



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD NUTRICIONAL DE LAS HOJAS DE *ANNONA MURICATA* EN CAPRINOS

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL
GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

POR:

Médico Veterinario Zootecnista

Joaquín Armando Fernández Vera

Asesores:

Dr. Juan Felipe de Jesús Torres Acosta

Dr. Carlos Alfredo Sandoval Castro

Mérida, Yuc., México Junio de 2016

Declaratoria de originalidad

“El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente”

Dedicatoria

A mi madre **Ligia Noemí Vera Pacheco**. Este trabajo te lo dedico porque siempre tuviste fe en mí y constantemente me motivabas a continuar con mis estudios, gracias por todo el amor y felicidad que nos diste todos los días de tu vida. Tu eres la razón más importante de que yo haya llegado hasta este punto en el camino de la vida y también la motivación para concluir este humilde trabajo de Grado, el cual lo realice con mucho esfuerzo y trabajo para que dónde sea que te encuentres estés orgullosa de mi.

A ti **Silvia Eugenia Vela Durán** por estar conmigo siempre en los buenos y malos momentos, y por darme siempre tu apoyo y tu amor. Gracias por ser mi esposa y compañera. Te amo.

A la **Sra. Eugenia Durán Loeza** por su enorme apoyo incondicional y su confianza.

A toda mi familia, mis hermanas **Karina y Adriana Fernández Vera**, mis tías **Margarita, Gaby, Mónica y Chary** porque siempre nos han ayudado incondicionalmente. Gracias

A mi padre **Joaquin Fernandez Peraza** por estar pendiente de nosotros estos últimos años

A mis amigos, tíos y casi padres **Patricia Velázquez Marvan y Carlos Traconis Contreras** que me han apoyado desde muy pequeño, y que siempre me han aconsejado y me han hecho sentir bienvenido en su familia. Los quiero mucho y muchas gracias. Al igual que **Daniel Traconis** quien siempre me ha brindado su especial amistad y su ayuda en todo momento.

A los docentes que me han acompañado durante el largo camino desde la licenciatura, brindándome siempre su orientación con profesionalismo ético en la adquisición de conocimientos y consolidando mi formación como estudiante.

A todas y todos quienes de una u otra forma han colocado un granito de arena para el logro de este Trabajo de Grado, agradezco de forma sincera su valiosa colaboración.

AGRADECIMIENTOS

A nuestra casa de estudios **UADY** y **CCBA** por haberme dado la oportunidad de ingresar al sistema de Educación Superior y cumplir este gran sueño.

Al **CONACYT** por otorgarme el apoyo financiero para la realización de mis estudios de posgrado

A todo el departamento de la **UPI** del **CCBA** por preocuparse por los estudiantes de posgrado y estar pendientes de nuestros avances y ayudarnos en mantenernos informados para poder concretar este proyecto.

Al **Dr. Felipe de Jesús Torres Acosta** por darme la oportunidad de trabajar con él este proyecto, por su paciencia y por todas sus enseñanzas que se me servirán en el presente y en el futuro, sobre todo el aspecto de la disciplina y de la metodología, al cual refrán japonés “La disciplina tarde o temprano vencerá a la inteligencia” Yokoi Kenji

Al **Dr. Carlos Sandoval Castro** por su amistad, asesoría, apoyo y su ayuda incondicional en los momentos más críticos y resolver cualquier tipo de problema y sobre todo por compartir la hora sagrada de la comida y platicar sobre temas diversos.

Al personal del laboratorio de nutrición y unidad de diagnóstico del **CCBA** por su apoyo y excelente trabajo.

A todo el equipo de polifenólicos y a todas y todos quienes de una u otra forma han colocado un granito de arena para el logro de este Trabajo de Grado, agradezco de forma sincera su valiosa colaboración.

RESUMEN

El objetivo fue describir y evaluar la calidad nutricional de las hojas secas de *A. muricata* en condiciones *in vitro* y en condiciones *in vivo* usando caprinos en crecimiento siguiendo la metodología propuesta para la confirmación de plantas con potencial nutracéutico bajo el contexto de aplicación a futuro en parasitología veterinaria. El estudio *in vitro* consistió en dos pruebas a) PGIV y b) DIVMS y DIVMO, con y sin polietilenglicol (PEG) ambas utilizaron un modelo de mezclas simple a 48 h. El estudio *in vivo* midió consumo voluntario, digestibilidad y balance de nitrógeno de diferentes niveles de inclusión de harina de *A. muricata* en 22 caprinos divididos en 4 grupos: Control 0% (n=5), T2 (2.5% n=6), T3 (5% n=6) y T4 (10% n=5). Se midieron valores de biometría hemática, alanina aminotransferasa (ALT) y creatinina. Los resultados de la PGIV y DIVMS mostraron diferencias entre los sustratos simples ($p < 0.05$). No hubo efecto de la adición de PEG ($p > 0.05$). El T4 se eliminó (rechazo del alimento y presentación de diarrea). El T3 tuvo menor consumo en g de MS y en g por PM, la menor ganancia de peso diario y total comparado con el control y T2 ($p < 0.05$). La DAMS de control, T2 y T3 fue similar ($p > 0.05$). El grupo T3 mostró un balance de nitrógeno negativo ($p < 0.05$). No existieron diferencias para biometría hemática, ALT y creatinina ($p > 0.05$). El reducido consumo voluntario de harina de hojas de *A. muricata* podría estar asociado a la baja calidad nutricional del sustrato, ya que pudiera contener un metabolito tóxico no identificado con un efecto negativo post-ingestivo. La harina de hojas de esta planta puede utilizarse en un nivel de 2.5% de la MS de la dieta de cabras en crecimiento.

Palabras clave: *Annona muricata*; Producción de gas *in vitro*; Digestibilidad *in vitro* e *in vivo*; Consumo; Toxicidad.

SUMMARY

The objective was to describe and evaluate the nutritional quality of the dried leaves of *A. muricata* on *in vitro* and *in vivo* conditions using growing goats following the methodology proposed for confirmation of plants with nutraceutical potential under the context of application to future veterinary parasitology. The *in vitro* study consisted of two tests a) IVGP and b) IVDMD and IVOMD, with and without polyethylene glycol (PEG) both test used a model of simple mixtures to 48 h. The *in vivo* study measured voluntary intake, digestibility and nitrogen balance of different including levels of *A. muricata* in 22 goats divided into 4 groups: Control 0% (n = 5), T2 (2.5% n = 6), T3 (5% n = 6) and T4 (10% n = 5). Values of blood count, alanine aminotransferase (ALT) and creatinine were measured. The results of the IVGP and IVDMD showed differences between simple substrates (p <0.05). There was no effect of the addition of PEG (p> 0.05). The T4 was removed (feed refusal and presentation of diarrhea). The T3 had lower consumption in g of DM and g by MW, the lowest daily gain and total weight compared with the control and T2 (p <0.05). The ADMD of control, T2 and T3 was similar (p> 0.05). The T3 group showed a negative nitrogen balance (p <0.05). There were no differences for blood count, ALT and creatinine (p>0.05). The reduced voluntary intake of *A. muricata* leaves could be associated with the poor nutritional quality of the substrate, and this could maybe contain a toxic unidentified metabolite with negative post-ingestive effect. The flour leaves of this plant can be used at an inclusion level of 2.5% of the DM diet for growing goats.

Key words: *Annona muricata*; *In vitro* gas production; *In vitro* e *in vivo* digestibility; voluntary intake; Toxicity.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
SUMMARY.....	II
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Calidad y valor nutricional.....	3
2.2. Técnica de producción de gas <i>in vitro</i>	4
2.2.1. Origen del gas	5
2.2.2. Los sistemas automáticos	6
2.2.3. Preparación para la incubación	6
2.2.4. Secado de las muestras	6
2.2.5. Molienda del sustrato.....	6
2.2.6. Tamaño de la muestra.....	6
2.2.7. Preparación del medio.....	6
2.2.8. Obtención del inóculo.....	7
2.2.9. Preparación del inóculo.....	7
2.2.10. Proporción de inóculo a medio.....	7
2.2.11. Blancos.....	7
2.3. Factores que afectan la producción de gas.....	8
2.3.1. Tipo de sustrato.....	8
2.3.2. Especie donadora del inóculo.....	8
2.3.3. Tampón empleado.....	8
2.3.4. pH del medio.....	8
2.3.5. Control de temperatura.....	8
2.3.6. Agitación.....	8
2.4. Alcances de la técnica de producción de gas.....	9
2.4.1. Predicción de la digestibilidad.....	9
2.4.2. Estudio de los constituyentes del alimento	9
2.4.3. Determinación de la calidad del alimento.....	9
2.4.4. Estudio de efectos asociativos.....	10
2.4.5. Estudio de la cinética de fermentación.....	10
2.4.6. Predicción del consumo.....	10
2.4.7. Limitaciones de la técnica.....	11
2.5. Uso del polietilenglicol (PEG).....	11
2.6. Digestibilidad <i>in vivo</i>	12
2.7. Métodos alternativos contra nemátodos gastrointestinales.....	13
2.8. ¿Qué es un nutraceutico y que es un fitoterapeutico?.....	14
2.8.1. Definición de nutraceutico.....	14
2.8.2. Definición fitoterapeutica.....	14
2.8.3. Identificación de futuros potenciales candidatos a nutraceuticos.....	15
2.8.4. Objetivo de administrar nutraceuticos en parasitología.....	16
2.8.5. Plantas nutraceuticas en Yucatán.....	16

2.9. Plantas de la familia de las Annonaceas	17
2.9.1. Contenido nutricional de las hojas de <i>A. muricata</i>	18
2.9.2. Usos medicinales.....	18
2.9.3 Estudios <i>in vitro</i> del efecto antihelmíntico de las Anonáceas.....	19
2.9.4 Estudios <i>in vivo</i> del efecto antihelmíntico de las Anonáceas.....	20
2.10. Toxicidad de las Annonaceas	21
2.10.1. Toxicidad aguda, subaguda y crónica en ratones.	21
2.11. Compuestos secundarios en las hojas de <i>A. muricata</i>	22
2.11.1 Análisis fitoquímico de las hojas de <i>A. muricata</i>	22
2.11.2. Flavonoides.....	23
2.11.3. Glucósidos.....	24
2.11.4. Saponinas.....	25
2.11.5. Alcaloides.....	26
2.11.6. Acetogeninas.....	26
2.11.7. Swainsonina.....	28
2.12 Toxicidad	30
2.12.1. El método de dosis fija.	30
2.12.2. Biometría Hemática.....	31
2.12.3. Alanina aminotransferasa (ALT).....	32
2.12.4. Creatinina.....	32
3. OBJETIVOS GENERAL	34
3.1 Objetivos específicos	34
4. HIPOTESIS	35
5. REFERENCIAS	36
6. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD NUTRICIONAL <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE LAS HOJAS DE <i>ANNONA MURICATA</i> EN CAPRINOS	46
6. RESUMEN	47
6.1. INTRODUCCIÓN	48
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS	50
6.2.1. Experimento 1 y 2. Producción de gas <i>in vitro</i> y digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca y orgánica con y sin la adición de PEG en un diseño de mezclas simple con alimento balanceado y <i>P. purpureum</i>.	50
6.2.2. Material de estudio.....	50
6.2.3. Análisis bromatológico.....	50
6.2.4. Producción de gas <i>in vitro</i>	51
6.2.5. Diseño experimental para la PGIV y para DIVMS con y sin PEG.....	52
6.2.6. Medición de la producción de gas y cinética de fermentación.....	52
6.2.7. Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS).	53
6.2.8. Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica (DIVMO).....	53
6.3.1 Experimento 3. Consumo, digestibilidad aparente y balance de nitrógeno de la inclusión de harina de hojas secas de <i>A. muricata</i> a diferentes niveles (10, 5 y 2.5%) en una dieta a base de alimento balanceado y su efecto sobre el crecimiento de caprinos	53

6.3.2 Lugar del estudio.....	53
6.3.3 Material vegetal.....	53
6.3.4. Animales experimentales.....	53
6.3.5. Diseño y dieta experimental.....	54
6.3.6. Criterios de eliminación de animales experimentales.....	54
6.3.7. Consumo de dietas experimentales.....	54
6.3.8. Digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS).....	55
6.3.9. Tasa de consumo.....	55
6.3.10 Biometría hemática (BH), enzima hepática ALT y creatinina.....	55
6.3.11. Ganancia diaria de peso y total de peso vivo.....	55
6.3.12. Balance de nitrógeno.....	56
6.4 Análisis estadístico.....	57
7. RESULTADOS.....	58
7.1. Composición química de los sustratos.....	58
7.2. Producción de gas <i>in vitro</i> (PGIV).....	58
7.3. Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca y materia orgánica con y sin PEG.....	60
7.4. Consumo.....	60
7.5. Tasa de consumo.....	61
7.6. Digestibilidad aparente de la materia seca y orgánica.....	62
7.7. Ganancia diaria de peso y total de peso vivo.....	62
7.8. Balance de nitrógeno.....	62
7.9. Signos clínicos, biometría hemática, enzima hepática alanina aminotransferasa (ALT) y creatinina.....	63
8. DISCUSIÓN.....	64
8.1. Análisis Bromatológico.....	64
8.2. Producción de gas <i>in vitro</i>	64
8.3. Digestibilidad <i>in vitro</i> de la MS y MO con y sin PEG.....	65
8.4 Prueba de Consumo de alimento con cantidades crecientes de harina de <i>A. muricata</i>	66
8.5. Ganancia de peso de caprinos consumiendo harina de <i>A. muricata</i>	68
8.6. Digestibilidad aparente de la MS y MO <i>in vivo</i>	68
8.7. Pruebas hematológicas, creatinina, ATP y signos clínicos.....	68
9. CONCLUSIONES.....	70
10. REFERENCIAS.....	71

ÍNDICE DE CUADROS, TABLAS Y FIGURA

Cuadro 1. Plantas taniníferas de Yucatán propuestas como nutraceuticas para pequeños rumiantes	17
Cuadro 2. Análisis proximal de diferentes partes del árbol de <i>A. muricata</i>	18
Cuadro 3. Lugares con reportes del uso de partes de <i>A. muricata</i> como antiparasitario en humanos	19
Cuadro 4. Contenido de polifenoles y flavonoides en extractos etanólicos y metanólicos de la hoja, semilla y pulpa de <i>A. muricata</i>	22
Cuadro 5. Análisis fitoquímico de hojas de <i>A. muricata</i>	23
Tabla 1. Composición química de las dietas experimentales	54
Tabla 2. Análisis proximal de sustratos experimentales utilizados para el estudio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de <i>Annona muricata</i>	58
Tabla 3. Producción de gas acumulado (ml gas/g MS \pm D.E.) de los sustratos experimentales y sus mezclas	59
Tabla 4. Digestibilidad <i>in vitro</i> de materia seca (DIVMS) y de la materia orgánica (DIVMO) de los ingredientes experimentales y las mezclas de los mismos con y sin adición de PEG	60
Tabla 5. Promedios de consumo diario de materia seca (g), consumo de materia seca por Kg de peso vivo metabólico, total, en g/kg de peso metabólico y g/kg de <i>Annona muricata</i>	61
Tabla 6. Porcentaje de cabras que consumen el alimento de los diferentes grupos experimentales en < 1 hora, >1 hora, pero < 2 horas y > 2 horas	62
Tabla 7. Proteína cruda (g) consumida en alimento y eliminada en heces o en orina, así como el balance de nitrógeno (g de PC) de cabritos alimentados con diferente nivel de inclusión de harina de hojas de <i>Annona muricata</i>	63
Figura 1. Producción de gas acumulada a 48 horas de los tratamientos simples y mezclas del experimento	59

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años, el uso de plantas nutraceuticas ha emergido como una estrategia viable para el manejo de los nematodos gastrointestinales (Hoste *et al.*, 2012). Incluso se ha propuesto una metodología para la búsqueda y confirmación de plantas con potencial para ser empleadas como nutraceuticos en parasitología veterinaria (Hoste *et al.*, 2015). Los principales pasos a seguir para estudiar plantas y determinar su potencial nutraceutico son: (1) demostrar su efecto antihelmintico (AH) *in vitro*, (2) describir el perfil de macronutrientes, (3) evaluar la digestibilidad de la materia seca (MS) y materia orgánica (MO) en pruebas *in vitro*, (4) realizar pruebas de consumo y preferencia *in vivo*, (5) evaluar la digestibilidad de la materia seca (MS) y materia orgánica (MO) *in vivo* así como su efecto en el balance de nitrógeno, (6) determinar el impacto sobre la salud y producción animal, y (7) evaluar su efecto AH *in vivo*. Los materiales nutraceuticos más estudiados y que sirven como modelo a seguir han sido los materiales ricos en taninos condensados y generalmente incluye plantas de la familia fabácea (Hoste *et al.*, 2006; Alonso-Díaz *et al.*, 2010). Sin embargo, existen otras plantas como las Anonáceas que se encuentran distribuidas en todo el trópico y son plantas representativas de los huertos familiares en Yucatán (Flores *et al.*, 2004). A esta familia de plantas se le ha prestado mucha atención en la etnobotánica, etnoveterinaria por sus propiedades medicinales y antiparasitarias (Flores *et al.*, 2004; Gajalakshmi *et al.*, 2011; Pandey y Barve, 2011). Más aún, se ha demostrado que especies de esta familia tiene propiedades AH *in vitro* contra NGI en pequeños rumiantes (Souza *et al.*, 2008; Kamaraj *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2013). En Yucatán, México, se ha demostrado que los extractos de acetona:agua (70:30) y metanol de *Annona muricata* tiene actividad AH *in vitro* con dosis efectivas letales a bajas concentraciones sobre huevos y larvas L₃ de *Haemonchus contortus* (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2014). Por lo tanto, cumple con el primer punto de la metodología para identificar materiales nutraceuticos. Estos autores también demuestran que los compuestos secundarios contenidos en los extractos de *A. muricata* pueden ser considerados tóxicos de acuerdo a la técnica *in vitro* de *Artemia salina* por lo que se deben tomar precauciones si quiere utilizarse como insumo para la alimentación animal. A pesar de ser una planta nutraceutica con potencial AH, existe poca información que describa las cualidades

nutricionales, tóxicas o antihelmínticas de esta especie de planta al ser consumida por pequeños rumiantes. Por lo tanto, se requiere generar la información que permita definir si las hojas de *A. muricata* pueden proponerse como materiales nutracéuticos contra los NGL. Para esto es indispensable complementar la descripción y evaluación de la calidad nutricional tanto *in vitro* como *in vivo* de las hojas secas de *A. muricata* como sugieren Hoste *et al.* (2015). Por lo tanto, el presente trabajo evaluó la calidad nutricional de las hojas secas de *A. muricata* en condiciones *in vitro* y en condiciones *in vivo* usando caprinos en crecimiento.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Calidad y valor nutricional

