



11673
0

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**EFFECTO NEMATICIDA Y NUTRICIONAL DE LOS
TANINOS DE FORRAJES TROPICALES EN
BORREGOS**

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL
P R E S E N T A :
J U A N L O P E Z

DIRECTOR: ARMANDO SHIMADA M.

**TUTORES: GERMINAL J. CANTO A., OSVALDO F. IBARRA V., ZOILA I.
TEJADA C., CARLOS G. VASQUEZ P. Y JUAN DE DIOS GARZA F.**

CUAUTITLAN, IZCALLI,

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi esposa María

El esfuerzo fue de los dos

A mis hijos: Luis, Juan, Teresa, Miguel

Don Juan arriesgó...!

A mi hermana Jovita, a sus hijos

Que son un recuerdo más de mis padres

Dr. Armando Shimada

**Dra. Irma Tejada, Drs. Carlos Vásquez, Froylan Ibarra,
Germinal Cantó y Juan de Dios Garza**

¡Gracias por su guía para escribir la historia!

Por sus consejos

A los Drs. Carlos Vega y Murguía y Zeferino García Vázquez

¡Gracias por su apoyo Técnico!

A la Dra. Amalia Martínez A

A los MVZ:

Oscar García G

Martín Ramírez S

Jesús Almaráz

Xóchitl Pastrana

Manuel Cornelio

Al Ing. Enrique Vera

Dr. Agustín Báez Ruíz

**Gracias por facilitar la administración de los recursos
para esta tesis.**

Esta tesis, se realizó con apoyo financiero parcial de la Fundación Produce-Tabasco A. C. y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

El responsable da especialmente las gracias al CP. Edgar Méndez Garrido por su gestión para obtener el soporte económico. A la Dra. Bertha Giner-Chavez por la orientación sobre taninos condensados y al Dr. Víctor Vásquez Prats, por su apoyo en la obtención de materiales biológicos (huevos y larvas de *Haemonchus contortus*).

RESUMEN

El objetivo fue evaluar *in vitro*, la actividad de taninos condensados (TC) de forrajes tropicales, precipitando proteínas, modificando la digestibilidad ruminal de materia seca y su efecto sobre huevos y larvas L-III de *Haemonchus contortus*. El resultado de un estudio descriptivo en 20 forrajes, determinó contenido variado de TC. El contenido total de taninos condensados, determinado con butanol-HCl, resultó de 12.2 a 278.1 g K⁻¹. En general las leguminosas presentaron los valores más altos y las gramíneas los más bajos. La actividad biológica de los TC de *Arachis pintoi*, *Gliricidia sepium*, *Guazuma ulmidifolia*, *Leucaena leucocephala* y *Manihot esculenta*, mediada como proteína precipitada, por difusión radial, tuvo efecto sobre la precipitación de albúmina sérica bovina (ASB), papaína, pepsina y tripsina a los pHs 5.0 y 6.8. Los valores de precipitación variaron de cero a 82.9 µg. La digestibilidad de la materia seca de *Medicago sativa* y *Brachiaria decumbens* con TC de *L. leucocephala*, disminuyó (75.5 a 68.7% y 77.4 a 62% respectivamente); los TC de *M. esculenta*, disminuyeron la de *B. decumbens* (77.4 a 61.9%) y la de *M. sativa* se vio incrementada de 75.7 a 87.1%. Los Taninos condensados de *A. pintoi*, *G. ulmidifolia*, *L. leucocephala* y *M. esculenta* tuvieron alta eficacia contra larvas L-III. Con 4.5 y 45 ppm afectaron 50% o más de las larvas. No se observó efecto ovicida. Se concluye que los TC evaluados fueron biológicamente activos, *in vitro*, precipitando proteínas, modificando la digestibilidad ruminal y resultaron eficaces nematicidas sobre larvas L-III de *H. contortus*.

INDICE

CONTENIDO

Pag.

CAPITULO UNO

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO	1

CAPITULO DOS

REVISIÓN DE LITERATURA	2
1. Importancia de los taninos	2
2. Características químicas de los taninos	2
3. Clasificación de los taninos	4
4. Biosíntesis de taninos	4
5. Mecanismo de acción de los taninos	9
6. Efecto antiparasitario	12
BIBLIOGRAFÍA	13

CAPITULO TRES

DETERMINACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS Y FENOLES TOTALES EN PLANTAS FORRAJERAS DEL TRÓPICO HÚMEDO	17
RESUMEN	17
1. INTRODUCCIÓN	17
2. OBJETIVO	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Forrajes.....	19
3.2. Extracción y determinación de taninos condensados.....	19
3.2.1. Extracción de taninos condensados libres (TCL).....	19
3.2.2. Extracción de taninos condensados adheridos a proteína (TCAP).....	20
3.2.3. Extracción de taninos condensados adheridos a fibra (TCAF).....	20
3.2.4. Estándar para determinación de TCL, TCAP y TCAF.....	20

CONTENIDO	Pag.
3.2.5. Curvas para determinar taninos condensados	21
3.2.6. Determinación de taninos condensados	21
3.3. Determinación de fenoles totales (FT)	21
3.4. Análisis estadístico	21
4. RESULTADOS	22
5. DISCUSIÓN	23
BIBLIOGRAFÍA	26

CAPITULO CUATRO

PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNA *in vitro* POR TANINOS CONDENSADOS PURIFICADOS DE PLANTAS FORRAJERAS DEL TRÓPICO HÚMEDO

RESUMEN	28
1. INTRODUCCIÓN	28
2. OBJETIVO	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Extracción y purificación de taninos condensados (TC)	29
3.2. Precipitación de proteína	30
3.3. Evaluación de la precipitación	30
3.4. Análisis estadístico	31
4. RESULTADOS	31
5. DISCUSIÓN	33
5.1. Efecto tanino	33
5.2. Efecto proteína	33
5.3. Efecto pH	34
5.4. Efecto interacción tanino-proteína	34
5.5. Efecto interacción tanino-pH	34
5.6. Efecto interacción proteína-pH	34
5.7. Efecto interacción tanino-proteína-pH	35
BIBLIOGRAFÍA	38

4

CAPITULO CINCO

EFFECTO DE LOS TANINOS CONDENSADOS PURIFICADOS DE PLANTAS FORRAJERAS DEL TRÓPICO SOBRE LA DIGESTIBILIDAD RUMINAL DE FORRAJES <i>in vitro</i>	40
RESUMEN	40
1. INTRODUCCIÓN	40
2. OBJETIVO	41
3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1. Forrajes	41
3.2. Purificación de taninos	41
3.3. Digestibilidad ruminal <i>in vitro</i>	41
3.4. Análisis estadístico	42
4. RESULTADOS	42
4.1. Experimento 1	42
4.2. Experimento 2	42
5. DISCUSIÓN	43
BIBLIOGRAFÍA	45

CAPITULO SEIS

EFICACIA <i>in vitro</i> DE TANINOS CONDENSADOS PURIFICADOS DE FORRAJES TROPICALES CONTRA HUEVOS Y LARVAS DE <i>Haemonchus contortus</i>	47
RESUMEN	47
1. INTRODUCCIÓN	47
2. OBJETIVO	48
3. MATERIALES Y MÉTODOS	48
3.1. Extracción y purificación de taninos	48
3.2. Soluciones patrón	49
3.3. Aislamiento de huevos	49
3.4. Obtención de larvas	49

CONTENIDO	Pag.
3.5. Medio de crecimiento	49
3.6. Evaluación nematocida	49
3.7. Análisis estadístico	50
4. RESULTADOS	50
4.1. Experimento 1	50
4.1.1. Eficacia ovicida	50
4.1.2. Eficacia nematocida	50
4.2. Experimento 2	51
4.2.1. Eficacia contra larvas L-III de <i>H. contortus</i>	51
5. DISCUSIÓN	51
5.1. Experimento 1	51
5.2. Experimento 2	52
BIBLIOGRAFÍA	56

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

CAPITULO DOS

REVISIÓN DE LITERATURA.

Figura 1. Formación de fenóxidos, radicales y puentes de hidrógeno por fenoles	3
Figura 2. Esterificación de Ac. gallico o Ac. ellagico para formar taninos hidrolizables	5
Figura 3. Taninos oligoméricos de Ac. Gallico	6
Figura 4. Anthocianidinas monoméricas derivadas de taninos condensados	7
Figura 5. Biosíntesis de taninos	8

CAPITULO TRES**DETERMINACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS Y FENOLES TOTALES EN PLANTAS FORRAJERAS DEL TRÓPICO HÚMEDO**

Cuadro 1. Contenido promedio de taninos condensados y fenoles totales en forrajes tropicales $\text{g kg}^{-1} \pm \text{DE}$ y (% del total)-----	25
--	----

CAPITULO CUATRO**PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNA *in vitro* POR TANINOS CONDENSADOS PURIFICADOS DE PLANTAS FORRAJERAS DEL TRÓPICO HÚMEDO**

Cuadro 1. Precipitación promedio de proteína por efecto de taninos condensados, tipo de proteína y pH (μg)-----	36
Cuadro 2. Efecto promedio de precipitación de proteína en la interacción tanino-proteína (μg)-----	36
Cuadro 3. Efecto promedio de precipitación de proteína por la interacción taninos o proteína con el pH (μg)-----	37
Cuadro 4. Precipitación promedio de proteína en la interacción tanino-proteína-pH (μg)-----	37

CAPITULO CINCO**EFFECTO DE LOS TANINOS CONDENSADOS PURIFICADOS DE PLANTAS FORRAJERAS DEL TRÓPICO SOBRE LA DIGESTIBILIDAD RUMINAL DE FORRAJES *in vitro***

Cuadro 1. Digestibilidad promedio <i>in vitro</i> de <i>M. sativa</i> con la adición de taninos condensados purificados de forrajes tropicales-----	44
Cuadro 2. Digestibilidad promedio <i>in vitro</i> de <i>B. decumbens</i> con la adición de taninos condensados purificados de forrajes tropicales-----	44

CAPITULO SEIS**EFICACIA *in vitro* DE TANINOS CONDENSADOS PURIFICADOS DE FORRAJES TROPICALES CONTRA HUEVOS Y LARVAS DE *Haemonchus contortus***

Cuadro 1. Porcentaje de eficacia ovicida <i>in vitro</i> por taninos condensados sobre huevos de <i>H. contortus</i> -----	54
Cuadro 2. Porcentaje de eficacia nematicida <i>in vitro</i> de taninos condensados sobre larvas L-III de <i>H. contortus</i> (Exp. 1) -----	54
Cuadro 3. Porcentaje de eficacia nematicida <i>in vitro</i> de taninos condensados sobre larvas L-III de <i>H. contortus</i> (Exp. 2) -----	55
APÉNDICE.	
Cuadros de análisis estadísticos -----	59

CAPITULO UNO

INTRODUCCIÓN

En los trópicos, las leguminosas forrajeras y otras especies vegetales son el recurso con más potencial para aumentar la producción animal; sin embargo, no han sido del todo aprovechadas. Algunos forrajes contienen factores que pueden ser benéficos para animales rumiantes; de importancia puede ser la presencia de taninos condensados; estos pueden influir en su valor nutritivo y en general en el de la dieta, al modificar su digestibilidad. Los taninos condensados son flavonoles muy reactivos, que pueden unirse simultáneamente a más de un sitio de la superficie de las proteínas y otras macromoléculas, característica dada por los grupos hidroxilo sustituyentes localizados en los anillos aromáticos de sus unidades estructurales. Esta característica química ofrece a los rumiantes, la ventaja de poder evitar la digestión de proteína en el rumen, generándose su sobrepaso al intestino y mayor retención de nitrógeno. También se ha encontrado que algunos taninos pueden matar parásitos gastrointestinales de animales y nematodos de vida libre.

La concentración de taninos en las plantas es regulada por características genéticas y por efecto del medio en que se cultivan. En los ecosistemas tropicales las condiciones ambientales, como la acidez del suelo, pueden favorecer el incremento de una amplia gama de estructuras moleculares de estos metabolitos y con ello de actividad biológica.

OBJETIVO.

El objetivo de esta tesis fue demostrar que los taninos condensados purificados de forrajes tropicales, precipitan proteínas, modifican la digestibilidad ruminal y tienen efecto ovicida y nematocidas sobre huevos y larvas L-III de *Hemonchus contortus*, *in vitro*.

CAPITULO DOS

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Importancia de los taninos. El valor de los forrajes no solo esta determinado por su contenido de proteína o su composición bromatológica, sino también por el consumo que de ellos hace el animal, y que se ve influenciado por algunos compuestos químicos que las plantas sintetizan (Bernaye *et al.*, 1989; D'Mello, 1992; Makkar, 1993), como los taninos condensados. Estos compuestos pueden influir en el valor nutritivo de los alimentos al modificar su digestibilidad, reducir el consumo voluntario y en el animal, fundamentalmente no rumiantes, pueden ocasionar efectos sistémicos como alteraciones fisiológicas, efectos tóxicos e incremento en los requerimientos de energía (Neucere *et al.*, 1978; D'Mello, 1992; Reed, 1995).

2. Características químicas de los taninos. El termino tanino, se usa para definir compuestos fenólicos que poseen uno o mas grupos hidroxilo (OH) sustituyentes, ligados al anillo aromático. Los compuestos que poseen varios hidroxilo sustituyentes son referidos como polifenoles. Una propiedad importante de los fenoles es su acidez; esta característica la adquieren al separarse el hidrógeno del oxígeno del hidroxilo. Otra es que pueden formar iones fenóxido cargado negativamente (fig. 1). Los fenóxidos son solubles en agua, esta característica se incrementa cuando en el medio se encuentran cationes metálicos como el sodio, u orgánicos como el NH_4 . La propiedad de ionización de los fenóxidos ofrece ciertas características: 1. Pueden delocalizar la carga negativa dentro del anillo formando aniones hemiquinona, en estos, la carga se encuentra más sobre el carbono que sobre el oxígeno. 2. Cuando un ion fenoxido pierde un electrón forma un radical que puede ser delocalizado. Los radicales pueden por acoplamiento oxidativo formar enlaces covalentes carbono-carbono o carbono-oxígeno. 3. También tienen la capacidad de formar puentes de hidrógeno con otras moléculas, al interactuar el hidrógeno ácido fenólico y el centro básico (carga negativa) de otra molécula (Waterman and Mole, 1994).

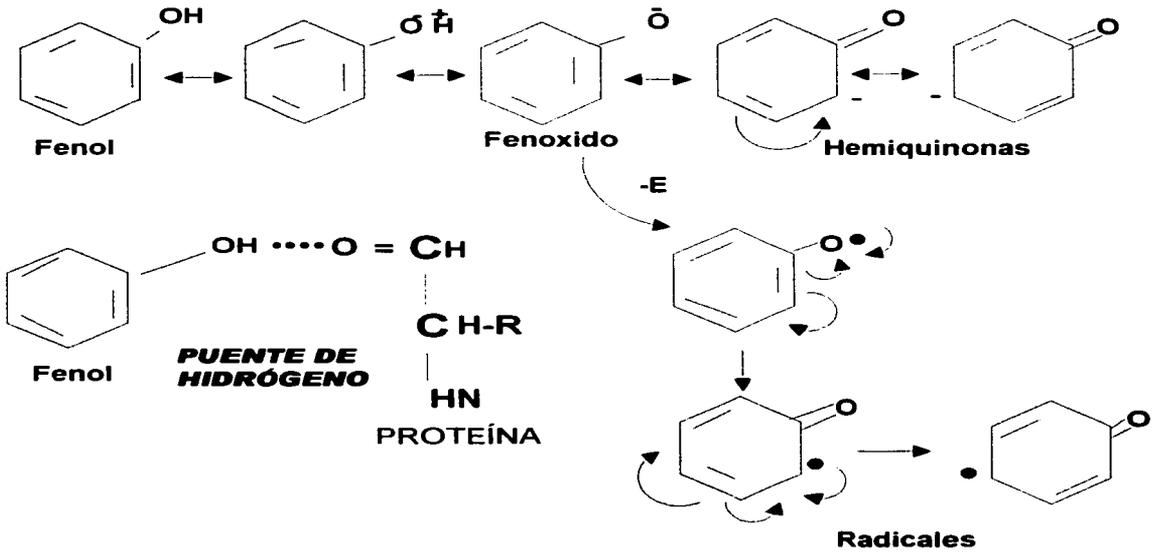
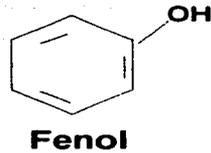
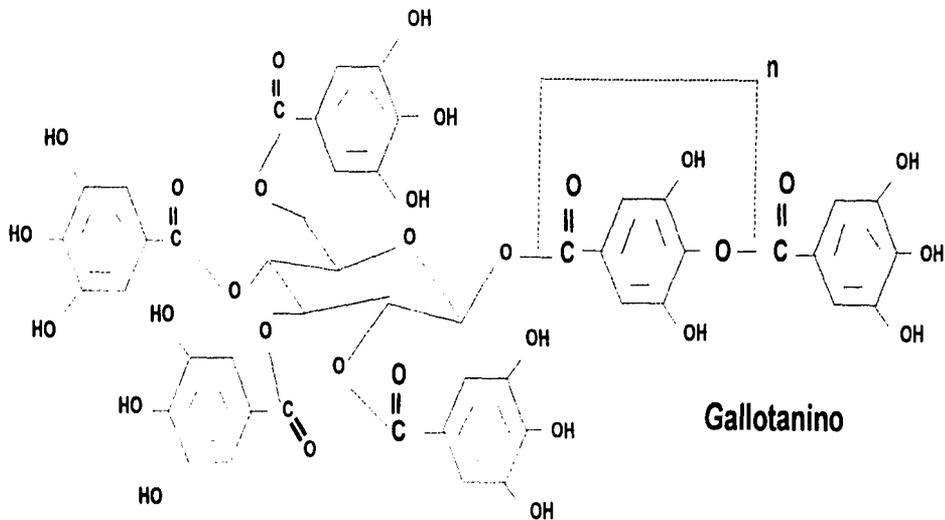


Figura 1. Formación de fenóxidos radicales y puentes de hidrógeno por fenoles. Adaptado de Waterman and Mole (1994).

