales</u>					
	11.6 a	9.2 ab	8.0 b	4.7 c	0.62
	<u>(10⁸ mL)</u>				

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma fila presentan diferencias significativas ($P < 0.05$)

AGV: Ácidos grasos volátiles

***Ipomoea pauciflora* con la adición de PEG**

Los resultados de la producción de ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) así como la relación acetato:propionato y concentración de bacterias ruminales totales incubados a las 96 h de la especie *Ipomoea pauciflora* con la adición de PEG, reflejó una menor producción ($P<0.05$) del ácido acético (en la concentración 0.8 g de extracto) y propiónico (en la concentración 0.4 y 0.8 g de extracto), sin embargo, respecto al butírico la concentración 0.8 g fue el que presentó la mayor producción ($P<0.05$) de este ácido (Tabla 3.10). Respecto a la concentración de bacterias ruminales totales a las 96 h de incubación, mostraron diferencias ($P<0.05$) las tres concentraciones de extracto (0.2, 0.4, 0.8 g), presentándose mayor concentración de bacteria conforme el extracto aumentaba (Tabla 3.10).

Tabla 3.10. Efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles, relación acético: propiónico y concentración de bacterias ruminales totales a las 96 h de incubación.

<i>Ipomoea pauciflora</i> con la adición de PEG					
	Tratamiento				
	Testigo				
	T1s	T2s	T3s	T4s	EEM
<i>Ipomoea pauciflora</i> (g)	0	0.2	0.4	0.8	
Rastrojo de maíz (g)	0.8	0.6	0.4	0	
PEG (g)	0	0.4	0.8	1.6	
<u>AGV (mol/ 100 mol)</u>					
Acético	71.43 a	71.38 a	71.30 a	67.54 b	0.88
Propiónico	19.25 a	18.91 a	16.43 ab	15.56 b	0.72
Butírico	9.31 b	9.70 b	12.25 b	16.88 a	0.74
Acético : Propiónico	3.73 a	3.78 a	4.35 a	4.37 a	0.20
<u>Concentración de bacterias ruminales</u>					
<u>(10⁸ mL)</u>	11.3 c	13.0 c	54.0 b	79.0 a	1.74

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma fila presentan diferencias significativas ($P<0.05$)

AGV: Ácidos grasos volátiles

PEG: Polietilenglycol

Comparación de *Ipomoea pauciflora* sin y con la adición de PEG

Al realizar las comparaciones de *I. pauciflora* sin y con la adición de PEG no se encontró diferencias ($P>0.05$) en cuanto a la producción de ácidos grasos volátiles, sin embargo si se encontró diferencias en la concentración de bacterias ($P<0.05$) mostrándose una mayor concentración de bacterias ruminales totales en los tratamientos (0.4 y 0.8 g de extracto) a los cuales se les adicióno PEG (Tabla 3.11).

Tabla 3.11. Efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles, relación acético: propiónico y concentración de bacterias ruminales totales a las 96 h de incubación.

Comparación de <i>Ipomoea pauciflora</i> sin y con la adición de PEG									
	Tratamiento								
	Testigos								
	T1s	T1c	T2s	T2c	T3s	T3c	T4s	T4c	ESM
<i>Ipomoea pauciflora</i> (g)	0	0	0.2	0.2	0.4	0.4	0.8	0.8	
Rastrojo de maíz (g)	0.8	0.8	0.6	0.6	0.4	0.4	0	0	
PEG (g)		0		0.4		0.8		1.6	
<u>AGV (mol/ 100 mol)</u>									
Acético	71.14a	71.43 ^a	70.96 ^a	71.38a	70.37a	71.30a	65.29b	67.54b	0.72
Propiónico	19.77a	19.25 ^a	18.9ab	18.91ab	17.67ab	16.43ab	17.48ab	15.56b	0.76
Butírico	9.07b	9.31b	10.06b	9.70b	11.94b	12.25b	17.23a	16.88a	0.71
Acético : Propiónico	3.62a	3.73 ^a	3.76 a	3.78a	4.00a	4.35a	3.76a	4.37a	0.19
<u>Concentración de bacterias</u>									
<u>ruminales</u>	11.6 c	11.3 c	9.2 cd	13.0 c	8.0cd	54.0 b	4.7d	79.0 a	1.30
<u>(10⁸ mL)</u>									

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma fila presentan diferencias significativas ($P<0.05$)

AGV: Ácidos grasos volátiles

PEG: Polietilenglycol

***Ipomoea murucoides* sin la adición de PEG**

En lo que respecta al ácido acético, la concentración 0.8 g de extracto mostró diferencia ($P<0.05$), presentándose una baja producción de este ácido. Sin embargo el ácido butírico presentó diferencias ($P<0.05$) entre el testigo y la concentración 0.4 y 0.8 g de extracto, observándose mayor producción de este ácido, conforme la concentración de extracto era mayor (Tabla 3.12). En la concentración de bacterias ruminales totales, se observó diferencias ($P<0.05$) entre el testigo y el nivel de extracto más alto (0.8 g), presentándose menor concentración de bacterias, conforme los niveles de extracto aumentan (Tabla 3.12).

Tabla 3.12. Efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles, relación acético: propiónico y concentración de bacterias ruminales totales a las 96 h de incubación.

<i>Ipomoea murucoides</i> sin la adición de PEG					
	Tratamiento				
	Testigo				
	T1s	T2s	T3s	T4s	EEM
<i>Ipomoea murucoides</i> (g)	0	0.2	0.4	0.8	
Rastrojo de maíz (g)	0.8	0.6	0.4	0	
<u>AGV (mol/ 100 mol)</u>					
Acético	71.78 a	70.33 a	69.07 ab	66.35 b	0.80
Propiónico	20.65 a	19.70 a	19.01 a	18.58 a	0.69
Butírico	7.55 c	9.96 bc	11.91 b	15.05 a	0.70
Acético : Propiónico	3.48 a	3.58 a	3.65 a	3.57 a	0.15
<u>Concentración de bacterias ruminales</u>					
	8.5 a	7.1 ab	6.0b	3.8 c	0.51
<u>(10⁸ mL)</u>					

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma fila presentan diferencias significativas ($P<0.05$)

AGV: Ácidos grasos volátiles

***Ipomoea murucoides* con la adición de PEG**

En cuanto a la producción de ácido acético, se encontró diferencias significativas ($P<0.05$) entre el testigo y la concentración 0.8 g de extracto, obteniéndose menor producción de este ácido conforme la concentración del extracto aumentaba. Situación contraria en lo que respecta al ácido butírico, encontrándose diferencias ($P<0.05$) en todos los tratamientos (0.2, 0.4 y 0.8 g de extracto), presentando mayor producción de este ácido (butírico) entre más aumenta la concentración de extracto (Tabla 3.13). En lo que respecta a la concentración de bacterias, hubo

diferencias ($P < 0.05$) en todos los tratamientos (0.2, 0.4 y 0.8 g) incluyendo el testigo, obteniéndose mayor concentración de bacterias ruminales totales conforme el nivel de extracto aumentaba (Tabla 3.13).

Tabla 3.13. Efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles, relación acético: propiónico y concentración de bacterias ruminales totales a las 96 h de incubación.