La calidad del forraje se define de varias maneras, pero a menudo se comprende muy poco. La calidad del forraje representa un concepto simple, pero abarca mucha complejidad. Aunque es muy importante la calidad del forraje a menudo recibe mucha menos atención de la que merece. La alimentación animal de calidad es esencial para lograr altas tasas de ganancia de peso, abundante producción de leche y una reproducción eficiente. La calidad del forraje tiene un efecto directo sobre el rendimiento de los animales por lo tanto ¿Que es la calidad del forraje? Esta puede definirse como el grado en que un forraje tiene el potencial de producir una respuesta animal deseada. La producción de forraje de calidad adecuada para una situación dada requiere el conocimiento de los factores que afectan la calidad del forraje. Los factores que influyen en la calidad del forraje incluyen los siguientes: 1) La palatabilidad ¿Los animales comen el forraje? Los animales tienen la capacidad de seleccionar sobre uno u otro forraje basado en el olfato, vista, sentir y el gusto. Por lo tanto, la palatabilidad puede estar influida por la textura, frondosidad, fertilización, madurez, contenido de humedad o compuestos que causan que el forraje sea dulce, agrio, salado al gusto. Los forrajes de alta calidad son por lo general muy palatables. 2) La ingesta o consumo ¿Cuánto van a comer? Los animales deben consumir cantidades adecuadas de forraje para un buen desempeño, cuanto mayor sea la palatabilidad, mayor será la ingesta. 3) La digestibilidad ¿Cuánta cantidad del forraje será digerido? (el grado en que el forraje es absorbido a medida que pasa a través del tracto digestivo de un animal) varía en gran medida. Los tejidos vegetales inmaduros de hojas pueden ser digeridos en un 80 a 90%, mientras que material maduro de tipo tallo se digiere menos del 50%. 4) El contenido de nutrientes. Una vez digerido, ¿Será el forraje capaz de proporcionar un nivel adecuado de nutrientes? Las plantas contienen por lo general de 70 a 90% de agua, para estandarizar los análisis, la producción de forraje y el contenido de nutrientes se expresan generalmente en base a materia seca (MS). De esta MS se puede dividir en dos categorías principales: (1) contenido celular (las partes no estructurales del tejido de la planta, tales como proteínas, azúcar y almidón); y (2) componentes estructurales de la pared

celular (celulosa, hemicelulosa y lignina). 5) Factores antinutricionales. Varios compuestos pueden estar presentes en el forraje que puede reducir el rendimiento del animal, causa la enfermedad, o incluso producir la muerte. Tales compuestos incluyen taninos, nitratos, alcaloides, cianoglicosidos, estrógenos, saponinas, etc. La presencia y/o gravedad de estos elementos dependen de las especies de plantas presentes, época del año, las condiciones ambientales, y la sensibilidad animal. Los forrajes de alta calidad no deben contener niveles peligrosos de componentes antinutricionales. 6) El rendimiento de los animales es la última prueba de la calidad del forraje, especialmente cuando los forrajes son ofrecidos solos y ha libre elección. La calidad del forraje abarca el término "valor nutritivo" (el potencial de proporcionar nutrientes, es decir, la digestibilidad y contenido de nutrientes). El rendimiento de los animales puede ser influenciado por cualquiera de varios factores asociados con cualquiera de las plantas o de los animales. La falta de dar la debida consideración a cualquiera de estos factores puede reducir el nivel de rendimiento de un animal, que a su vez reduce los ingresos potenciales (Ball *et al.*, 2001).

Retomando estos términos el autor Newman *et al.*, (2006) concuerda en que debe hacerse la distinción entre los términos calidad y valor nutritivo. Por mucho tiempo se ha hecho uso indistinto e intercambiable de estos términos refiriéndose a la calidad del alimento. El valor nutritivo de un forraje se refiere a la concentración de energía disponible (total de nutrientes digestibles) y concentración de proteína cruda. La calidad de un forraje es un término más amplio que no solo incluye el valor nutritivo sino también su consumo. En la práctica animal el desempeño productivo de los animales refleja la calidad de un forraje.

2.2 Técnica de producción de gas *in vitro*

El desempeño productivo de los rumiantes depende mucho de la calidad del forraje, ya que el valor nutricional de un ingrediente o dieta impactará positiva o negativamente en el consumo y la digestibilidad de dicho alimento (Posada y Noguera, 2005). Los métodos *in vitro* son importantes para los nutriólogos, ya que son muy útiles para determinar la calidad nutricional de los alimentos. Estos métodos permiten tener un mayor control de las condiciones experimentales y requieren menos tiempo para su ejecución comparado con

experimentos *in vivo* (Makkar, 2005). La técnica de producción de gas es una técnica *in vitro* que sirve para la evaluación del valor nutricional, la cual a diferencia de otras técnicas no sólo determina la extensión, sino también la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas liberado directamente como un producto de la fermentación (Theodorou *et al.*, 1994). Debido al incremento de interés en la utilización de fuentes de alimentos no convencionales, se ha incrementado la utilización de esta técnica, que puede proveer información muy útil sobre la cinética de la digestión en sus fracciones soluble e insoluble de los alimentos. Su manera fácil de medir los productos finales de la fermentación lo hace más eficiente que otros métodos *in vitro* para el estudio de fitoquímicos, metabolitos secundarios de las plantas y aditivos en los alimentos. Otras ventajas que posee este método es que se pueden manejar muchas muestras al mismo tiempo, tiene aplicaciones para calcular la digestibilidad e incluso puede emplearse para el balance de nitrógeno (Makkar, 2005).

La técnica de producción de gas emplea sustratos molidos, medio anaeróbico, temperatura de 39 °C e inóculo ruminal. La técnica puede medir el volumen de gas a presión atmosférica constante, la presión de gas a un volumen fijo, o hace una combinación de ambos procedimientos; disponiendo para tal efecto de metodologías manuales, semiautomáticas y automáticas. Los perfiles de producción de gas obtenidos pueden ajustarse a diferentes ecuaciones para resumir la información cinética, permitiendo la comparación de los sustratos, la evaluación de diferentes ambientes de fermentación y la obtención de las tasas de fermentación de los constituyentes solubles y estructurales. Si determinaciones gravimétricas son realizadas a determinados intervalos de tiempo, la producción de gas por unidad de materia seca o de materia orgánica puede ser cuantificada. Algunos de los factores que afectan la producción de gas se encuentra el tipo de sustrato y de inóculo, la especie animal donadora del inóculo, su alimentación, el pH del medio y el tampón empleado (Krishnamoorthy *et al.*, 2005).

2.2.1. Origen del gas. La energía para el crecimiento microbiano es derivada de la fermentación de los carbohidratos, principalmente almidón y celulosa, cuya digestión anaerobia produce ácidos grasos volátiles (AGV), succinato, lactato, etanol, dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), y trazas de hidrógeno (H₂). La cantidad de gas producida por gramo de materia seca (MS) o de materia orgánica (MO) desaparecida puede ser calculada si

las pérdidas de sustrato son medidas, bien sea a determinados intervalos de tiempo o al final de la fermentación (Posada y Noguera, 2005).

2.2.2. Los sistemas automáticos. Estos sistemas permiten realizar un mayor número de lecturas de la producción de gas (ejemplo cada minuto, 5 minutos, 10 minutos, etc.) lo que conduce a la obtención de perfiles muy detallados. Otra ventaja de los sistemas automáticos es la reducción de la labor, especialmente las primeras 36 horas de incubación donde, debido a la rápida fermentación, frecuentes lecturas son requeridas en los procedimientos manuales. La introducción de más avanzados y sensibles equipos de producción de gas que cuantifican la cinética de fermentación con una alta precisión con diferentes procesos hace necesaria la utilización de modelos multifásicos como el del autor Groot *et al.* (1996). El valor potencial de estos modelos multifásicos es que separan el sustrato evaluado en las fracciones más rápida y más lentamente fermentables. No obstante, otra desventaja de los sistemas automáticos es el alto costo inicial, la complejidad y los problemas de mantenimiento (Posada y Noguera, 2005).

2.2.3. Preparación para la inoculación. La técnica de producción de gas al igual que otros procedimientos de digestibilidad usan sustratos molidos, medio anaeróbico, temperatura de 39°C e inóculo ruminal (Posada y Noguera, 2005).

2.2.4. Secado de las muestras. El contenido y la naturaleza de varios constituyentes del alimento y por consiguiente, la cinética de fermentación, pueden ser influenciados por la temperatura y el proceso de secado del sustrato. La mayoría de los grupos hacen secado por congelación o en el horno a 60 o 70°C (Posada y Noguera, 2005).

2.2.5. Molienda del sustrato. Un menor tamaño de partícula aumenta el área de superficie para la degradación microbiana. Para el análisis de producción de gas, la mayoría de los autores muelen los sustratos a través de una malla de 1 mm (Posada y Noguera, 2005).

2.2.6. Tamaño de la muestra. La cantidad de material requerido para evaluar la cinética de fermentación varía desde 0.1 a 1 g. Con un aumento en el tamaño de la muestra se produce una disminución en la producción de gas por cada gramo de MS, debido a la baja proporción de microorganismos en relación al sustrato o al agotamiento del tampón (Posada y Noguera, 2005).

2.2.7. Preparación del medio. Todos los medios en uso tienen en común tampón de bicarbonato y fosfato, un agente reductor, una fuente de nitrógeno, varios minerales, y

resazurina como indicador de potencial redox. En todos los casos, el CO₂ es usado durante la preparación del medio para asegurar un bajo potencial redox al momento de la inoculación, ya que la ausencia de anaerobiosis resulta en pérdidas de bacterias celulolíticas y amilolíticas (Posada y Noguera, 2005).

2.2.8. Obtención del inóculo. El fluido ruminal tomado después del ayuno es menos activo que el que se colecta dos horas después de alimentar, pero es más consistente en su composición y actividad. Como regla general, se recomienda colectar el inóculo antes de la alimentación y de por lo menos tres animales consumiendo la misma dieta. La incubación de un mismo sustrato puede conducir a diferente producción de gas si el fluido ruminal es tomado en diferentes días, situación que deberá corregirse por la introducción de estándares de conocida producción de gas (Posada y Noguera, 2005).

2.2.9. Preparación del inóculo. El licuado incrementa en el inóculo el número de bacterias previamente adheridas a la fibra, la mayoría celulolíticas, pero también el número de partículas pequeñas del alimento, por lo que la producción de gas en los frascos de incubación y en los blancos se hace mayor. El procedimiento de licuado puede también aumentar el riesgo de exposición al oxígeno si el flujo de CO₂ no es suficientemente fuerte (Posada y Noguera, 2005).

2.2.10. Proporción de inóculo a medio. Estudios *in vitro* describen que un medio conteniendo 20 a 25% de fluido ruminal da los mejores resultados. Sin embargo, la cantidad de inóculo adicionado varía ampliamente entre grupos. Algunas proporciones líquido ruminal:tampón son 1:2 (Menke y Steingass 1998); 1:4, y 1:9 (Theodorou *et al.*, 1994).

2.2.11. Blancos. Una serie de botellas blanco conteniendo medio e inóculo pero no sustrato, es rutinariamente incluida en cada corrida. El promedio de gas registrado por los blancos, que normalmente corresponde al 13-27% de la lectura final, es substraído desde el total de gas producido por los sustratos evaluados, obteniendo así el total de gas realmente derivado desde la fermentación del sustrato (Posada y Noguera, 2005).

2.3. Factores que afectan la producción de gas

2.3.1. Tipo de sustrato. Los henos de leguminosas se degradan a una tasa más alta que los henos con una alta participación de gramíneas (Posada y Noguera, 2005).

2.3.2. Especie donadora del inóculo. Las diferencias en la actividad de los microorganismos desde el rumen de diferentes especies, o de la misma especie, pero con diferentes dietas, significa que todas las descripciones de producción de gas deberán describir las condiciones del animal donador (Posada y Noguera, 2005).

2.3.3. Tampón empleado. Los datos de producción de gas serían más fácilmente interpretados si un sistema tampón basado únicamente en bicarbonato o fosfato fuera utilizado. Sin embargo, para lograr un pH > 6, una mezcla de bicarbonato-fosfato es necesaria (Posada y Noguera, 2005).

2.3.4. pH del medio. Los microorganismos ruminales son muy sensibles a cambios en el pH y la mayoría prefieren un rango de pH entre 6.5 a 6.8. Las bacterias celulolíticas, en particular, son más sensibles a bajos pH que las bacterias amilolíticas. Un pH alto (7.5) o bajo (5.5) severamente compromete la digestión de la fibra (Posada y Noguera, 2005).

2.3.5. Control de temperatura. La actividad microbiana, el volumen de gas y las presiones cambian con la temperatura, por lo que está debe estar en 39 °C (Posada y Noguera, 2005).

2.3.6. Agitación. El CO₂ tiene una fuerte tendencia a formar soluciones súper saturadas en medio acuoso. Si esto ocurre, la presión o el volumen obtenidos en las lecturas serán incorrectos. Afortunadamente esta tendencia puede ser reducida por suave agitación ocasional (Posada y Noguera, 2005).

2.4. Alcances de la técnica de producción de gas

2.4.1. Predicción de la digestibilidad. Se ha demostrado que la producción de gas está relacionada con la desaparición de la FDN, la relación entre ambos conceptos es lineal, con una pendiente marcadamente constante. Igualmente se ha encontrado una alta correlación entre la producción de gas *in vitro* y la disponibilidad del almidón en los granos de cereales, la producción de gas acumulada en 24 horas estuvo bien correlacionada con la digestibilidad de la MO determinada *in vivo*. Finalmente han reportado significativas correlaciones entre la tasa fraccional de desaparición de la MS *in situ* y la tasa fraccional de producción de gas (Krishnamoorthy *et al.*, 2005).

2.4.2. Estudio de los constituyentes del alimento. La técnica de producción de gas puede ser también usada para determinar la importancia de las diferentes fracciones alimenticias (monosacáridos, pectinas, almidón, celulosa y hemicelulosas) para proveer energía a los microorganismos y para determinar que componentes inhiben la actividad microbiana. La discrepancia entre los valores estimados de fermentabilidad de los forrajes empleando técnicas *in situ* e *in vitro* se presenta por la más baja fermentación de la fibra en el sistema *in vitro*. Algunas razones que explican esta discrepancia corresponden al hecho que algunas plantas tienen factores antinutricionales que son liberados durante la fermentación y se acumulan en el medio de incubación alcanzando niveles inhibitorios para los microorganismos, en tanto que en la técnica de la bolsa de nylon la toxicidad para los microorganismos o el enlace a sus enzimas es diluido. Adicionalmente, los métodos basados en determinaciones gravimétricas permiten la solubilización de los factores antinutricionales, por lo que ellos son medidos como MS digestible cuando realmente no hicieron ninguna contribución de energía al sistema. Contrariamente, en la técnica de gas, el efecto de estos principios sobre la fermentación ruminal es reflejada precisamente en la menor producción de gas (Posada y Noguera, 2005).

2.4.3. Determinación de la calidad del alimento. La técnica de producción de gas permite detectar diferencias entre los sustratos generadas por su madurez, condiciones de crecimiento, especie o cultivar y métodos de preservación. Igualmente ha sido usada para

determinar diferencias en la fermentabilidad de los residuos de cosecha sometidos a diversos tratamientos químicos o físicos (Krishnamoorthy *et al.*, 2005).

2.4.4. Estudio de efectos asociativos. La técnica tiene potencial para investigar efectos asociativos entre alimentos. El procedimiento consiste en incubar primero las dietas separadamente y posteriormente en combinación, monitoreando la producción de gas. Los trabajos realizados al respecto han observado una interacción positiva en la producción de gas en las etapas tempranas de la incubación. De lo anterior se desprende que la producción de gas ofrece un medio para investigar las interacciones de las fracciones solubles e insolubles durante la fermentación (Posada y Noguera, 2005).

2.4.5. Estudio de la cinética de fermentación. La cinética de producción de gas depende de las proporciones de partículas solubles, insolubles pero degradables, y no degradables del alimento. La sincronización entre la energía y el nitrógeno suplementados en el rumen es una aproximación para mejorar la eficiencia de la fermentación ruminal. Para aplicar este principio en formulación de alimentos, se necesitan datos sobre las tasas de degradación de las proteínas y de fermentación de los carbohidratos. Las técnicas de producción acumulativa de gas pueden ser usadas para generar esta información. La producción de gas podría también ser potencialmente usada para comparar la cinética de fermentación desde el rumen o el intestino grueso de diferentes especies y/o del resultado de diferentes dietas (Posada y Noguera, 2005).

2.4.6. Predicción del consumo. Se ha demostrado que el consumo de forrajes fue mejor correlacionado con sus características de degradabilidad ruminal que con la digestibilidad en el tracto digestivo total. La técnica de producción de gas ha sido usada como una medida de la degradación ruminal de los alimentos y como un indicador del consumo de MS digestible. De hecho, la tasa fraccional de degradación ha sido un medio para predecir el consumo voluntario de forrajes por los rumiantes. No obstante, en los intentos que se han realizado para relacionar las tasas de digestión *in vitro* con el consumo de MS, las correlaciones han sido bajas, porque las variables claramente importantes en regular el consumo son la palatabilidad, estado fisiológico, el nivel de producción y las condiciones ambientales que no se toman en cuenta. La producción de gas desde la FDN está mejor correlacionada con el consumo voluntario que los valores obtenidos desde la incubación del

forraje entero porque el consumo de pared celular genera distensión ruminal (Krishnamoorthy *et al.*, 2005; Posada y Noguera, 2005).

2.4.7. Limitaciones de la técnica. Una limitación de la técnica es la falta de uniformidad en las metodologías, lo que hace difícil comparar resultados entre grupos de investigación. Además, como otros métodos de bioensayo, requieren animales fistulados en el rumen para la obtención del inóculo, y la fistulación no solamente incrementa el número de problemas prácticos, como son la facilidad quirúrgica, el constante cuidado para evitar infecciones, particularmente en los trópicos, el costo asociado con el largo término de mantenimiento de esos animales, sino que se trata de un procedimiento invasivo, el cual está en desuso por consideraciones éticas (Posada y Noguera, 2005).

2.5. Uso del polietilenglicol (PEG).

Los polímeros artificiales como el polietilenglicol (PEG) se utilizan como formadores de complejos de taninos, el PEG es soluble en agua y contiene un gran número de átomos de oxígeno que son capaces de formar enlaces de hidrogeno con los grupos polifenólicos de los taninos. Esta propiedad de generar complejos de unión con taninos ha sido explotada para la separación de metabolitos de las plantas (Frutos *et al.*, 2004). Recientemente se ha retomado el interés en su uso como agente generador de complejos de taninos para su cuantificación y para neutralizar sus efectos negativos en los animales como disminución de apetito reducción en la concentración de amoníaco y ácidos grasos volátiles, disminución de la digestibilidad de la materia orgánica, proteína y pared celular, así como causar interferencia con la acción de enzimas pancreáticas y absorción de aminoácidos. La capacidad del PEG para formar complejos con los taninos ha permitido realizar investigaciones relacionadas con el apetito y procesos digestivos (Silanikove *et al.*, 2001; Frutos *et al.*, 2004).