TESIS CON
 FALLA DE CUBEN

3. Clasificación de los taninos. Los taninos se clasifican como hidrolizables y condensados. Los hidrolizables se caracterizan por tener un poliol, generalmente con d-glucosa como núcleo. En estos, los grupos hidroxilo de la molécula del carbohidrato, están parcial o totalmente esterificado con fenoles (figura 2). Estos taninos pueden ser oligómeros del fenol que los forma, unidos entre el meta hidroxilo de un fenol y el grupo carboxilo de otro. Se pueden esterificar por cada molécula de glucosa uno o varios fenoles (Fig 3). El termino hidrolizable se debe a la susceptibilidad de estos a hidrolizarse por ácidos, bases o esterasas (taninas) para rendir carbohidratos y ácidos fenólicos (Mann, 1978; Muller-Harvey *et al.*, 1988; Field and Lettinga, 1992). Los taninos condensados, se distribuyen más ampliamente en la naturaleza que los hidrolizables. Los taninos condensados son oligómeros de unidades flavonoides unidas carbono-carbono (fig. 4). Estos no son susceptibles a hidrólisis en condiciones normales, pero expuestos a temperatura elevada en ácidos fuertes pueden ser degradados a antocianidinas como: Flavon-3en-ol, cianidin, etc. (Haslam, 1977; Haslam, 1989; Waterman and Mole, 1994).

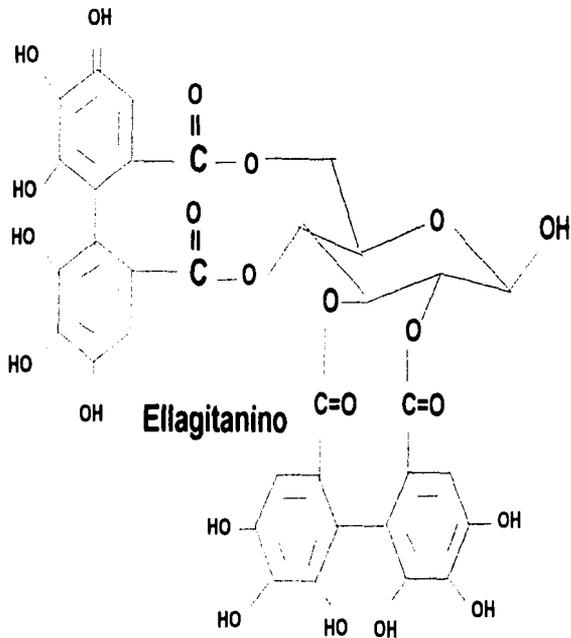
4. Biosíntesis de taninos. En las plantas, la síntesis de taninos ocurre en el retículo endoplásmico. Se han propuesto dos rutas que tienen como intermediario común al ácido shikímico. Una es la vía del ácido gallico, pasando por ácido quínico como precursor de los taninos hidrolizables y la otra es por la desaminación de fenilalanina para rendir ácido cinámico. Por esta ruta se sintetizan los taninos condensados y otros fenilpropanoides, como la lignina (fig. 5). Los taninos se almacenan en una gran vacuola en la célula. La síntesis de los condensados ha sido ampliamente especulada; se ha propuesto que ocurre a través de la ruta del shikimato (fig. 5). En la síntesis, la fenilalanina es el precursor de p-coumaril que reacciona con tres unidades de C₂ para producir calcon y flavanones, hasta rendir flavon-3en-3-ol y flavon-3-ol que son grupos flavonoides con ausencia de oxígeno en la posición 4 del anillo heterocíclico. El flavon-3en-3-ol es un intermediario clave en la síntesis, su reducción debe rendir el flavon 3-ol y la oxidación el tanino condensado. Se ha demostrado que el anillo A del flavon deriva del acetato y el anillo B y los tres carbonos del anillo heterocíclico provienen del cinamato (Haslam,

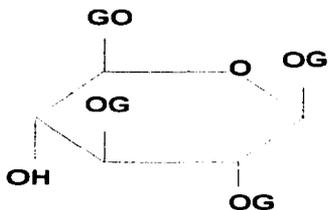


5

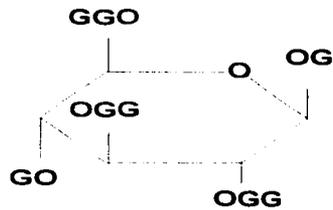
TESIS CON
 FALLA DE CUBIEN

Fig. 2. Esterificación de Ac. gallico o Ac. elleagico para formar taninos hidrolizables. Adaptado de Waterman and Mole (1994)

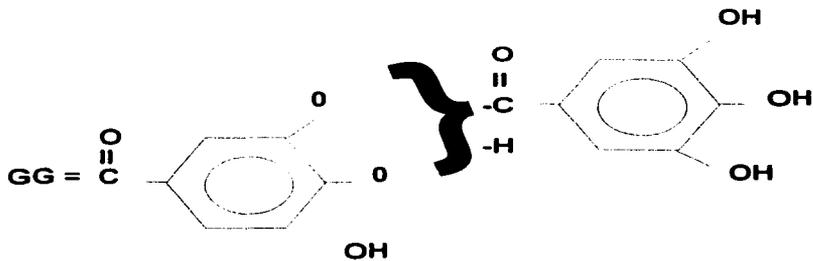




Tetra galloil



Octa galloil



digalloil = galloil-galloil

Fig. 3. Taninos oligoméricos de Ac. Gallico.
Adaptado de Waterman and Mole (1994)

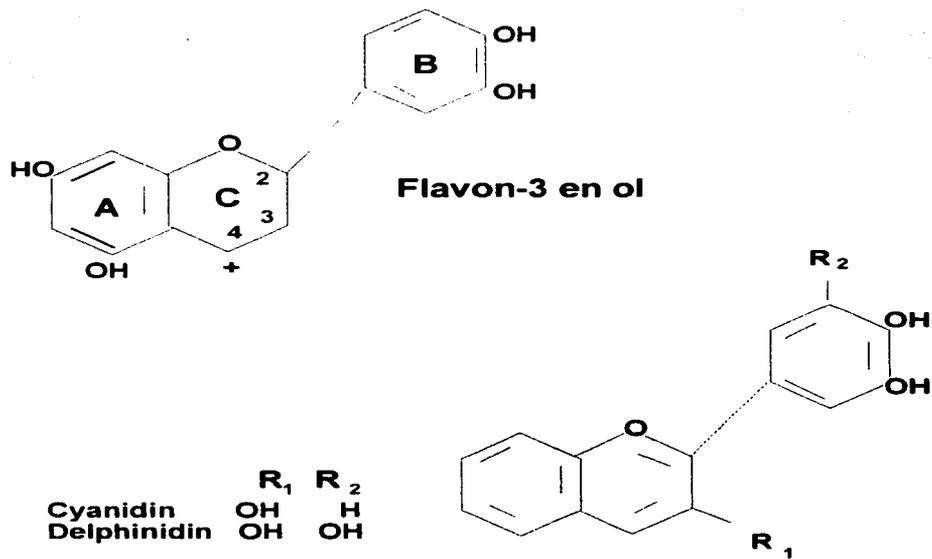
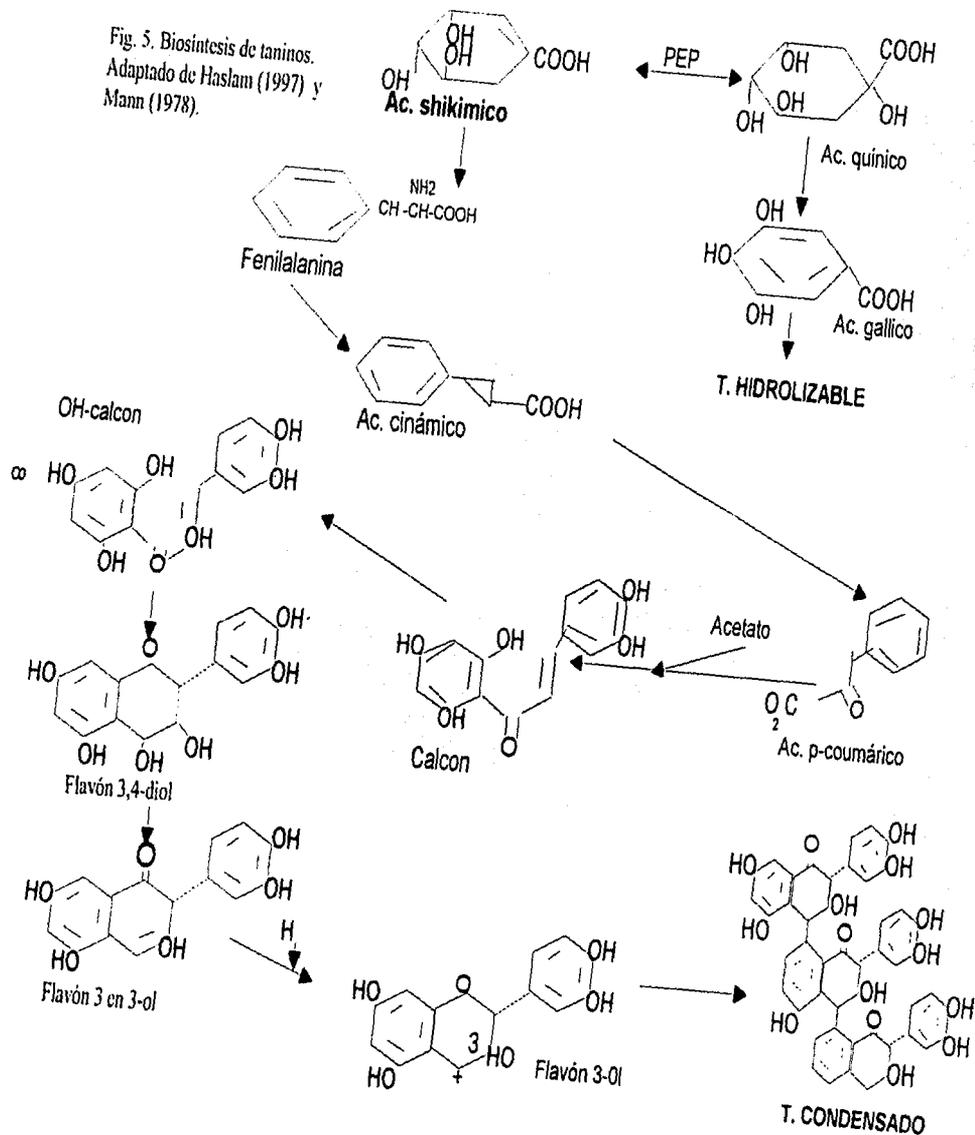


Fig. 4. Anthocianidinas monoméricas derivadas de taninos condensados. Adaptado de Waterman and Mole (1994)

Fig. 5. Biosíntesis de taninos.
Adaptado de Haslam (1997) y
Mann (1978).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1977; Mann, 1978; Waterman and Mole, 1994). Los taninos condensados son oligómeros de unidades estructurales múltiples, generalmente hidrosolubles, con un peso molecular de 500 a 20,000; las moléculas de elevado peso molecular se forman por procesos, oxidativos y no son hidrosolubles (Hagerman and Buttlar, 1980; Waterman and Mole, 1994).

La concentración de taninos en los forrajes y en las semillas es determinada por características genéticas de la especie. Aunado a lo anterior los metabolitos derivados del ácido shikimico, se producen eficientemente cuando los cultivos crecen en condiciones de deficiencia de nutrientes y en suelos ácidos. En adición, se ha relacionado la incidencia de luz solar sobre los cultivos, con la producción de aleloquímicos fenólicos. En los ecosistemas tropicales, es posible encontrar las condiciones antes señaladas, lo que con seguridad favorece el incremento de metabolitos secundarios vía el ácido shikimico (Barry and Forss, 1983; Jakson and Barry, 1996).

5. Mecanismo de acción de los taninos. La función de los taninos en la planta no es clara, no se ha encontrado actividad metabólica, se dice que poseen función redox y protegen a las plantas del ataque de insectos, microorganismos, y herbívoros superiores (Haslam, 1977; Hagerman and Buttlar, 1980; Haslam, 1989; Waterman and Mole, 1994).

La presencia de taninos en el alimento puede jugar un papel significativo, su efecto puede manifestarse desde una disminución en el consumo, hasta alteraciones nutricionales y metabólicas, incluso la muerte (Bernaye *et al.*, 1989). Concentraciones desde 0.6% en el alimento consumido por no rumiantes, pueden generar efectos antinutricionales, que incluyen depresión del consumo, del crecimiento, baja utilización de la proteína, daños al epitelio gastrointestinal, alteración en la excreción de cationes y balance negativo de la proteína (Treviño *et al.*, 1992; Ortiz *et al.*, 1993). En rumiantes concentraciones en el forraje de hasta 60 g Kg⁻¹, pueden mejorar la utilización de proteínas. Niveles superiores pueden originar menor digestibilidad de la fibra, reducir el consumo voluntario y el crecimiento (Barry and Forss, 1983; Barry and Manley, 1984; Barry *et al.*, 1986;

Mueller-Harvey *et al.*, 1988; Núñez-Hernández *et al.*, 1991). El consumo voluntario, se ve afectado por la sensación que causan los taninos en la boca, al precipitar las proteínas de la saliva o al adherirse a las de la mucosa de la boca y lengua, induciendo al animal a seleccionar su alimento (Haslam and Lilley, 1988; Núñez-Hernández *et al.*, 1991; Terrill *et al.*, 1992; Reed, 1995).