<i>Ipomoea murucoides</i> con la adición de PEG					
	Tratamiento				
	Testigo				
	T1s	T2s	T3s	T4s	EEM
<i>Ipomoea murucoides</i> (g)	0	0.2	0.4	0.8	
Rastrojo de maíz (g)	0.8	0.6	0.4	0	
PEG (g)	0	0.4	0.8	1.6	
<u>AGV (mol/ 100 mol)</u>					
Acético	70.93 a	70.29 ab	69.62 ab	67.17 b	0.75
Propiónico	19.97 a	20.19 a	18.55 a	17.07 a	0.91
Butírico	9.09 c	9.51 c	11.83 b	15.75 a	0.40
Acético : Propiónico	3.56 a	3.52 a	3.76 a	3.99 a	0.21
<u>Concentración de bacterias ruminales</u>					
<u>(10^8 mL)</u>	11.25 d	23.5 c	79.0 b	87.7 a	1.83

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma fila presentan diferencias significativas ($P < 0.05$)

AGV: Ácidos grasos volátiles

PEG: Polietilenglycol

Comparación de *Ipomoea pauciflora* sin y con la adición de PEG

Al realizar las comparaciones de *I. murucoides* sin y con la adición de PEG no se encontró diferencias ($P > 0.05$) en cuanto a la producción de ácidos grasos volátiles, sin embargo, si se encontró diferencias en la concentración de bacterias ($P < 0.05$) mostrándose una mayor concentración de bacterias ruminales totales en los tratamientos (0.2, 0.4 y 0.8 g de extracto) a los cuales se les adiciono PEG (Tabla 3.14).

Tabla 3.14. Efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles, relación acético: propiónico y concentración de bacterias ruminales totales a las 96 h de incubación.

Comparación de <i>Ipomoea murucoides</i> sin y con la adición de PEG									
	Tratamiento								
	Testigos		Tratamiento						
	T1s	T1c	T2s	T2c	T3s	T3c	T4s	T4c	ESM
<i>Ipomoea murucoides</i> (g)	0	0	0.2	0.2	0.4	0.4	0.8	0.8	
Rastrojo de maíz (g)	0.8	0.8	0.6	0.6	0.4	0.4	0	0	
PEG (g)		0		0.4		0.8		1.6	
<u>AGV (mol/ 100 mol)</u>									
Acético	71.7a	70.9 ^a	70.3ab	70.2ab	69.0abc	69.6abc	66.35c	67.17bc	0.78
Propiónico	20.6a	19.9 ^a	19.7 ^a	20.19a	19.0a	18.5a	18.5a	17.0a	0.81
Butírico	7.5c	9.09c	9.9bc	9.5bc	11.9b	11.8b	15.0a	15.7a	0.57
Acético : Propiónico	3.4a	3.5 ^a	3.5 ^a	3.5 ^a	3.6a	3.7a	3.5a	3.9a	0.18
<u>Concentración de bacterias</u>									
<u>ruminales</u>	8.5d	11.2d	7.1de	23.5c	6.0de	79.0b	3.8e	87.7a	1.35
<u>(10⁸ mL)</u>									

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma fila presentan diferencias significativas (P<0.05)

AGV: Ácidos grasos volátiles

PEG: Polietilenglycol

Comparación entre *Ipomoea murucoides* e *Ipomoea pauciflora* sin la adición de PEG

Al realizar las comparaciones de *I. murucoides* e *I. pauciflora* sin la adición de PEG, no se encontraron diferencias (P>0.05) en la producción de ácidos grasos volátiles ni en la concentración de bacterias (Tabla 3.15).

Tabla 3.15. Efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles, relación acético: propiónico y concentración de bacterias ruminales a las 96 h de incubación.

	Comparación entre <i>Ipomoea pauciflora</i> e <i>Ipomoea murucoides</i> sin la adición de PEG								ESM
	Tratamiento								
	Testigos								
	<i>I.p</i>	<i>I.m</i>	<i>I.p</i>	<i>I.m</i>	<i>I.p</i>	<i>I.m</i>	<i>I.p</i>	<i>I.m</i>	
	T1s	T1c	T2s	T2c	T3s	T3c	T4s	T4c	
<i>Ipomoea spp.</i> (g)	0	0	0.2	0.2	0.4	0.4	0.8	0.8	
Rastrojo de maíz (g)	0.8	0.8	0.6	0.6	0.4	0.4	0	0	
<u>AGV (mol/ 100 mol)</u>									
Acético	71.1a	71.7a	70.9a	70.3a	70.3a	69.0ab	65.2c	66.3bc	0.74
Propiónico	19.7a	20.6a	18.9a	19.7a	17.6a	19.0a	17.4a	18.5a	0.75
Butírico	9.0cd	7.5d	10.0dc	9.9dc	11.9bc	11.9bc	17.2a	15.0ab	0.69
Acético : Propiónico	3.6 a	3.4a	3.7a	3.5a	4.00a	3.6a	3.7a	3.57a	0.17
<u>Concentración de bacterias ruminales (10⁸ mL)</u>	11.6a	8.5ab	9.2ab	7.1bcd	8.0 bc	6.0cde	4.7de	3.8e	0.57

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma fila presentan diferencias significativas (P<0.05)

AGV: Ácidos grasos volátiles

I.p: *Ipomoea pauciflora*; *I.m*: *Ipomoea murucoides*

Comparación entre *Ipomoea murucoides* e *Ipomoea pauciflora* con la adición de PEG

Las comparaciones de estas especies (*I. murucoides* e *I. pauciflora*) con la adición de PEG no mostró diferencias ($P>0.05$) en cuanto a la producción de ácidos grasos volátiles sin embargo, si se encontró diferencias en la concentración de bacterias ($P<0.05$), reflejándose una mayor concentración de bacterias ruminales totales en las tres concentraciones 0.2, 0.4 y 0.8 g de extracto de *I. murucoides* (Tabla 3.16).

Tabla 3.16. Efecto de los tratamientos en la producción de ácidos grasos volátiles, relación acético: propiónico y concentración de bacterias ruminales a las 96 h de incubación.

	Comparación entre <i>Ipomoea pauciflora</i> e <i>Ipomoea murucoides</i> con la adición de PEG								ESM
	Tratamientos								
	<i>Lp</i>	<i>Lm</i>	<i>Lp</i>	<i>Lm</i>	<i>Lp</i>	<i>Lm</i>	<i>Lp</i>	<i>Lm</i>	
	Testigos								
	T1s	T1c	T2s	T2c	T3s	T3c	T4s	T4c	
<i>Ipomoea spp.</i> (g)	0	0	0.2	0.2	0.4	0.4	0.8	0.8	
Rastrojo de maíz (g)	0.8	0.8	0.6	0.6	0.4	0.4	0	0	
PEG (g)	0	0	0.4	0.4	0.8	0.8	1.6	1.6	
<u>AGV (mol/ 100 mol)</u>									
Acético	71.4a	70.9abc	71.3ab	70.2abc	71.3ab	69.2abc	67.5bc	67.1c	0.82
Propiónico	19.2ab	19.9a	18.9ab	20.1 ^a	16.4ab	18.5ab	15.5b	17.0ab	0.82
Butírico	9.31c	9.0c	9.7bc	9.5bc	12.2 b	11.8bc	16.8a	15.7a	0.59
Acético : Propiónico	3.7a	3.5 ^a	3.7 ^a	3.5 ^a	4.3 ^a	3.7a	4.37a	3.9a	0.20
<u>Concentración de bacterias ruminales (10⁸ mL)</u>									
	11.3e	11.2e	13.0e	23.5d	54.0c	79.0b	79.0b	87.7 ^a	1.79

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma fila presentan diferencias significativas ($P<0.05$)

AGV: Ácidos grasos volátiles

PEG: Polietilenglycol; *Lp*: *Ipomoea pauciflora*; *Lm*: *Ipomoea murucoides*

Tabla 3.17. Comparación del incremento (%) en la producción de gas mL/g MS, MO, MSD y MOD (96 h) de *I. pauciflora* e *I. murucoides* al adicionar PEG