En estudios *in vivo* el tratamiento a ratas, ovejas, cabras y vacas con PEG incrementa no solo el consumo voluntario sino también la digestibilidad de la dieta, particularmente de la proteína. Estudios de degradación *in vitro* e *in situ* demuestran las respuestas positivas de la incubación de muestras de plantas taníferas con la adición de agentes formadores de

complejos y sin ellos. El incremento de la producción de gas y la degradabilidad cuando se adiciona PEG se ha utilizado como un indicador de los efectos de los taninos en el rumen. La ventaja de estos estudios es su simplicidad y evita el problema de insolubilidad de los taninos. Estos métodos son muy eficientes para clasificar los efectos negativos de los taninos, pero la desventaja que tienen es que únicamente son cualitativos y no dicen mucho acerca de los efectos de los taninos *in vivo*. Por otro lado, la adición de PEG a plantas libres de taninos no incrementa la producción de gas *in vitro*, ni la degradabilidad *in situ*, no tiene efecto en el comportamiento de consumo y la digestibilidad *in vivo*. Luego entonces se concluye que el efecto positivo del PEG en la degradación de la materia orgánica está relacionado con la neutralización de los efectos adversos de los taninos en la degradación ruminal (Silanikove *et al.*, 2001; Frutos *et al.*, 2004).

2.6. Digestibilidad *in vivo*

En esta técnica la digestibilidad de un alimento se estima a partir del supuesto de que la cantidad de alimento consumido que no se excreta en las heces se considera que fue absorbido por el animal (Rymer, 2000). Sin embargo, se considera digestibilidad aparente debido a que en rumiantes el metano proviene de la fermentación de los carbohidratos se pierde en el eructo y no es absorbido por el animal. También se considera aparente por la presencia en las heces de productos metabólicos del animal. (McDonald *et al.*, 2014). La técnica consiste en alojar a los animales en jaulas metabólicas adaptadas con separadores de heces y orina. Antes de iniciarse la fase experimental los animales deberán ser desparasitados y serán pesados al inicio y final de la prueba, cuyo objetivo es adaptar a los animales a la dieta y eliminar todos los residuos de alimento no digeridos ajenos a la dieta a evaluar. (McDonald *et al.*, 2014).

Esta técnica tiene la ventaja de poder determinar la digestibilidad y el consumo de un alimento de manera directa o indirecta mediante el empleo de marcadores internos o externos. Esta técnica, está limitada a la descripción de los efectos digestivos del aparato digestivo completo y no permite diferenciar entre lo que es degradado en el rumen y lo que es digerido después del rumen. Como medio para la evaluación de alimentos esta técnica tiene la desventaja de requerir labores intensas, largos tiempos de mediciones, requiere de grandes

cantidades del alimento a evaluar, así como el uso de animales y por lo tanto es costosa. Sin embargo, el empleo de esta técnica se justifica a partir de la necesidad de validación de muchos experimentos *in vitro* e *in situ* que requieren de información *in vivo* sobre la tasa de digestión, cinética de la digestión y respuesta animal en el consumo, producción y reproducción (Rymer, 2000).

2.7. Métodos alternativos contra nemátodos gastrointestinales

Uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la producción de pequeños rumiantes a nivel comercial y producción en traspatio, es la presencia de los nemátodos gastrointestinales (NGI) que causan pérdidas económicas y productivas en todo el ciclo de producción (Aparecida-Nogueira *et al.*, 2012). De manera tradicional, la parasitosis por NGI han sido tratadas principalmente con drogas AH comerciales. Sin embargo, este tipo de manejo es costoso ya que se ha estimado un costo anual asociado cercano a los 10 billones de dólares en todo el mundo (Roeber *et al.*, 2013). Además, el control de los parásitos se ha complicado con la aparición de cepas de nemátodos que exhiben resistencia a diferentes clases de antihelmínticos en todo el mundo (Papadopoulos *et al.*, 2012; Torres-Acosta *et al.*, 2012a). En Yucatán, México se reportó una prevalencia de NGI resistentes a benzimidazoles del 58.3% y a lactonas macrocíclicas del 36.3%. Se encontraron cepas del parásito *Haemonchus contortus* resistente a ambas familias de antihelmínticos, y cepas *T. colubriformis* resistente a las lactonas macrocíclicas (Torres-Acosta *et al.*, 2003).

Debido al problema derivado de los NGI y su resistencia a los tratamientos con AH se están investigando soluciones alternativas diferentes al uso de drogas comerciales para el control de los parásitos (Torres-Acosta *et al.*, 2012b). Entre ellas se encuentra el uso de agujas de óxido de cobre, hongos nematófagos, rotación de praderas, selección genética, suplementación estratégica y en los últimos años la utilización de plantas con efecto AH (Sandoval-Castro *et al.*, 2012).

Aun cuando se han realizado numerosos trabajos en relación al efecto AH de las plantas ricas en taninos condensados tanto en zonas de clima templado (Hoste *et al.*, 2006), como en clima tropical (Alonso-Díaz *et al.*, 2010) también se han identificado y reportado otros compuestos bioactivos con propiedades AH los cuales incluyen, catequinas, flavonoides,

esteroides y polifenoles, enzimas (cisteína-proteasa) y alcaloides glucósidos. Sin embargo, aún se necesita entender los mecanismos de acción de estos compuestos, ya que a pesar de que se han demostrado propiedades AH, también en ocasiones se han identificado efectos negativos en los animales, tales como la reducción en la ingesta y ganancia diaria de peso. El uso tradicional de las plantas se ha basado principalmente en la preparación de extractos aplicados como remedios con base en hierbas, sin embargo, una nueva opción de explotar las plantas como nutraceuticos está siendo evaluado hoy en día (Sandoval-Castro *et al.*, 2012). Para ello, tanto los efectos benéficos de las plantas como son la actividad AH y su valor nutricional, así como los posibles efectos negativos deben ser evaluados antes de proponer el empleo de cualquier planta como parte de una estrategia para el control de los NGI (Hoste *et al.*, 2015).

2.8. ¿Qué es un nutraceutico y que es un fitoterapeutico?

2.8.1. Definición de nutraceutico. El término nutraceutico fue acuñado desde 1989 por el Dr. Stephen DeFelice, Presidente de la Fundación para la innovación en Medicina, quien lo definió como “Un alimento o parte de un alimento que proporciona beneficios medicinales o saludables incluyendo la prevención o el tratamiento de una enfermedad o padecimiento”. El término nutraceutico resulta de la combinación de las palabras nutrición y farmacéutico (Kalra, 2003).

2.8.2. Definición fitoterapeutica. Las drogas fitoterapeuticas son preparaciones de plantas o extractos de plantas obtenidos a través de varios procesos físicos y químicos, y que su administración, por un período corto de tiempo y restringido tiene como objetivo “tratar animales infectados” (Brunet *et al.*, 2011; Hoste *et al.*, 2012).

La Ciencia Veterinaria se enfoca más en una subcategoría de nutraceutico que puede ser definido como un alimento que combina valores nutricionales con efectos benéficos sobre la salud animal y esta doble acción se sospecha que depende de la presencia de varios metabolitos secundarios o compuestos bioactivos contenidos en las plantas, que pueden ser usadas directamente como parte de la dieta de un animal o añadiendo en forma concentrada los extractos que contienen estos compuestos (Hoste *et al.*, 2015).

A diferencia de las drogas sintéticas, los complementos aditivos y las drogas herbales los nutraceuticos se caracterizan por (Hoste *et al.*, 2015):

1.- El modo de administración puede ser como una planta que contiene metabolitos secundarios o añadiendo metabolitos secundarios (extractos) al alimento.

2.- El modo de administración depende del consumo voluntario del animal y se brinda por un tiempo prolongado.

3.- La calidad de sus compuestos activos es muy variable y muy diverso, pero se puede apoyar en análisis fitoquímicos para su identificación.

4.- El modo de acción es todavía hipotético y se sospecha que pudiera existir resistencia antihelmíntica a ciertas moléculas.

5.- El objetivo de su administración es la de prevenir o curar.

2.8.3. Identificación de futuros potenciales candidatos a nutraceuticos. Los pasos a seguir para el estudio de plantas con un potencial nutraceutico en estudios de parasitología veterinaria son (Hoste *et al.*, 2015):

1) Demostrar su efecto AH *in vitro*.

2) Tener un perfil de macronutrientes elevado (altos niveles de proteína y energía; y bajos niveles de lignina).

3) La calidad nutricional debe ser sometida a pruebas *in vitro* para evaluar la digestibilidad de materia seca (MS) y la materia orgánica (MO).

4) Realizar pruebas de consumo y de preferencia, en caso de no ser consumida considerar otra estrategia para ofrecer al animal.

5) Evaluar la digestibilidad de MS y MO *in vivo*.

6) Determinar el impacto sobre la salud y producción animal.

7) Evaluar el efecto AH *in vivo*.

2.8.4. Objetivo de administrar nutraceuticos en parasitología. Los nutraceuticos se utilizan como una fuente de alimentación, pero la razón principal de su explotación se relaciona con el potencial efecto benéfico sobre la salud animal (Hoste *et al.*, 2006). Una diferencia clave entre las consecuencias de los fármacos AH comparados con los nutraceuticos se relaciona con el hecho de que la administración a corto plazo de un AH sintético tiene como objetivo romper el ciclo de vida de los NGI mediante la eliminación del 100% de la población dentro del hospedero. Por el contrario, para alcanzar niveles significativos en la eficiencia, la administración o distribución de piensos con componentes bioactivos está normalmente previsto o programado para ofrecer a los animales unos pocos días, con el objetivo principal de prevenir infecciones graves. Los efectos esperados de los metabolitos secundarios de las plantas contribuyen más a la desaceleración de la dinámica de la infección y en la reducción de la tasa de infección a niveles que permitan una productividad aceptable y mantener el bienestar de los animales. El mecanismo de acción se basa en alterar varios procesos biológicos clave para la supervivencia del nemátodo (Hoste *et al.*, 2012). El objetivo final de la integración de los nutraceuticos en el sistema de producción es lograr un manejo sostenible de la población de NGI. Como consecuencia de la desaceleración de la dinámica de infección se esperaría una reducción en la frecuencia de desparasitaciones y esto debería ayudar a bajar la presión de selección hacia AH sintéticos que favorece la aparición de resistencia en las poblaciones de parásitos (Hoste *et al.*, 2012).

2.8.5. Plantas nutraceuticas en Yucatán. Los metabolitos secundarios con efectos nutraceuticos más estudiados son los taninos condensados, los cuales además de poseer propiedades AH, se ha demostrado que a bajas concentraciones mejoran el rendimiento de los animales atribuido a: 1) mejora de la eficiencia de la síntesis de proteína microbial y modulación de la fermentación ruminal 2) reducción de la degradación de la proteína en el rumen (al formar uniones tanino-proteínas) lo que lleva a un aumento en el flujo de aminoácidos (esenciales) hacia el intestino delgado y aumento de la absorción de aminoácidos esenciales 3) prevención del meteorismo y reducción en la producción de metano 4) efecto citoprotector contra radicales libres (Makkar, 2003). Por otra parte, el consumo de altas concentraciones de taninos condensados (> 7% de la MS) ha sido asociado con efectos

negativos en rumiantes, incluyendo la reducción del consumo voluntario, inhibición del crecimiento e interferencia con la morfología y actividad proteolítica de la microflora del rumen. La concentración y estructura de los taninos condensados presentes en las diferentes especies de plantas parece ser el mayor factor que modula la eficacia contra los nematodos. En una visión general de los trabajos realizados *in vivo* en borregos y cabras, sugiere que con 30 a 40g de taninos condensado por kg de materia seca (3-4% de MS) es suficiente para observar actividad antiparasitaria (Hoste *et al.*, 2006). En el Cuadro 1 se muestran algunos ejemplos de plantas nutraceuticas en Yucatán.

Cuadro 1. Plantas taniníferas de Yucatán propuestas como nutraceuticas para pequeños rumiantes.

Nombre común	Nombre científico	Efecto AH	Referencias
<i>In vitro</i>			
Jabín	<i>Piscidia piscipula</i>	Inhibición de la motilidad	(Alonso-Díaz <i>et al.</i> , 2008a,b)
Chimay	<i>Acacia pennatula</i>		(Hernández-Orduño <i>et al.</i> , 2008)
		Eclosión de huevos	Vargas-Magaña <i>et al.</i> , 2014
		Eclosión de huevos	Chan-Pérez <i>et al.</i> , 2016
<i>In vivo</i>			
Tsalam	<i>Lysiloma latisiliquum</i>	Reducción de huevos en heces,	(Martínez-Ortiz-de-Montellano., 2010)
Chukum	<i>Havardia albicans</i>	Reducción en tamaño de parásitos	(Méndez-Ortiz <i>et al.</i> , 2012) (Galicia-Aguilar <i>et al.</i> , 2012)

2.9. Plantas de la familia de las Annonaceas

La península de Yucatán es una de las regiones con mayor presencia de huertos familiares en América Latina y el mundo; además de su importancia de brindar seguridad alimentaria y nutrición a lo largo del año y como generador de ingresos también tienen una gran biodiversidad y presencia de plantas medicinales (Mariaca-Méndez, 2012). El huerto constituye un medio por el cual la población de cada región se vale para curar a los animales con los recursos disponibles sin necesidad de acudir a medicamentos de patente. Esta información pasa de generación a generación y se alimenta por experimentación empírica de tal manera que algunas plantas medicinales utilizadas para el ser humano se usan para los animales (Mariaca-Méndez, 2012). En este contexto, se sabe que las anonáceas poseen

propiedades benéficas para la salud humana y animal (Gajalakshimi *et al.*, 2011). Las anonáceas son una familia bien representada en la península y común dentro de los huertos familiares (Flores *et al.*, 2004). Son plantas apreciadas por sus frutos comestibles, así como por las propiedades insecticidas y medicinales de las semillas, hojas, corteza y raíces. Además, su madera sirve para la elaboración de utensilios, artesanías, andamios y como leña. Las especies más representativas de la región son: *Annona squamosa* (Saramuyo), *A. muricata* (Guanábana) y *A. reticulata* (Anona) (Flores *et al.*, 2004).

2.9.1. Contenido nutricional de las hojas de *Annona muricata*

Existen pocos estudios acerca del valor nutricional de las anonáceas, entre ellas *A. muricata* (guanábana). Se ha reportado un contenido elevado de grasa en la semilla y un valor proteico intermedio en la hoja y semilla (Cuadro 2).

Cuadro 2.- Análisis proximal de diferentes partes del árbol *Annona muricata*

	Húmedad	Cenizas	Extracto Etéreo	Proteína Cruda
Hoja seca	9.87	7.17	2.94	13.92
Hoja fresca	62.64	1.85	0.70	5.63
Semilla	13.74	1.44	25.75	14.77
Pulpa	86.32	0.29	0.60	0.32

(Vit *et al.*, 2014)

2.9.2. Usos medicinales. Se calcula que la planta *A. muricata* en Jamaica se encuentra en el quinto lugar de las 50 plantas más comúnmente usadas en la medicina herbal, con una frecuencia del 15% (Picking *et al.*, 2011). Entre los usos medicinales en animales destacan la molienda de la semilla de *A. squamosa* para su empleo como desparasitante en perros y la hoja de *A. reticulata* se emplea como repelentes contra ectoparásitos colocándolas en los sitios donde descansan las gallinas (Flores *et al.*, 2004). En humanos se ha comprobado que los diversos extractos de las anonáceas poseen propiedades tales como: antiviral, antimicrobiana, anti-leishmania, anticancerígena (McLaughlin, 2008), regeneración celular, antidiabética, antioxidante, hepatoprotector, insecticida, pesticida y antihelmíntica (Gajalakshimi *et al.*, 2011; Pandey y Barve, 2011; Kant y Ahmad, 2012; Moghadamtousi *et al.*, 2015). El efecto AH en humanos ha sido reportado por varios investigadores (Cuadro 3).

Cuadro 3. Lugares con reportes del uso de partes de *Annona muricata* como antiparasitario en humanos

Lugar	Parte	Método	Uso	Actúa sobre	Autor
India	Hojas	Polvo	Parásitos	Vermes	Badrie y Schaus, (2010).
	Semillas	Aceite	Insecticida	Piojos, chinches, sarna	Badrie y Schaus, (2010).
Jamaica Haití	Fruto	Jugo	Parásitos		Badrie y Schaus, (2010).
Brasil	Fruta	Pulpa o jugo	Vermífugo antihelmíntico		Badrie y Schaus, (2010).
Panamá	Semilla	Triturada	Vermífugo		Ross (2005)
	Planta	Cocción	Antihelmíntico		

2.9.3. Estudios *in vitro* del efecto antihelmíntico de las Anonáceas. En lo que respecta al uso de las anonáceas como AH en rumiantes, se han evaluado diversas partes de estas plantas y sus extractos, basando los estudios principalmente en información etnoveterinaria:

1) En Brasil se han utilizado las semillas de *A. squamosa* de las cuales se obtuvo extractos etíl-acetato, y un compuesto que se aisló de las semillas llamado acetogenina1 que fueron aplicados *in vitro* para la evaluación de su efecto en la eclosión de huevos de *H. contortus*, encontrando para el extracto etíl-acetato y el compuesto acetogenina1 una inhibición de más del 99% a concentraciones de 5 a 25 mg/mL (Souza *et al.*, 2008).

2) En Pakistán se evaluó los extractos etíl-acetato, acetónico y metanólico, de la corteza de *A. squamosa* sobre la eclosión de huevos de *H. contortus* y se obtuvo una inhibición de 94 ± 1.97 , 91 ± 1.58 y $100 \pm 0\%$ respectivamente a 25 mg/ml demostrando la actividad ovicida y larvicida de esta planta (Kamaraj *et al.*, 2011).

3) Ferreira *et al.*, (2013) demostraron que el extracto acuoso de las hojas de *A. muricata* al 50, 25, 12.5 y 6.25% de concentración inhibían el desenvaine larval de *H. contortus* en 84.9, 79.1, 66.9 y 47.42% respectivamente. Los autores también evaluaron el efecto sobre la motilidad de la larva infectante L₃ a las mismas concentraciones y obtuvo porcentajes en la reducción de la motilidad en 83.29, 89.08, 74.62 y 30.47% indicando una actividad significativa de *A. muricata* sobre la larva infectante de este parásito. El análisis

fitoquímico del extracto acuoso de las hojas de *A. muricata* no reveló ningún tipo de acetogenina o alcaloide, pero sí estuvieron presentes compuestos polifenólicos.

4) En Yucatán, México se probaron *in vitro* los extractos acetona:agua y metanólicos de las hojas de *A. squamosa*, *A. muricata* y *A. reticulata* donde se determinó que a concentraciones muy bajas de estos extractos (150 µg/mL) se lograban efectos AH sobre el desenvaine larval y la eclosión de huevos de *H. contortus*. Sin embargo, no se aisló ninguna clase de acetogenina (Castañeda-Ramírez, 2014).

2.9.4. Estudios *in vivo* del efecto antihelmíntico de las Anonáceas.

1) En Nairobi Kenia se estudió el efecto antihelmíntico del extracto acuoso de *A. squamosa* en borregos, a una dosis de 1000 mg/kg de peso total. Comparado con el grupo control, no se observaron diferencias significativas en el conteo de huevos por gramo de heces, el conteo total de carga parasitaria al sacrificio y tampoco en el aumento de peso (Githiori, 2004).