Los taninos ligan proteínas formando complejos estables en un rango de pH de 3.5 a 7.0 y se pierde la estabilidad cuando se incrementa o disminuye. Esta característica ofrece la ventaja de poder evitar la degradabilidad de proteínas a nivel del rumen (McLeod 1974; Jones and Mangan, 1977; Barry and Manley, 1984; Waterman and Mole, 1994). Trabajos de investigación (Barry and Manley, 1984; Barry *et al.*, 1986; Núñez-Hernández *et al.*, 1991) demostraron que la digestibilidad aparente del nitrógeno antes del abomaso se reduce con el empleo de taninos; también disminuye la concentración de amonio en el rumen y el paso de aminoácidos de la dieta, al intestino se incrementa. Por eso la presencia de taninos en el alimento de rumiantes se asocia con una mayor retención de nitrógeno. Estudios *in vivo*, sugieren que forrajes con hasta 60 g Kg⁻¹ de taninos condensados totales, pueden generar esos efectos; concentraciones más altas pueden deprimir la digestibilidad de carbohidratos rápidamente fermentables, de hemicelulosa y el consumo voluntario (Barry and Manley, 1984; Barry *et al.*, 1986). Diferentes mecanismos se han propuesto para explicar como los taninos influyen en la utilización de proteínas y carbohidratos. Cuando se ofrecen a rumiantes forrajes con taninos, generalmente las bacterias del rumen penetran la barrera física a través de los estomas, lenticelas y áreas dañadas, empezando por los tejidos rápidamente digestibles; este proceso se incrementa gracias a que los hongos del rumen pueden penetrar directamente la cutícula. Se asume que el proceso de digestión por microorganismos es continuo, por intermediación de feruloil y coumaroil esterasas, para romper los dímeros fenólicos de la lignina, impactando en la digestión del contenido y la pared celular. Durante este proceso, los taninos que no se asocian a la pared celular, rápidamente se unen a las proteínas formando complejos enlazados a través de puentes de hidrógeno (McAllister *et al.*, 1994), reduciendo su digestión de proteínas y

carbohidratos. La menor digestibilidad puede deberse a la precipitación extracelular de las enzimas microbianas. También se cree que pueden ligar proteínas a través de la interferencia de los sitios reactivos (Jones *et al.*, 1973). Blytt *et al.* (1988), encontraron que la fosfatasa alcalina y la 5-nucleótido fosfodiesterasa de la mucosa intestinal de bovino, fueron inhibidas por taninos condensados de semillas de sorgo y quebracho. Se ha reportado que la glucosidasa, tripsina, amilasa, lipasa y celulasa son inhibidas, por ácido tánico y taninos condensados. Otras enzimas que han sido inhibidas son la Angiotensina convertina y a la Xantina oxidasa (Jones *et al.*, 1973; Jones and Mangan, 1977; Blytt *et al.*, 1988; Petersen and Hill, 1991; Young Je Cho *et al.*, 1993). Se ha demostrado que en la interacción tanino-proteína intervienen fuerzas hidrofobas y puentes de hidrógeno. La formación de puentes de hidrógeno es el mecanismo que mejor explica la reversibilidad del sustrato. Esta unión reversible protege a las proteínas de la degradación bacteriana en el rumen, generándose proteína de sobrepaso que se disocia en el duodeno, quedando disponible en el intestino sin sufrir cambios (Jones and Mangan, 1977; Neucere *et al.*, 1978; Waghorn *et al.*, 1987; Hagerman and Butler, 1980). Se ha argumentado que la estructura molecular de los taninos y de la proteína son factor determinante en la unión con las proteínas. Esto se ha demostrado con trabajos en que los taninos interactuaron monoionicamente con algunas cadenas de aminoácidos, efecto que no se observa con otras (Neucere *et al.*, 1978; Meek and Weiss, 1979). Una característica es que a mayor número de grupos hidroxilo en la molécula de taninos, se genera mayor número de enlaces de hidrógeno con las cadenas de proteína (Neucere *et al.*, 1978; Blytt *et al.*, 1988). En la industria de la curtiduría de pieles se ha demostrado que taninos de 2-10 unidades ($500-3000 \text{ g mol}^{-1}$), resultan más eficientes como agentes tánicos; esta característica es debida a que las formas oligoméricas tienen mayor capacidad para formar múltiples enlaces. Además, el tamaño de la molécula, les confiere capacidad bactericida. Las estructuras de mediano peso molecular son más eficientes bactericidas por que reaccionan con mayor eficacia con las enzimas extra e intracelulares de las bacterias, que las moléculas monoméricas o de elevado peso molecular (Field and Lettinga, 1992;

McAllister *et al.*, 1994). El mecanismo se explica por que las moléculas con peso superior a 8000 g/mol, o los formados por procesos de polimeración oxidativa (humus), no pueden penetrar la membrana de la célula bacteriana como los de peso intermedio (500-7700); en tanto que las moléculas monoméricas no tienen la capacidad de formar múltiples puentes de hidrógeno (Field and Lettinga, 1992).

6. Efecto antiparasitario. Otra característica de los taninos es su actividad antiparasitaria. Algunos fenoles son molusquicidas y pueden evitar la presencia de Schistosomiasis al controlar al nematodo (Hussein, 1983; Marston and Hostettmann, 1985). Evidencia de efecto nematicida es el obtenido con taninos del fruto granada, que controlaron experimentalmente a *Taenia solium* y al *Ascaridia galli* (Hukkeri *et al.*, 1993); además, prácticamente se ha observado que los taninos pueden controlar la parasitosis de bovinos infectados con *Rabdities bovis* (Odongo and D'sousa, 1989). Lo anterior es probable, ya que los parásitos producen enzimas que les permiten realizar acciones como: penetración de los tejidos del huésped, digestión extracelular, actividad anticoagulante, evasión de la respuesta inmune, etc. con las que dañan al huésped (Ozerol and Silverman, 1969; Rogers, 1982; Knox and Jones, 1990).

Esas características de los taninos condensados deben ser consideradas, por la peculiaridad que pueden transmitir a los forrajes, como reguladores de la digestión y el consumo de los alimentos, además de que ofrecen una alternativa en el control de las parasitosis de los rumiantes.

BIBLIOGRAFÍA.

Barry TN, Forss DA. The Condensed tannin content of vegetative *Lotus pedunculatus*, its regulation by fertilizer application, and effect upon protein solubility. *J Sci Food Agric* 1983; 34:1047-1056.

Barry TN, Manley TR. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep., 2. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. *Br J Nutr* 1984; 51:493-504.

Barry TN, Manley TR, Duncan SJ. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep., 4. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. *Br J Nutr* 1986; 55:123-137.

Bernaye EA, Driver GC, Bilgener M. Herbivore and plant tannins. *Advances in Ecological Research* 1989; 19:263-302.

Blytt HJ, Guscar TK, Butler LG. Antinutritional effects and ecological significance of dietary condensed tannins may not be due to binding and inhibiting digestive enzymes. *J Chem Ecol* 1988; 14(6):1455-1465.

D'Mello JPF. Chemical constraints to the use of tropical legumes in animal nutrition. *Anim. Feed Sci and Tech* 1992; 38 (2/3):237-261.

Field JA, Lettinga G. Biodegradation of tannins. Metal ions in biological systems. degradation of environmental pollutants by microorganisms and their metalloenzymes. Marcel Dekker Inc., New York. 1992; (28):61-97.

Hagerman AE, Butler LG. Condensed tannin purification and characterization of tannin-associated. *J Agric Food Chem* 1980; 28:947-952.

Haslam E. Symmetry and promiscuity in procyanidin biochemistry. *Phytochemistry* 1977; 16:1625-1640

Haslam E Gallic acid and its metabolites. In: Plant polyphenols: Synthesis properties, significance, ed Hemingway RW & Laks P.E. Plenum Press, NY, USA 1989; pp 169-194.

Haslam E, Lilley TH. Natural astringency in foodstuffs. A molecular approach. *Crit Rev Food Sci and Nutr* 1988; 27 1-38.

- Hukkeri VI, Kalyani GA, Hatpaki BC, Marvi FV.** *In vitro* anthelmintic activity of aqueous extract of fruit rind of punica granatum. *Fitoterapia* 1993; 64 (1) : 69-70.
- Hussein ASM.** Molluscicidal properties of *Acasia nilotica* subspecies tormentosa and astringens (II). *Fitoterapia* 1983; 54 (4) : 189-192.
- Jackson FS, Barry TN** The Extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree, shrub and forage legumes. *J Sci Food Agric* 1996; 71:103-110.
- Jones WT, Anderson LB, Ross MD.** Bloat in cattle, XXXIX. Detection of protein precipitants (Flavolans) in legumes, *N Z J Agric Res* 1973;16:441-446.
- Jones WT, Mangan JL.** Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop*) with fraction 1 leaf protein and with sub-maxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *J Sci Food Agric* 1977; 28:126-136.
- Knox DP, Jones DG.** Studies on the presence and release of proteolytic enzymes (proteinases) in gastro-intestinal nematodes of ruminants. *Int J for Parasitology* 1990; 20 (2) : 243 - 249.
- Mann J.** Secondary metabolism. Oxford University Press, Oxford Chemistry Series 1978.
- Makkar HPS.** Antinutritional factores in foods for livestock. Occasional publication. *Br Soc of Anim Prod* 1993; 16:69-85.
- Marston A, Hostettmann K.** Plant molluscicides. *Phytochemistry* 1985; 24 (4): 639-652.
- McAllister TA, Bae HD, Jones GA, Cheng KJ.** Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J Anim Sci* 1994; 72, 3004-3018
- McLeod MN.** Plant tannins their role in forages quality. *Nutr Abst Rev* 1974; 44:803-815.
- Meek KM, Weiss JB.** Diferential fixation of poly (L-Arginine) and poly (L-Lisine) by tannic acid and its application to the fixation of collagen in electron microscopy. *Biochimica et Biophysic Acta* 1979; 585 : 112 - 120.

Muller-Harvey I, McAllen AB, Theodoru M K, Beever DE. Phenolics in fibrous crop residues and their effects on the digestion and utilization of carbohydrates and proteins in ruminants in plant breeding and the nutritive value of crop residues. Ed. Reed J.D., Capper B.S. & Neate P.J.H. ILCA, Proceedings, ILCA, Addis Ababa, December 5-10. Ethiopia 1988 pp 97-132.

Neucere NJ, Jacks TJ, Sumrell G. Interactions of globular protein with simple polyphenols. *J Agric Food Chem* 1978; 26 (1):214-216.

Nuñez-Hernández G, Wallace JD, Holechek JL, Galyan ML, Cardenas M. Condensed tannins and nutrient utilization by lambs and goats feed low-quality diets. *J Anim Sci* 1991; 69:1167-1177.

O'dongo MO, D'Souza CF. Prevalence and treatment of bovine parasitic otitis in olkarkar group ranch of kajiado district kenya. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa* 1989; 37 (2) : 191-193.

Ortiz L, Centeno C, Treviño J. Tannins in faba beans seeds: Effects on the digestion of protein and amino acids in growing chicks. *Anim Feed Sci Technol* 1993; 41 271-278.

Ozerol NH, Silverman PH. Partial characterization of *Haemonchus contortus* exsheathing fluid. *J of Parasitology* 1969; 55 (1) : 79 -87.

Petersen JC, Hill NS. Enzyme inhibition by *Sericea lespedeza* tannine and the use of supplements to restore activity. *Crop Sci* 1991; 31(3):827-832.

Reed JD. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J Anim Sci* 1995; 73: 1516-1528.

Rogers WP. Enzymes in the exsheathing fluid of nematodes and their biological significance. *Int J for Parasitology* 1982; 12 (6) : 495 - 502.

Terrill TH, Rowan AM, Douglas GD, Barrey TN. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *J Sci Food and Agric* 1992; 58 (3) : 321-329.

Treviño J, Ortiz L, Centeno C. Effect of tannins from faba beans (*Vicia faba*) on the digestion of starch by growing chicks. *Anim Feed Sci Technol* 1992; 37 345-349.

Young Je Cho, Bong Jeun An, Cheong Choi. Isolation and enzyme inhibition of tannins from korean green tea. *Korean Biochem J* 1993; 26(3):216-223.

Waterman PG, Mole S. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Sci. Pub., 1994. London, UK, pp 90-91.

Waghorn GC, Ulyatt MJ, John A, Fisher MT. The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus* l. *Br J of Nutrition* 1987; 57:115-126.

CAPITULO TRES

DETERMINACIÓN DE TANINOS CONDENSADOS Y FENOLES TOTALES EN PLANTAS FORRAJERAS DEL TRÓPICO HÚMEDO

RESUMEN

Con el fin de conocer el contenido de taninos condensados (TC): taninos condensados libres (TCL), taninos condensados adheridos a proteína (TCAP), taninos condensados adheridos a fibra (TCAF), taninos condensados totales (TCT) y fenoles totales (FT), se realizó un estudio descriptivo en 20 forrajes tropicales. Las determinaciones, expresadas en g Kg⁻¹ de materia seca, se realizaron con las técnicas del Butanol-HCl y Azul de Prusia. Sobresalieron por su contenido de TCL: *D. ovalifolium* (228.4), *G. ulmidifolia* (129.7) y *L. leucocephala* (129.5). La mayor concentración de TCAP fue para: *G. sepium* (61.0), *F. macrophylla* (23.3) y *G. ulmidifolia* (21.1). Los valores mas altos de TCAF fueron en: *G. ulmidifolia* (55.1), *F. macrophylla* (46.7) y *G. sepium* (41.5). El contenido más alto de FT correspondió a: *F. macrophylla* seguido de *L. leucocephala* (89.6 y 83.6). Las gramíneas tuvieron mayor porcentaje de TCAF, pero en general la cantidad de TCT fue mas bajo que en las leguminosas y otras especies forrajeras. En conclusión, los resultados mostraron amplia variación de TC y FT en las especies forrajeras evaluadas.

1. INTRODUCCIÓN

En los trópicos, las leguminosas y otras especies vegetales pueden ser un recurso alimenticio importante para el ganado; sin embargo, antes se deben realizar estudios sobre su contenido y disponibilidad de nutrimentos, así como de factores antinutricionales que puedan limitar su consumo. De importancia en los forrajes, es el contenido de taninos condensados, estos pueden influir en el consumo voluntario, y en el valor nutritivo al modificar la digestibilidad ruminal (Hagerman and Butler, 1980; Reed, 1995). En las plantas la síntesis de taninos ocurre en el retículo endoplasmico y se almacenan en una gran vacuola central en la célula (Giner-

Chavez, 1996). Su concentración en los forrajes es determinada por las características genéticas, y se sintetizan eficientemente cuando los cultivos crecen en condiciones de deficiencia de nutrientes. En suelos ácidos donde la conversión de amonio a nitrato es muy baja, se reduce la incorporación de nitrógeno, favoreciendo esto el incremento de taninos (Barry and Forss, 1983). La función de los taninos en la planta no se asocia con ninguna actividad metabólica; se ha considerado su principal papel proteger a las plantas del ataque de insectos, microorganismos, y herbívoros superiores. Un atributo importante es su capacidad para unirse a proteínas y carbohidratos formando complejos (tanino-proteína o tanino-carbohidratos) solubles e insolubles a través de puentes de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos (Barry *et al.*, 1986; Giner-Chavez, 1996). La capacidad para formar esos complejos puede ser benéfica, ya que pueden generar en rumiantes, la reducción de la degradabilidad ruminal de la proteína, ocasionado el sobre paso de esta y mayor ganancia de peso. No obstante, pueden reducir el consumo y ocasionar alteraciones nutricionales y metabólicas (Barry and Manley, 1984; Barry *et al.*, 1986). Hagerman and Butler (1980) y Giner-Chavez, (1996) mencionan que el consumo voluntario, se puede afectar cuando en la planta los taninos forman complejos con proteínas (taninos condensados adheridos a proteína) y con carbohidratos estructurales (taninos condensados adheridos a fibra), o por la capacidad de estos para formar complejos con las proteínas de la saliva y de la mucosa de la lengua y boca (astringencia).

2. OBJETIVO

El objetivo de éste estudio fue determinar y describir la cantidad de taninos condensados libres o extractables (TCL), taninos condensados adheridos a proteína (TCAP), taninos condensados adheridos a fibra (TCAF) y fenoles totales (FT), en 20 especies forrajeras del trópico. Además, de seleccionar algunas por su contenido de TCL, para purificarlos y utilizarlos en los experimentos que se describen posteriormente.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Forrajes. Se analizaron los siguientes forrajes: *Desmodium ovalifolium*, *Flemigia macrophylla*, *Guazuma ulmidifolia*, *Leucaena leucocephala*, *Glyricidia sepium*, *Manihot esculenta*, *Arachis pintoi*, *Erithrina fusca*, *Melina arborea*, *Diphysa robinoides*, *Pueraria phaseoloides*, *Hibiscus rosa-sinensis*, *Brossimum alicastrum*, *Canavalia ensiformis*, *Erithrina poepigiana*, *Crotolaria maypurensis*, *Hemartria altissima*, *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria humidicola*, *Cynodon dactylon*. Los forrajes se cosecharon casi en su totalidad en el trópico húmedo del Estado de Tabasco, en suelos previamente clasificados como vertizoles y fluvisoles éutricos por Palma y Cisneros (1996). Los forrajes fueron seleccionados por su disponibilidad, o por su potencial para ser cultivados. Fueron cosechados manualmente simulando el corte que realizan los rumiantes cuando los consumen en el campo, inmediatamente, fueron congelados con hielo seco y acetona y almacenadas a -18 C; posteriormente se liofilizaron y fueron molidos con una criba de 1 mm, almacenados y protegidos de la luz a -18 C, para su posterior análisis.

3.2. Extracción y determinación de taninos condensados. Se empleó la técnica de Terrill *et al.* (1992) con modificaciones.