		TRATAMIENTOS											
		Testigo											
		<i>I.p</i>	<i>I.m</i>		<i>I.p</i>	<i>I.m</i>		<i>I.p</i>	<i>I.m</i>		<i>I.p</i>	<i>I.m</i>	
<i>Ipomoea</i>													
<i>spp.</i> (g)		0	0		0.2	0.2		0.4	0.4		0.8	0.8	
R. de maíz (g)	EEM	0.8	0.8	EEM	0.6	0.6	EEM	0.4	0.4	EEM	0	0	EEM
PEG (g)		0	0		0.4	0.4		0.8	0.8		1.6	1.6	
MS		1.76	1.98	0.89	2.80	12.45	3.67	10.72b	38.55a	7.73	27.83	27.88	6.11
MO		1.85	1.98	0.89	2.80	5.91	2.16	10.75b	38.52a	7.73	27.83	27.88	6.11
MSD		1.81	2.10	1.07	4.70	10.27	2.4	11.65b	44.70a	8.09	63.48	45.64	7.47
MOD		0.70	0.76	1.32	4.75	11.01	2.48	11.81b	45.15a	8.13	62.70	44.11	7.18

^{a,b,c} Medias con distinta literal en la misma fila presentan diferencias significativas

(P<0.05); EEM: Error estándar de la media; R.de maíz: Rastrojo de maíz

PEG: Polietilenglycol; *I.p*: *Ipomoea pauciflora*; *I.m*: *Ipomoea murucoides*

3.5. DISCUSIÓN

Los taninos son sustancias muy complejas que se encuentran comúnmente en las especies forrajeras utilizadas en la alimentación de animales de producción pastoril. La concentración de estas sustancias es muy variable, dependiendo de la especie, tipo de tejido, cultivo, estado de desarrollo y condiciones ambientales. Más del 30% de las plantas que se reproducen por semilla los contienen con porcentajes que varían ampliamente de una planta a otra: su presencia puede limitarse a unos pocos puntos porcentuales o hasta 60-70% (Theacher, 1921; McMahon *et al.*, 2000 y Frutos *et al.*, 2001). La corteza, hojas, bellotas, flores, etc., son algunas de las estructuras de las plantas donde pueden estar presentes los taninos, tal es el caso de las especies estudiadas en esta investigación (*I. muruoides* e *I. pauciflora*), en la cuales se encontró de manera cualitativa (mediante cromatografía de capa fina) un alto contenido (+++) de taninos en las hojas (extracto metanólico). Diversos autores mencionan que en zonas áridas, semiáridas (con altas temperaturas, estrés hídrico, la baja calidad de los suelos y la intensidad de la luz o) tiende a aumentar el contenido de taninos de las especies vegetales, pudiendo alcanzar hasta un 37 %. (Swain, 1977; Rhoades, 1979; Van Soest, 1994; Mass *et al.*, 1996; McMahon *et al.*, 2000; Rubanza *et al.*, 2005), siendo estas características, propias de la región de la Mixteca de Oaxaca, lugar donde se colectaron las hojas *I. muruoides* e *I. pauciflora*, aunque no solo los factores ambientales intervienen en las variaciones de taninos en las especies vegetales, sino que también varían según el desarrollo fenológico de las mismas (Rhoades, 1979; Álvarez del Pino *et al.*, 2001).

Los taninos se pueden encontrar en las plantas en dos formas principales, taninos hidrolizables y condensados, sus efectos sobre los animales van desde benéficos a tóxicos, incluyendo la muerte (Nguyen *et al.*, 2005).

Los taninos hidrolizables son potencialmente tóxicos para los rumiantes ya que son rápidamente hidrolizados y degradados por los microorganismos del rumen a compuestos fenólicos de menor tamaño (pyrogallol y ácido gálico), causando lesiones a nivel intestinal, hepático y renal al ser absorbidos, causando algunos signos y síntomas clínicos como ictericia, fotosensibilización, dolor abdominal, y deshidratación (Kumar and Shing, 1984; Leinmuller *et al.*, 1991; Hagerman *et al.*, 1992; Reed, 1995; McSweeney *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2001). Por esto se ha sugerido que los taninos hidrolizables pueden no tener una acción en la reducción de la degradación de los alimentos en el rumen (Hagerman *et al.*, 1992; Foley *et al.*, 1999). Sin embargo, en el caso de los

taninos condensados, no se ha podido determinar en condiciones *in vitro*, la degradación ruminal de estos compuestos por medio de la ruptura de las uniones carbono-carbono. Así pues, se cree, puede no ser posible que la ruptura ocurra en el rumen, debido a que este se encuentra en condiciones de anaerobiosis (McSweeney *et al.*, 2001). Los taninos condensados no son considerados tóxico en bajas concentraciones debido a que no son absorbidos por el animal y son eliminados una vez que atraviesan el tracto gastrointestinal, sin embargo en altas concentraciones están asociados con lesiones en la mucosa intestinal disminuyendo la absorción de nutrientes, a la vez que forman complejos con diversas moléculas, reduciendo de esta manera su absorción y asimilación, además, que reducen la absorción de aminoácidos esenciales, (metionina y lisina) causando con ello un incremento en la toxicidad de otros compuestos de las plantas como glucósidos cianogénicos (Kumar y Singh, 1984; Reed, 1995; Barahona *et al.*, 1990). Mismos que son caracterizados por ejercer un claro efecto en la degradación ruminal y dicho efecto se encuentra aceptado por la comunidad científica (Van Hoven, 1984; Drieger y Halfield, 1972; McLeod, 1974; Mueller-Harver y McAllan, 1992; Pace *et al.*, 1993; Loyola *et al.*, 1999; McSweeney *et al.*, 2001 y Hervás *et al.*, 2001).

La baja degradación proteínica en el rumen se ha considerado la mayor significancia de los taninos, en rumiantes, ya que su afinidad por las proteínas es muy alta y las condiciones del pH del medio ruminal permiten formar complejos tanino-proteína y permanecer estables (McLeod, 1974; Butter *et al.*, 1999 y Mueller-Harver, 1999). Por otro lado, Hervás *et al.*; (2000) y Kobeyssi *et al.*; (1999), mencionan que los taninos condensados y en menor proporción los hidrolizables tienen el efecto de reducir la fracción inmediatamente disponible de la proteína y, principalmente, una disminución en el ritmo de degradación. Sin embargo aunque su acción en el rumen es fundamental sobre las proteínas, también se han observado efectos sobre los carbohidratos, específicamente sobre polisacáridos (celulosa, hemicelulosa, pectina, etc.), moléculas de paredes celulares bacterianas, enzimas involucradas en la digestión, alcaloides, ácidos nucleicos, minerales, etc. (McLeod, 1974; Jansman, 1993; Haslam, 1994; McMahan *et al.*, 2000; Schofield *et al.*, 2001; Komolong *et al.*, 2001; Hervás *et al.*, 2001; Barry *et al.*, 2003; Bennik, 2002; Bras *et al.*, 2010). Es importante mencionar que los taninos no modifican la digestibilidad de todos los componentes de la dieta por igual (Kumar y Singh 1984; Kumar y D'Mello, 1995). Horigone *et al.* (1988) hicieron la observación de que los taninos reducían la digestibilidad de la hemicelulosa, pero no así de la celulosa, pudiendo decir que lo mismo sucede con el efecto sobre

la digestibilidad de diversos aminoácidos, esenciales o no (Barry and Manley, 1984; Waghorn *et al.*, 1987 -1994; Lee *et al.*, 1992; Schwab, 1995; Wang *et al.*, 1996; McMahan *et al.*, 2000) dependiendo de su grado de polimerización, peso molecular (300-20000 Da), y debido a su elevada afinidad por estas moléculas (McLeod, 1974; Kumar y Singh, 1984; Mole y Waterman, 1987; Mangan, 1988; Mueller-Harvey y McAllan, 1992; Jansman, 1993; McSweeney *et al.*, 2001; Reed 2010; Cala *et al.*, 2011).