2) En India se reportó que la utilización, en cabras, de 100 mg/kg de extracto de *A. squamosa* posee efecto AH al reducir la cantidad de huevos por gramo de heces de *H. contortus*, aunado a que no se encontró alteración alguna en las pruebas hematológicas y bioquímicas del animal (Mahour *et al.*, 2007).

3) La región de Myanmar Burma, Dain y Win, (2006) empleando bloques multinutricionales de urea-melaza adicionados con plantas con efecto AH, han evaluado plantas anonáceas de la región para probar su eficacia en la reducción de excreción de huevos en vacas novillas. Entre las plantas evaluadas se encuentran *Momordica charantia*, *A. squamosa* y *A. comosus* obteniendo para *A. squamosa* reducciones del 50 al 87.9%.

4) En Veracruz, México se probó la administración de 10 ml y 15 ml de un extracto acuoso preparado de 93.5 gramos de semilla molida de *A. muricata* disuelta y hervida en 1,875 ml de agua con dosificación cada 19 días en ovinos con infección natural encontrándose una reducción parasitaria a los 19 días (Cabrera *et al.*, 2014).

2.10. Toxicidad de las Annonaceas

2.10.1. Toxicidad aguda, subaguda y crónica en ratones.

Estudios realizados con ratones evaluaron la toxicidad de un extracto acuoso de las hojas de *A. muricata* por vía oral a diferentes concentraciones con el objetivo de investigar su aplicación en humanos. No obstante, estos trabajos pueden servir como referentes para evaluar el efecto potencial en animales domésticos.

- **Toxicidad Aguda.** Para la primera prueba de toxicidad aguda se utilizaron 25 ratones (albino suizo de 20-25g de peso) que recibieron una dosis de 0.3 ml de agua destilada y 100, 1000, 2500, 5000 mg/kg de extracto acuoso. Los resultados reportan que para la prueba aguda con una duración de 7 días no se observaron signos clínicos para ninguno de los tratamientos y tampoco se observó cambios en las heces, orina y ojos. Ningún animal murió durante el experimento, por lo que se estima una dosis letal (LD) mayor de 5000mg/kg por vía oral.

- **Toxicidad subaguda.** En la segunda prueba de toxicidad subcrónica se emplearon 20 ratones que recibieron 0.3 ml agua destilada y 100, 1000 y 2500 mg/kg de extracto acuoso durante 14 días. Nuevamente no se reportó ningún caso de mortalidad para los tratamientos, sin embargo, si se observaron pérdidas de peso en los animales que recibieron 1000mg/kg en los días 12 y 14 y para el grupo que recibió 2500mg/kg a partir del día 10, como resultado de pérdida del apetito, disminución de la conversión alimenticia y por lo tanto disminución de peso. Y por otro lado a dosis de 100 mg/kg produjo ganancias diarias de peso. Al finalizar el estudio se sacrificó a los animales y se encontró un incremento en el tamaño del útero, por lo que se recomendó tener precauciones en el uso de *A. muricata* durante la gestación (Arthur *et al.*, 2011). En los parámetros hematológicos se encontró un incremento en los linfocitos y disminución de la glucosa (a partir de 1000mg/kg), y una disminución del colesterol de baja densidad (colesterol dañino para la salud) a partir de 100 mg/kg, lo que le confiere propiedades a la planta como un estimulante del sistema inmune, antidiabética e hipolipidémica. Por otra parte, un aspecto negativo fue el hallazgo de un incremento de creatinina a partir de 2500mg/kg, este incremento sugiere daño renal a nivel del mecanismo de

filtración. No se afectaron los parámetros relacionados con las enzimas ALT, AST, ALP, urea. Debido a las reducciones en los niveles de colesterol y triglicéridos se consideró un agente hipolipidémico (Arthur *et al.*, 2011).

- **Toxicidad crónica.** El extracto etanólico de las hojas de *A. muricata* tiene el potencial de causar daño renal cuando se dosifica por tiempo prolongado. El extracto etanólico en suero salino genera daño renal si se administra por 40 días (dosis de 10, 20 y 40mg/kg). Los efectos incluyen incremento de creatinina en suero y daño en la estructura tubular, que conduciría a una falla renal (Dayeef *et al.*, 2013).

2.11. Compuestos secundarios en las hojas de *A. muricata*

2.11.1 Análisis fitoquímico de las hojas de *A. muricata*

Se ha determinado compuestos secundarios en las diversas fracciones de *A. muricata* (hoja, semilla, pulpa) empleando diversas metodologías, encontrando la presencia de diversos compuestos en función de la metodología (técnica analítica), fracción de la planta o método de extracción empleado (Cuadros 4, 5).

Cuadro 4. Contenido de polifenoles y flavonoides en extractos etanólicos y metanólicos de la hoja, semilla y pulpa de *A. muricata*.

	Extracto	Flavonoides mg EQ/100g	Polifenoles Mg EGA/100g
Hoja fresca	Etanólico	337.4	629
Hoja fresca	Metanólico	250	549
Hoja seca	Etanólico	245	766
Hoja seca	Metanólico	97.3	375
Pulpa	Etanólico	574	941
Pulpa	Metanólico	480	624
Semilla	Etanólico	309	451
Semilla	Metanólico	159.8	280

EQ= Equivalente de Quercetina EGA= Equivalente de ácido gálico (Vit *et al.*, 2014).

Cuadro 5. Análisis fitoquímico de hojas de *A. muricata*.

Metabolitos	Extracto etanólico (Vimala <i>et al</i> , 2012)	Extracto acuoso (Arthur <i>et al</i> , 2011).
Reductores de azúcar	+	n.d.
Antraquinonas	+	n.d.
Flavonoides	+	+
Terpenoides	+	n.d.
Saponinas	-	+++
Taninos	+	+++
Alcaloides	+++	-
Glicosidos	+	+++
n.d., No determinado		

2.11.2. Flavonoides. Entre los metabolitos secundarios los flavonoides han despertado un importante interés en su estudio debido a su amplio rango de actividad biológica, en particular a sus propiedades antimicrobianas. Estos son clasificados como compuestos polifenólicos y se cree que tienen efectos directos sobre los metanógenos y que son una alternativa para suprimir la producción de gas metano. Los flavonoides están presentes generalmente en forma de glicósidos con la aglicona ligado a una mitad de una azúcar variable por un enlace β -glucosídico. La presencia de este resto de azúcar reduce la bioactividad del flavonoide. Por lo tanto, la eliminación de resto de azúcar no sólo mejora las propiedades funcionales de flavonoide sino que también mejora la biodisponibilidad en el tracto gastrointestinal. Un estudio reciente mostró que los microbios del rumen mejoran la biodisponibilidad de flavonoide rutina (quercetina - 3 -O - rutinósido) por la degradación del enlace glicosídico. Esta degradación resultó en liberación de quercetina. A continuación, se menciona algunas de las conclusiones de los efectos de los flavonoides (myricetina, kaempferol, flavona > quercetina, naringina, rutina y catequina) en la fermentación ruminal: La digestibilidad *in vitro* puede ser reducida entre un 7.6-5.4% en presencia de todos los flavonoides excepto, quercetina y naringina. La producción de gas puede ser reducido en un 23 y 16% para flavona y myricetina respectivamente mientras que los otros mejoran la producción de gas. La actividad inhibitoria sobre la metanogenesis puede ser categorizada en orden descendiente de esta manera myricetina \geq kaempferol \geq flavona > quercetina \geq naringina \geq rutina \geq catequina. En general la disminución de la digestibilidad de la materia seca, producción de gas y metano debido a la adición de flavonoides podría ser atribuido a la

acción antimicrobiana que poseen. Sin embargo, se diferencian en su acción sobre la población de microorganismo del rumen por ejemplo: la adición de flavona, myrecitina, catequina, rutina y kaempferol significativamente reducen la población de todos los microorganismos del rumen, reducen las actividades de las enzimas carboximetil celulasa, fibra paperasa, xilanasas y β -glucosidasa, contenido de purinas y la eficiencia de síntesis de proteína microbiana. Por otra parte la naringina y la quercetina poseen efectos deseables ya que afectan únicamente a los protozoarios del rumen y a la población metanogénica sin afectar a las bacterias celulolíticas. Estos efectos se logran cuando se usan a una concentración del 4.5% (w/w) del sustrato en base seca. Además de no afectar la digestibilidad de la materia seca (Oskoueian *et al.*, 2013).

2.11.3. Glucósidos. Son la unión éster entre un compuesto orgánico o toxina (la aglucona) y un azúcar. Los glucósidos son amargos, sin color y no cristalinos. Están muy difundidos; muchos no son tóxicos. El glucósido ranunculina al hidrolizarse da lugar a una lactona conocida con el nombre de protoanemonina: un aceite amarillo volátil considerado un potente agente vesicante (que produce ampollas) y que, por lo tanto, tiene un efecto irritante sobre la piel y las mucosas. Los glucósidos cianogénicos al hidrolizarse liberan un azúcar y ácido cianhídrico. La acción tóxica del ácido cianhídrico se produce al reaccionar con el hierro trivalente de la citocromooxidasa en las mitocondrias, impidiendo la fijación de oxígeno en las células del torrente sanguíneo, inhibiendo la respiración celular en los tejidos (sobre todo en los tejidos con alta oxidación metabólica como el SNC y el músculo cardíaco). Entre los síntomas más característicos en las personas y animales intoxicados están la salivación, los vómitos, dolores abdominales, diarreas, respiración acelerada que cambia a disnea, taquicardia, excitación y posterior postración, parálisis de los miembros, temblor, convulsiones, coma y muerte. Otro tipo los glucósidos cardíacos. - poseen actividad cardiotónica (indicados en insuficiencia cardíaca congestiva, taquicardias supraventriculares y fibrilación auricular). La geninaesteroídica tiene un anillo lactónico no saturado pentacíclico (cardenólidos) o hexacíclico (bufadienólidos). Los signos de intoxicación (cardíacos y gástricos, con diarrea y gastroenteritis) aparecen a las 4-12 horas de la ingestión de la planta y la muerte puede presentarse entre las 12-24 horas (Villar y Ortiz, 2006).

2.11.4. Saponinas. Son heterósidos de esteroides (saponósidos esteroídicos) o de triterpenos (saponósidos triterpénicos). Tienen acción hemolítica, al interactuar con el colesterol de la membrana de los eritrocitos. En dosis altas causan irritación de la mucosa bucofaríngea y digestiva, dolor abdominal, vómitos, diarrea, gastroenteritis, disminución en el consumo de alimento debido al sabor amargo y la irritación de la mucosa oral, incremento de temperatura, incoordinación de movimientos y pérdida de sensibilidad; por su acción de estupefaciente, ocasiona decaimiento, somnolencia, parálisis con disnea y taquicardia (Villar y Ortiz, 2006; Díaz Gonzalo, 2010;).

El mecanismo de acción de las saponinas consiste en su poder anti - ATPasa merced perturbando el transporte de sodio a través de ella (descompensación iónica); el estímulo nervioso queda paralizado manifestándose una parálisis de las células musculares y causando la muerte del animal por asfixia. Otro efecto de las saponinas es que irritan el tracto gastrointestinal, incrementando la permeabilidad de las células del epitelio permitiendo su entrada en el torrente circulatorio lo que permite actuar su acción hemolítica. Reducen la absorción del colesterol (al interactuar con los ácidos biliares), disminuyen la funcionalidad intestinal e influyen en la digestión y absorción de distintos componentes de la dieta (Villar y Ortiz, 2006).

En un experimento se evaluaron tres niveles de saponinas (0, 0.2, 0.4 mg/ml) sobre la producción de gas *in vitro*, fermentación ruminal y emisiones de gas metano en líquido ruminal faunado y defaunado. Comparado con el control la adición de saponinas redujo la producción de gas en 24 horas en el rumen faunado y no tuvo ningún efecto sobre el líquido ruminal defaunado. En el líquido ruminal faunado la adición de 0.2 y 0.4 mg/ml redujeron las emisiones de gas metano en un 12.7% y 14.0% respectivamente, al mismo tiempo que se redujeron los conteos de protozoarios demostrando la asociación de este efecto con el descenso de la producción de gas. Un posible mecanismo por el cual ejercen su efecto sobre los protozoarios es porque producen cambios en la permeabilidad de la membrana celular (Hu *et al.*, 2005).

2.11.5. Alcaloides. Los alcaloides son compuestos orgánicos básicos que forman sales con los ácidos. Son insolubles o poco solubles en agua. Contienen nitrógeno, normalmente en una estructura heterocíclica o aromática y se clasifican basándose en ese tipo de anillo. Se conocen miles de alcaloides, aunque muchos no son tóxicos. Los más tóxicos se caracterizan por tener sabor amargo, un factor importante para prevenir la ingestión de la planta. Alcaloides de la piridina. De unos 20 alcaloides estudiados, la nicotina y lobelina son los más conocidos, y la estimulación gangliónica inicial que provocan suele ir seguida por una desensibilización continuada de los receptores y falta de transmisión nerviosa. Alcaloides de la quinolizidina. Se han identificado más de 150 alcaloides quinolizidínicos en la familia de las leguminosas. Tres síndromes distintos que se atribuyen a estos alcaloides son: teratogénesis, miopatías y encefalopatías agudas. Alcaloides de la indolizidina. Desde el punto de vista tóxico, el principal alcaloide indolizidínico es la swainsonina (Villar y Ortiz, 2006).

Se ha demostrado que el extracto clorofórmico rico en alcaloides de la planta *Prosopis juliflora* posee efectos antibacterianos contra bacterias Gram-positivas como *Micrococcus luteus* (concentración mínima inhibitoria “CMI” = 25 µg/ml), *Staphylococcus aureus* (CMI = 50 µg/ml) y *Streptococcus mutans* (CMI = 50 µg/ml). Este efecto se evaluó mediante la técnica de producción de gas *in vitro*, para conocer su influencia sobre la digestión ruminal, utilizando la monensina como control positivo. Los resultados mostraron que el extracto disminuía la producción de gas de manera tan eficiente como la monensina después de 36 horas de fermentación, revelando la influencia que podría tener el extracto rico en alcaloides como un aditivo del alimento para disminuir la producción de gas durante la digestión ruminal (Dos Santos *et al.*, 2013).

2.11.6. Acetogeninas. Se ha reportado el aislamiento de una cantidad diversa de acetogeninas, contenidas en las hojas de las anonáceas a los que se les atribuye efecto anticancerígeno (en humanos), y también como pesticidas naturales y antihelmínticos. El mecanismo de acción de estas moléculas se basa en que son potentes inhibidores del complejo I mitocondrial y de la producción de ATP. La inhibición de la producción de ATP a nivel

aeróbico (oxidativo) y a nivel de fosforilación anaeróbica, produce la muerte celular, apoptosis (McLaughlin, 2008; Moghadamtousi *et al.*, 2015).

Los primeros estudios relacionados con el mecanismo de acción de las acetogeninas, surgieron de estudios con insectos que presentaban letargia e inmovilidad previa a la muerte. Los insectos presentaban niveles bajos de ATP, efectos similares causados a la antimicina A, un conocido inhibidor del sistema de transporte de electrones a nivel mitocondrial. Se probaron enzimas mitocondriales y se encontró que las acetogeninas son 2.5 a 5 veces más potentes que la rotenona en inhibir el complejo I (NADH: ubiquinona-oxidoreductasa) mitocondrial (McLaughlin, 2008).

En experimentos de consumo utilizando ratones, estos toleraron el extracto de *Asimina triloba* (Annonacea Papaya mezclado en su dieta al 1%, esta dieta fue consumida durante 4 días sin presentación de ningún efecto letal. Sin embargo, a nivel de 5% o mayores, sucumbían después 3 días, mostrando como único signo letargia. La inyección de 185 µg/Kg de PV a cerdos tiene un efecto emético, siendo la primera prueba de que las acetogeninas son el principio emético de la fruta *A. triloba*, prueba de que el consumo excesivo de esta fruta causa náusea y vómito (McLaughlin, 2008). En 1999 en un estudio se discutió la posible relación entre el consumo de estas frutas tropicales con la incidencia del Parkinson atípico en las Islas Francesas del Oeste. Además, la etiología de la enfermedad neurodegenerativa en las Islas de Guadalupe reveló una correlación cercana entre el consumo de acetogeninas y la enfermedad endémica. Por lo tanto, se sugiere que algunas acetogeninas son neurotoxinas responsables del trastorno neurodegenerativo. Un reciente estudio mostró que la fruta de *A. muricata* contiene una acetogenina llamada annonacina a la cual se le atribuye el mayor riesgo como potencial factor neurodegenerativo demostrado en pruebas con transfusiones intravenosas en ratones (Moghadamtousi *et al.*, 2015). Extractos de annonaceas (*A. triloba*) fueron evaluados en un test de mutagenicidad (test Ames) y los resultados fueron negativos en 9 de 10, resultando ligeramente positivo en un 2.5% (en una histidina mutante de *Salmonella typhimurium* posterior a la activación de la enzima del extracto). Estos resultados se confirmaron usando las acetogeninas puras: squamocina (contenida en *A. squamosa*) y annonacina (contenida en *A. muricata*), ninguna resultó mutagénica en 3 cepas de *S. typhimurium*, sin embargo, ambas fueron tóxicas a la bacteria (McLaughlin, 2008).

2.11.7. Swainsonina. La *A. muricata* también produce imino azúcares que incluyen al alcaloide neurotóxico Swainsonina, el cual es una potente manosidasa que causa neurotoxicidad ya que actúa como inhibidor de la alfa-manosidasa lisosomal. En el pasado esta sustancia se aisló de un producto medicinal comercial a base de *A. muricata* a una concentración muy baja (0.0004% base seca), pero se estima que concentraciones de 0.001% en la dieta puede causar desórdenes neurológicos en los animales de producción. Su mayor concentración se encuentra en la fruta y en las semillas. Su concentración y presencia dependerá de diversos factores como la variedad de la planta, condiciones de crecimiento, tiempo de cosecha, métodos de obtención, entre otros (Mohanty *et al.*, 2008).