3.2.1. Extracción de taninos condensados libres (TCL). Por triplicado, 500 mg de muestra del forraje molido fueron pesados en tubos de centrifuga de 50 ml con tapa de rosca, y extraídos tres veces con una mezcla de 20 ml de una solución de ácido ascórbico al 0.1% en acetona-agua 7:3 v/v (AA). Los tubos fueron agitados en un agitador Vortex y centrifugados a 18,000 x g por 15 min. Los sobrenadantes se combinaron en un embudo de separación de 100 ml y se extrajeron con 30 ml de éter dietílico. Se formaron dos fases, recuperándose la inferior o acuosa. A la fase acuosa se aplicó succión a 25 °C para eliminar los residuos de disolventes; posteriormente, nuevamente fue centrifugada a 18000 x g 15 min, para remover los compuestos no taninos. El sobrenadante se diluyó a 50 ml con agua destilada para evaluar el contenido de taninos.

3.2.2. Extracción de taninos condensados adheridos a proteína (TCAP). Para obtener los TCAP se adicionaron a los residuos sólidos de la primera extracción, 15 ml de una solución de 10 g litro^{-1} de dodecil sulfato de sodio, 50 g litro^{-1} de 2-mercaptoetanol, y tris cloruro 10 mM, ajustando a pH 8.0 con HCl (DSS). Los residuos de forraje en DSS, fueron colocados en un baño María y mantenidos a ebullición por 45 min. Los tubos fueron retirados del baño, enfriados y centrifugados a 18000 x g por 15min, llevando el sobrenadante a otro tubo de centrifuga de 50 ml. Este proceso se repitió y la combinación de sobrenadantes se centrifugó a 18,000 x g por 15 min, para eliminar los residuos no fenoles. Para el análisis de TCAP, los sobrenadantes se combinaron y diluyeron a un volumen de 50 ml con DSS.

3.2.3. Extracción de taninos condensados adheridos a fibra (TCAF). Se extrajeron directamente de los residuos remanentes de la extracción de TCAP, como se describe posteriormente.

3.2.4. Estándar para determinación de TCL, TCAP y TCAF. Los TCL de *F. macrophylla* fueron purificados con la técnica de Hagerman (1991), con algunas modificaciones. A 1 g del forraje se adicionaron 10 ml de etanol agua al 80%. El etanol agua con el forraje se dejó reposar toda la noche a 4 °C, posteriormente fue filtrado a través de un crisol Pyrex con fondo de vidrio poroso (40-60 μ) con vacío. El líquido resultado de la filtración se adicionó a 100 ml de una mezcla de Sephadex LH-20 en etanol agua al 80% (v/v) (4g de Sephadex ml^{-1} de etanol agua), agitando suavemente por 3 minutos, con reposo de una hora. Posteriormente la mezcla se lavó con etanol agua al 95% (v/v), en un embudo de 1 litro, con placa de vidrio de porosidad de 15 a 20 μ , con ligera presión de vacío al inicio, hasta obtener una absorbancia de cero a 280 nm. Los taninos adheridos al Sephadex fueron eluidos con 300 ml de acetona agua al 50%. La acetona fue evaporada al vacío a 25 °C. La solución de taninos fue lavada 3 veces con un volumen igual de acetato de etilo para eliminar los residuos de acetona. El acetato de etilo remanente se evaporó al vacío a 25°C. Finalmente los líquidos con los taninos condensados fueron liofilizados.

3.2.5. Curvas para determinar taninos condensados. Las curvas se realizaron empleando los taninos purificados de *F. macrophylla*. La concentración de taninos por ml., fue de 0, 55. . . 660 μg , a partir de una solución patrón de 550 $\mu\text{g ml}^{-1}$ del tanino. Para la determinación de TCAP y TCAF la curva se elaboró en DSS.

3.2.6. Determinación de taninos condensados. La determinación de los TCL se realizó en los extractos AA y la de TCAP y TCAF con extractos DSS.

En la determinación de TCL y TCAP, a un mililitro de cada extracto, se adicionaron 6 ml de una solución recién preparada de butanol-HCL (95 : 5v/v) en un tubo Pyrex con tapón de rosca. Llevándose a reacción en un baño María en ebullición por 75 min. La lectura se hizo en un espectrofotómetro a 550 nm.

Contenido de TCAF. A 50 mg de los residuos sólidos resultado de la extracción de los TCAP, se adicionaron 1 ml de DSS y 6 ml de butanol-HCL; El desarrollo de color y las lecturas se realizaron en las condiciones antes mencionadas. Adicionalmente se corrieron blancos con la solución butanol-HCL.

El contenido de taninos condensados totales (TCT), fue la suma de los valores obtenidos de TCL, TCAP y TCAF. El porcentaje se expresó en relación a los TCT.

3.3. Determinación de fenoles totales (FT). Con el sobrenadante de TCL, la determinación se realizó siguiendo la técnica de Azul de Prusia (Price and Butler, 1977). La curva se elaboró empleando como estándar +catechin a las siguientes concentraciones 0, 40. . . 240 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Contenido de fenoles totales (FT). Se emplearon .250 ml del sobrenadante obtenido con AA, que se hicieron reaccionar como se sugiere. Después de 20 minutos de reacción se procedió a leer en espectrofotómetro a 720 nm.

3.4. Análisis estadístico. La estimación de las curvas se realizó con los valores de absorbancia, dados por la concentración de TC de *F. macrophylla* o de +catechin, utilizando modelos de regresión (SAS, 1990). Mientras que las determinaciones de los taninos y los fenoles se describieron a través de medidas de tendencia central.

4. RESULTADOS

En el Cuadro 1, se presentan los promedios generales, sus desviaciones estándar y los porcentajes de taninos condensados y fenoles totales en las 20 especies de forrajes tropicales estudiadas.

Los TCL, fueron calculados con base en la curva representada por la ecuación: $Y = -0.0196 + 0.001(X)$, $r^2 = 0.996$. El contenido más alto correspondió a, *D. ovalifolium* (228.4 g kg⁻¹), *F. macrophylla* (181.9 g kg⁻¹); *G. ulmidifolia* (129.7 g kg⁻¹) y *L. leucocephala* (129.5 g kg⁻¹). Valores intermedio (10.4 a 53.5 g kg⁻¹) correspondieron a *M. esculenta*, *A. pintoii*, *E. fusca* y *M. arborea*. Valores inferiores a 7.9 g kg⁻¹ se presentaron en *G. sepium*, *D. robinoides*, *P. phaseoloides*, *C. ensiformis*, *E. poepigiana*, *C. maypurensis* y *H. altissima*. No se detectaron TCL en *H. rosasinensis*, *B. alicastrum*, *B. decumbens*, *B. humidicola* y *C. dactylon*.

Los TCAP fueron calculados con la ecuación $Y = -0.0499 + 0.0013(X)$, $r^2 = 0.988$. La mayor concentración de TCAP (61.0 gKg⁻¹) se encontró en *G. sepium*, seguida por *F. macrophylla*, *G. ulmidifolia*, *D. ovalifolium*, *L. leucocephala* y *E. fusca*, (23.3, 21.1, 15.6, 14.2 y 10.2 g Kg⁻¹ respectivamente). Un contenido inferior a 10 g Kg⁻¹ se encontró en el resto de los forrajes.

Los taninos condensados adheridos a fibra (TCAF), fueron calculados con la ecuación de la curva empleada para TCAP. La mayor concentración correspondió a *G. ulmidifolia* (55.1 g Kg⁻¹), seguida de *F. macrophylla* (46.7 g Kg⁻¹) y *G. sepium* (41.5 g Kg⁻¹). *L. leucocephala*, *D. ovalifolium*, *A. pintoii*, *D. robinoides* y *B. alicastrum*, presentaron valores en un rango comprendido entre 30 a 20 g Kg⁻¹ (32.8, 34.0, 25.4, 20.6 y 20.1 respectivamente). En el resto de los forrajes la concentración fue inferior a 20 g Kg⁻¹.

Los FT fueron calculados con la ecuación: $Y = -0.38 + 0.004(X)$, $r^2 = 0.99$. Como se puede observar, la mayor concentración correspondió a *F. macrophylla* (89.6 g kg⁻¹) y fue disminuyendo en el siguiente orden: *L. leucocephala* (83.6 g kg⁻¹), *D. ovalifolium* (59.7 g kg⁻¹), *G. ulmidifolia* (58.4 g kg⁻¹), *M. esculenta* (56.2 g kg⁻¹) y *E. fusca* (40.3 g kg⁻¹). Valores de 40 a 20 g kg⁻¹ se observaron en orden decreciente

para *D. robinoides*, *A. pintoi*, *P. phaseoloides*, *C. ensiformis*, *H. altissima*, *E. poepigiana*, *B. decumbens*, *H. rosa-sinensis* y *M. arborea*. La menor concentración fue para los pastos *C. dactylon* y *B. humidicola* (15.0 y 13.1 g kg⁻¹) y para las leguminosas *C. maypurensis* y *B. alicastrum* (12.4 y 13.9 g kg⁻¹ respectivamente).

En el cuadro 1 también se observan los valores promedio de TCT y los porcentajes de cada fracción (TCL, TCAF Y TCAF).

D. ovalifolium, tuvo el mayor contenido de TCT (278.1g kg⁻¹), cantidad cubierta en 82.2% por los TCL; seguido de *F. macrophylla*, con 251.9 g Kg⁻¹, en éste el mayor porcentaje (72.2%) resultó de TCL; *G. ulmidifolia* y *L. leucocephala* tuvieron 205.9 y 176.5 g Kg⁻¹, en estos también los TCL fueron los que más contribuyeron al porcentaje. *G. sepium* tuvo un total de taninos de 110.4 g Kg⁻¹, en éste forraje el mayor aporte fue por los adheridos a la proteína (55.3%) y a fibra (37.6%), que representan el 92.9% del total. Se observa también que *M. esculenta*, *A. pintoi* y *E. fusca*, poseen más de 50% de taninos condensados totales (81.7, 54.4, 50.2 g Kg⁻¹ respectivamente); el mayor aporte en *M. esculenta* fue por TCL (65.5%), en *A. pintoi* (46.8 %) por TCAF y en *E. fusca* los TCL aportaron 47.6%. En los forrajes: *M. arborea*, *D. robinoides*, *P. phaseoloides*, *C. ensiformis* y *E. poepigiana* con concentraciones de TCT inferiores a 4%, el mayor aporte al total de taninos fue por los TCAF (52.7, 69.0, 61.6, 55.7 y 59.8% respectivamente). En *C. maypurensis* se determinó un total de 19.19 g Kg⁻¹ de taninos condensados totales; en éste el principal aporte se debió a los TCAF. En *H. rosa-sinensis* y *B. alicastrum*, no se detectaron TCL, el mayor aporte al total correspondió a los TCAF (69.5 y 77.8% respectivamente). Las gramíneas *H. altissima*, *B. decumbens* y *B. humidicola* fueron las de menor contenido de taninos condensados totales, en estos el mayor aporte correspondieron a TCAF.

5. DISCUSIÓN

Los forrajes evaluados, por su contenido de taninos condensados totales, se pueden agrupar en tres categorías: de bajo contenido con hasta 30 g Kg⁻¹, de contenido

moderado con más de 30 y hasta 60 g Kg⁻¹ y de elevado contenido los que poseen más de 60 g Kg⁻¹. Giner-Chavez (1996), y Jackson and Barry (1996) encontraron valores similares en TCT en *A. pintoii*, *D. ovalifolium*, *G. sepium* y *M. esculenta*, aunque estos con un menor porcentaje de TCAF. En la literatura (Barry and Manley, 1984; Barry *et al.*, 1986; Jackson and Barry, 1996) se menciona que forrajes con 60 g Kg⁻¹ de TCT pueden inducir un incremento en sobrepaso ruminal de proteína y en la retención de nitrógeno, sin afectar el consumo voluntario. En contra posición más de 60 g Kg⁻¹ pueden ser menos apetecibles por el ganado y de menor digestibilidad ruminal. Aunque la actividad biológica se asocia a los TCT, la presencia y contenido de cada fracción o tipo de tanino (TCL, TCAP y TCAF) debe ser considerado. En este estudio se observó que cuando el contenido de TCT fue igual o superior a 50 g Kg⁻¹, generalmente los TCL aportaron el mayor porcentaje al total; aunque se encontraron excepciones. En los forrajes *G. sepium* y *A. pintoii*, a pesar de que el contenido de TCT fue superior a 50 g Kg⁻¹, el mayor aporte fue por TCAP y TCAF respectivamente. Cuando el total de taninos condensados fue menor de 50 g Kg⁻¹, el mayor aporte correspondió a TCAF, seguidos de los TCAP y en algunos forrajes no se encontraron TCL. Esta variación en el contenido y tipo de taninos, por especie forrajera, sugiere que algunos taninos presentan mayor o menor actividad sobre ciertas macromoléculas (proteínas carbohidratos etc.). En adición, se debe ser prudente cuando se quiera evaluar el contenido de taninos condensados de un forraje, por su valor de fenoles totales; como se apreció la determinación de estos puede subestimar o sobreestimar el valor real.

Cuadro 1

Contenido promedio de taninos condensados y fenoles totales en forrajes tropicales $\text{g/kg}^{-1} \pm \text{DE}$ y (% del total)

Forraje	TCL \pm DE (%)	TCAP \pm DE (%)	TCAF \pm DE (%)	TCT *	FT \pm DE
<i>Desmodium ovalifolium</i> ^{2,3}	228.4 \pm 10.7 (82.2)	15.6 \pm 0.3 (5.6)	34.0 \pm 0.8 (12.2)	278.1	59.7 \pm 0.5
<i>Flemigia macrophylla</i> ^{1,3}	181.9 \pm 3.5 (72.2)	23.3 \pm 0.5 (9.2)	46.7 \pm 0.7 (18.5)	251.9	89.6 \pm 1.0
<i>Guazuma ulmifolia</i> ^{1,4}	129.7 \pm 2.1 (63.0)	21.1 \pm 0.5 (10.2)	55.1 \pm 0.3 (26.8)	205.9	58.4 \pm 0.3
<i>Leucaena leucocephala</i> ^{1,4}	129.5 \pm 1.1 (73.3)	14.2 \pm 0.6 (8.1)	32.8 \pm 0.8 (18.6)	176.5	83.6 \pm 0.9
<i>Gliricidia sepium</i> ^{1,5}	7.9 \pm 0.2 (7.1)	61.0 \pm 2.7 (55.3)	41.5 \pm 1.0 (37.6)	110.4	20.0 \pm 1.0
<i>Manihot esculenta</i> ^{2,4}	53.5 \pm 3.7 (65.5)	9.3 \pm 0.2 (11.4)	18.8 \pm 0.5 (23.1)	81.7	56.2 \pm 1.0
<i>Arachis pintoi</i> ^{2,5}	21.0 \pm 1.7 (38.7)	7.9 \pm 0.3 (14.5)	25.4 \pm 0.6 (46.8)	54.4	31.1 \pm 0.5
<i>Eritrina fusca</i> ^{2,4}	23.9 \pm 1.0 (47.6)	10.2 \pm 0.7 (20.3)	16.1 \pm 0.8 (32.1)	50.2	40.3 \pm 0.5
<i>Melina arborea</i> ^{2,4}	10.4 \pm 0.4 (27.8)	7.2 \pm 0.4 (19.5)	19.6 \pm 0.2 (52.7)	37.3	20.9 \pm 0.4
<i>Diphysa robinoides</i> ^{1,4}	4.1 \pm 0.4 (13.9)	5.1 \pm 0.1 (17.1)	20.6 \pm 0.4 (69.0)	29.8	39.8 \pm 1.3
<i>Pueraria phaseoloides</i> ^{2,4}	4.8 \pm 0.2 (17.5)	5.7 \pm 0.1 (20.9)	16.9 \pm 0.6 (61.6)	27.5	27.0 \pm 0.4
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> ^{2,5}	No encontrados	8.1 \pm 0.1 (30.5)	18.5 \pm 1.3 (69.5)	26.6	22.5 \pm 0.9
<i>Brossimum alicastrum</i> ^{1,4}	No encontrados	7.7 \pm 0.0 (22.2)	20.1 \pm 0.8 (77.8)	25.8	13.9 \pm 0.3
<i>Canavalia ensiformis</i> ^{1,4}	3.6 \pm 0.3 (15.7)	6.5 \pm 0.2 (28.6)	12.6 \pm 0.2 (55.7)	22.7	26.5 \pm 1.5
<i>Eritrina poeppigiana</i> ^{1,4}	3.3 \pm 0.2 (15.7)	5.1 \pm 0.1 (24.5)	12.6 \pm 0.4 (59.8)	21.1	22.7 \pm 2.3
<i>Crotalaria maypurensis</i> ^{2,4}	3.3 \pm 0.1 (17.2)	6.3 \pm 0.1 (32.7)	9.6 \pm 0.2 (50.1)	19.2	12.4 \pm 0.5
<i>Hemarthria altissima</i> ^{2,6}	3.2 \pm 0.1 (17.7)	4.4 \pm 2.9 (24.2)	10.5 \pm 3.4 (58.0)	18.0	23.9 \pm 1.0
<i>Brachiana decumbens</i> ^{2,6}	No encontrados	5.0 \pm 0.2 (36.0)	8.8 \pm 0.2 (64.0)	13.8	22.6 \pm 0.2
<i>Brachiana humidicola</i> ^{2,6}	No encontrados	4.4 \pm 0.0 (35.3)	8.0 \pm 0.4 (64.7)	12.4	13.1 \pm 0.2
<i>Cynodon dactylon</i> ^{2,7}	No encontrados	4.5 \pm 0.2 (37.0)	7.7 \pm 0.3 (63.0)	12.2	15.0 \pm 0.9

TCL taninos condensados libres; TCAP, taninos condensados adheridos a proteína; TCAF, taninos condensados adheridos a fibra; TCT, total de taninos condensados; TP, fenoles totales.