Lo descrito anteriormente fortalece los resultados obtenidos en esta investigación, respecto a la DIVMS y DIVMO (96 h de incubación) de los tratamientos (proporción: rastrojo: extracto) de *I. pauciflora*, ya que reflejaron una mayor degradación de la materia conforme la concentración de extracto aumentaba (Tabla 3.1). Pudiendo resultar que el extracto de la especie *I. pauciflora* contiene cierta proporción de taninos hidrolizables, mismos que fueron degradados por los microorganismos del rumen aumentando con ello la degradación *in vitro* de la materia (MS-MO), pero no así fue significativa la producción de gas, como respuesta del aumento de esta degradación (resultados de la cinética de producción de gas mL/ g de MS, MO, MSD y MOD de las 6 a 96 h de incubación), existiendo una correlación negativa ya que entre mayor degradación de materia la producción de gas disminuyó, asumiendo que por una parte los taninos hidrolizables fueron degradados por los microorganismos, siendo la respuesta a un aumento en la degradación, pero no de una producción de gas favorable (Tabla 3.1), similares resultados presentaron diferentes autores al realizar investigaciones *in vitro* de taninos condensados purificados (Murdiati *et al.*, 1990; Bae *et al.*, 1993; Van Hoven y Furstemburg, 1992; Singh, 2001). Respecto a los resultados de la producción de ácidos grasos volátiles (Tabla 3.9) se reflejó un comportamiento uniforme en la producción del ácido propiónico, sin embargo en el acético la producción disminuyó significativamente (71.14, 70.96, 70.37 y 65.29 mol/ 100mol) en la concentración más alta de extracto (0.8 g), situación que no se presentó con el butírico ya que éste ácido, aumentó en esta concentración (0.8 g) de 17.13 contra 9.07, 10.06 y 11.94 mol/ 100mol que reflejaron las concentraciones 0.0, 0.2 y 0.4 g respectivamente. Resultados similares presentaron Bae *et al.*, (1993), Van Hoven y Furstemburg, (1992). Finalmente con la concentración de bacterias ruminales totales (96 h de incubación) se corroboró la presencia tanto de taninos hidrolizables como condensados en el extracto de *I. pauciflora* disminuyendo la concentración de bacterias ruminales totales (11.6, 9.2, 8.0 y 4.7 x 10⁸ bacterias /mL) conforme la concentración de extracto aumentaba (0.0, 0.2, 0.4 y 0.8 g) respectivamente, pudiendo ser

afectados por la presencia de taninos principalmente los condensados ya que diversos estudios han corroborado que estos taninos ejercen efectos de privación de sustrato (McAllan, 1992; McAllister *et al.*, 1994; Aharoni *et al.*, 1999 y Mc Mahon *et al.*, 2000), inhibición enzimática (Barry y Manley, 1984; Makkar *et al.* 1988; Bae *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1994; McSweeney *et al.*, 2001) y acción directa sobre los microorganismos del rumen (Leinmuller *et al.*, 1991; Scalbert, 1991).

En la privación del sustrato los taninos pueden tener la capacidad de bloquear o atenuar la habilidad de las bacterias ruminales para adherirse a las proteínas, acción fundamental para que luego éstas puedan ser degradadas disminuyendo con ello la actividad fermentativa y la multiplicación celular. Respecto a la inhibición enzimática, los taninos se consideran inhibidores del crecimiento de los microorganismos, aunque en la actualidad no se han determinado con exactitud los mecanismos implicados, sin embargo, se ha visto que la reacción de los taninos frente alguna de las enzimas microbianas (bacterianas y fúngicas) es de privación o reducción de su actividad (proteolítica y celulítica), bloqueando el transporte de nutrientes, dilatando el crecimiento microbiano y así alterando la proporción de la población microbiana en el rumen, tal como lo describe McAllister *et al.*, (1994) y Nelson *et al.*, (1997). Finalmente, referente a la acción de los taninos sobre los microorganismos del rumen, se ha observado que éstos infieren sobre los microorganismos ruminales, provocando directamente modificaciones en la permeabilidad de las membranas, o produciendo deficiencias nutritivas, trayendo como consecuencia la reducción del ritmo de crecimiento y de reproducción de los microorganismos y, por lo tanto, se ve afectada la fermentación del rumen. Finalmente Miyakawa *et al.* (2010) concluyeron mediante un trabajo realizado *in vitro* con diferentes cepas de *clostridium* sp que las mezclas de taninos de quebracho y castaño, no sólo tuvieron un efecto antibacteriano, sino que también actuaron contra diferente toxinas producidas por las bacterias.

En base a lo descrito anteriormente y con los resultados obtenidos en esta investigación (disminución de la concentración de bacterias conforme se aumentaba la concentración de extracto), se pudo corroborar los efectos que causa la presencia de taninos (hidrolizable y condensados) en el extracto de la especie *I. pauciflora* (Tabla 3.9). similares resultados presentó Solano, (1994) al encontrar el efecto que causaron tres especies de plantas (Chaparro prieto, Guajillo y Junco) que contenían diferentes concentraciones de taninos, afectando desde el

consumo, así como un adecuado aprovechamiento de la proteína y la utilización de la fibra por acción de las bacterias ruminales.

El uso de la técnica de producción de gas *in vitro* en conjunto con agentes inhibidores ha sido establecido para el estudio de factores antinutricionales en especies arbóreas (Theodorus et al., 1994). Se ha propuesto el uso del polietilenglycol (PEG) para detectar la actividad biológica de los compuestos fenólicos en las plantas (Makkar et al., 1995). El PEG es un agente que neutraliza el efecto de los taninos sobre la fermentación ruminal; por lo que, un incremento en la producción de gas *in vitro* y en los parámetros de degradación cuando se suministra PEG indicaría la actividad de taninos en los alimentos (Getachew et al., 1998). Llevándose a cabo dicho procedimiento con PEG (6000), se calculó la producción de gas en mL/ g de MS, MO, MSD y MOD haciendo la comparación con y sin la adición de PEG (Tabla 3.1-3.2). En donde se observó que el tratamiento con PEG aumentó ($P < 0.05$) el volumen de gas (mL) en la especie *I. pauciflora* (Tabla 3.3). Indicando con ello que el contenido de taninos condensados es alto ya que el incremento en la producción de gas fue resultado de la unión de estos compuestos antinutricionales al PEG, inhibiéndose, con este último su actividad. Resultados similares obtuvieron Tolera et al., (1997) y Pinto et al., (2009) con especies leñosas forrajeras tropicales. Sin embargo, otras especies no presentaron incrementos en la producción de gas al adicionarles PEG, explicando por el hecho de que los efectos del PEG son específicos a los compuestos antinutricionales (taninos) y que la ausencia de estos o su nivel bajo provoca que el PEG no tenga ningún efecto sobre la fermentación y, por tanto en la producción de gas *in vitro* (Mlambo et al. 2002; Pinto et al., 2009).

En esta misma investigación al adicionar PEG (6000) se reflejó un aumento en las concentraciones de bacterias ruminales totales presentando diferencias ($P < 0.05$) en los tratamientos 0.4 g (54×10^8 contra 8.0×10^8 bacterias/mL) y 0.8 g de extracto (79×10^8 contra 4.7×10^8 bacterias/mL), corroborando nuevamente con ellos que los taninos prefieren ligarse al polietilenglycol (PEG) en lugar de otras moléculas de la dieta; esto hace que quede libre la proteína para la digestión, y además que la actividad de las proteínas endógenas y enzimas no se afecte (Tabla 3.11), mismo resultado se observaron en la cinética de producción de gas mL/g en base a MS, MO, MSD y MOD (aumento en la producción de gas) en las tres diferentes concentraciones (0.2, 0.4 y 0.8 g) al adicionar PEG, como se muestra en la tabla 3.3 - Fig. 9-12. Sin embargo, no hubo diferencias ($P > 0.05$) en la producción de ácidos grasos volátiles (Tabla.