El alcaloide quinolizidina swainsonina fue descubierto por primera vez en la planta *Swainsona canescens* en Australia, y posteriormente fue hallado en las hierbas locas (locoweed) en el oeste de Estados Unidos, que son causantes del síndrome de envenenamiento llamado locoísmo. Algunas especies como *Astragalus* y *Oxytropis* contienen esta sustancia, producida por un endófito *Undifilum oxytropis*. La swainsonina inhibe enzimas esenciales como α -manosidasa y manosidasa II, que se encuentran en los lisosomas y participan en el metabolismo de las glicoproteínas, por lo tanto, se interrumpe el proceso de formación de estas moléculas, alterando la síntesis y función de hormonas, enzimas, y receptores, en general todos los sistemas del cuerpo se ven adversamente afectados. Los signos clínicos solo se desarrollan después de varias semanas de ser ingeridas estas plantas. Cuando el ganado inicia su consumo, no se observa ningún signo hasta los 14 días que comienzan a evitar moverse, pierden el apetito, y presentan temores visibles cuando se mueven. Si continúa el envenenamiento los animales se deterioran, pierden mucho peso, tienen déficits propioceptivos, se ponen nerviosos, desarrollan problemas cardiovasculares, ascitis y mueren. Otros signos que se han descrito son: baja conversión alimenticia, abortos, reducción de la fertilidad en ambos sexos, perturbaciones neurológicas que van desde la extrema depresión hasta la agresión, se compromete el sistema inmune aumentando la probabilidad de enfermar, se presenta la pérdida de la habilidad para comer o beber agua y eventual inanición, la madre puede transmitir la sustancia a través de la leche afectando a los neonatos. Se ha realizado estudios alimentando a ovejas con 0.2 mg/Kg de swainsonina durante 30 días, desarrollando los signos de envenenamiento. A dosis más altas (8 mg /kg /día swainsonina), cabras gestantes

mostraron signos de intoxicación en 9 días, incluyendo parálisis del tren posterior y déficit de propiocepción, indicando que las cabras podrían ser altamente sensibles a la toxicidad por swainsonina. Además de que la mayoría de los animales abortaron o murieron antes de concluir el estudio (Ralphs y Stegelmeier, 2011).

La swainsonina se ha encontrado también en plantas como *Ipomea* perteneciente a las convolvuláceas conocidas como campanitas (África y América Tropical) las cuales son enredaderas herbáceas. Algunos mencionan que la planta es tóxica para los animales herbívoros siendo más susceptible la especie caprina, ovina y bovina; principalmente los animales más jóvenes. En caprinos se presenta necrosis de neuronas, desaparición del contorno celular, modificaciones tumefactantes del núcleo u nucléolo y satelitismo patológico. Todo el cuadro se comprobó histológicamente en células de la sustancia gris del cerebro, médula y células de Purkinje del cerebelo. Los signos clínicos observados a 30 días fueron Ataxia, incoordinación, temblores musculares, movimientos laterales de cabeza (Rodríguez *et al* 2005).

Al consumir *Ipomea fistulosa* durante 4 semanas también se observó un incremento de AST y ALP y en los estudios de histopatología se observó congestión hepática, acúmulo de glóbulos rojos en vasos sanguíneos, colestasis en el 50% de los animales, ensanchamiento de los conductos biliares en la región periportal, hiperplasia de conductos biliares, tumefacción de hepatocitos, necrosis centrolubillar de hepatocitos, necrosis grasa periportal. Entre los signos clínicos observados se pudieron hallar pérdida del apetito, reducción de la motilidad ruminal e intestinal (Ríos *et al.*, 2007).

2.12. Toxicidad

La toxicidad es el grado o nivel en el que una sustancia, toxina o veneno puede herir a los animales. La toxicidad se puede referir al efecto causado a nivel celular (citotoxicidad), en un órgano (renal o hepático) o en todo el organismo, esto explica porque muchos científicos usan diferentes procedimientos para medir la toxicidad y proveer un estimado de cuanto de una sustancia puede causar un tipo de daño. Todas las sustancias son potencialmente tóxicas dependiendo de su cantidad. Incluso muchas sustancias terapéuticas pueden ser tóxicamente agudas, pero que son beneficiosas cuando se usan a un nivel apropiado, por ejemplo, como la vitamina C. Es por esto que la determinación de la toxicidad se enfoca principalmente en descubrir el tipo y el grado de daño que se ocasiona al organismo en diferentes cantidades (Bhardwaj, 2012).

Muchas de las reacciones tóxicas que son causadas por nuevos químicos se pueden detectar mediante test toxicológicos de rutina. La experiencia ha demostrado que la predictibilidad de reacciones tóxicas es mejor en experimentos de dosis dependientes. Este tipo de test se aplica de manera rutinaria en experimentos de toxicología que se aplican sobre todo para cada nueva droga desarrollada, descubierta y/o desconocida. Los efectos de una toxicidad pueden ocurrir a corto plazo (efecto agudo – dosis única – 24 horas) o posterior a repetidas exposiciones por un periodo largo como el subagudo (dosis diaria - de 14 a 28 días), subcrónico (dosis diaria – más de 90 días), crónico (dosis diaria- más de 1 año). Previo a un test de toxicidad se recomienda considerar lo siguiente: identificar la estructura química de la sustancia, sus propiedades físico-químicas, resultados de otros estudios *in vitro* o *in vivo*, datos toxicológicos de estructuras relacionadas o similares a esta sustancia, conocer si hubo un uso anticipado de la sustancia (Bhardwaj, 2012).

2.12.1. El método de dosis fija. Un grupo de animales recibe dosis crecientes fijas de una sustancia. La dosis inicial se selecciona en base a un estudio de observación, donde se espera que cause signos de toxicidad, sin causar severos efectos tóxicos o mortalidad. Los grupos de animales reciben las diferentes dosis y de manera repetida en el tiempo, este proceso

se detiene cuando: 1) se logra ocasionar una evidente toxicidad 2) un animal muere 3) los efectos no son vistos a las dosis más altas o 4) las muertes ocurren a las dosis más bajas (Bhardwaj, 2012).

Tras la administración de la dosis, el animal es observado por lo menos los primeros 30 minutos, y periódicamente las primeras 24 horas (con especial atención las primeras 4 horas posterior a su consumo) y después, diariamente por un total de 14 días, excepto cuando se necesite retirar del estudio o se requiera su sacrificio por razones de bienestar animal. Los signos clínicos deben ser registrados individualmente, por ejemplo: salivación, convulsiones, espasmos musculares, letargia, etc. Así como el tiempo de su aparición y desaparición. Los animales que llegarán a presentar condiciones de dolor severo, moribundos o signos que causan un estrés severo estos deben ser sacrificados siguiendo los lineamientos para una eutanasia correcta. También deben registrarse los pesos y su ganancia o pérdida durante la prueba. El consumo de los animales (comida y en ocasiones hasta el agua), valores de hematología, clínica bioquímica y patología incluyendo histopatología. El estudio ayuda a obtener información sobre los mayores efectos tóxicos, sobre que órganos podría actuar y la posibilidad de detectar un efecto toxico acumulativo (Bhardwaj, 2012). En los estudios toxicológicos se puede hacer uso de una gran variedad de estudios bioquímicos para evaluar un amplio rango de funciones fisiológicas y metabólicas, la identificación de órganos blanco, evaluación de la persistencia y severidad del tejido dañado (Evans, 2005)

2.12.2. Biometría Hemática. Es una evaluación básica de la sangre que incluye los estudios recuento de eritrocitos, de hemoglobina (Hb), hematocrito (Ht), recuento y fórmulas leucocitarias, y de plaquetas, así como forma y estructura plaquetarias. Las indicaciones de un hemograma completo comprenden la detección de anemias, leucemias, infección, inflamación y reacciones adversas a fármacos La biometría hemática completa (BHC) es una prueba de detección básica y constituye la técnica del laboratorio que se pide con más frecuencia. Los datos que se proporcionan constituyen información diagnóstica muy valiosa sobre el sistema hematológico y otras partes del cuerpo, ayudan en el pronóstico, sirve para monitorear la respuesta al tratamiento y la recuperación del paciente (Mendoza-González *et al.*, 2010).

2.12.3. Alanina aminotransferasa (ALT). La mayoría de las drogas que se toman por vía oral son absorbidas y transportadas rápidamente hacia el hígado. Esto enfatiza la importancia de la función del hígado en el metabolismo y detoxificación, y al mismo tiempo es vulnerable a los químicos o sustancias que se ingieran. La mayoría de los test que se utilizan para investigar el daño hepático en animales se derivan de la medicina clínica en humanos. La ALT es una enzima que se encuentra en mayor proporción en el hígado, dentro del citoplasma de las células hepáticas, pero también se halla en los glóbulos rojos, miocardio, masa muscular, páncreas y riñón. También es llamada transaminasa glutámico pirúvica (T.G.P), esta cataliza la transferencia reversible de un grupo amino (alanina) hacia el alfa-cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. La ALT está involucrada en el metabolismo del nitrógeno, aminoácidos y gluconeogénesis. Su mayor rol en el hígado es el de transformar alanina en glucosa para luego ser transportada y utilizada en múltiples procesos. Esta enzima es de suma importancia en el diagnóstico de enfermedades hepáticas, cuando algún órgano sufre algún daño como el hígado o corazón, se incrementan los niveles de ALT en el torrente sanguíneo, y este incremento es proporcional a la lesión. Uno de los métodos más utilizados es el análisis colorimétrico (Xing-Jiu *et al.*, 2006).

2.12.4. Creatinina. La creatinina es un producto final del metabolismo muscular. Se origina a partir de la creatina por pérdida de una molécula de agua. A su vez, la creatina es un ácido orgánico nitrogenado que ayuda a suplir energía al músculo. Se produce por hidrólisis del fosfato de creatina, por acción de la creatin-fosfo-kinasa (CPK), apareciendo como metabolitos de dicha reacción el fosfato energético y la creatina. El radical fosfato puede aportar energía directamente por dicha reacción o a través de su acoplamiento a una molécula de ADP para formar ATP y posterior hidrólisis por acción de ATPasa. La eliminación de creatinina en el cuerpo tiene lugar casi exclusivamente a través de la filtración glomerular, siendo un importante índice del funcionalismo renal. A diferencia de la urea, la eliminación de creatinina por la orina no viene afectada por la diuresis, es muy constante su eliminación diaria con casi independencia de la dieta alimenticia, siendo la masa muscular el factor condicionante más directo de su excreción total por día. En resumen, podemos decir que la eliminación de creatinina en un intervalo de 24 horas es un valor constante, dependiente

principalmente de la masa muscular del individuo, y que por otro lado el cálculo del aclaramiento de la creatinina será un parámetro directo del funcionalismo renal. La creatinina es eliminada por filtración glomerular a través del riñón y excretada en la orina sin reabsorción tubular. En una falla renal la habilidad del riñón para filtrar la creatinina se ve disminuida provocando un incremento en el suero sanguíneo. Es por esta razón que la creatinina en suero se usa como un indicador de la función renal. Uno de los métodos más utilizados es el análisis colorimétrico (Evans, 2005).

De la revisión de literatura se puede concluir de manera general que existe evidencia de un potencial valor nutracéutico de las anonáceas, ya que presentan una composición químico-nutricional aceptable y existe evidencia de efectos farmacológicos positivos. Sin embargo, también se ha reportado que estas plantas contienen compuestos secundarios que podrían causar toxicidad (efectos farmacológicos negativos). Por lo tanto, es necesario evaluar de manera integral (*in vivo* e *in vitro*) cualquier anonácea que se desee proponer como nutracéutico.

3. OBJETIVOS GENERAL

Evaluar la calidad nutricional de las hojas secas de *A. muricata* en condiciones *in vitro* y en condiciones *in vivo* utilizando caprinos en crecimiento.

3.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Describir el contenido bromatológico de las hojas secas de *Annona muricata* y el efecto de diferentes niveles de inclusión sobre la digestibilidad *in vitro* de la materia seca y la cinética de la fermentación utilizando la prueba de producción de gas *in vitro*

Determinar el efecto de adicionar PEG a diferentes niveles de inclusión de hojas secas de *Annona muricata* para confirmar el efecto de los taninos sobre la digestibilidad *in vitro*.

Describir el consumo voluntario, la digestibilidad aparente de la materia seca y el balance de nitrógeno en caprinos alimentados con diferentes niveles de inclusión de hojas secas de *A. muricata*.

Identificar la existencia de algún efecto tóxico agudo y subagudo ocasionado por el consumo de *A. muricata* incluyendo signos clínicos e indicadores clínicos como biometría hemática e indicadores hepáticos (alanina aminotransferasa) y renales (creatinina).

4. HIPOTESIS:

La inclusión de hojas secas de *Annona muricata* al 30%, 20% y 10% de inclusión no afectan la cinética de la fermentación y la digestibilidad de la materia seca *in vitro* y la adición de un 10% de PEG no mejora la digestibilidad *in vitro* en los diferentes tratamientos con *A. muricata*.

La inclusión de hojas secas de *A. muricata* al 10, 5 y 2.5% en una dieta a base de alimento balanceado puede ser consumida por los caprinos sin afectar la digestibilidad aparente de la dieta ofrecida y sin afectar el balance nitrógeno. Además, no genera signos compatibles con toxicidad incluyendo signos clínicos nerviosos, digestivos o manifestaciones clínicas en la biometría hemática, la alanina aminotransferasa o la creatinina.

5.REFERENCIAS

- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Capetillo-Leal, C., Brunet, S., Hoste, H. 2008a Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Veterinary Parasitology*, 153: 187-192.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres Acosta, J.F.J., Sandoval Castro, C.A., Aguilar Caballero, A.J., Hoste, H. 2008b. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contorts* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology*, 153: 313-319.
- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H. 2010. Tannins in tanniniferous tree fodders fed to small ruminants: a friendly foe? *Small Ruminant Research* 89: 164–173.
- Aparecida-Nogueira, F., Nunes-Oliveira, L., Brito da Silva R., Silva-Nery, P., Ferreira-Virgínio G., Castro-Geraseev, L., Robson-Duarte, E. 2012. Anthelmintic efficacy of banana crop residues on gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* tests. *Parasitology Research*, 111:317–323.
- Arthur, F.K.N., Woode, E.T., Larbie, C. 2011. Evaluation of acute and subchronic toxicity of *Annona Muricata* (Linn.) aqueous extract in animals. *European Journal of Experimental Biology*, 4: 115-124.
- Badrie, N., Schauss, A.G. 2010. Soursop (*Annona muricata* L.): Composition, nutritional value, medicinal uses, and toxicology. In: Ronald Ross Watson and Victor R. Preedy, ed., *Bioactive foods in promoting health*. Oxford: Academic Press Elsevier Inc., pp. 621-643.

- Ball, D.M., Collins, M., Lacefield, G.D., Martin, N.P., Mertens, D.A., Olson, K.E., Putnam, D.H., Undersander, D.J., y Wolf, M.W. 2001. Understanding forage quality. American Farm Bureau Federation Publication 1-01, Park Ridge, IL. <https://www.uky.edu/Ag/Forage/ForageQuality.pdf> - Revisado 16/03/2016
- Bhardwaj S.D.G. 2012. Study of acute, subacute and chronic toxicity test. International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical and Biosciences.2:103-129
- Brunet, S., Fourquaux, I., Hoste, H. 2011. Ultrastructural changes in the third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. Parasitology International. 60: 419– 424
- Cabrera, A.N., Lammoglia, M.A.V., Rentería, I., Del., C.D., Ronquillo, R.R. 2014. An ecological alternative for the control of gastrointestinal nematodes in sheep in Northern Veracruz (Mexico) Journal of Environmental Science and Engineering B3: 14-17.
- Castañeda-Ramírez, 2014. Evaluación *in vitro* de los extractos metanólicos y acetónicos de *Annonas quamosa*, *A. muricata* y *A. reticulata* con uso potencial en contra de *Haemonchus contortus* Tesis maestría, Posgrado Institucional en Ciencias Agropecuarias y Manejo de Recursos Naturales Tropicales. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.
- Chan-Pérez J.I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste H., Castaneda-Ramírez G.S., Vilarem, G., Mathieu C. 2016. In vitro susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone:water extracts of two tannin rich plants Veterinary Parasitology 217:53–60.
- Chartier, C. y Hoste, H. 1997. Response to challenge infection with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in dairy goats. Differences between high and lowproducers. Veterinary Parasitology 73, 267-276

- Dain, T., y Win, T. 2006. Evaluation of urea-molasses multi-nutrient blocks as a feed supplement for cattle production and as a carrier for anthelmintic medication in Myanmar. FAO-IAEA TEC-DOC-1495(International Atomic Energy Agency). Viena, Austria. pp. 219-230.
- Dayeef, A.Y.M., Karyono, S., Sujuti H. 2013. The influence of *Annona muricata* leaves extract in damaging kidney cell. Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 8(5): 48-52.
- Diaz-Gonzalo (2010) Plantas tóxicas de importancia en salud y producción animal en Colombia. Editorial Vicerrectoría Académica- Universidad Nacional de Colombia.
- Dos Santos, E.T., Pereira, M.L., da Silva, C.F., Souza-Neta, L.C., Geris, R., Martins, D., Santana, A.E., Barbosa, L.C., Silva, H.G., Freitas, G.C.,Figueiredo, M.P., de Oliveira, F.F., Batista, R. 2013. Antibacterial activity of the alkaloid-enriched extract from *Prosopis juliflora* pods and its influence on in vitro ruminal digestion. International Journal of Molecules Science.14(4):8496-516.
- Evans G.O. 2005. Animal Clinical Chemistry A primer for toxicologists. Edited by Editorial Taylor & Francis e-Library pp 63-99.
- Ferreira, L., Castro, P., Chagas, A., Franca, S., Belebani, R. 2013. *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. Experimental Parasitology, 134:327-332.
- Flores, J.S., Cabrera-Cano, E.F., Hernández-Martínez, E.H., Salazar-Gómez, C. 2004. Etnoflora Yucatenense, Fascículo 21. Annonaceae de la península de Yucatán. Taxonomía, Florística y Etnobotánica. Ed. UADY, Mérida, Yucatán, México.

- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F.J. y Mantecón, A.R. 2004. Review. Tannins and ruminant nutrition. Spanish Journal of Agricultural Research 2: 191-202
- Gajalakshmi, S., Vijayalakshmi, S., Devi-Rajeswari, V. 2011. Phytochemical and pharmacological properties of *A. muricata*: A Review, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 4(2):3-6.
- Galicia-Aguilar, H.H., Rodríguez-González, L.A., Capetillo-Leal, C.M., Cámara-Sarmiento, R., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Torres-Acosta, J.F.J. 2012. Effects of *Havardia albicans* supplementation on feed consumption and dry matter digestibility of sheep and the biology of *Haemonchus contortus* Animal Feed Science and Technology Volume 176(1-4):178-184.
- Githiori, J.B. 2004. Evaluation of anthelmintic properties of ethnoveterinary plants preparations used as livestock dewormers by pastoralists and small holder farmers in Kenya. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Upsala. Suecia.
- Groot, J.C.J., Cone, J.W., Williams, B.A., Debersaques, F.M.A. y Lantinga, E.A. 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. Animal Feed Science Technology 64: 77-89
- Hernández-Orduño, Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Reyes-Ramírez, R.R., Hoste, H., Calderón-Quintal, J.A. 2008. Efecto antihelmíntico *in vitro* de los extractos de *Acacia gaureri*, *Havardia albicans* y quebracho sobre larvas L3 de una cepa mexicana de *Haemonchus contortus*. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 8: 191- 197.

- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S., Hoskin S. 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*, 22(6): 253-261.
- Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, Manolarakia, F., Brunet, N. Ojeda-Roberto, J.F.J. Torres-Acosta, Sandoval-Castro, C.A. 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections *Veterinary Parasitology*, 186:18– 27.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J, Sandoval-Castro, C.A., Mueller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvandini, H., Thamsborgg, S.M., Terrill T.H. 2015. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology*, 212: 5–17.
- Hu, W.L., Wu, Y.M., Liu, J.X., Guo, Y.Q. y Ye, J.A. 2005. Tea saponins affect in vitro fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Journal of Zhejiang University Science Biomedicine and Biotechnology*.6(8): 787–792.
- Kamaraj, C., Rahuman, A.A., Elango, G., Bagavan A., Zahir, A.A. 2011. Anthelmintic activity of botanical extracts against sheep gastrointestinal nematodes, *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research*, 109:37–45.
- Kalra, E.K. 2003. Nutraceutical- definition and introduction. *American Association of Pharmaceutical Science* 5: 1-28
- Kant, R.U., Ahmad, S. 2012. Ethno-medicinal plants and their pharmaceutical potential. *Journal of Pharmacy Research* 5(4):2162-2173.
- Krishnamoorthy, U., Rymer, C., y Robinson,P.H. 2005. The in vitro gas production technique: Limitations and opportunities. *Animal Feed Science and Technology* 123-124:1-7

- Mahour, K., Kumar, A., Rana, R., Dwivedi, D., Vihan, V.S. 2007. Efficacy of *Annona Squamosa* plant leaves extract against *Haemonchus contortus* infection in goats. *Journal Veterinary Practitioner* 8(1):52-54.
- Makkar, H.P.S. 2005. In vitro gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. *Animal Feed Science and Technology* 123:291-302
- Makkar, H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research* 49: 241-256
- Mariaca-Méndez, R. 2012. El huerto familiar del sureste de México. Secretaria de Recursos Naturales y Protección Ambiental del Estado de Tabasco. ECOSUR, México.
- Martínez Ortiz de Montellano, C. 2010 Mecanismos de acción de plantas ricas en taninos sobre la población adulta de nemátodos gastrointestinales de los pequeños rumiantes. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.
- McDonald, P., Edwards R.A., Greenhalgh. J. F. D., Morgan C.A., Sinclair L.A y Wilkinson R. G. 2014. *Animal nutrition*. Seventh edition. Editorial Pearson.
- McLaughlin, J.L. 2008. Paw Paw and Cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to commercial. *ProductsJournal Natural of Products*.71, 1311–1321
- Méndez-Ortíz, F.A., Sandoval-Castro, C.A., Torres-Acosta J.F.J. 2012. Short term consumption of *Havardia albicans* tannin rich fodder by sheep: Effects on feed intake, diet digestibility and excretion of *Haemonchus contortus* eggs. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1–4): 185–191.

- Mendoza-González, A., Berumen-Alatorre, A.C., Santamaria-Mayo, E. y Cuspinera, G.C. 2010. Diagnóstico clínico del ovino. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco pp: 41-66
- Menke, K.H. y Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research* 23:103-116
- Moghadamtousi, S.Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Mohd Ali, H., Abdul Kadir, H. 2015. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities *International Journal Molecular Sciences*, 16(7): 15625–15658.
- Mohanty, S., Hollinshead, J., Jones, L., Jones, P.W., Thomas, D., Watson, A.A., Grey, A.I. 2008. *Annona muricata* (Graviola): Toxic or therapeutic? *Natural Product Communications* 3(1): 31-33.
- Newman, Y.C., Lambert, B. y Muir, J.P. 2006. Defining Forage Quality Subtitle: Nutritive Value of Southern Forages Texas Cooperative Extension and Texas A&M University. Soil and Crop Sciences Department and Animal Sciences Department. http://publications.tamu.edu/FORAGE/PUB_forage_Defining%20Forage%20Quality.pdf - Revisado 16/03/2016
- Oskoueian, E., Abdullah, N., y Oskoueian, A. 2013. Effects of flavonoids on rumen fermentation activity, methane production, and microbial population. *BioMed Research International*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/349129>

- Pandey, N. y Barve, D. 2011. Phytochemical and pharmacological review on *Annonas quamosa* Linn. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 2(4):1404-1412.
- Papadopoulos, E., Gallidis, E. y Ptochos, S. 2012. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. Veterinary Parasitology 189:85–88
- Picking, D., Younger, N., Mitchell, P., Delgoda, R. 2011. The prevalence of herbal medicine home use and concomitant use with pharmaceutical medicines in Jamaica. Journal of Ethnopharmacology, 137: 305– 311.
- Posada, S.L. y Noguera, R.R. 2005. The *in vitro* gas production technique: a tool to evaluate ruminant feeds. Livestock Research for Rural Development 17: 36.
- Ralphs, M.H., Stegelmeier, B.L. 2011. Locoweed toxicity, ecology, control, and management international Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 1:47-64.
- Ríos, E.M., Bogado, F.B., Acosta de Pérez, C.O. 2007. Daño hepático por *Ipomea fistulosa* cabras. Veterinaria México, 38(7): Resumen V-017
- Rodríguez, C.L., Rios, E.E., Macció, O.A., Merlo, W.A., Lectora, J. 2005. Intoxicación por *Ipomea fistulosa* en cabras. Efectos sobre el sistema nervioso. Universidad Nacional del Noreste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2005. Resumen V-015.
- Roeber, F., Jex, A.R., Gasser, R. 2013. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes on sheep and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance an Australian perspective. Parasites and Vectors, 6:153
- Ross, I.A. 2005 Medicinal plants of the world chemical constituents, traditional and modern medicinal uses. Vol. 1. Editorial Totowa N.J. Humana press Inc. USA.

- Rymer, C. 2000. Chapter 6 The measure of the forage in digestibility *in vivo*. In forage evaluation in ruminant nutrition. pp 113-134
- Sandoval-Castro, C.A., Torres-Acosta, J.F.J., Hoste, H., Salem, A.Z.M., Chan-Pérez, J.I. 2012. Using plant bioactive materials to control gastrointestinal tract helminths in livestock *Animal Feed Science and Technology*, 176(1-4): 192-201
- Silanikove, N., Perevolotsky, A., Provenza, F. 2001. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants *Animal Feed Science and Technology* 91: 60-81.
- Souza, M., Belvi, C., Morais, S. M., Costa, C., Silva, A., Braz-Filho, R. 2008. Anthelmintic acetogenin from *Annona squamosa* L. Seeds. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 80: 271-277.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48:185-197
- Torres-Acosta, J.F.J., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Caballero, A.J., Cuellar-Ordaz, J.A. 2012a. Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Veterinary Parasitology*, 189:89-96.
- Torres-Acosta, J.F.J., Molento, M., Mendoza de Gives, P. 2012b. Research and implementation of novel approaches for the control of nematode parasites in Latin America and the Caribbean: Is there sufficient incentive for a greater extension effort? *Veterinary Parasitology*, 186: 132-142.

- Torres-Acosta, J.F.J., Roberts, B., Canto-Dorantes, J., Martínez-Ortiz, C., Rodríguez, J., L. Canul-Ku, L., 2003. Prevalence of sheep herds with gastrointestinal nematodes resistant to benzimidazoles, imidazothiazoles and macrocyclic lactones in Yucatan. Proceedings V International Seminar of Animal Parasitology, Merida, Mexico
- Vargas-Magaña, J.J., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H. y Chan-Pérez, J.I. 2014. Anthelmintic activity of acetone-water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: Interactions between tannins and other plant secondary compounds 206: 322–327.
- Villar D. y Ortiz J.J. 2006. Plantas tóxicas de interés veterinario casos clínicos Editorial MASSON pp:15-25.
- Vimala, J.R., Rose, A.L., Raja, S. 2012. A study on the phytochemical analysis and corrosion inhibition on mild steel by *Annona Muricata* .L leaves extract in 1 N hydrochloric acid. Der Chemica Sinica 3(3):582-588.
- Vit, P., Santiago, B., Pérez-Pérez, E.M. 2014. Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L. Interciencia, 39(5):350-353.
- Xing-Jiu, H., Yang-Kyu C., Hyung-Soon I., Oktay, Y., Euisik Y. y Hak-Sung K. 2006. Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques Sensors. 6: 756-782

6. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD NUTRICIONAL *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LAS HOJAS DE *ANNONA MURICATA* EN CAPRINOS

Fernández-Vera, J.A.^a, Torres-Acosta, J.F.J.^a, Sandoval-Castro, C.A.^a,

^a Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, CCBA, Universidad Autónoma de Yucatán,

Km 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil, Mérida, Yucatán, México. Email:

joaquin_fernandez_vera@hotmail.com, tacosta@correo.uady.mx, ccastro@correo.uady.mx

Artículo para someter a la revista *Animal Feed Science and Technology*

RESUMEN

El objetivo fue describir y evaluar la calidad nutricional de las hojas secas de *A. muricata* en condiciones *in vitro* y en condiciones *in vivo* usando caprinos en crecimiento siguiendo la metodología propuesta para la confirmación de plantas con potencial nutraceutico bajo el contexto de aplicación a futuro en parasitología veterinaria. El estudio *in vitro* consistió en dos pruebas a) PGIV y b) DIVMS y DIVMO, con y sin polietilenglicol (PEG) ambas utilizaron un modelo de mezclas simple a 48 h. El estudio *in vivo* midió consumo voluntario, digestibilidad y balance de nitrógeno de diferentes niveles de inclusión de harina de *A. muricata* en 22 caprinos divididos en 4 grupos: Control 0% (n=5), T2 (2.5% n=6), T3 (5% n=6) y T4 (10% n=5). Se midieron valores de biometría hemática, alanina aminotransferasa (ALT) y creatinina. Los resultados de la PGIV y DIVMS mostraron diferencias entre los sustratos simples ($p < 0.05$). No hubo efecto de la adición de PEG ($p > 0.05$). El T4 se eliminó (rechazo del alimento y presentación de diarrea). El T3 tuvo menor consumo en g de MS y en g por PM, la menor ganancia de peso diario y total comparado con el control y T2 ($p < 0.05$). La DAMS de control, T2 y T3 fue similar ($p > 0.05$). El grupo T3 mostró un balance de nitrógeno negativo ($p < 0.05$). No existieron diferencias para biometría hemática, ALT y creatinina ($p > 0.05$). El reducido consumo voluntario de harina de hojas de *A. muricata* podría estar asociado a la baja calidad nutricional del sustrato, ya que pudiera contener un metabolito toxico no identificado con un efecto negativo post-ingestivo. La harina de hojas de esta planta puede utilizarse en un nivel de 2.5% de la MS de la dieta de cabras en crecimiento.

Palabras clave: *Annona muricata*; Producción de gas *in vitro*; Digestibilidad *in vitro* e *in vivo*; Consumo; Toxicidad.

INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años, el uso de plantas nutraceuticas ha emergido como una estrategia viable para el manejo de los nematodos gastrointestinales (Hoste *et al.*, 2012). Incluso se ha propuesto una metodología para la búsqueda y confirmación de plantas con potencial para ser empleadas como nutraceuticos en parasitología veterinaria (Hoste *et al.*, 2015). Los principales pasos a seguir para estudiar plantas y determinar su potencial nutraceutico son: (1) demostrar su efecto antihelmintico (AH) *in vitro*, (2) describir el perfil de macronutrientes, (3) evaluar la digestibilidad de la materia seca (MS) y materia organica (MO) en pruebas *in vitro*, (4) realizar pruebas de consumo y preferencia *in vivo*, (5) evaluar la digestibilidad de la materia seca (MS) y materia organica (MO) *in vivo* así como su efecto en el balance de nitrógeno, (6) determinar el impacto sobre la salud y producción animal, y (7) evaluar su efecto AH *in vivo*. Los materiales nutraceuticos más estudiados y que sirven como modelo a seguir han sido los materiales ricos en taninos condensados y generalmente incluye plantas de la familia fabacea (Hoste *et al.*, 2006; Alonso-Díaz *et al.*, 2010). Sin embargo, existen otras plantas como las Anonaceas que se encuentran distribuidas en todo el trópico y son plantas representativas de los huertos familiares en Yucatán (Flores *et al.*, 2004). A esta familia de plantas se le ha prestado mucha atención en la etnobotánica, etnoveterinaria por sus propiedades medicinales y antiparasitarias (Flores *et al.*, 2004; Gajalakshmi *et al.*, 2011; Pandey y Barve, 2011). Más aún, se ha demostrado que especies de esta familia tiene propiedades AH *in vitro* contra NGI en pequeños rumiantes (Souza *et al.*, 2008; Kamaraj *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2013). En Yucatán, México, se ha demostrado que los extractos de acetona:agua (70:30) y metanol de *Annona muricata* tiene actividad AH *in vitro* con dosis efectivas letales a bajas concentraciones sobre huevos y larvas L₃ de *Haemonchus contortus* (Castañeda-Ramírez *et al.*, 2014). Por lo tanto, cumple con el primer punto de la metodología para identificar materiales nutraceuticos. Estos autores también demuestran que los compuestos secundarios contenidos en los extractos de *A. muricata* pueden ser considerados tóxicos de acuerdo a la técnica *in vitro* de *Artemia salina* por lo que se deben tomar precauciones si quiere utilizarse como insumo para la alimentación animal. A pesar de ser una planta nutraceutica con potencial AH, existe poca información que describa las cualidades

nutricionales, tóxicas o antihelmínticas de esta especie de planta al ser consumida por pequeños rumiantes. Por lo tanto, se requiere generar la información que permita definir si las hojas de *A. muricata* pueden proponerse como materiales nutracéuticos contra los NGL. Para esto es indispensable complementar la descripción y evaluación de la calidad nutricional tanto *in vitro* como *in vivo* de las hojas secas de *A. muricata* como sugieren Hoste *et al.* (2015). Por lo tanto, el presente trabajo evaluó la calidad nutricional de las hojas secas de *A. muricata* en condiciones *in vitro* y en condiciones *in vivo* usando caprinos en crecimiento.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo consistió en 3 ensayos que evaluaron las cualidades nutricionales de las hojas secas de *A. muricata* y el efecto de adicionar harina de estas hojas a diferentes niveles, sobre la digestibilidad *in vitro*, consumo voluntario, digestibilidad aparente *in vivo* y balance de nitrógeno, así como su efecto sobre el crecimiento y la salud de los cabritos. Los ensayos fueron:

Experimento 1. Producción de gas *in vitro* de las hojas secas de *A. muricata* y su inclusión a niveles del 30, 20 y 10% en un diseño de mezclas simple con alimento balanceado y *P. purpureum*.

Experimento 2. Digestibilidad *in vitro* de la materia seca y orgánica con y sin la adición de PEG en un diseño de mezclas simples con *A. muricata*, alimento balanceado y *P. purpureum*.

Experimento 3. Consumo, digestibilidad aparente y balance de nitrógeno en caprinos alimentados con harina de hojas secas de *A. muricata* a diferentes niveles (10, 5 y 2.5%). En éste diseño se incluyó el efecto de la inclusión de *A. muricata* sobre indicadores de producción y salud animal.

6.2.1 Experimento 1 y 2. Producción de gas *in vitro* y digestibilidad *in vitro* de la materia seca y orgánica con y sin la adición de PEG en un diseño de mezclas simple con alimento balanceado y *P. purpureum*.

6.2.2. Material de estudio. Se colectaron hojas de *A. muricata* en las zonas sur y poniente de Mérida, Yucatán, durante los meses de diciembre 2013 a abril 2014. Las hojas se secaron sobre papel periódico. Las hojas fueron moviéndose para lograr un secado homogéneo. Una vez que las hojas estuvieron secas se molieron con una criba de 3 mm y se almacenaron en bolsas, dentro de un contenedor de plástico.

6.2.3. Análisis bromatológico. La harina de hojas de *A. muricata* se analizó para determinar el contenido de proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE), cenizas (S) y materia

orgánica (MO), siguiendo la metodología descrita por la A.O.A.C. (1980). Las fracciones de Fibra Detergente Neutro (FDN) y Fibra Detergente Ácida (FDA) se determinaron de acuerdo a Robertson y Van Soest (1981). Se determinó también el contenido de fenoles totales (FT) equivalente al ácido gálico (Price y Butter, 1977) y los taninos condensados (TC) equivalente a catequina (Price *et al.*, 1978).

6.2.4. Producción de gas *in vitro*. Se empleó un equipo automático ANKOM^{RF} (2015)

- **Preparación del medio.** El medio se preparó un día previo a la toma de líquido ruminal de acuerdo a los autores Menke y Steingass (1988), el cual considera diversas soluciones y componentes: solución de microminerales, buffer, macrominerales, reductora, cisteína, y resazurina (indicador de anaerobiosis o concentración de CO₂). Previo a la obtención del inóculo, el medio se calentó a 39°C/2 horas antes en un vaso de precipitado de 2000ml.

- **Obtención del inóculo.** Se colectaron muestras de líquido ruminal directamente del rumen de tres vacas cruzadas (*Bos indicus* × *Bos taurus*). Las vacas fueron sometidas a ayuno de 12 horas sin agua y recibieron una dieta de 7 kg de MS de pasto fresco picado (*Pennisetum purpureum*) y 3 kg de MS de un alimento concentrado a base de granos (Lorgam, Yucatán, México) con un contenido de 180 g/kg de PC. Las muestras de líquido ruminal se depositaron en una bolsa hermética de plástico que inmediatamente se trasladaron al laboratorio de nutrición de la FMVZ-UADY. Posteriormente, las muestras de dicho líquido se exprimieron en un colador sobre un vaso de precipitado para obtener únicamente la fase líquida con un flujo constante de CO₂. Después se procedió a licuar los sólidos que fueron separados en el colador. Este licuado se filtró y se le adicionó a la fase líquida obtenida al inicio. Esta mezcla forma el inóculo que se mantuvo en todo momento con flujo de CO₂ en una placa de calentamiento a 39 °C.

- **Incubación para la medición de la producción de gas *in vitro* (PGIV).** Se utilizaron botellas de 250 ml donde se adicionó 0.5 g para los tratamientos de sustrato simple y esta cantidad se tomó como base (100%) para hacer las inclusiones correspondientes a cada tratamiento de mezclas dobles y triples. A cada botella se le adicionó 100 ml de la solución

buffer y 25 ml del inóculo. Se adicionó CO₂ antes de tapar los frascos. Posteriormente se colocaron en la incubadora a 39 °C durante 48 h.

- **Digestibilidad *in vitro* de la materia seca con y sin PEG (DIVMS).** Se utilizaron botellas de 100 ml de capacidad, donde se adicionó 0.5 g de sustrato y mezclas correspondientes con base en 0.5 g a los cuales se les adicionó 42 ml de la solución buffer y 18 ml del inóculo. Se taparon y se les insertó una aguja para permitir la liberación de gas. Posteriormente se colocaron en la incubadora a 39 °C durante 24 h.

6.2.5. Diseño experimental para la PGIV y para DIVMS con y sin PEG. Se introdujo como máximo un total de 0.5 g (100%) de uno o varios sustratos previamente secados y molidos con criba de 1mm. Cada sustrato simple, doble y triple requirió de 2 repeticiones en 3 líquidos ruminales de diferente animal. Los sustratos simples y combinaciones que se probaron fueron:

- 1) 0.5 g de *A. muricata* (*Am*)
- 2) 0.5 g de *Pennisetum purpureum* (*Pp*)
- 3) 0.5 g de Alimento balanceado (*C*)
- 4) 0.15 g (*Pp*) -0.35 g (*C*)
- 5) 0.15 g (*Am*)-0.35 g (*C*)
- 6) 0.1 g (*Am*)-0.05 g (*Pp*) 0.35 g (*C*)
- 7) 0.05 g (*Am*)-0.1 g (*Pp*) 0.35 g (*C*)
- 8) **Blanco:** únicamente líquido ruminal + medio

6.2.6. Medición de la producción de gas y cinética de fermentación. El equipo ANKOM se programó para realizar lecturas cada 5 minutos durante 48 h. Los resultados de producción de gas fueron sustituidos en la ecuación de Groot *et al.* (1996) para obtener la curva de producción de gas acumulada.