* TCT obtenidos de la suma de TCL, TCAP y TCAF

- 1 Cultivados en suelos Vertisoles
- 2 Cultivados en suelos Fluvisoles
- 3 Cultivados en suelo no determinado
- 4 Días a la cosecha 42
- 5 Días a la cosecha 35
- 6 Días a la cosecha 28
- 7 Días a la cosecha 21

BIBLIOGRAFÍA

Barry TN, Forss DA. The condensed tannin content of vegetative *Lotus pedunculatus*, its regulation by fertilizer application, and effect upon protein Solubility. *J Sci Food Agric* 1983; 34:1047-1056.

Barry TN, Manley TR. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep., 2. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. *Br J Nutr* 1984; 51:493-504.

Barry TN, Manley TR, Duncan SJ. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep., 4. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. *Br J Nutr* 1986; 55:123-137.

Giner-Chavez BI. Condensed tannins in tropical forages. Tesis Ph.D. degree, Cornell University 1996.

Hagerman AE. Tannin Analysis. Miami University, Oxford, OH, USA 1991.

Hagerman AE, Butler LG. Condensed tannin purification and characterization of tannin-associated. *J Agric Food Chem* 1980; 28:947-952.

Jackson FS, Barry TN. The extractable and bound condensed tannin content of leaves from tropical tree shrub and forage legumes. *J Sci Food Agric* 1996; 71:103-110.

Palma LJD y Cisneros DJ. Plan de uso sustentable de los suelos de tabasco. Fundación Produce Tabasco, A. C. 1996; Volumen I.

Price ML, Butler LG. Rapid visual and spectrophotometric determination of tannin in sorghum grain. *J Agric Food Chem* 1977; 25:1268-1277.

Reed JD. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J Anim Sci* 1995; 73: 1516-1528.

Statistical Analysis Systems (SAS), SAS/STAT User's Guide (Release 6.08). SAS Institute Inc., Cary, NC, USA 1990.

Terrill TH, Rowan AM, Douglas GD, Barrey TN. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *J Sci Food and Agric* 1992; 58 (3) : 321-329.

CAPITULO CUATRO

PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNA *in vitro* POR TANINOS CONDENSADOS PURIFICADOS DE PLANTAS FORRAJERAS DEL TRÓPICO HÚMEDO

RESUMEN

Con un diseño en arreglo factorial con 6 tipos de taninos condensados purificados, 4 fuentes de proteína y 2 pH, se evaluó por difusión radial, la actividad precipitando proteínas *in vitro*, de 96 µg de taninos condensados de *M. esculenta*, *L. leucocephala*, *A. pintoii*, *G. ulmidifolia* y *G. sepium*, además del Ac. tánico. Las proteínas que se precipitaron a pH 5.0 y 6.8 fueron: albumina sérica bovina (ASB), papaína, pepsina y tripsina. Se observó efecto significativo ($P < 0.05$) por tipo de tanino, fuente de proteína, pH y sus interacciones. La mayor precipitación a pH 5.0 fue para pepsina (82.9 µg), por los taninos de *G. ulmidifolia*; la menor (0 y 0.2 µg) se observó en ASB por *G. sepium* y *A. pintoii* a pH 6.8. En general la actividad biológica de los taninos, se vió afectada por el tipo de proteína y el pH.

1. INTRODUCCIÓN

Los taninos ligan proteínas y otras macro moléculas formando complejos estabilizados por puentes de hidrógeno y fuerzas hidrofóbicas (Waterman and Mole, 1994;). Trabajos de investigación han demostrado que la interacción se realiza en un rango de pH de 3.5 a 7.0 y se pierde cuando disminuye de 3.5, o cuando es superior a 7.0 (McLeod, 1974; Jones and Mangan, 1977). Los taninos son muy reactivos con las proteínas, a través de la formación de puentes de hidrógeno; también se dice que pueden actuar ligando proteínas a través de la interferencia de sitios reactivos (Jones *et al.*, 1973; Barry and Manley, 1984). La Fosfatasa alcalina y la 5-Nucleótido fosfodiesterasa de la mucosa intestinal de bovino, fueron inhibidas por taninos condensados de sorgo y quebracho (Blytt *et al.*, 1988). Empleando taninos de té, Young Je Cho, *et al.* (1993), encontraron que los taninos inhiben a la Angiotensina convertina y a la Xantina oxidasa; el Galloil catechin fue el más inhibidor. También

se ha demostrado que el tipo y peso molecular de los taninos cambian con la variedad del vegetal de donde son extraídos, característica que modifica su actividad. Se ha observado que a mayor peso (22000 vs 7700), disminuye la capacidad de interacción tanino-proteína (Jones *et al.*, 1973).

2. OBJETIVO

El objetivo de este experimento fue evaluar la actividad de los taninos condensados purificados de plantas forrajeras del trópico, precipitando proteínas en medios con diferente acidez.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Extracción y purificación de taninos condensados (TC). Se empleó la técnica utilizada por Giner-Chavez (1996), con modificaciones. Por triplicado, se colocaron en tubos de nalgeno de 50 ml, 2 g de forraje liofilizado molido y 20 ml de acetona-agua (70-30 (v/v)), sonicándose por 15 minutos en baño de hielo. La mezcla forraje-acetona-agua fue filtrada en crisoles con fondo de vidrio con porosidad de 40-60 μ , aplicando una ligera succión por vacío, al inicio del filtrado. El líquido resultante se colocó en un embudo de separación, adicionándose éter etílico en cantidad suficiente para formar dos fases, desechándose la superior. El residuo líquido fue evaporado al vacío en Baño María a 25 °C por 15 minutos, para eliminar los restos de acetona-éter; ya evaporados los disolventes, el líquido fue lavado dos veces con 5 ml de una solución de etanol-agua (90-10 (v/v)), sometido en cada lavado a evaporación, con las condiciones anteriores. Al residuo de las tres extracciones se agregó una mezcla de 20 g de Sephadex LH-20 y 100 ml de etanol-agua al 80%. La mezcla de Sephadex y los extractos se agitaron ligeramente por tres minutos, dejándose reposar por un periodo no menor de 3 horas para la completa absorción de los taninos. Posteriormente el Sephadex-taninos fue lavado varias veces (sobre un embudo de 1 litro, con fondo de vidrio de porosidad de 15-20 μ), con etanol-agua al 95% (v/v), hasta que la solución mostró a 280 nm, una absorbancia de cero. Los taninos fueron liberados del Sephadex con 300 ml de acetona-agua al 50% (v/v). La

acetona fue evaporada al vacío en baño María a 25°C por un periodo de 15 minutos. Finalmente las soluciones fueron lavadas dos veces con 5 ml de etanol-agua (90-10 (v/v)). Los taninos purificados en solución, fueron liofilizados y sellados al vacío.

3.2. Precipitación de proteína. Se empleó la técnica de difusión radial de Hagerman (1987). En cajas de Petri de 10 cm de diámetro se adicionaron 10 ml de una solución al 1% de agarosa (w/v) tipo I y 0.1% (w/v) de albúmina sérica bovina (ASB), fracción V libre de ácidos grasos volátiles, en 50 mM de ácido acético y 60 mM de ácido ascórbico, ajustado a pH 5.0 empleando una solución al 2% de NaOH, o en 25 mM de buffer N-(-2- acetamido)-2-ácido iminodiacético (ADA), ajustado a pH 6.8 con diethanolamina 1M. Las proteínas papaina, pepsina y tripsina (seleccionadas por su solubilidad en los medios de difusión) fueron adicionadas en cantidad suficiente para alcanzar el mismo contenido de proteína cruda que aportó el 0.1% de ASB; la determinación, se realizó por el método de Biuret. La agarosa en los buffers fue mantenida en ebullición en Baño María; las fuentes de proteína se adicionaron a la solución de agarosa después de reducir la temperatura de ésta hasta 40 °C, también sobre Baño María.

En el medio de difusión, se hicieron pozos de 4 mm de diámetro, donde se adicionaron 6 alícuotas de 8 µl de soluciones de 2 mg ml⁻¹ de taninos purificados de *M. esculenta*, *L. leucocephala*, *A. pintoi*, *G. ulmidifolia*, *G. sepium* y de Ac.tánico, hasta alcanzar una dosis de 96 µg. Se sellaron las cajas con parafilm y se incubaron por 120 hrs a 30 °C.

3.3. Evaluación de la precipitación. Para evaluar la actividad de los taninos, se empleó la fórmula para calcular la proteína precipitada (PP) de C. Lascano (citado por Giner-Chavez (1996). La proteína precipitada se midió multiplicando el volumen de precipitación, por la proteína contenida en el gel.

$PP(\mu g) = (\text{Volumen de precipitación (ml)}) \times (\text{Concentración de proteína } (\mu g \text{ ml}^{-1}))$

donde:

Volumen de precipitación = $(r_1 - r_2)^2 h \pi$

r_1 = radio de precipitación.

r_2 = radio del pozo.

h= altura del pozo (cm).

$\pi = 3.1416$

3.4. Análisis estadístico. Para evaluar la fuente de taninos (*M. esculenta*, *L. leucocephala*, *A. pintoii*, *G. ulmidifolia* and *G. sepium* y ácido tánico), el tipo de proteína (BSA, papaina, tripsina y pepsina) y el pH (5.0 and 6.8), sobre la precipitación de proteína, se usó un análisis de varianza de tres caminos de clasificación. El total de la variación se atribuyó al siguiente modelo.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + TP_{ij} + A_k + TA_{ik} + PA_{jk} + TPA_{ijk} + \varepsilon(ijk)$$

donde:

Y_{ijk} es la i -ésima precipitación de proteína (μg), asociada a la i -ésima fuente de tanino del j -ésimo tipo de proteína, y al k -ésimo pH, $\varepsilon(ijk)$ es el error experimental, $NID(0, \sigma^2)$.

El análisis de medias ($p < 0.05$) fue realizado con datos transformados por raíz cuadrada. El paquete estadístico del SAS (1990), se empleo para el análisis.

4. RESULTADOS

El Cuadro 1 muestra las medias mínimo cuadráticas de precipitación por efecto del tipo de taninos, proteína y pH.

Por el origen de taninos, se observó que precipitaron igual ($P > 0.05$) cantidad de proteína los TC de *L. leucocephala* con los de *G. ulmidifolia* (22.6 y 25.9 μg); y los de *A. pintoii* con los de *G. sepium* (6.3 y 1.3 μg).

Por tipo de proteína papaina con 24.2 μg y pepsina con 29.9 μg fueron precipitadas igual ($P > 0.05$).

En el efecto del pH, se observó que la precipitación a pH 5.0 fue superior ($P < 0.05$) a la obtenida a 6.8

En el Cuadro 2, se observan los promedios de precipitación por la interacción tanino-proteína. Con ASB, se obtuvieron resultados similares ($P > 0.05$) en precipitación, cuando reaccionó con Ac. tánico y los TC de *M. esculenta*, *L. leucocephala* y *G. ulmidifolia* (11.5, 6.0, 10.7 y 8.3 μg respectivamente). Con papaina, la precipitación obtenida fue igual ($P > 0.05$) con los taninos de *M. esculenta*

y *G. ulmidifolia* (18.4 y 20.7 μg); así como con los de *A. pinto* y de *G. sepium* (6.1 y 5.1 μg). La precipitación de tripsina resultó similar cuando interactuó con TC de *M. esculenta* y con los de *A. pinto* (5.0 y 5.3 μg). La precipitación de pepsina no fue diferente ($P>0.05$) al interactuar con Ac. tánico y con los taninos de *M. esculenta* (40.7 y 43.5 μg), así como en la interacción con los de *L. leucocephala* y de *A. pinto* (13.2 y 12.1 μg).

La precipitación de ASB por el Ac. tánico comparada con la de éste tanino y las otras proteínas resultó diferente ($P<0.05$). En la interacción de ASB con TC de *M. esculenta*, la actividad resultó igual ($P>0.05$) que la observada con éste tanino y tripsina (6.0 y 5.0 μg). La precipitación de ASB que causó *L. leucocephala* (10.7 μg) fue igual ($P>0.05$) a la generada al interactuar con pepsina (13.2 μg). Los taninos de *A. pinto* precipitaron ASB en cantidad diferente ($P<0.05$), a la precipitación observada con otras proteínas. Los TC de *G. ulmidifolia* precipitaron cantidad similar ($P>0.05$) de tripsina, que de ASB (11.0 vs 8.3 μg). Los taninos de *G. sepium* tuvieron una actividad diferente ($P<0.05$) precipitando ASB con respecto a papaína y pepsina.

El Cuadro 3 muestra la proteína precipitada al interactuar los taninos o la proteína en distinto pH.

Interacción taninos-pH. En la interacción a pH 5.0, se observa que los TC de *M. esculenta*, *L. leucocephala* y *G. ulmidifolia* precipitaron estadísticamente ($P>0.05$) cantidades iguales de proteína (21.9, 22.6 y 29.9 μg respectivamente). A pH 6.8 el Ac. tánico y los TC de *L. leucocephala* y *G. ulmidifolia* tuvieron un comportamiento similar (30.6, 22.7 y 21.9 μg respectivamente); también resultó igual la precipitación por *A. pinto* y *G. sepium* (6.3 y 1.0 μg).

Al comparar el efecto a diferente pH, se observó que el Ac. tánico y los taninos de *G. sepium* tuvieron respuesta diferente ($P<0.05$).

Interacción proteína-pH. A pH 5.0 ASB precipitó en cantidad similar ($P>0.05$) a tripsina. A pH 6.8, precipitaron igual ($P>0.05$) papaína y tripsina (25.7 vs 23.1 μg).

La precipitación comparada entre los pH fue igual ($P >0.05$) con papaína.

En el Cuadro 4 se observan los promedios de precipitación por la interacción taninos-proteína-pH.

Interacción a pH 5.0.

La precipitación de ASB resultó diferente ($P < 0.05$) en las interacciones evaluadas. La papaína precipitó igual ($P > 0.05$) con los TC de *M. esculenta* y los de *G. ulmidifolia* (20.2 y 18.5 μg). Tripsina fue precipitada en cantidad similar ($P > 0.05$) cuando interactuó con los taninos de *M. esculenta*, de *A. pintoii* y *G. ulmidifolia*. La pepsina precipitó diferente ($P < 0.05$) en todas las comparaciones.

Interacción a pH 6.8.

La ASB, no precipitó cuando interaccionó con Ac tánico y los taninos de *G. sepium* y resultó similar su precipitación ($P > 0.05$) por los de *M. esculenta* y *G. ulmidifolia* (3.6 y 2.8 μg). Papaína presentó respuesta similar ($P > 0.05$) al interactuar con los taninos de *A. pintoii* y de *G. sepium*. La tripsina precipitada por TC de *M. esculenta* y *A. pintoii* (5.6 y 7.5 μg) fue estadísticamente igual ($P > 0.05$). Pepsina presentó valores similares ($P > 0.05$) con Ac. tánico y los taninos condensados de *M. esculenta* (37.0 y 32.4 μg); y entre los de *L. leucocephala* y *G. sepium* (6.6 y 8.6 μg).