3.10 y 3.11), situación que puede deberse a el tipo de sustrato (rastreo de maíz) que se maneja en el medio de cultivo (para la producción de gas *in vitro*), ya que posee poco valor alimenticio, baja digestibilidad y alta lignificación, motivo por el cual no se vio reflejado en diferencias ($P > 0.05$) en la producción de ácidos grasos volátiles, situación contraria que presentó Pinto et al., (2009) al utilizar un medio de cultivo rico en nitrógeno para medir la producción de gas *in vitro* de diferentes especies forrajeras, en donde al adicionar PEG se observó de manera evidente diferencias significativas en la producción de AGV (Pinto et al., 2009). Referente a *I. muruoides*, la otra especie estudiada en esta investigación, en la cual se determinó la presencia de taninos (+++) de manera cualitativa (Capítulo I), se observó similar comportamiento que *I. pauciflora* en los diferentes parámetros estudiados (DIMSD, DIVMO producción de gas (mL/g) en base a MS, MO, MDS, MOD, sus parámetros cinéticos (6-96 h), producción de AGV y concentración de bacterias ruminales totales con y sin la adición de PEG), existiendo pequeñas diferencias, tal es el caso de la DIVMS y DIVMO (Tabla 3.4), que presentaron mayor degradación conforme la concentración del extracto aumentaba (similar a *I. pauciflora*), sin embargo, al agregar PEG (Tabla 3.5) en los tratamientos del extracto de *I. muruoides*, hubo diferencias significativas, disminuyendo la degradación de la materia (DIVMS y DIVMO) en las tres concentraciones (.2, 0.4 y 0.8), situación que en *I. pauciflora* únicamente se presentó en la concentración más alta (0.8 g). Asumiendo que el PEG tuvo afinidad con los taninos hidrolizables evitando con ello que los microorganismos ruminales los degradaran, reflejándose en una disminución en la degradación (Tabla 3.6).

Respecto a la cinética de producción de gas (mL/ g de MS, MO, MSD y MOD) de las 6 a 96 h de incubación (Tabla 3.4 - 3.5), así como en la producción de ácidos grasos volátiles, concentración de bacterias (Tabla 3.12 -3.13) sin y con la adición de PEG, se observó el mismo comportamiento en ambas especies (*I. pauciflora* e *I. muruoides*), visualizando esta comparación en la tabla 3.6 y en la tabla 3.14 (producción de AGV y concentración de bacterias ruminales totales). Similares resultados obtuvo Ming-Cheng et al., (1994) y Solano. (1994) al encontrar que un elevado contenido de taninos en las plantas, afecta de manera negativa el crecimiento de las bacterias ruminales, así como su adecuada utilización por parte de los rumiantes, bajando la calidad nutritiva de las plantas al presentar estos metabolitos (taninos).

Sin embargo, para poder comparar los efectos que causa una especie de otra, se procedió a comparar los diferentes parámetros evaluados (DIVMS, DIVMO, cinética de producción de gas

mL/g MS, Mo, MSD, MOD, producción de ácidos grasos volátiles y concentración de bacterias ruminales totales) de *I. pauciflora* e *I. muruoides* con y sin la presencia de PEG. La comparación entre *I. pauciflora* e *I. muruoides* sin la adición de PEG, se muestra en la tabla 3.7, en donde se observa que la degradación de la materia (DIVMS-DIVMO) fue incrementando conforme la concentración del extracto aumentaba, mismo comportamiento se reflejó en ambas especies. En cuanto a la comparación de la cinética de la producción de gas, *I. pauciflora* presentó mayor producción de gas en las concentraciones 0.2, 0.4 g del extracto en MS, MO, MSD, MOD y en la concentración 0.8 g en MS y MO, siendo similar la producción en ambas especies respecto a MSD y MOD (0.8g). Referente a la concentración de bacterias se observó un pequeño incremento en *I. pauciflora*, sin embargo, no fue significativa ($P>0.05$) al compararla con *I. muruoides*, misma situación se presentó con la producción de ácidos grasos volátiles (Tabla 3.15).

En la tabla 3.8 nuevamente se presenta la comparación de ambas especies (*I. pauciflora* e *I. muruoides*) pero con la adición de PEG, en donde se refleja una disminución en la degradación de la materia (DIVMSDIVMO) a diferencia de cuando no se les adicionó PEG, situación que pudiese ser por la disminución de la degradación de taninos hidrolizables ya que éstos como los condensados tienen la capacidad de unirse al PEG, evitando con ello su degradación así como la unión a otras moléculas. Respecto a la cinética de producción de gas se observó que *I. pauciflora* en concentración 0.4 y 0.8 g de extracto (MS, MO, MSD, MOD) presentó mayor producción de gas, sin embargo para efectos de comparar los incrementos (%) en la producción de gas en las especies tratadas con PEG respecto a las no tratadas a las 96 h de incubación se utilizó la fórmula propuesta por Khazaal et al., (2004), en donde se observa que el aumento en la producción de gas fue similar en ambas especies a excepción de la concentración 0.4 g de extracto (MS, MO, MSD, MOD) donde *I. muruoides* reflejó mayor porcentaje en el incremento de gas comparándolo cuando no se le adicionaba PEG. Makkar *et al.*(1995) y Getachew (1998) mencionan que el PEG debido a su elevado peso molecular (6000) neutraliza el efecto de los taninos sobre la fermentación ruminal, así mismo ayuda a detectar la actividad biológica de los compuestos fenólicos en la plantas. Misma situación se vio reflejada en el aumento de la concentración de bacterias de la especie *I. muruoides* (0.2, 0.4 y 0.8) existiendo diferencias ($P<0.05$) en comparación con *I. pauciflora* (Tabla 3.16), deduciendo que el aumento de la concentración de bacterias se debió a que se neutralizó el efecto de los taninos, sin embargo, en lo que se refiere a

la producción de ácidos grasos volátiles y relación acetato propionato no hubo diferencias significativas, pudiendo ser la causa el sustrato utilizado en el medio el cual fue discutido anteriormente. Sin embargo es importante resaltar lo mencionado por Beecher, (2003) y Andrés et al. (2010), al mencionar que los mecanismos de acción de estos compuestos, poseen diferentes efectos biológicos, los cuales requieren ser estudiados ya que algunos factores aun no son bien comprendidos, como su absorción o metabolismo, mismos que dependen de la naturaleza química del compuesto.

3.6. CONCLUSIONES

La técnica de producción de gas *in vitro*, corroboró la presencia y efectos de los taninos presentes en el extracto metanólico de las de las dos especies de *Ipomoea* (*pauciflora* y *murucoides*). Los efectos de los taninos se reflejarán gradualmente conforme la concentración del extracto aumentaba (0.0, 0.2, 0.4 y 0.8 g), presentando una baja producción de gas en los parámetros cinéticos en base a mL/g de MS, MO, MSD y MOD de las 6 a 96 horas de incubación, una disminución en la producción de ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y relación acetato: propionato). Se presentaron también, efectos negativos en la concentración de bacterias ruminales totales así como en la DIVMS, DIVMO, y finalmente, el uso del polietilenglycol (PEG 6000), un agente inhibidor de taninos, permitió detectar la actividad biológica de estos compuestos fenólicos (taninos), al adicionarlos en los tratamientos (0.0, 0.2, 0.4 y 0.8 g de extracto). PEG permitió neutralizar el efecto de los taninos sobre la fermentación ruminal, modificando los resultados de los parámetros descritos anteriormente con tendencia positiva. En base a estos resultados, se determinó que ambas especies presentan compuestos fenólicos (taninos), sin embargo, *I. murucoides* presentó un mayor contenido de los mismos con base en las respuestas de las variables evaluadas. Se concluyó que los taninos están presentes en ambas especies de *Ipomoea* (*pauciflora* subsp. *pauciflora* y *murucoides*), y son responsables de problemas de toxicidad en los rebaños caprinos en temporada de sequía, causando diversos signos clínicos que provocan altos índices de morbilidad y mortalidad en la Mixteca baja de Oaxaca, donde estos arbustos constituyen la única alternativa de alimentación en pastoreo extensivo en esta temporada.