6.2.7. Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS). Al término de la incubación el material residual de todas las botellas se filtró con papel Whatman #1, el filtrado junto con la parte sólida fue secado a una temperatura de 60° C por 24 h. Para determinar la DMSIV se realizó una resta del peso de la MS al inicio de la incubación menos el peso de la MS residual al final de la incubación esto dividido entre la MS inicial.

6.2.8. Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO). Los residuos fueron incinerados a 550°C por 4 h para obtener el contenido de cenizas de los sustratos y poder calcular la MO contenida en cada tratamiento. Para determinar la DMOIV se realizó una resta del contenido de MO al inicio de la incubación menos el contenido de la MO residual al final de la incubación esto dividido entre la MO inicial.

6.3.1 Experimento 3. Consumo, digestibilidad aparente y balance de nitrógeno de la inclusión de harina de hojas secas de *A. muricata* a diferentes niveles (10, 5 y 2.5%) en una dieta a base de alimento balanceado y su efecto sobre el crecimiento y salud de caprinos.

6.3.2 Lugar del estudio. El experimento se realizó en el Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CCBA), en las instalaciones del área de nutrición animal.

6.3.3 Material vegetal. Se colectaron hojas de *A. muricata* en la zona poniente de Mérida y carretera Xmatkuil. Las hojas se secaron exponiéndolas al sol durante el día. Una vez secas las hojas fueron molidas con criba de 3mm para la alimentación de los animales.

6.3.4. Animales experimentales. Se utilizaron 22 cabras con un peso promedio 15 ± 5 kg y una edad entre 3 meses a 8 meses. Los animales se pesaron al momento de su llegada al CCBA y de acuerdo a su peso fueron desparasitados con levamisol a 12 mg/kg vía subcutánea y albendazol vía oral 10 mg/kg (Chartier y Hoste, 1997). Se monitoreo la eliminación de huevos en heces de las cabras de estudio durante una semana para confirmar que estuvieran libres de NGI. Este monitoreo se realizó mediante las pruebas de flotación centrifugada y McMaster. Una vez descartada la infección por NGI, los animales se alojaron en jaulas metabólicas de metal y permanecieron en las mismas durante todos los días del estudio.

6.3.5. Diseño y dieta experimental. Los 22 animales se dividieron en 4 grupos balanceados considerando peso, edad y sexo. Se ofreció una cantidad de alimento equivalente al 3% del peso vivo de cada animal en materia seca. Todos los animales recibieron un 10% de inclusión de pasto *P. purpureum* en base al consumo calculado del 3% de su peso vivo, previo a recibir las dietas experimentales. Los grupos recibieron niveles crecientes de harina de hojas secas de *A. muricata* mezclado con alimento balanceado a diferentes niveles de inclusión: Control (0% harina; n=5), T2 (2.5% harina; n=6), T3 (5% harina; n=6) y T4 (10% harina; n=5). El estudio de consumo, digestibilidad y balance de nitrógeno tuvo una duración de 17 días, de los cuales 11 días fueron de adaptación de los animales a las dietas y 6 días de mediciones experimentales. La composición de las dietas se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1.- Composición química de las dietas experimentales

	MS	PC	EE	FDN	FDA	LIG	CEN
Control	0.88	16.22	1.54	32.92	12.84	3.77	6.20
T2 -2.5%	0.86	15.79	1.50	32.21	12.61	3.69	6.05
T3- 5%	0.85	15.36	1.46	31.50	12.38	3.61	5.89
T4- 10%	0.82	14.51	1.39	30.08	11.91	3.45	5.59

MS: materia seca, PC: proteína cruda; EE: extracto etéreo; FDN y FDA: fibra detergente neutra y acida; LIG: lignina; CEN: cenizas.

6.3.6. Criterios de eliminación de animales experimentales

Se eliminó de la prueba a los animales que presentaron diarrea o rechazo total del alimento que contenía harina de *A. muricata*.

6.3.7. Consumo de dietas experimentales

Se pesó diariamente el alimento ofrecido y rechazado para calcular el consumo diario de alimento. Durante los 6 días de la fase experimental (día 12 al 17) se calculó el consumo diario en g, consumo por peso metabólico, estimado del consumo de *A. muricata* en g/kg de peso vivo.

6.3.8. Digestibilidad aparente de la materia seca (DAMS) La digestibilidad aparente de la dieta se midió los últimos 6 días de la fase experimental (día 12 al 17). Se empleó la técnica de colecta total de heces (Rymer, 2000) y se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{DAMS} = \frac{\text{MS consumida} - \text{MS excretada}}{\text{MS consumida}}$$

6.3.9. Tasa de consumo

Con ayuda de etogramas se registró qué animales terminaban su alimento en < 1 h, entre 1 y 2 h, o > 2 h (máximo 24 h) y/o tuvieran cero consumos. Se registró cualquier signo clínico compatible con incoordinación generalizada, parálisis, incoordinación del tren posterior, ictericia, problemas de prensión o masticación y diarrea. Otros signos como rechinado de dientes, ausencia de rumia fueron considerados solo en caso de presentarse algún problema relacionado con otros cambios en la conducta. Estas observaciones se realizaron en tres momentos diferentes del día: (a) inicio del consumo de alimento concentrado, (b) 4 h posteriores al consumo de alimento concentrado y a las 6:30 pm aproximadamente.

6.3.10. Biometría hemática (BH), enzima hepática ALT y creatinina

Se tomaron 2 muestras de sangre de la vena yugular cada una con de 2 ml, con ayuda de una aguja de calibre 18. Se utilizaron dos recipientes diferentes un tubo con anticoagulante y otro tubo sin anticoagulante. Las muestras fueron remitidas y procesadas en el laboratorio de diagnóstico del CCBA. A las muestras con anticoagulante se les determinó la biometría hemática completa y a las muestras sin anticoagulante se determinó la enzima hepática ALT y la creatinina. Las muestras se tomaron los días 0, 7 y 17 experimentales. Estas muestras fueron obtenidas para monitorear posibles problemas de toxicidad en los caprinos de estudio.

6.3.11. Ganancia diaria de peso y total de peso vivo

Los animales se pesaron los días: 0, 7, 14, 21. Estos pesajes sirvieron para determinar la ganancia diaria de peso, así como la ganancia de peso vivo final.

6.3.12. Balance de nitrógeno

La orina de todos los animales experimentales fue recolectada cada 24 horas, del día 13 al 17 del estudio (5 días consecutivos). En los recipientes de plástico se colocó 70 ml de ácido sulfúrico al 10% para garantizar un pH entre 2 a 3 y evitar la pérdida de nitrógeno por volatilización. Todas las orinas fueron diluidas hasta 1 litro de agua. Posteriormente recolectó el 10% del total de orina y se conservó en un recipiente de plástico en congelación (-4°C). Al término del período de recolección se hizo una mezcla de la orina de cada animal y este material sirvió para determinar el contenido de N total (A.O.A.C., 1980). De la misma manera que la orina, se obtuvo una muestra del 10% de todas las heces obtenidas diariamente de cada animal para hacer una mezcla y determinar el contenido de N para calcular el N retenido (g/d) de acuerdo a la fórmula siguiente (Rodríguez y Llamas, 1990)

$$NR \text{ (g/d)} = NC - (NH + NO)$$

Donde:

NR= N retenido

NC= N consumido

NH= N en heces

NO= N en orina

6.4 Análisis estadístico

Se utilizó el software Graphpad Prism para analizar la cinética de fermentación *in vitro* y el software Minitab para realizar el análisis de mezclas (Minitab, 1997). Se utilizó el programa SAS 9.3.1 para realizar el análisis estadístico de ANOVA y comparar las variables de consumo diario (g), consumo expresado por su peso vivo (g/kg peso vivo), consumo por kg de peso metabólico (g/Kg PM), ganancia diaria de peso (GDP) y ganancia de peso vivo (GPV). Se determinó el riesgo relativo de rechazar el alimento con diferentes niveles de inclusión de *A.muricata* mediante tablas de contingencia 2 x 2 (Chi-cuadrada) con ayuda de un software libre www.winepi.net (Blas, 2006) o prueba exacta de Fisher en www.socscistatistics.com (Stangroom, 2015). Para analizar los datos de las biometrías hemáticas, la ALT y la creatinina de los 4 grupos de estudio se utilizaron los respectivos ANOVA utilizando el programa SAS ver. 9.3.1.

7. RESULTADOS

7.1 Composición química de los sustratos

La composición química de los ingredientes usados en el experimento se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Análisis proximal de sustratos experimentales utilizados para el estudio *in vitro* e *in vivo* de *Annona muricata*.

Sustrato	MS	PC	EE	FDN	FDA	LIG	CEN	FT	TAN	TC
<i>Annona muricata</i>	0.30	15.56	4.23	47.63	32.49	7.61	7.92	2.01	1.36	4.76
<i>Pennisetum purpureum</i>	0.33	7.9	1.77	73.65	44.88	8.74	6.74	0.87	0.88	0.96
Alimento balanceado	0.94	17.14	1.51	28.39	9.28	3.22	6.14	0.65	0.74	1.55

PC: proteína cruda; EE: extracto etéreo; FDN y FDA: fibra detergente neutra y acida; LIG: lignina; CEN: cenizas; FT: fenoles totales; TAN: taninos y TC: taninos condensados.

7.2 Producción de gas *in vitro* (PGIV)

Los valores de producción de gas acumulada se observan en la Tabla 3 y Figura 1. Se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos simples (*A. muricata*, *P. purpureum* y alimento balanceado). También se encontró que en medida que se incrementó proporcionalmente la inclusión de *A. muricata* esta tiende a disminuir la producción de gas siendo el tratamiento con 10% inclusión (96.02 ± 0.6) estadísticamente significativo ($p < 0.05$) del tratamiento con 20% (92.8 ± 0.3) y 30% (92.7 ± 0.6).

Tabla 3. Producción de gas acumulado (ml gas/g MS ± D.E.) de los sustratos experimentales y sus mezclas

Tratamiento	GV	B	C	R ²	Sy.x	DIVMS ±D.E.
<i>Annona muricata</i> (Am)	47.6 ± 0.9 ^a	9.6 ± 0.3 ^a	1.586 ± 0.08 ^a	0.905	3.886	37.3 ± 1.1 ^a
<i>Penisetum purpureum</i> (Pp)	86.8 ± 1.5 ^b	13.2 ± 0.3 ^b	1.800 ± 0.07 ^a	0.948	5.578	53.3 ± 4.6 ^b
Alimento Balanceado (AB)	114.8 ± 0.3 ^c	9.3 ± 0.05 ^a	2.632 ± 0.03 ^b	0.992	3.141	81.3 ± 7 ^c
30% Pp: 70% AB	105.0 ± 0.6 ^c	9.6 ± 0.1 ^a	2.200 ± 0.05 ^c	0.978	4.621	70.6 ± 5 ^d
30% Am: 70% AB	92.7 ± 0.6 ^e	8.3 ± 0.1 ^c	2.498 ± 0.08 ^b	0.953	5.972	62 ± 9.1 ^d
20% Am :10% Pp: 70% AB	92.8 ± 0.3 ^e	9.2 ± 0.06 ^a	2.499 ± 0.04 ^b	0.989	2.955	65.3 ± 6.1 ^d
10% Am-20%P-70%AB	96.02 ± 0.6 ^f	9.059 ± 0.1 ^a	2.249 ± 0.06 ^c	0.978	4.285	70 ± 2.0 ^d

GV, B y C corresponden a los parámetros de la ecuación $\text{ml gas} = \text{GV} (1 + (\text{B}/t)^C)^{-1}$ (Groot *et al.*, 1996). R²: valor de regresión y SxY: residual. DIVMS= Digestibilidad *in vitro* de la materia seca, D.E.= Desviación estándar.

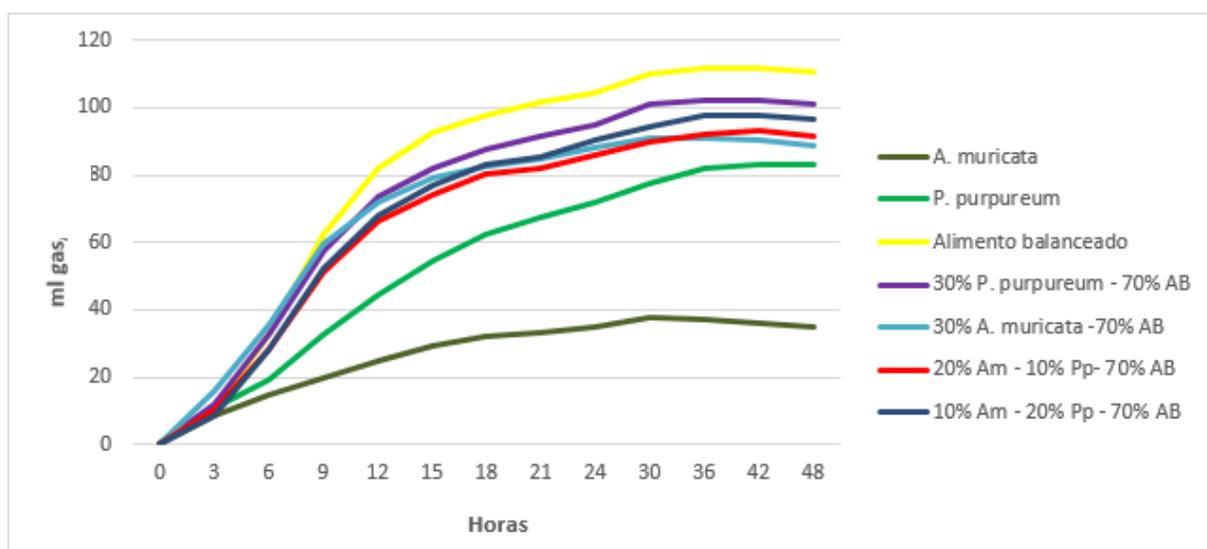


Figura 1. Producción de gas acumulada a 48 horas de los tratamientos simples y mezclas del experimento.

7.3 Digestibilidad *in vitro* de la materia seca y materia orgánica con y sin PEG

La digestibilidad *in vitro* de la MS y MO, con y sin adición de polietilenglicol (PEG), se presenta en la Tabla 4. Se puede observar que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en la digestibilidad de los diferentes ingredientes con la adición de PEG en los tratamientos.

Tabla 4. Digestibilidad *in vitro* de materia seca (DIVMS) y de la materia orgánica (DIVMO) de los ingredientes experimentales y las mezclas de los mismos con y sin adición de PEG

Tratamiento	DIVMS		DIVMO	
	Sin PEG	Con PEG	Sin PEG	Con PEG
<i>Annona muricata</i> (Am)	40 ± 5.51 ^{a,A}	39.3 ± 7.11 ^{a,A}	42.44 ± 5.62 ^{a,A}	39.5 ± 8.40 ^{a,A}
<i>Pennisetum purpureum</i> (P)	54.6 ± 2.07 ^{b,B}	53.6 ± 3.44 ^{b,B}	54.96 ± 3.59 ^{b,B}	48.2 ± 5.80 ^{b,B}
Alimento Balanceado (AB)	81 ± 2.76 ^{c,C}	77 ± 4.69 ^{c,C}	82.60 ± 2.10 ^{c,C}	77.2 ± 4.40 ^{c,C}
30% P -70%AB	74.6 ± 5.61 ^{d,D}	70 ± 1.78 ^{d,D}	75 ± 5.68 ^{d,D}	71.18 ± 2.61 ^{d,D}
30%Am -70%AB	67 ± 5.02 ^{d,D}	64.3 ± 4.08 ^{d,D}	67.8 ± 6.06 ^{d,D}	64.4 ± 4.99 ^{d,D}
20%Am-10%P-70%AB	72.6 ± 5.75 ^{d,D}	67.6 ± 1.96 ^{d,D}	74.5 ± 5.70 ^{d,D}	68.1 ± 2.32 ^{d,D}
10%Am-20%P-70%AB	75 ± 8.46 ^{d,D}	70 ± 2.19 ^{d,D}	76.8 ± 9.88 ^{d,D}	71.5 ± 2.22 ^{d,D}

PEG: polietilenglicol. No hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) por adición de PEG. Las literales minúsculas indican diferencias dentro de columnas. Las literales mayúsculas indican diferencias entre columnas para DIVMS sin y con PEG y para DIVMO sin y con PEG

7.4. Consumo

De acuerdo a los criterios de eliminación indicados en la metodología, el grupo T4 fue eliminado del experimento. Esto debido a que los animales no aceptaron el alimento (menos del 1% de consumo de MS / kg PV) y además un animal presentó diarrea.

Las cabras que recibieron la harina de *A. muricata* al 5% (T3) redujeron su consumo de alimento ($p < 0.05$) con respecto al grupo control (0% de *A. muricata*) y T2 (2.5% de harina de *A. muricata*) (Tabla 5).

Tabla 5. Promedios de consumo diario de materia seca (g), consumo de materia seca por Kg de peso vivo metabólico, total, en g/kg de peso metabólico y g/kg de *Annona muricata*

Tratamientos	Consumo diario g de MS	Consumo en g de MS por Kg ^{0.75}	Consumo g/kg MS de <i>A. muricata</i>
Control (0% <i>A. muricata</i>)	396 NS	0.052 ^a	0 ^a
T2 (2.5% <i>A. muricata</i>)	379 NS	0.040 ^a	9 ^b
T3 (5% <i>A. muricata</i>)	230 NS	0.029 ^c	11 ^c
EE	0.038	0.034	0.001

Las letras a, b y c indican diferencias significativas con ($p < 0.05$)

MS: materia seca; PM: peso metabólico; NS: no significativo; EE: Error estándar

7.5. Tasa de consumo

La tasa de consumo de la dieta tendió a ser más lenta a medida que esta contenía más harina de *A. muricata* (Tabla 6). Adicionalmente, el análisis de riesgo relativo de rechazar la dieta al incluir harina de hojas de *A. muricata* en la dieta fue de 4.5 y 5.2 veces mayor para las cabras de los grupos T2 y T3 respectivamente, comparado con el grupo control ($p < 0.05$).