En las comparaciones de la triple interacción a diferente pH, se observó lo siguiente: únicamente la tripsina resultó precipitada igual ($P > 0.05$) a los pHs 5.0 y 6.8 cuando interactuó con Ac. tánico, (19.9 y 21.6 μg) y con los taninos condensados de *M. esculenta* que precipitaron 4.5 y 5.6 μg .

5. DISCUSIÓN

5.1. Efecto tanino. A pesar de observarse similitud en la actividad de los taninos de *L. leucocephala* y *G. ulmidifolia* y en la de *A. pintoii* y *G. sepium*, los resultados sugieren especificidad por su origen. Makkar (1988) y Cano *et al.* (1994), mencionan que la actividad de los taninos depende del tipo de forraje y se ve influenciada por condiciones ambientales en que son cultivados. En adición se ha encontrado que esas características originan estructuras moleculares distintas en los taninos.

5.2. Efecto proteína. Aunque estadísticamente, se observó similar precipitación entre algunas proteínas, otras fueron precipitadas con diferente intensidad. Este

efecto pudo deberse a la estructura molecular de la proteína o a su composición química. Se ha argumentado que la estructura química y el contenido de algunos aminoácidos las hace distinguirse como proteínas de alta o baja afinidad por taninos (Asquith and Butler, 1986).

5.3. Efecto pH. Como se observó, a pH 5.0 se llevó a cabo la mayor precipitación de proteína, esto es un indicador de que el potencial de hidrógeno, es una condición que influye en la precipitación. Al respecto, se ha argumentado que los taninos poseen un rango de pH en que presentan mayor o menor actividad, (Meck and Weiss, 1979; Giner-Chavez, 1996). Dado lo anterior se puede asumir que el pH fue determinante en la actividad de precipitación.

5.4. Efecto interacción tanino-proteína. En general los taninos precipitaron proteína en un amplio rango, no obstante, puede haber cierta similitud en precipitación, como fueron los casos de TC de *M. esculenta*, *L. leucocephala* y de *G. ulmidifolia* al precipitar ASB. Asquith and Butler (1986), encontraron que los taninos tienen diferente afinidad por las proteínas. En adición Giner-Chavez (1996), encontró que los taninos por ella evaluados (*A. pintoii*, *G. sepim* y *M. esculenta*), precipitaron cantidad diferente de ASB y proteína de alfalfa. Dado lo anterior es de esperar que el efecto de precipitación esté en función del punto isoeléctrico de la proteína y del tipo de tanino.

5.5. Efecto interacción tanino-pH. Se observó que algunos taninos, por el pH, modificaron substancialmente su actividad biológica *in vitro*, esto se observó con el Ac. tánico y los TC de *G. sepium*. Giner-Chavez (1996), evaluando la precipitación de proteína a diferente pH, también encuentra cambios en precipitación.

5.6. Efecto interacción proteína-pH. Al considerar la interacción proteína-pH, se observó que el pH tiene un marcado efecto sobre la precipitación de proteína. No obstante, se debe considerar que la precipitación de algunas proteínas no se ve afectada substancialmente por éste, tal es el caso de la pepsina que precipitó en cantidad similar en los dos pH. Pérez-Maldonado *et al.* (1995) encontraron que el Ac. tánico alcanza su máxima interacción con proteínas de ASB y de plantas a pH de 4.5 a 5.5, pero a pH menos ácido la interacción no ocurre.

5.7. Efecto interacción tanino-proteína-pH. Considerando los resultados de interacción, podemos argumentar que los taninos cambian su actividad sobre las proteínas cuando se modifica la acidez del medio; cabe destacar que en éste experimento ASB y pepsina fueron más precipitadas a pH 5.0, por casi todos los taninos; en tanto que papaína interactuó más a pH 6.8. Un efecto de éste tipo fue demostrado por Giner-Chavez (1996), que encontró diferente actividad con TC de *A. pintoi*, *G. sepim* y *M. esculenta*, sobre las proteínas de ASB y alfalfa a pH 6.8; No obstante lo anterior, algunos taninos y proteínas pueden interactuar de manera similar en pH distintos; en éste experimento esto se observó con TC de *M. esculenta* y Acido tánico, sobre tripsina.

Se concluye, que el efecto que tiene cada tipo de taninos sobre la precipitación, dependerá de la fuente de proteína y del pH en que se realice la reacción.

Cuadro 1

Precipitación promedio de proteína por efecto de taninos condensados, tipo de proteína y pH (μg).

Efecto	
Tanino	
Ac. tánico	33.1 a (± 2.4)
<i>M. esculenta</i>	18.2 b (± 2.4)
<i>L. leucocephala</i>	22.6 c (± 2.4)
<i>A. pintoi</i>	06.3 d (± 2.4)
<i>G. ulmidifolia</i>	25.9 c (± 2.4)
<i>G. sepium</i>	01.3 d (± 3.5)
Proteína	
ASB	05.6 a (± 2.0)
Papaína	24.2 b (± 2.0)
Tripsina	11.9 c (± 2.2)
Pepsina	29.9 b (± 1.9)
pH	
5.0	19.4 a (± 1.5)
6.8	16.4 b (± 1.4)

Literales distintas en la columna en el mismo efecto son diferentes ($p < 0.05$).

EE, error estándar.

Cuadro 2

Efecto promedio de precipitación de proteína en la interacción tanino-proteína (μg).

Tanino/Proteína	ASB (\pm EE)	Papaína (\pm EE)	Tripsina (\pm EE)	Pepsina (\pm EE)
Ac. tánico	11.5a ^a (± 2.5)	59.3 a ^b (± 2.5)	20.8 b ^b (± 2.5)	40.7 b ^b (± 2.5)
<i>M. esculenta</i>	06.0a ^a (± 2.5)	18.4 c ^b (± 2.5)	05.0 c ^a (± 2.5)	43.5 b ^b (± 2.5)
<i>L. leucocephala</i>	10.7a ^a (± 2.5)	32.6 b ^b (± 2.5)	34.1 a ^b (± 2.5)	13.2 c ^a (± 2.5)
<i>A. pintoi</i>	01.7b ^a (± 2.5)	06.1 d ^b (± 2.5)	05.3 c ^b (± 2.5)	12.1 c ^b (± 2.5)
<i>G. ulmidifolia</i>	08.3a ^a (± 2.5)	20.7 c ^b (± 2.5)	11.0 d ^a (± 2.5)	63.7 a ^b (± 2.5)
<i>G. sepium</i>	NP	05.1 d ^b (± 4.3)	ND	06.4 d ^b (± 2.5)

Literales distintas en la misma columna son diferentes ($P < 0.05$).

Superíndices distintos con la interacción tanino-ASB en línea, son diferentes ($P < 0.05$).

NP, no precipitó; ND, no fue determinado; EE, error estándar.

Cuadro 3

Efecto promedio de precipitación de proteína por la interacción taninos o proteína con el pH (μg).

Efecto	Precipitación	
	pH 5.0 (\pm EE)	pH 6.8 (\pm EE)
Tanino		
Ac tánico	35.5 a ^a (\pm 1.7)	30.6 a ^b (\pm 1.7)
<i>M. esculenta</i>	21.9 b ^a (\pm 1.7)	14.5 b ^a (\pm 1.7)
<i>L. leucocephala</i>	22.6 b ^a (\pm 1.7)	22.7 a ^a (\pm 1.7)
<i>A. pintoi</i>	06.3 c ^a (\pm 1.7)	06.2 c ^a (\pm 1.7)
<i>G. ulmidifolia</i>	29.9 b ^a (\pm 1.7)	21.9 a ^a (\pm 1.7)
<i>G. sepium</i>	01.0 e ^a (\pm 4.5)	05.3 c ^b (\pm 2.0)
Proteína		
ASB	12.7 a ^a (\pm 3.7)	02.1 a ^b (\pm 3.3)
Papaína	25.4 b ^a (\pm 3.7)	25.7 b ^a (\pm 3.3)
Tripsina	11.6 a ^a (\pm 3.7)	18.9 c ^b (\pm 3.7)
Pepsina	36.8 c ^a (\pm 3.3)	23.1 b ^b (\pm 3.3)

Literales distintas en la misma columna, en el mismo efecto son diferentes ($p < 0.05$)

EE, error estándar

Cuadro 4

Precipitación promedio de proteína en la interacción tanino-proteína-pH (μg).

Proteína/pH	Proteína-pH 5.0				Proteína-pH 6.8				
	Tanino	ASB	Papaína	Tripsina	Pepsina	ASB	Papaína	Tripsina	Pepsina
Ac. tánico		23.0a ^a	54.7a ^a	19.9a ^a	44.5a ^a	NP	63.9a ^b	21.6a ^a	37.0a ^b
<i>M. esculenta</i>		8.5b ^a	20.2b ^a	4.5b ^a	54.5b ^a	3.6b ^b	16.5b ^b	5.6b ^a	32.4a ^b
<i>L. leucocephala</i>		15.3c ^a	29.1c ^a	26.2c ^a	19.7c ^a	6.2c ^b	36.1c ^b	42.1c ^b	6.6b ^b
<i>A. pintoi</i>		3.1d ^a	4.4d ^a	3.1b ^a	14.7d ^a	0.2d ^b	7.7d ^b	7.5b ^b	9.4c ^b
<i>G. ulmidifolia</i>		13.9e ^a	18.5b ^a	4.4b ^a	82.9e ^a	2.8b ^b	23.0e ^b	17.5d ^b	44.5d ^b
<i>G. sepium</i>		ND	ND	ND	4.3f ^a	NP	7.3d	ND	8.6b ^b

Valores con literales distintas en la columna indican diferencia ($P < 0.05$).

Promedios de la misma interacción a diferente pH, con superíndice distinto son diferentes ($p < 0.05$).

Error estándar 1.46

ND no fue determinado; NP no precipitó.

BIBLIOGRAFÍA

Asquith TN, Butler LG. Interactions of condensed tannins with selected proteins. *Phytochemistry* 1986; Vol. 25 (7):1591-1593.

Barry TN, y Manley TR. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep., 2. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. *Br J Nutr* 1984; 51:493-504.

Blytt HJ, Guscar TK, Butler LG. Antinutritional effects and ecological significance of dietary condensed tannins may not be due to binding and inhibiting digestive enzymes. *J of Chem Ecology* 1988; 14(6):1455-1465.

Cano R, Carulla J, Lascano CE. Métodos de conservación de muestras de forrajes de leguminosas tropicales y su efecto en el nivel y en la actividad biológica de los taninos. *Pasturas Tropicales* 1994; 16 (1): 2-7

Giner-Chavez BI. Condensed tannins in tropical forages. Thesis Ph.D. degree, Cornell University 1996.

Hagerman AE. Radial diffusion method for determining tannin in plant extracts. *J Chem Ecol* 1987; 13: 437-449.

Jones WT, Mangan JL. Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia scop*) with fraction 1 leaf protein and with sub-maxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *J Sci Food Agric* 1977; 28:126-136.

Jones WT, Anderson LB, Ross MD. Bloat in cattle, XXXIX. Detection of protein precipitants (flavolans) in legumes. *N Z J Agric Res* 1973;16:441-446.

McLeod MN. Plant tannins their role in forages quality. *Nutr Abst Rev* 1974; 44:803-815.

Makkar HPS, Dawra RK, Singh B. Changes in tannin content, polymerisation and protein precipitation capacity in oak (*Quercus incana*) leaves with maturity. *J Sci Food Agric* 1988; 44. 301-307.

Meek KM, Weiss JB. Differential fixation of poly (L-arginine) and poly (L-lisine) by tannic acid and its application to the fixation of collagen in electron microscopy. *Biochim et Biophys Acta* 1979; 585 : 112 - 120.

Perez-Maldonado RA, Norton BW, Kerven GL. Factors affecting *in vitro* formation of tannin-protein complexes. *J Sci Food Agric* 1995; 69,291-298.

Statistical Analysis Systems (SAS), SAS/STAT User's Guide (Release 6.08). SAS Institute Inc., Cary, NC, USA 1990.

Young Je Cho, Bong Jeun An, Cheong Choi. Isolation and enzyme inhibition of tannins from korean green tea. *Korean Biochem J* 1993; 26(3):216-223.

Waterman PG, Mole S. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Sci. Pub. London, UK 1994; pp 90-91.

CAPITULO CINCO

EFFECTO DE LOS TANINOS CONDENSADOS PURIFICADOS DE PLANTAS FORRAJERAS DEL TRÓPICO SOBRE LA DIGESTIBILIDAD RUMINAL DE FORRAJES *in vitro*

RESUMEN

Empleando un diseño completamente al azar con 6 repeticiones, se evaluó en dos experimentos *in vitro*, el efecto de adicionar 1.25 y 2.50 mg de taninos condensados purificados de los forrajes *Manihot esculenta* y *Leucaena leucocephala*, sobre los cambios de digestibilidad en líquido ruminal de la materia seca de *Medicago sativa* y *Brachiaria decumbens*. La digestibilidad de *M. sativa* sin taninos fue de 75.7%; con taninos de *L. leucocephala* disminuyó ($P < 0.05$) a 68.7% con 1.25 mg y con 2.5 a 71.1%; con los de *M. esculenta* con cualquier dosis se incrementó ($P < 0.05$), a 82.4% y 87.1% respectivamente para las dosis evaluadas. En la *B. decumbens*, se observó 77.4% de digestibilidad en el testigo. Con el empleo de cualquier tipo de taninos disminuyó ($P < 0.05$): con los de *L. leucocephala* a 62.0% y 65.7% y con los de *M. esculenta* a 56.0% y 67.8%, respectivamente para las dosis 1.25 y 2.5 mg. Se concluye que la digestibilidad ruminal *in vitro* de la materia seca de los forrajes fue regulada por la dosis y tipo de tanino.

1. INTRODUCCIÓN

Por la importancia de los forrajes como fuente de alimento en la ganadería tropical, se considera fundamental conocer su calidad nutritiva. Además se debe dar especial importancia a compuestos químicos, como los taninos condensados, que puedan modificar el consumo de alimento o inducir cambios en su valor nutritivo. Los taninos condensados, metabolitos secundarios de forrajes y otros vegetales, pueden generar los mencionados efectos. Esta característica se debe a que son capaces de unirse simultáneamente a más de un sitio de la superficie de las proteínas y a los carbohidratos. La unión es por puentes de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos

(Spencer *et al.*, 1988). La formación de puentes de hidrógeno es dinámica y al azar, las ligaduras de los enlaces continuamente se rompen y se vuelven a formar (McLeod, 1974; McManus *et al.*, 1981). Se ha mencionado (Martin and Martín, 1983., Horigome *et al.*, 1988), que el grado de interacción depende del tipo de proteína o carbohidrato, así como del tipo de tanino que interviene en la reacción. Por la diferencia que puede haber en peso molecular y composición química en los taninos (Jones *et al.*, 1976), la actividad en cada especie forrajera puede ser diferente. Tanner *et al.* (1994) mencionan que el efecto nutricional de los taninos, se debe a su interacción con las proteínas de la dieta o con enzimas digestivas. Además el efecto puede deberse al cambio morfológico o de inhibición del crecimiento que sufren las bacterias, al ser expuestas a los taninos (McAllister *et al.*, 1994).

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro*, el efecto de los taninos condensados purificados de plantas forrajeras del trópico, sobre la digestibilidad de la materia seca de forrajes libres de taninos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Forrajes. Se realizaron dos pruebas de digestibilidad *in vitro*, una sobre *Medicago sativa* y la otra en *Brachiaria decumbens*. A los forrajes previamente se determinó su contenido de taninos condensados totales. Este fue la suma de los taninos condensados libres, los adheridos a proteína y los adheridos a fibra. En la determinación se uso la técnica modificada de Terrill *et al.* (1992), como se refirió en el estudio descriptivo. Los valores de taninos resultaron de 0.0 y de 11.0 g Kg⁻¹ respectivamente para *M. sativa* y *B. decumbens*.

3.2. Purificación de taninos. Los taninos condensados (TC) de *Manihot esculenta* y *Leucaena leucocephala* fueron purificados, con la técnica empleada por Giner-Chavez (1996), como se describió en el experimento anterior.