3.7 LITERATURA CITADA

- Aharoni, Y., Gilboa, N., Silanikove, N. 1999. Models of suppressive effect of tannins. Analysis of the suppressive effect of tannins on ruminal degradation by compartmental models. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 71, 251-267.
- Álvarez del Pino, M.C., Frutos, P., Hervas, G., Gómez, A., Giraldez, F.J. y Mantecon, A.R. 2001. Efecto del contenido de taninos en la degradación ruminal *in vitro* de varios órganos de especies arbustivas. *ITEA Producción Animal*, 22, 355-357.
- Andrés, C., Medina, A., Llorach, R., Urpi, M., Khan, N., Chiva, G., Zamora, R., Rotches, M., Lamuela, R. 2010. Phenolic compound: chemistry and occurrence in fruits and vegetables. In: L.A De la Rosa, E. Alvarez-Parrilla, G.A. Gonzalez-Aguilar (eds). *Fruit and Vegetable Phytochemicals, Chemistry, nutritional value and stability*. USA: Wiley-Blackwell. 53-88.
- A.O.A.C. 1975. Official Methods of Analysis of the Association of official Agricultural Chemists. 12th Edition. Published by the Association of official Agricultural Chemists. Washington, D.C.
- Argyle, J.L., Hespell, R.B., 1987. Digestion of alfalfa hay using washed ruminal bacteria. *J. Dair. Sci.* 70: 2525-2533.
- Bae, H.D., McAllister, T.A., Yanke, J., Cheng, K.J. and Muir A.D. 1993. Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2132-2138.
- Barahona, R., Lascano, C.E., Cochran, R., Morrill, J., Titgemeyer, E. C. 1990. Intake, digestion, and nitrogen utilization by sheep fed tropical legumes with contrasting tannin concentration and astringency. *J. Anim. Sci.* 75: 1633-1640.
- Barnes, R.F., Gustines, D.L. 1973. Allelochemistry and forage crops. En: *Antiquality components of forages*. Crop Sci Soc Amer. pp. 1-13
- Barry, T. N., Min, B. R., Attwood, W. C. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106: 3-39.
- Barry, T.N., Manley, T.R. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 2. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. *British J. Nutr.* 51: 493-504.
- Beecher, G. 2003. Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake. *Journal of Nutrition* 133:3248s-3254s.
- Bennik, A. 2002. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13:184-196.

- Bras, N., Goncalves, R., Mateus, N., Fernandez, P., Ramos, M., De Freitas, V. 2010. Inhibition of pancreaticelastase by polyphenolic compound. *J. Agric. Food Chem.* 19:10668-10676.
- Butter, N.L., Dawson, J.M. and Buttery, P.L. 1999. Effects of dietary tannins on ruminants. In: Secondary plants products. Antinutritional and beneficial actions in animal feeding. J.C. Caygill and I. Mueller- Harvey (Eds). Nottingham University Press. pp. 51-70
- Cala, O., Fabre, S., Pinaud, N., Dufourc, E., Fouquet, E., Laguerre, M., Pianet, I. 2011. Towards a Molecular Interpretation of Astringency: Synthesis, 3D Structure, Colloidal State, and Human Saliva Protein Recognition of Procyanidins. *Planta Med* 11:116-1122.
- Carulla, J., Lascano, C., Klopfenstein, T. 2001. Reduction of tannin level in a tropical legume (*Desmodium ovalifolium*) with polyethyleneglycol (PEG): effects on intake a N balance, digestion and absorption by sheep. *Arch Latinoam Prod Anim.* 9:17-24.
- Devendra, C. 1990. "The use of shrubs and tree fodder by ruminants", Shrubs and fodder for farm animals, Proceedings of a workshops in Denpasar, Indonesia. pp. 42-60.
- Domínguez, X.A. 1988. Métodos de Investigación Fitoquímica. Cuarta Reimpresión Ed. Limusa, México. p.281.
- Driedger, A., Hatfield, E.E. 1972. Influence of tannins on the nutritive value of soybean meal for ruminants. *J. Anim. Sci.* 34: 465.
- Fedorak, P. M., Hruday, S. E. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Envir. Technol. Lett.* 4: 425-432.
- Foley, W.J., Iason, G.R. McArthur, C. 1999. Role of secondary metabolites in the nutritional ecology of mammalian herbivores. H.J.G. Jung and G.C. Fahey, Jr. (Eds). P 130-209. American Society of Animal Science, Illinois. (Estados Unidos).
- Frutos, P., Hervás, G., Ramos, G., Mantecon, A.R., Giraldez, F.J. 2001. La selección de la dieta: papel de los compuestos secundarios de las plantas. *Ovis*, 74: 81-101.
- Getachew, G., De Peters, E.J., Robinson, P.H., Fadel, J.G. 2005. Use of an in-vitro rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feed and its impact on fermentation products. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 547-559
- Getachew, G., Bliimmel, M., Makkar, H. P. S., Becker, K. 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72: 261-281.
- Hagerman, A.E., Robbins C. T., Weerasuriya, T.C., Wilson, C., McArthur. 1992. Tanin chemistry in relation to digestion. *J. Range Manage.* 45:57.

- Harbone, J.B. 1999. An overview of antinutritional factors in higher plants. In: J.C. Carygill and I. Mueller-Harvey (Eds). Secondary plant products. Antinutritional and beneficial actions in animal feeding. Nottingham University Press. pp. 7-16.
- Haslam, E. 1994. Complexation and oxidative transformation of polyphenols. Polyphenols, 94. Palma de Mallorca (España), May 23-27. Ed. INRA, Paris 1995. (Les Colloques, N. 69).
- Hervás, G., Álvarez del Pino, M.C., Giraldez, F.J., Mantecón, A.R. Frutos, P. 2001. Effect of two type of tannin, in the presence or absence of PEG, on *in vitro* rumen fermentation in goats. In: 9th Seminar of the FAOCIHEAM sub-network on sheep & goat nutrition. Nutrition and feeding strategies of sheep and goats under harsh climates, 8-10 November 2001. Hammament (Tunissia), pp. 57. Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisia (Túnez).
- Hervás, G., Frutos, P., Serrano, E., Mantecón, A.R. and Giraldez, F.J. 2000. Effect of tannic acid on rumen degradation and intestinal digestión of treated soya bean meals in sheep. J. Agric. Sci. Cambridge, 135:305-310.
- Horigone, T., Kumar, R., Okamoto, K. 1988. Effects of condensed tannins prepared from leaves of fodder plants on digestive enzymes *in vitro* and in e intestine of rats. British J. Nutr. 60: 275-285.
- Jansman, A.J.M., Verstegen, M. W. A., y Huisman J., 1993. Effects of dietary inclusion of hulls of faba beans (*Vacia Faba L.*) with a low and high content of condensed tannins on digestion and some physiological parameters in piglets. Anim. Feed Sci. Technol. 43:239.
- Jones, G.A., McAllister, T.A., Muir, A.D. and Cheng, K.J. 1994. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop.*) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 60, 1374-1378.
- Kerr, S.E. Seraidarian. K. 1945. The separation of purine nucleosides from free purines and determination of the purines and ribose in these fractions. J. Biol. Chem. 159:211-225.
- Khazaal, K., Boza J., y Orskov E. R. 1994. Assessment of phenolics-related antinutritive effects in Mediterranean browse: a comparison between the use of the *in vitro* gas production technique with or without insoluble polyvinylpolypyrrolidone or nylon bag. Anim. Feed Sci. Technol.. 49:133.
- Khazaal, K., Boza, J., Orskov, E.R. 1994. Assesment of phenolic related antinutritive effects in Mediterranean browse: a comparation between the use of the *in vitro* gas production technique with or without insoluble polyvinylspolypyrrolidone or nylon bag. Anim. Feed Sci. Technol. 49:133-149.
- Khazzal, K., Orskov, E.R. 1994. The *in vitro* gas production technique: an investigation on its potential use with insoluble polyvinylpolyprrolidone for the assessment of phenolic-related antinutritive factors in browse species. Anim. Feed Sci. Technol. 47:305.