3.3. Digestibilidad ruminal *in vitro*. Se empleó la Técnica de digestibilidad para forrajes descrita por Tejada (1992), con una relación de líquido ruminal y

amortiguador de 70:30. El líquido ruminal fue obtenido en partes iguales de ovinos fistulados en rumen, alimentados con *Medicago sativa* y heno de *Avena sativa* (80 y 20% respectivamente). Una hora antes de iniciar la digestibilidad, se adicionaron a cada tubo, conteniendo cantidades exactas (.25 g) de *M. sativa* y *B. decumbens*, un ml de solución de McDougall con: cero, 1.25 y 2.50 mg de cada tanino; de tal forma que resultaron los siguientes tratamientos: 1. Forraje sin taninos (testigo). 2. Forraje adicionado de taninos condensados de *L. leucocephala* (1.25 mg). 3. Forraje adicionado de taninos condensados de *L. leucocephala* (2.50 mg). 4. Forraje adicionado de taninos condensados de *M. esculenta* (1.25 mg) y 5. forraje adicionado de taninos condensados de *M. esculenta* (2.50 mg). Posteriormente se siguió la metodología sugerida.

3.4. Análisis estadístico. Para evaluar los tratamientos, en cada experimento se empleó un diseño completamente al azar, con seis repeticiones. Se realizaron las siguientes comparaciones: entre tratamientos y taninos de *L. leucocephala* vs. taninos de *M. esculenta*. Las diferencias entre medias se definieron a una probabilidad menor de 0.05. El paquete estadístico del SAS (1990), se uso para el análisis de los datos.

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1. En el Cuadro 1 se observa el efecto promedio de digestibilidad en *M. sativa*. Se observa en el tratamiento sin taninos, que *M. sativa* fue digerida en un porcentaje que resultó diferente ($P < 0.05$) al obtenido al incluir cualquier tipo de tanino o dosis. Al incluir 1.25 mg de taninos de *L. leucocephala* la digestibilidad resultó similar ($P > 0.05$) que al adicionar 2.50 mg. La respuesta con cualquier dosis de TC de *M. esculenta*, resultó de efecto superior ($P < 0.05$). También se observaron diferencias en digestibilidad al adicionar 1.25 vs 2.50 mg de esos taninos. Por el origen de los taninos, se observó que los de *M. esculenta* tuvieron un efecto mayor ($P < 0.05$).

4.2. Experimento 2. En el cuadro 2, se observa la digestibilidad promedio de *B. decumbens*. Cuando no se emplearon taninos, el efecto resultó diferente ($P < 0.05$) al

obtenido al adicionarlos. Al incluir TC de *L. leucocephala*, se observó similitud de respuesta ($P>0.05$) entre las dosis; pero difirió de la observada con los de *M. esculenta*. La digestibilidad con 1.25 vs 2.50 mg de TC de *manihot*, resultó diferente ($P<0.05$). Por efecto del origen de los taninos no hubo diferencia en la digestibilidad del forraje ($P>0.05$).

5. DISCUSIÓN

En términos generales los reportes de investigación señalan, por efecto de los taninos, reducción de la digestibilidad de proteínas y carbohidratos: se argumenta que actúan disminuyendo la actividad de las proteínas enzimáticas al interactuar en los sitios reactivos, o al formar complejos tanino-proteína, tanino-carbohidrato indigestibles (Makkar *et al.*, 1988; Tanner *et al.*, 1994). Ese efecto se observó en la digestibilidad de la materia seca de *M. sativa* y de *B. decumbens* cuando se emplearon taninos de *L. leucocephala*; pero con los de *M. esculenta*, solo se observó en la brachiaria, ya que en la leguminosa se incrementó. El aumento en digestibilidad puede ser atribuido a algún efecto selectivo de los taninos sobre la microflora ruminal. McAllister *et al.* (1994), mencionan que los taninos condensados a una concentración de $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ inhiben *in vitro* el crecimiento de *Butyrivibrio fibrisolvens* y con $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ producen cambios en la morfología de la célula; en contraste *Prevotella ruminicola* y *Streptococcus bovis* crecieron en presencia de $600 \mu\text{g ml}^{-1}$, con esta concentración, los taninos no tuvieron efecto sobre la morfología de *P. ruminicola*, pero impidieron la división celular de *S. bovis*. Este argumento se apoya en que los taninos pueden actuar directamente sobre las proteínas endógenas de las bacterias al penetrar al interior de la célula bacteriana, o al interferir en la disponibilidad de proteínas útiles para su desarrollo (Field and Lettinga, 1992). En conclusión, los resultados sugieren que la actividad *in vitro* de los taninos de cada especie de forraje es diferente, y dependiendo de la dosis será el efecto sobre la digestibilidad.

Cuadro 1

Digestibilidad promedio *in vitro* de *M. sativa* con la adición de taninos condensados purificados de forrajes tropicales.

Efecto de tratamiento	Dosis (mg)	Digestibilidad % (E.E.)
Control	Cero	75.7a (± 1.5)
<i>Leucaena leucocephala</i> .	1.25	68.7b (± 1.5)
<i>Leucaena leucocephala</i> .	2.50	71.1b (± 1.5)
<i>Manihot esculenta</i> .	1.25	82.4c (± 1.5)
<i>Manihot esculenta</i> .	2.50	87.1d (± 1.5)
Efecto por tanino		
<i>Leucaena leucocephala</i>		69.9a (± 1.1)
<i>Manihot esculenta</i>		84.7b (± 1.1)

Literales distintas en la misma columna indican diferencia ($P < 0.05$)
E.E. error estándar.

Cuadro 2

Digestibilidad promedio *in vitro* de *B. decumbens* con la adición de taninos condensados purificados de forrajes tropicales.

Efecto de tratamiento	Dosis (mg)	Digestibilidad % (E.E.)
Control	Cero	77.4a (± 1.4)
<i>Leucaena leucocephala</i> .	1.25	62.0b (± 1.4)
<i>Leucaena leucocephala</i> .	2.50	65.7b (± 1.4)
<i>Manihot esculenta</i> .	1.25	56.0c (± 1.4)
<i>Manihot esculenta</i> .	2.50	67.8d (± 1.4)
Efecto por tanino		
<i>Leucaena leucocephala</i>		63.8a (± 1.5)
<i>Manihot esculenta</i>		61.9a (± 1.5)

Literales distintas en la misma columna indican diferencia ($P < 0.05$)
E.E. error estándar.

BIBLIOGRAFÍA

- Field JA, Lettinga G.** Biodegradation of tannins. Metal ions in biological systems. Degradation of environmental pollutants by microorganisms and their metalloenzymes. Marcel Dekker Inc., New York 1992; 28:61-97.
- Giner-Chavez BI.** Condensed tannins in tropical forages. Cornell University (thesis Ph.D) 1996.
- Horigome T, Kumar R, Okamoto K.** Effects of condensed tannins prepared from leaves of fodder plants on digestive enzymes *in vitro* and in the intestine of rats. *Br J of Nutr* 1988; 60, 275-285.
- Jones WT, Broadhurst RB, Lyttleton JW.** The condensed tannins of pasture legume species. *Phytochemistry* 1976; 15, 1407-1409.
- Makkar HPS, Singh B, Dawra RK.** Effect of tannin-rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. *Br J of Nutr* 1988; 60, 287-296.
- Martin JS, Martin MM.** Tannin assays in ecological studies: Precipitation of ribulose-1,5,-bisphosphate carboxylase/oxygenase by tannic acid, quebracho and oak foliage extracts. *J of Chem Ecology* 1983; 9, 285-294.
- McAllister TA, Bae HD, Jones GA, Cheng KJ.** Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J Anim Sci* 1994; 72, 3004-3018
- McLeod MN.** Plant tannins- Their role in forage quality. *Nutr Abs and Reviews* 1974; 44, 803-815.
- McManus JP, Davis K G, Lilley TH, Haslam E.** The association of protein with polyphenols. *J of Chem Communications* 1981; 7,309-311.
- SAS., SAS/STAT.** User's guide (release 6.08). SAS Institute Inc., Cary, NC, USA 1990.
- Spencer CM, Cai Y, Martin R, Gaffney SH, Goulding PN, Magnolato D, Lilley TH, Haslam E.** Polyphenol complexation-some thoughts and observations *Phytochemistry* 1988; 27, 2397-2409.
- Tanner GJ, Moore AE, Larkin PJ.** Proanthocyanidins inhibit hydrolysis of leaf proteins by rumen microflora *in vitro*. *Bri J of Nutr* 1994; 71, 947-958.

Tejada de Hernández I. Manual de laboratorio para análisis de Ingredientes utilizados en la alimentación animal. 1a. Ed. Patronato de Apoyo a la Investigación y la Experimentación Pecuaria en México, A. C. México, D.F., 1985.

Terrill TH, Rowan AM, Douglas GD, Barrey TN. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *J Sci Food and Agric* 1992; 58 (3), 321-329.

CAPITULO SEIS

EFICACIA *in vitro* DE TANINOS CONDENSADOS PURIFICADOS DE FORRAJES TROPICALES CONTRA HUEVOS Y LARVAS DE *Haemonchus contortus*

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar *in vitro* la eficacia ovicida y nematicida, de los taninos condensados (TC) purificados de los forrajes *Arachis pintoi*, *Guazuma ulmidifolia*, *Leucaena leucocephala* y *Manihot esculenta*, sobre huevos y larvas de *Haemonchus contortus*; se realizaron dos experimentos. En cada experimento, con un arreglo factorial 5X5, se evaluaron para cada tanino las concentraciones de 45, 4.5, 0.9, 0.3 y 0.1 ppm, con 4 repeticiones. Adicionalmente, como fármaco de referencia, se incluyeron dosis iguales de albendazol. En el experimento 1, se evaluó la eficacia ovicida y la nematicida sobre las larvas eclosionadas (larvas L-III). En el experimento 2, se midió únicamente la eficacia sobre larvas L-III. En el primer experimento, la eficacia ovicida ejercida fue de 0 a 2%, sin que se observaran diferencias entre dosis de los taninos evaluados ($p>0.5$). Con respecto a la eficacia nematicida contra L-III, los taninos de *A. pintoi* tuvieron un efecto de 100% a 11.5%; con los TC de *G. ulmidifolia* fue de 99.4% a 20.9%; los taninos de *L. leucocephala* afectaron entre 74.2% y 5.9% de los parásitos y los de *M. esculenta* de 100% a 14.7%; con albendazol la eficacia resultó de 98.4% a 24.4%. En el experimento 2, los taninos de *A. pintoi* mostraron eficacia larvicida de 98.8% a 32.3%; con los de *G. ulmidifolia* de 98.8% a 33.7%; los taninos de *L. leucocephala* afectaron 98.4% a 6.3% de las larvas y los de *M. esculenta* 98.8% a 24.4%; albendazol eliminó 98.7% a 29.5%. Se concluye que los taninos mostraron alta eficacia sobre larvas L-III de *H. contortus* a las dosis de 45 y 4.5 ppm y nulo efecto ovicida.

1. INTRODUCCIÓN

Los taninos condensados, polifenoles del metabolismo secundario de plantas, juegan un papel significativo en la ganadería, ya que pueden generar efectos

benéficos en la digestión de proteínas, al reducir su digestibilidad en el rumen, y en el metabolismo al disponer el animal de mayor calidad de proteína; no obstante lo anterior pueden causar efectos detrimentales en la digestión de carbohidratos y en el consumo voluntario (Barry and Manley, 1984; Barrey et al., 1986; Muller-Harvey et al., 1988; Giner-Chavez, 1996). Estas propiedades ocurren al reaccionar los taninos con las proteínas o carbohidratos, originando complejos estables, dentro de ciertos límites de pH, (Neucere et al., 1978; Meek and Weiss, 1979; Petersen and Hill, 1991; Young et al., 1993; Waterman and Mole, 1994). Otro efecto benéfico de los taninos es su actividad antiparasitaria. Se ha demostrado por Taylor and Murant (1966), que algunos fenoles actúan sobre *Longidorus elongatus*, reduciendo su población. Otra evidencia de su efecto antihelmíntico es el trabajo de investigación de Hukkeri et al. (1993), que con taninos extraídos del fruto de la granada controlaron a *Taenia solium* y al *Ascaridia galli*. En adición, se ha observado que los taninos pueden controlar la parasitosis de bovinos infectados con *Rhabdities bovis* (Odongo and D'Souza, 1989). Niezen et al. (1995) mencionan que el desarrollo y daño por los parásitos en borregos esta asociado a la especie de forraje que pasten. Lo anterior es probable si consideramos que los parásitos producen enzimas que facilitan sus acciones de digestión de tejidos, digestión extracelular, actividad anticoagulante, evasión de la respuesta inmune, etc... (Rogers, 1982; Knox and Jones, 1990).

2. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue evaluar si los taninos condensados purificados de forrajes tropicales, poseen eficacia ovicida y nematicida sobre huevos y larvas L-III de *Haemonchus contortus*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Extracción y purificación de taninos.

Los taninos condensados (TC), fueron extraídos de los forrajes *Arachis pintoi*, *Guazuma ulmidifolia*, *Leucaena leucocephala* y *Manihot esculenta* con la técnica

descrita por Giner-Chavez en 1996, con modificaciones, como se describió previamente.

3.2. Soluciones patrón.

Los TC purificados y el albendazol, fueron diluidos con agua destilada a una concentración de 500 ppm. De éstos se tomaron alícuotas para alcanzar concentraciones de 50.0, 10.0, 3.33 y 1.11 ppm.

3.3. Aislamiento de huevos.

Utilizando la técnica de Nemeseri and Hollo (1961), los huevos se obtuvieron de heces de un ovino pelibuey infectado con 5000 larvas-III de *H. contortus*. La concentración se ajustó con agua hasta obtener aproximadamente 50 huevos en 0.2 ml.

3.4. Obtención de larvas.

Las larvas fueron obtenidas de huevos extraídos de heces de un ovino previamente infectado, con 5000 larvas (L-III) de *H. contortus*. El material fecal fue procesado por coprocultivo. La identificación del estadio larvario se realizó de acuerdo a sus características morfométricas (Whitlock, 1959). Las larvas se concentraron y ajustaron en agua hasta tener aproximadamente una dilución de 50 en 0.2ml

3.5. Medio de crecimiento.

El medio de crecimiento, se preparó con 10g de excretas de borrego, que fueron molidas y llevadas a suspensión con 100 ml de agua destilada; inmediatamente se centrifugó por 5 minutos a 5000 x g. Los sobrenadantes fueron pasados a través de un filtro para filtración rápida, recibiendo en una probeta, aforándose con agua destilada hasta alcanzar una densidad óptica de 1.8

3.6. Evaluación nematicida.

Se empleó la técnica descrita por Ibarra and Jenkins (1984). Para alcanzar una concentración final de 45, 4.5, 0.9, 0.3 y 0.1 ppm de los taninos y del albendazol (nematicida de referencia), en cajas de plástico para cultivo de tejidos de 24 pozos de fondo plano, se depositaron por cuadruplicado 0.04 ml de cada dilución patrón. Seguidamente se incluyeron 0.2 ml del medio de crecimiento y la suspensión de huevos o larvas L-III a razón de 0.2 ml a cada pozo. Con la finalidad de proporcionar

una atmósfera húmeda, se vertió agua destilada al rededor de los pozos, llevándose las cajas a una estufa de cultivo para su incubación a 27 °C. Como grupo control por cada tipo de tanino y el albendazol se utilizaron 4 pozos conteniendo huevos o larvas en solo medio de crecimiento.

La eficacia ovicida, se midió como el porcentaje de huevos sin eclosión larvaria a las 96 horas post exposición, con referencia al porcentaje de eclosión de larvas en los pozos control.

La eficacia larvicida, se determinó con base al porcentaje de L-III muertos (larvas en posición lineal sin movimiento), a las 96 horas post exposición; con relación al porcentaje de larvas-III que sobrevivieron en los pozos testigo.

La eficacia ovicida y nematicida se calculó con la formula descrita por Forey (1988):

$$E = \frac{(\text{huevos o larvas en el control}) - (\text{huevos o larvas en los tratamientos})}{(\text{huevos o larvas en el control})} \times 100$$

donde: E= eficacia ovicida o nematicida.

3.7 Análisis estadístico.

Para evaluar los resultados, se empleó un diseño al azar en arreglo factorial 5X5. Los factores fueron, los cuatro 4 tipos de taninos y el albendazol y las cinco dosis evaluadas. Dado el empleo de porciones, para cumplir con los supuestos de normalidad e independencia estadística, las inferencias se realizaron de datos transformados por arco seno de la raíz cuadrada de la porción. El análisis de los datos se realizó empleando el paquete estadístico del SAS (1990).