- Kobeisy, M.A., Boechm, J., Dirl, G., Holtershinken, M. Leibetseder, J. 1999. The influence of tannin on rumen metabolism using RUSITEC. *J. Anim. Sci.* 77, Suppl. 187.
- Komolong, M.K., Barber, D.G. and McNeill, D.M. 2001. Post-ruminal protein supply and N retention of weaner sheep fed on a basal diet of Lucerne hay (*Medicago sativa*) with increasing levels of quebracho tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 92: 59-72.
- Kumar, R. Singh, M. 1984. Tannins: Their adverse role in ruminant nutrition. *J. Agric. Food Chem.* 32: 447-453.
- Kumar, R. D'Mello, J.P.F. 1995. Anti-nutritional factors in forage legumes. In: *Tropical legumes in animal nutrition*. J.P.F. D'Mello and C. Devendra (Eds.), pp. 95-133. CAB International, Wallingford (Reino Unido).
- Lee, J., Harris, P.M., Sinclair, B.R. and Treolar, B.P. 1992. The effect of condensed tannin containing diets on whole body amino acid utilization in Romney sheep: consequences on wool growth. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 52, 243-245.
- Leinmuller, E., Steingass, H. Menke H.K., 1991. Tannins in ruminant feedstuffs. *Biannual Collection of Recent German Contributions Concerning Development Through Animal Research*, 33, 9-62.
- Lowry, J.B. 1990. Toxic factors and problems: methods of alleviating them in animal" Shrubs and fodder for farm animals, *Proceedings of a workshops in Denpasar, Indonesia*. P. 76-88.
- Loyola, V.R., Dos Santos, G.T., Zeoula, L.M., Bett, V. e Taborianski, A.L. 1999. Degradabilidade *in situ* do farele de Canola tratado com calor e/ou tanino. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 28, 598-604.sh
- Maass, B.L., Lascano, C.E., Cárdenas, E.A. 1996. La leguminosa arbustiva *Codariocalyx gyroides*. Valor nutritivo y aceptabilidad en el piedemonte amazónico, Caquetá, Colombia. *Pasturas Tropicales*. 18:10-16.
- Madigan, M.T., Martiniko, J.M., Parker, J. 2002. *Biología de los microorganismos*. Editorial Pearson-Prentice Hall, 8a edición. Madrid, España. 986p.
- Makkar, H.P. S., Singh, B., y Negi S. 1989. Relationship of rumen degradability with microbial colonization, cell wall constituents and tannin levels in some tree leaves. *Anim. Prod.* 49:299.
- Makkar, H.P.S., Blummel, M., Becker, K. 1995. Formation of complexes between ptyvinil pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins and their implication in gas production and true digestibility *in vitro* techniques. *British J. Nutr.*73: 897-913.

- Makkar, H.P.S. 1993. Antinutritional factors in food for livestock. In: Animal production in developing countries. BSAS Occasional Publication N. 16. M. Gill, E. Owen, G.E. Pollot and T.L.J. Lawrence (Eds.), P.69-85. Br. Soc. Anim.Sci. (BSAS), Edimburgo, Reino Unido.
- Makkar, H.P.S., Becker, K., 1999. Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. Br. J. Nutr. 81: 107-113.
- Makkar, H.P.S., Singh, B. and Dawra, R.K. 1988. Effect of tannin rich of oak (*Quercys incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. Br. J. Nutr. 60: 287-296.
- Mangan, J.L. 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. Nutrit.Res. Rev. 1: 209-231.
- Marshak, A. Vogel, H.J. 1951. Microdetermination of purines and pyrimidines in biological materials. J. Biol. Chem. 189:597-604.
- Mc Mahon, L.R., McAllister, T.A., Berg, B.P., Majak, W., Acharya, S.N., Popp, J.D., Coulman, B.E., Wang, Y. Cheng, K.J.2000. A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. Can. J. Plant Sci. 80: 469-485.
- McAllister, T.A., Bae, H.D., Yanke, L.J., Cheng, K.J. and Muir, A. 1994. Effect of condensed tannins from birdsfoot trefoil on the endoglucanase activity and the digestion of cellulose filter paper by ruminal fungi. Can. J. Microbiol. 40: 298-305.
- McLeod, M.N. 1974. Plant tannins their role in forage quality. Nutrition Abstracts and Reviews. 44:803-812.
- McMahon, L.R., Mc Allister, T.A., Berg, B.P., Majak, W., Acharya, S.N., Popp, J.D., Coulman, B.E., Wang, Y. and Cheng, K.J.2000. A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. Canad. J. Plant. Sci. 80, 469-485.
- McSweeney, C.S; Palmer, B., McNeill, D.M. Krause, D.O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. Anim. Feed. Sci. Technol. 91: 83-93.
- Menke, KH., Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Anim. Res. Dev. 28:7-55.
- Ming-Cheng, J., James Ch., Bailey W., Collins, J.L. 1994. Dietary tanning from cowpeas and tea transiently alter apparent calcium absorption but not absorption and utilization of protein in rats. J. Nutr. 124:283.
- Miyakawa, M.E., Elizondo, A.M., Mercado, E.C., Rabinovitz, B.C. 2010. Effect of tannins on the *in vitro* growth of *Clostridium perfringens*. Vet. Microbiol. 145:308-314.
- Mole, S. Waterman. P.G. 1987. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies. I Techniques for chemically defining tannins. Oecologia, 72:137-147.