4. RESULTADOS.

4.1. Experimento1.

4.1.1. Eficacia ovicida.

La eficacia ovicida de los TC purificados se observa en el Cuadro 1. La actividad ejercida contra huevos del trematodo en las diferentes concentraciones de taninos, osciló entre 0 y 2%, sin llegar a ser diferente, entre dosis ni entre grupos(p>0.05).

4.1.2 Eficacia nematicida.

La eficacia generada por los TC contra larvas infectantes de *H. contortus*, se observa en el Cuadro 2. *A. pintoi* mostró una eficacia de: 100, 76.0, 70.0, 65.5 y 11.5%, para las concentraciones de 45, 4.5, 0.9, 0.3 y 0.1 ppm respectivamente. Estadísticamente los valores obtenidos con las dosis 4.5, 0.9 y 0.3 ppm, resultaron similares ($p>0.05$). Los taninos de *G. ulmidifolia* eliminaron larvas de *H. contortus* en 99.4, 87.3, 55.1, 34.2 y 20.9%, resultando similar la eficacia al emplear 0.3 y 0.1 ppm. Con TC de *L. leucocephala* la mortalidad resultó de 74.2, 71.0, 60.5, 20.4 y 5.9%, la eficacia de estos fue similar al emplear 45, 4.5 y 0.9 ppm. Con los TC de *M. esculenta* el efecto fue de: 100, 69.9, 84.7, 69.9 y 14.7%, resultando la respuesta igual de eficaz ($p>0.05$) con 4.5 y 0.3 ppm. Con relación a la eficacia mostrada por albendazol, esta fue de 98.4, 92.4, 83.7, 59.8 y 24.4%. Con éste nematocida, la mortalidad resultó igual ($p>0.05$) cuando se empleó 4.5 y 0.9 ppm.

4.2. Experimento 2.

4.2.1. Eficacia contra larvas L-III de *H. contortus*.

El cuadro 3 muestra los resultados promedio obtenidos. La eficacia con TC de *A. pintoi* fue de 98.8, 83.5, 70.6, 64.1 y 32.3%, respectivamente para 45, 4.5, 0.9, 0.3, y 0.1 ppm. La respuesta no fue diferente ($P>0.05$) al incluir 0.9 y 0.3 ppm. El efecto por TC de *G. ulmidifolia* se presentó de la siguiente manera: 98.8, 86.0, 79.1, 54.6 y 33.7%; con estos, la mortalidad al adicionar 4.5 y 0.9 ppm resultó igual ($p>0.05$). Con taninos de *L. leucocephala* la eficacia fue de 98.4, 87.4, 69.3, 52.0 y 6.3%; con éstos la respuesta con cualquier dosis resultó diferente ($p<0.05$). Los TC de *M. esculenta* eliminaron 98.8, 78.6, 56.5, 40.5 y 24.4%, resultando distinta la eficacia con cualquier dosis ($p<0.05$). El albendazol mostró la mayor eficacia (98.7%) con la dosis más alta. Con éste la respuesta con 0.3 y 0.9 ppm resultó estadísticamente igual.

5. DISCUSIÓN.

5.1. Experimento 1.

Algunas investigaciones coinciden en que antihelmínticos como el albendazol tiene efecto ovicida. Sin embargo, también se ha encontrado que la actividad se puede

perder por incremento en la resistencia a los nematicidas, o cuando no se tiene plena solubilidad *in vitro* (Ibarra and Jenkins, 1984; Maipanich *et al.*, 1997). Boersema *et al.* (1982), mencionan que *in vitro*, con 50 a 160 ppm de albendazol, disminuye la solubilidad. Por la característica de auto oxidación de los taninos (Waterman and Mole, 1994), es probable algún grado de pérdida de solubilidad; sin embargo, la falta de estudios con estos como ovicidas, y de acuerdo a los resultados, se sugiere que el efecto sobre huevos de *H. contortus* es nulo.

Al evaluar el efecto nematicida sobre larva L-III de *H. contortus*, los taninos de *A. pintoii*, y *M. esculenta*, mostraron alta eficacia, desde la dosis de 0.3 ppm. Con los de *G. ulmidifolia* y los de *L. leucocephala*, se observó eficacia aceptable a partir de 0.9 ppm. Los resultados sugieren que la actividad de los taninos contra larvas L-III puede variar, dependiendo de su origen y dosis. Variaciones por producto y nivel de concentración empleado, se observaron en algunos antihelmínticos, sobre larvas de *H. contortus* y otros nematodos por Ibarra and Jenkins (1984).

5.2. Experimento 2.

Con la finalidad de corroborar la eficacia larvicida obtenida en el primer experimento, se realizó un segundo trabajo. En este los taninos de *A. pintoii*, *G. ulmidifolia* y *L. leucocephala* mostraron eficacia superior a 50% a partir de 0.3 ppm. Cabe destacar que los TC de *M. esculenta* fueron menos efectivos al incluir 0.3 ppm. Los resultados sugieren que como algunos nematicidas, los taninos, tienen efecto diferente sobre los parásitos. Ibarra and Jenkins (1984), observaron que el albendazol, tiabendazol y mebendazol a dosis de .02, .01 y .04 mg l⁻¹ respectivamente afectaron al 50% de larvas de *H. contortus*. En tanto que la fenotiazina y el febantel, requirieron 4.5 y 6.5 mg l⁻¹ para afectar al mismo porcentaje de parásitos. En función de la dosis, Ibarra and Jenkins (1984) y Jenkins and Ibarra (1984), clasificaron a antihelmínticos como efectivos *in vitro*, cuando afectaron con 10 mg l⁻¹ el 50% o más de los parásitos. Por su respuesta, los taninos evaluados se pueden considerar de actividad aceptable ya que con 4.5 ppm o menos, afectaron 50% o más de las larvas. En adición a los resultados obtenidos, Taylor and Murant (1966), demostraron que extractos de *S. lorentzii* (quebracho) y *A. mollissima* actuaron sobre el nemátodo *Longidorus*

elongatus, reduciendo casi 50% su número; en tanto que los ácidos fenólicos tánico y gallico, y el hidroxibenzóico, el catecol y la hidroxiquinona, aunque la reducen, solo con catecol e hidroxiquinona se observó efecto significativo. No se conoce ningún mecanismo por el que los taninos afectan a los parásitos, sin embargo, es probable que como los benzimidazoles, inhiban sistemas enzimáticos (Prichard *et al.*, 1978, Behm and Bryant, 1985), o que interactúen con las proteínas estructurales de la célula. Estos mecanismos probablemente no sean ajenos a los TC, ya que se ha demostrado que estos actúan formando complejos con proteínas (Barry *et al.*, 1986; Giner-Chavez, 1996). Además hay que considerar que los parásitos liberan proteínas durante los procesos de muda (Rogers, 1982; Knox and Jones, 1990; Wharton, 1991; Echevarria *et al.*, 1992), sobre las que pueden actuar los TC. Se concluye que los taninos evaluados en este experimento mostraron aceptable actividad nematocida sobre larvas L-III de *H. contortus* y nula eficacia ovicida.

Cuadro 1

Porcentaje de eficacia ovicida *in vitro* por taninos condensados sobre huevos de *H. contortus**.

Dosis ppm	Tanino				Albendazol ¹ %
	<i>A. pintoi</i> ¹ %	<i>G. ulmidifolia</i> ¹ %	<i>L. leucocephala</i> ¹ %	<i>M. esculenta</i> ¹ %	
45.0	1.0 a	1.0 a	1.0 a	1.0 a	4.0 a
4.5	1.0 a	1.0 a	1.0 a	1.0 a	2.0 a
0.9	2.0 a	0.0 a	0.0 a	2.0 a	1.0 b
0.3	1.0 a	0.0 a	1.0 a	2.0 a	1.0 b
0.1	1.5 a	0.0 a	0.0 a	2.0 a	1.0 b

Literales distintas en la misma columna indican diferencia (P<0.05).

*Error estándar 0.7.

¹Eficacia promedio de 4 repeticiones.

Cuadro 2

Porcentaje de eficacia nematicida *in vitro* de taninos condensados sobre larvas L-III de *H. contortus** (Exp. 1).

Dosis ppm	Tanino				Albendazol ¹ %
	<i>A. pintoi</i> ¹ %	<i>G. ulmidifolia</i> ¹ %	<i>L. leucocephala</i> ¹ %	<i>M. esculenta</i> ¹ %	
45.0	100.0 a	99.4 a	74.2 a	100.0 a	98.4 a
4.5	76.0 b	87.3 b	71.0 a	69.9 b	92.4 b
0.9	70.0 b	55.1 c	60.5 a	84.7 c	83.7 b
0.3	65.5 b	34.2 d	20.4 b	69.9 b	59.8 c
0.1	11.5 c	20.9 d	5.9 c	14.7 d	24.4 d

Literales distintas en la misma columna indican diferencia (P<0.05).

*Error estándar 4.3.

¹Eficacia promedio de 4 repeticiones

Cuadro 3

Porcentaje de eficacia nematicida *in vitro* de taninos condensados sobre larvas L-III de *H. contortus** (Exp. 2).

Dosis ppm	Tanino				Albendazol ¹ %
	<i>A. pintoi</i> ¹ %	<i>G. ulmidifolia</i> ¹ %	<i>L. leucocephala</i> ¹ %	<i>M. esculenta</i> ¹ %	
45.0	98.8 a	98.8 a	98.4 a	98.8 a	98.7 a
4.5	83.5 b	86.0 b	87.4 b	78.6 b	91.2 b
0.9	70.6 c	79.1 b	69.3 c	56.5 c	71.1 c
0.3	64.1 c	54.6 c	52.0 d	40.5 d	58.5 c
0.1	32.3 d	33.7 d	6.3 e	24.4 e	29.5 d

Literales distintas en la misma columna indican diferencia ($P < 0.05$).

*Error estándar 4.1.

¹Eficacia promedio de 4 repeticiones.

BIBLIOGRAFÍA

Barry TN, Manley TR. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep.- 2. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. *Br J Nutr* 1984; 51, 493-504.

Barry TN, Manley TR, Duncan SJ. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep., 4. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. *Br J Nutr* 1986; 55,123-137.

Behm CA, Bryant C. Resistance in nematodes to anthelmintic drugs. CSIRO Division of Animal Health. Australian Wool Corporation. Australia 1985.

Boersema JH, Lewing-Van Der Wiel PJ, Borgsteede FHM. Benzimidazole resistance in a field strain of *Haemonchus contortus* in the Netherlands. *Vet Record* 1982; 110, 203-204.

Echevarria FAM, Gennari SM, Tait A. Isoenzyme analysis of *Haemonchus contortus* resistant or susceptible to ivermectin. *Vet Parasitology* 1992; 44, 87-95.

Giner-Chavez BI. Condensed tannins in tropical forages. Tesis Ph.D. degree, Cornell University 1996.

Hukkeri VI, Kalyani GA, Hatpaki BC, Marvi FV. *In vitro* anthelmintic activity of aqueous extract of fruit rind of *Punica granatum*. *Fitoterapia* 1993; 64 (1), 69-70.

Ibarra OF, Jenkins DC. The relevance of *in vitro* anthelmintic screening tests employing the free-living stages of trichostrongylid nematodes. *J Helminthology* 1984; 58, 107 - 112.

Jenkis DC, Ibarra OF. *Nematospiroides dubius*. Response of the late fourth-stage larve to anthelmintics *in vitro*. *Parasitenkd* 1984; 70, 395 - 402.

Knox DP, Jones DG. Studies on the presence and release of proteolytic enzymes (proteinases) in gastro-intestinal nematodes of ruminants. *Int J for Parasitology* 1990; 20 (2), 243 - 249.

Maipanich W, Pubampen S, Sanguankiat S, Nontasut P, Waikagul J. Effect of albendazole and mebendazole on soli transmitted helminth eggs. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 1997; 28(2), 321-325.

Meek KM, Weiss JB. Differential fixation of poly (L-arginine) and poly (L-lisine) by tannic acid and its application to the fixation of collagen in electron microscopy. *Biochemical et Biophysic Acta* 1979; 585, 112 - 120.

Muller-Harvey I, McAllen AB, Theodoru MK, Beaver DE. Phenolics in fibrous crop residues and their effects on the digestion and utilization of carbohydrates and proteins in ruminants in plant breeding and the nutritive value of crop residues. Proceedings, ILCA, Addis Ababa, Ed. Reed JD, Capper BS & Neate PJH ILCA, Addis Ababa, Ethiopia 1988; 97-132 pp.

Nemeseri L, Hollo JP. Diagnóstico parasitológico veterinario. Ed. Acribia, Zaragoza, España 1961.

Neucere NJ, Jacks TJ, y Sumrell G. Interactions of globular protein with simple polyphenols. *J Agric Food Chem* 1978; 26 (1), 214-216.

Niezen JH, Waghorn TS, Charleston WAG, Waghorn GC. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *J Agric Sci (Camb.)* 1995; 125, 281-289.

Odongo MO, D'Souza CF. Prevalence and treatment of bovine parasitic otitis in olkarkar group ranch of Kajiado District Kenya. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa* 1989; 37 (2), 191-193.

Petersen JC, Hill NS. Enzyme inhibition by *Sericea lespedeza* tannine and the use of supplements to restore activity. *Crop Sci* 1991; 31(3), 827-832.

Prichard RK, Hennessy DR, Steel JW. Prolonged administration: a new concept for increasing the spectrum and effectiveness of anthelmintics. *Vet Parasitol* 1978; 4, 304-315.

Rogers WP. Enzymes in the exsheathing fluid of nematodes and their biological significance. *Int J Parasitology* 1982; 12, 495-502.

Statistical Analysis Systems (SAS). SAS/STAT User's Guide (Release 6.08). SAS Institute Inc., Cary, NC, USA 1990.

Taylor CE, Murant AF. Nematicidal activity of aqueous extracts from raspberry canes and roots. *Nematologica* 1966; 12, 488-494.

- Waterman PG, Mole S.** Methods in ecology. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications. London Edinburgh Boston 1994.
- Wharton DA.** Ultrastructural changes associated with exsheathment of infective juveniles of *Haemonchus contortus*. *Parasitology* 1991; 103:413-420.
- Whitlock HV.** The recovery and identification of the first stage larvae of sheep nematodes. *Aust Vet J* 1959; 32, 310-316.
- Forey TWJ.** Efficacy of a febendazole-triclabendazole combination against *Fasciola hepatica* and gastrointestinal nematodes in sheep. *Vet Parasitology* 1988; 26, 265-271
- Young Je Cho, Bong Jeun An, Cheong Choi.** Isolation and enzyme inhibition of tannins from korean green tea. *Korean Biochem J* 1993; 26(3), 216-223.

APENDICE

Análisis de varianza con datos transformados (raíz cuadrada) para precipitación de proteína

Origen de la variación	G. libertad	Cuadrado medio
Tanino	5	49.1892•
Proteína	3	82.0432•
PH	1	04.1227•
Tanino * pH	5	02.8150•
Tanino * proteína	14	13.1912•
Proteína * pH	3	21.7418•
Tanino * proteína * pH	12	02.1327•
Error	131	00.0948

•Significancia estadística a una probabilidad menor de 0.05

Análisis de varianza para digestibilidad ruminal de forrajes

Origen de la variación	G. libertad	Cuadrado medio
<i>Digestibilidad Medicago sativa</i>		
Tratamiento	4	0353.7212•
Tanino 1 vs tanino 2	1	1319.1285•
Residual	3	0557.6166
Error	25	0013.6005
<i>Digestibilidad Brachiaria decumbens</i>		
Tratamiento	4	0372.0090•
Tanino 1 vs tanino 2	1	0022.7565•
Residual	3	0131.5885
Error	25	0012.3306

•Significancia estadística a una probabilidad menor de 0.05

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Análisis de varianza de datos transformados (arco seno de la raíz cuadrada) para eficacia ovicida y nematicida

Origen de la variación	G. libertad	Cuadrado medio
Eficacia ovicida (exp 1)		
Tanino	4	52.7555•
Dosis	4	30.2414•
Tanino * dosis	16	20.7804•
Error	75	20.6489
Eficacia Nematicida (exp. 1)		
Tanino	4	01157.2910•
Dosis	4	10163.6805•
Tanino * dosis	16	00242.3575•
Error	75	00036.9548
Eficacia nematicida (exp 2)		
Tanino	4	00232.2612•
Dosis	4	09064.2543•
Tanino * dosis	16	00081.8059•
Error	75	00035.6128

•Significancia estadística a una probabilidad menor de 0.05

TESTEADO
FALLA DE ORIGEN