- Mueller-Harver, I. 1999. Tannins: Their nature and biological significance. In: Secondary plants products. Antinutritional and beneficial actions in animal feeding. J.C. Caygill and I. Mueller- Harvey (Eds), pp. 17-70. Nottingham University Press (Reino Unido).
- Mueller-Harvey, I and McAllan, A.B. 1992. Tannins. Their biochemistry and nutritional properties. In: Advances in plant cell biochemistry and biotechnology. Vol. 1. I.M. Morrison (Ed.) P. 151-217. JAI Press Ltd., Londres (Reino Unido).
- Murdiati, T.B., McSweeney, C.S. Cambell, R.S.F., Stolz, D.S. 1990. Prevention of hydrolysable tannin toxicity in goats fed *Clidemia hirta* by calcium hydroxide supplementation. J. Appl. Toxic. 10: 325-333.
- Nelson, K.E., Pell, A.N., Doane, P.H., Giner- Chavez, B.I. Schofield, P. 1997. Chemical and biological assays to evaluate bacterial inhibition by tannins. Journal of Chemical Ecology, 23 1175-1194.
- Nguyen, Thi Mui., Binh, D. V., Orskov, E. R. 2005. Effect of foliages containing condensed tannins and on gastrointestinal parasites. Anim. Feed Sci. Technol. 121: 77–87.
- Orskov, E.R., MacDonald, I.M. 1979. Estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurement weighted according to rate of passage, J. Agric. Sci, Cambridge. 96: 499-503.
- Pace, V., Settineri, D. e Castillo, G. 1993. Influencia di trattamenti con tannini sulla digestibilità *in vitro* della farina di soia. Zootecnia i Nutricion Animali.19: 73-79.
- Pinto, R. R., Hernández, S. D., Ramírez, A. L., Sandoval, C.C., Cobos, M., Gómez, C.H. 2009. Taninos y Fenoles en la fermentación *in vitro* de leñosas forrajeras tropicales. Agron. Mesoam. pp. 81-89
- Posada, S. L., y R. R. Noguera. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. Liv. Res. Rural Development 17:36. <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/4/posa17036.htm>. (Consulta: 2012).
- Ramos, G., Frutos, R., Giraldez, F.J., Mantecon, A.R.1998. Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. Arch Zootec 47:597-620.
- Reed, J.D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. J. Anim. Sci. 73:1516-1528.
- Rhoades, D.F. 1979. Evolution of plant chemical defence against herbivores. In: Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites. G.A. Rosenthal and D.H. Janzen (Eds), pp. 3-54. Academic Press, Nueva York (Estados Unidos).
- Rosales, M. 1998. Avances en el uso de la diversidad forrajera tropical para la alimentaci[on de bovinos. En T Clavero (Ed.) Estrategias de alimentación para la ganadería tropical. LUZ. Maracaibo. pp. 85-100.

- Rubanza, C.D.K., Shem, M.N., Otsyina, R., Bakengesa, S.S., Ichinohe, T., Fujihara, T. 2005. Polyphenolics and tannins effect on *in vitro* digestibility of selected Acacia species leaves. *Animal Feed Sci. Technol.* 119:129-142.
- Salem, A.Z.M., Salem, M.Z.M., Adawy, M.M., Robinson, P.H. 2006. Nutritive evaluations of some browse tree foliages during the dry season. Secondary compounds, feed intake and *in vivo* digestibility in sheep and goats. *Anim Feed Sci Techn* 127:251-267.
- Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, 3875-3883.
- Schofield, P., Mbugua, D.M. Pell, A.N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91: 21-40.
- Schwab, C.G. 1995. Protected proteins and amino acids for ruminants. In: *Biotechnology in animal feeds and animal feeding*. R.J. Wallace and A. Chesson (Eds.), pp. 115-141. V.C.H. Press, Weinheim (Alemania).
- Sigh, B., Bhat, T.K. and Sharma, O.P. 2001. Biodegradation of tannic acid in an *in vitro* ruminal system. *Livest. Prod.Sci.* 68: 259-262.
- Silanikove, N., Landau, S., Kababya, D., Bruckental, I., Nitsan, Z. 2006. Analytical approach and effects of condensed tannins in carob pods (*Ceratonia siliqua*) on feed intake, digestive and metabolic responses of kids. *Livest. Sci.* 99:29-38.
- Solano, V.H. 1994. Dinámica estacional del contenido de minerales y taninos del forraje de 15 plantas arbustivas nativas del Estado de Nuevo León.
- Stahl, E. 1969. *Thin Layer chromatography, a Laboratory Handbook*. Springer Verlag, Berlin. p.1041.
- Steel, R. G., J. H. Torrie. 1988. *Bioestadística. Principios y procedimientos*. 2ª edición . McGrawHill, México. 622 p.
- Swain, T. 1977. Secondary compounds as protective agents. *Annual Review of Plant Physiol.* 28: 479-501.
- Theodorus, 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.
- Tolera, A., Khazaal, K., Orskov, ER. 1997. Nutritive evaluation of some browse species. *Anim. Feed Sci. Technol.* 67:181-195.
- Van Hoven, W., 1984. Tannins and digestibility in greater Kudu. *Can. J. Anim. Sci.* 64:177 (suppl).

- Van Soest, P.J. 1994. Nutritional Ecology of the ruminant (2nd Edn.). Cornell University Press. Ithaca.NY (Estados Unidos).
- Waghorn, G.C., John, A., Jones, W.T. and Shelton, I.D. 1987. Nutritive value of *Lotus corniculatus* L. containing low and medium concentrations of condensed tannins for sheep. Proc. New Zealand Soc. Anim. Prod. 47: 25-30.
- Waghorn, G.C., Shelton, I.D. McNabb, W.C. 1994. Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* its nutritive value for sheep. 1. Non-nitrogenous aspects. J. Agric. Sci., Cambridge. 123: 99-107.
- Wang, Y., Douglas, G.B., Eaghorn, G.C., Barry, T.N., Foote, A.G. and Purchas, R.W. 1996. Effect of condensed tannins upon the performance of lambs grazing *Lotus corniculatus* and lucerne (*Medicago sativa*). J. Agric. Sci. Cambridge. 126: 87-98.
- Zinn R.A., Owens, F.N. 1986. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. Can. J. Anim. Sci., 66, 157-166.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIÓN GENERAL

Las dos especies conocidas como cazahuate blanco y negro, causantes de intoxicación en cabras en el periodo de sequía (primavera-verano) en la región Mixteca baja de Oaxaca, fueron identificadas como *Ipomoea murucoides* e *Ipomoea pauciflora* subsp *pauciflora*, pertenecientes a la misma familia (Convolvulaceae). Ambas especies mostraron un alto porcentaje de proteína y extracto etéreo, sin embargo, se encontró la presencia de diversos metabolitos secundario en los cuatros extracto evaluados de ambas especies, presentando un alto contenido (+++) de taninos y flavonoides, así como la presencia notable (++) de terpenoides y alcaloides libres y liberados. Mediante el bioensayo de toxicidad de nauplios de *Artemia salina*, se demostró que el extracto metanólico (alto contenido de taninos) fue el más tóxico en ambas especies a una concentración de 3.55 mg/mL para *I. pauciflora* subsp. *pauciflora* y 1.46 mg/mL para *I. murucoides*, en comparación con los otros extractos.

Para corroborar la presencia y determinar los efectos de los taninos presentes en el extracto metanólico de ambas especies, se procedió a evaluar cuatro diferentes concentraciones del extracto mediante la técnica de producción de gas *in vitro* sin y con la adición de PEG 6000. Se concluyó que los efectos de los tratamientos (conforme la concentración del extracto aumentaba) mostraron una gradual baja de producción de gas en los parámetros cinéticos en base a mL/g de MS, MO, MSD y MOD de las 6 a 96 horas de incubación, una disminución en la producción de ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y relación acetato: propionato), así como efectos negativos en la concentración de bacterias ruminales totales.

Finalmente, el polietilenglycol (PEG 6000) utilizado como un agente inhibidor, permitió detectar la actividad biológica de estos compuestos fenólicos (taninos) al adicionarlos en las diferentes

concentraciones de los tratamientos (0.0, 0.2, 0.4 y 0.8 g). El PEG permitió neutralizar el efecto de los taninos sobre la fermentación ruminal, modificando los resultados de los parámetros descritos anteriormente con tendencia positiva. En base a estos resultados, se determinó que ambas especies presentan compuestos fenólicos (taninos), sin embargo, *I. murucoides* fue la que presentó el mayor contenido de los mismos en base a las respuestas de las variables evaluadas. Con base en los resultados obtenidos en la presente investigación, se concluye que los taninos son unos de los compuestos presentes en las dos especies de *Ipomoea* (*murucoides* y *pauciflora* subsp. *pauciflora*), responsables de ocasionar señales de intoxicación en los rebaños caprinos en temporada de sequía, causando diferentes signos clínicos que conllevan a presentar altos índices de morbilidad y mortalidad de cabras en la Mixteca baja de Oaxaca.