Tabla 6. Porcentaje de cabras que consumen el alimento de los diferentes grupos experimentales en > 1 hora, >1 hora pero < 2 horas y > 2 horas

Tratamientos	>1 h	1< y > 2 h	> 2 h
Control	52.6 %	28.4 %	18.9 %
T2 (2.5% de <i>Anona muricata</i>)	2.1 %	14.7 %	83.2 %
T3 (5% de <i>Anona muricata</i>)	0 %	0 %	100 %

7.6 Digestibilidad aparente de la materia seca y orgánica

En cuanto a la DAMS y la DAMO no existió diferencia significativa entre tratamientos ($p>0.05$). Para la DAMS se obtuvo 77.2 ± 4 , 78.7 ± 2 y $77.6 \pm 0.9\%$ para control, T2 y T3 respectivamente. Y para DAMO 77.5 ± 2.7 , 77.9 ± 2.1 y $75.1 \pm 2.2\%$ para los mismos tratamientos.

7.7 Ganancia diaria de peso y total de peso vivo

La GDP y GTP del grupo T3 (5% de *A. muricata*) fue significativamente inferior que las de T1 y T2 ($p<0.05$). Los valores de GDP obtenidos fueron de 106 ± 33 , 71 ± 78 y 24 ± 32 g para grupo control, T2 y T3 respectivamente. Los valores de GTP obtenidos fueron 1.8 ± 0.5 , 1.2 ± 1.3 y 0.4 ± 0.5 Kg para grupo control, T2 y T3 respectivamente.

7.8. Balance de nitrógeno

Los resultados del balance de nitrógeno que resultan del consumo de las diferentes dietas se presentan en el Tabla 7. Se puede observar que el grupo T3 mostró un balance negativo de nitrógeno ($p<0.05$). Además, no hubo diferencias entre el grupo control y T2 (Tabla 7).

Tabla 7. Proteína cruda (g) consumida en alimento y eliminada en heces o en orina así como el balance de nitrógeno (g de PC) de cabritos alimentados con diferente nivel de inclusión de harina de hojas de *Annona muricata*.

Tratamiento	PC (g) consumo	PC (g) heces	PC (g) orina	Balance
Control	54.51	14.26	24.2	16.48 ^a
T2 (2.50% de <i>Annona muricata</i>)	49.32	11.50	22.5	13.88 ^a
T3 (5% de <i>Annona muricata</i>)	30.93	8.30	26.2	-4.90 ^c

Las columnas con letras diferentes son significativamente diferentes con (p<0.05)

7.9 Signos clínicos, biometría hemática, enzima hepática alanina aminotransferasa (ALT) y creatinina.

No se registró ningún signo clínico relacionado con el sistema nervioso durante el experimento. Los resultados de las pruebas de biometría hemática mostraron que los grupos Control (0% de *A. muricata*), T2 (2.5% de *A. muricata*) y T3 (5% de *A. muricata*) tienen valores hemáticos semejantes ($P > 0.05$). Es decir, los niveles de inclusión elegidos no afectaron los valores de cantidad de eritrocitos (de 13.7 a 15.2 x 10⁶/mm³), hemoglobina (8.3 a 9.2 gr/dl), hematocrito (29.4 a 31.6%), volumen globular medio (21.4 a 22.8 f/l) y concentración media de hemoglobina corpuscular (29.6 a 30.gr/dl). Los diferentes grupos también mostraron valores semejantes de los diferentes tipos de glóbulos blancos ($P > 0.05$). Leucocitos (13 ± 3.4 a 16 ± 9.1 x 10³/mm³), neutrófilos (4.8 ± 1.9 a 6.8 ± 3.4 x 10³/mm³), linfocitos (6.4 ± 3.3 a 8 ± 1 x 10³/mm³), monocitos (280 ± 189 a 342 ± 213 / mm³) y eosinófilos (212 ± 199 a 272 ± 161 / mm³). Por otro lado, los valores de ALT de los diferentes grupos fue también semejante para el grupo Control (13.2 ± 4.6), el grupo T2 (12.3 ± 2.7) y el grupo T3 (12.5 ± 5.9). De la misma manera, la creatinina de los animales de los tres grupos de estudio fue semejante (Control = 1.06 ± 0.52, T2 = 0.99 ± 0.58 y T3 = 0.96 ± 0.40). Los valores normales reportados son 24-83 U/L para ALT y para creatinina 1.0-1.8 mg/dl (Pugh y Baird *et al.*, 2012).

8. DISCUSIÓN

8.1 Análisis Bromatológico

El valor potencial de un alimento para proveer nutrientes puede ser determinado por su análisis de composición química (Mc Donald *et al*, 2014). Los valores obtenidos de las hojas de *A. muricata* (MS 0.30, PC 15.56, Cenizas 7.92 y EE 4.23) son muy similares a los encontrados por Vit *et al.* (2014) para *A. muricata* con una MS 37.36, PC 13.92, Cenizas 7.17 y EE 2.94. Los valores encontrados para las hojas de *A. muricata* son muy similares también a los que presentan otros árboles forrajeros de Yucatán, al menos en MS y PC. Tal es el caso del *Enterolobium cyclocarpum* (MS = 36.7% y PC = 15.7%), *Piscidia piscipula* (MS = 37.9% y PC = 14.1%), *Guazuma ulmifolia* (MS = 38.5% y PC = 15.0%), *Acacia gaumeri* (MS = 36.8% y 16.14%) y *Brosimum alicastrum* (MS = 42% y PC = 16.9%) (Sánchez *et al* 2001; Monforte-Briceño *et al.*, 2005). En lo que respecta al contenido de FDN y FDA los valores de las hojas de *A. muricata* fueron semejantes a los valores de otras plantas forrajeras *E. cyclocarpum* (50.43 y 30.70%), *P. piscipula* (41.10 y 25.66%), *G. ulmifolia* (47.60 y 29.77%), *Lysiloma latisiliquum* (46.20 y 25.50%), (Monforte-Briceño *et al*, 2005) y *B. alicastrum* (42 y 16.9%) (Sánchez *et al.*, 2001). El valor de cenizas reportado para las hojas de *A. muricata* fue de 7.92% y que nuevamente coincide con valores como los de *E. cyclocarpum* (8.23%), *G. ulmifolia* (7.24%) y *Acacia gaumeri* con 8.91%. Por lo tanto, este primer análisis sugiere que las hojas *A. muricata* parecieran tener el potencial de ser una fuente de mediana a alta calidad de alimento, como sugiere Di Marco, (2011), un forraje es de alta calidad cuando tiene menos de 50% de fibra detergente neutra (FDN) y más de 15% de proteína bruta (PB).

8.2 Producción de Gas *in vitro*

La diferencia significativa en los valores del volumen final de producción gas en los sustratos simples se dio principalmente debido a la diferencia en el tipo alimento y flora microbiana que se forma. Los carbohidratos estructurales poco digestibles (fibra) fermentan lentamente a 2-5% por hora de modo que la velocidad con que se producen AGV es lenta, favoreciendo el

desarrollo de una flora celulolítica y por otra parte los carbohidratos no estructurales (almidón) fermentan con mayor rapidez y producen una mayor cantidad de AGVs y con mayor rapidez a un 20-50% por hora (Bach y Calsamiglia, 2006). Por el buen contenido de nutrientes era de esperarse que las hojas de *A. muricata* tuvieran un buen desempeño en la prueba de PGIV, sin embargo, la producción de gas de las hojas de *A. muricata* quedaron por debajo del pasto *P. purpureum* 86.8 vs. 47.5 ml ($P < 0.05$). La prueba de PGIV nos indica que es muy probable que las hojas secas de *A. muricata* contengan algún o algunos factores anti-nutricionales, que, al ser liberados durante la incubación, estos se concentraron alcanzando niveles inhibitorios para los microorganismos afectando la fermentación de manera proporcional a su inclusión en la mezcla, reflejándose precisamente en una menor producción de gas ($p < 0.05$) (Posada y Noguera, 2005). De acuerdo a los reportes sobre los metabolitos secundarios contenidos en las hojas de *A. muricata*, los alcaloides, flavonoides y saponinas son metabolitos que poseen efectos antiprotozoarios y/o antimicrobianos que impactan directamente sobre la fermentación microbiana produciendo un descenso sobre la producción de gas *in vitro* y la digestibilidad (Hu *et al.*, 2005; Dos Santos *et al.*, 2013; Oskoueian *et al.*, 2013;). Hasta este punto se puede concluir con la prueba de PGIV que a pesar del buen contenido nutricional de las hojas de *A. muricata*, la baja digestibilidad y producción de gas *in vitro* considera a las hojas secas de baja a mediana calidad. Como menciona Di Marco, (2011), un forraje es de baja calidad cuando la DIVMS disminuye a menos del 50% y no es deseable que un forraje contenga antinutricionales como menciona Ball *et al.*, (2001) estos pueden comprometer el desempeño productivo de los rumiantes, causar alguna enfermedad o muerte.

Al comparar la PGIV y DIVMS de las hojas secas de *A. muricata* con árboles forrajeros de la región se hallaron valores semejantes con *E. cyclocarpum* (94.1 ml-120 h y 37.64 ml a 48 horas aproximadamente y una DIVMS de 29.37 y DIVMO de 29.10%), *P. piscipula* (117ml-120h y 46.8 ml aprox. y con DIVMS 37.84% y DIVMO 42) y *L. latisiliquum* (85ml-120h y 34ml-48 aprox. DIVMS de 24.42 y DIVMO de 21.93%.) y *Leucaena leucocephala* con una DIVMS de 44.70% y una DIVMO de 40.71%, (Monforte-Briceño *et al.*, 2005). Como se puede observar estos árboles forrajeros también poseen bajos niveles de PGIV y DIVMS, pero cada uno posee sus propios atributos y desventajas cuando se ofrecen para consumo a los

rumiantes. Por ejemplo, las hojas de *E. cyclocarpum* tienen muy poca palatabilidad para los rumiantes y son realmente sus frutos los que se utilizan para el consumo animal (Zamora *et al*; 2001). El árbol forrajero *P. piscicula* cuenta con buena aceptación por los rumiantes y el follaje de *L. Latisiliquum* es consumido por los rumiantes, pero tiene un contenido mayor a 10% de taninos condensados en sus hojas, lo que compromete la digestibilidad. Por lo tanto, la descripción del contenido nutricional de las dietas que contienen hojas de *A. muricata* se compara al de muchos árboles forrajeros de la región. Sin embargo, la prueba de PGIV indica que el uso de las hojas secas a un 100% pudieran causar algún efecto negativo en los rumiantes, incluso con los niveles de inclusión (10, 20 y 30%) se observó una tendencia a disminuir la PGIV y la digestibilidad proporcional al incrementó de estos niveles, por lo que se optó complementar esta hipótesis con pruebas de consumo y digestibilidad *in vivo* utilizando estos mismos niveles de inclusión.

8.3 Digestibilidad *in vitro* de la MS y MO con y sin PEG

La utilización de PEG con *A. muricata* no tuvo efecto sobre la DIVMS y DIVMO. Por lo tanto, se asume que los fenoles y taninos contenidos en las hojas de *A. muricata* no afectaron su digestibilidad *in vitro*. En lo que respecta a las mezclas triples, aunque no se encontró diferencia significativa, se observó que la digestibilidad tiende a disminuir a medida que se incrementa la inclusión de *A. muricata* en la dieta, por ejemplo, la digestibilidad *in vitro* al 10, 20 y 30% de inclusión en frascos de 100ml fue de 75 ± 8 , 72.6 ± 5 y $67 \pm 5\%$.

8.4 Prueba de Consumo de alimento con cantidades crecientes de harina de *A. muricata*

Debido a la nula aceptación de harina de *A. muricata* en caprinos a un nivel de inclusión de 30% de la MS en un estudio piloto previo, se decidió reducir el nivel de inclusión de harina de hojas de *A. muricata* a niveles más bajos que pudieran permitir el consumo de la dieta por los caprinos. El presente trabajo demostró que la inclusión de harina de hojas de *A. muricata* incluso a un nivel de 10% siguió siendo un nivel que ocasionó el rechazo por parte de los caprinos experimentales. Por lo tanto todo el grupo T4 quedó fuera del experimento, ya que

existía un rechazo del 100% del alimento. Aun en las dietas que usaron niveles muy bajos de hojas de *A. muricata* se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) comparadas con el grupo control. El riesgo del rechazo de la dieta se incrementó a medida que aumentó la inclusión de hojas secas de *A. muricata* en la dieta con un RR = 4.5 para el T2 (2.5% de harina de *A. muricata*) vs. el grupo Control. El RR se aumentó a 5.2 para el T3 (5% de harina de *A. muricata*) vs. el control. Como consecuencia del rechazo de la dieta se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el consumo entre el grupo Control, T2 (2.5% de *A. muricata*) y el T3 (5% de *A. muricata*) ($p < 0.05$). Se estimó el consumo en g de hojas secas de *A. muricata* de los animales en T2 y T3 que fue de 9 y 11 g/kg de harina de esta planta, respectivamente. Por lo tanto, es evidente que los animales evitaron consumir cantidades superiores de ese insumo. Esto puede servir como idea de la dosis máxima que podría considerarse en el futuro para probarse como nutraceutico. De acuerdo a Solaiman (2010), los factores que tienen influencia sobre la conducta de alimentación en cabras que pastorean son multifactoriales. Sin embargo, en este caso es probable que el factor olor/sabor, la concentración de metabolitos secundarios y la experiencia previa (malestar o diarrea) pudieron ocasionar ese rechazo del alimento con harina de *A. muricata*.

En la literatura está documentada la presencia de saponinas en las hojas de *A. muricata*, que probablemente pudieron causar malestar o diarrea ya que estos metabolitos generan gastroenteritis, dolor abdominal y diarrea como consecuencia del daño e irritación que ocasionan en la mucosa del intestino (Díaz-Gonzalo, 2010). Sin embargo, no se descarta la acción de otros metabolitos que pudieran causar este problema. Se recomienda realizar los estudios fitoquímicos que permitan identificar los compuestos secundarios contenidos en las hojas de *A. muricata* e investigar aquellos que estén asociados al rechazo del alimento y a la causa de diarreas en los caprinos. Evidentemente se requiere identificar un nivel de inclusión que no ocasione efectos negativos sobre el consumo de este material y ese nivel pudiera ser explorado como un follaje nutraceutico contra NGI.

8.5. Ganancia de peso de caprinos consumiendo harina de *A. muricata*

Cuando se comparó la GDP y la GPV se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo control y el T3 (106 vs. 24 g/día y 1.8 vs. 0.4 kg totales respectivamente). Nuevamente, se atribuye esta diferencia al rechazo que mostraron los cabritos de T3 por su alimento con 5% de harina de *A. muricata*. Este nivel de inclusión de la harina de hojas de *A. muricata* no es adecuado para usar como nutracéutico.

8.6. Digestibilidad aparente de la MS y MO *in vivo*

No se encontraron diferencias entre los tratamientos ($p < 0.05$) tanto para DAMS como para DAMO. La DAMS y la DAMO fluctuaron alrededor del 77% para el control, T2 (2.5%) y T3 (5%). Esta ausencia de una reducción significativa de la digestibilidad aparente entre los grupos experimentales se debe a que el consumo se redujo en T2 y T3 y estos bajos consumos permitieron una elevación de la DAMS y la DAMO.

8.7. Pruebas hematológicas, creatinina, ATP y signos clínicos.

No se hallaron signos clínicos de tipo nervioso durante el estudio *in vivo*, que se esperaba fuera uno de los riesgos que pudieran presentar los animales por su contenido de annonacina (Moghadamtousiet *al.*, 2015) y swainsonina (Rodríguez *et al* 2005; Ralphs y Stegelmeier, 2011). En este estudio no se alteraron los indicadores de salud en glóbulos rojos y blancos, ALT y creatinina, lo que concuerda con los hallazgos de Mahour *et al.* (2007) en animales consumiendo hojas de *A. squamosa*. En los estudios con ratones los resultados obtenidos a corto plazo (toxicidad aguda y sub-aguda) concuerdan con los resultados obtenidos con que no se incrementa la enzima ALT, por lo que no se considera hepatotóxico, sin embargo, no se descarta los efectos negativos a nivel renal, a largo plazo en rumiantes (Arthur *et al.*, 2011). Retomando las dosis de harina de *A. muricata* consumidas por las cabras en los grupos T2 y T3 (de 9 y 11 g/kg PV respectivamente). Estas dosis se encuentran por arriba de las

recomendaciones hechas por Arthur *et al*, (2011) que establecen una dosis máxima de 5 g/kg de acuerdo a las pruebas de toxicidad aguda en ratones. La OECD (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico, Paris, Francia), establece que las hojas de *A. muricata* son seguras para usarse por vía oral en el manejo de diversas enfermedades o padecimientos en humanos. La dosis de 5g/kg de PV como LD50 para un adulto promedio de 60 kg se traduciría una dosis de 300 g de extracto ó 1 copa de té 3 veces al día= 211 mg/kg/día). La alta LD50 es una clara indicación del uso seguro de *A. muricata*, pero a dosis elevadas pueden ocasionar daño renal o alterar la función uterina, al menos en ratones que es la especie donde se probó. El presente estudio demuestra que el uso de harina de *A. muricata* en dosis de 10% y 5% (11 g/kg) del alimento excedió la dosis recomendada, ocasionando diarrea y rechazo del alimento en el corto plazo. Las dosis entre 5 g/kg y 9 g/kg de harina de hojas secas de *A. muricata* pueden tomarse como referencia para evitar alguna toxicidad en su implementación en rumiantes en el futuro.

Una vez que ya se sabe que se puede utilizar un alimento con un máximo de 2.5% de la dieta en caprinos, el siguiente paso debe ser evaluar si dicho nivel de consumo de harina de hojas de *A. muricata* en la dieta pudiera servir para el control de NGI a manera de un nutraceutico. La evaluación de dicho efecto AH debe seguir considerando la confirmación de no ocasionar problemas en la salud y bienestar de los animales que lo consuman, como sugieren Hoste *et al*. (2015).

9. CONCLUSIONES

La harina de hojas de *A. muricata* como ingrediente único posee una digestibilidad promedio del 40% y se sospecha que contiene factores antinutricionales que comprometen la digestión y la fermentación ruminal, por lo que se considera que posee una baja calidad nutricional.

La inclusión del 30, 20 y 10% de harina de *A. muricata* reduce la producción de gas *in vitro*, la DIVMS y la DIVMO de manera proporcional a su nivel de inclusión, pero sin afectar la velocidad de fermentación (cinética) y sin un efecto de la adición de PEG.

El estudio *in vivo* con caprinos sugiere que el consumo de harina de *A. muricata* incluso a un 10% de inclusión (T4) ocasiona el rechazo total del alimento y, en caso de consumirse podría provocar diarrea.

A un nivel de consumo del 5% de inclusión (T3) reduce significativamente el consumo de la dieta, lo que ocasiona una disminución de la ganancia de peso con respecto al control. No se encontró un efecto negativo sobre la digestibilidad aparente de la MS y MO, pero si en el balance de nitrógeno, ambos efectos posiblemente como consecuencia del bajo consumo.

No se encontró ningún efecto negativo agudo o sub-agudo sobre las variables hematológicas, ALT y creatinina de los animales de los grupos consumiendo harina de *A. muricata* (grupos T2 y T3)

La inclusión de harina de hojas secas *A. muricata* al 2.5% (T2) fue el único nivel tolerado por los animales sin afectar significativamente su consumo, digestibilidad, balance de nitrógeno y crecimiento.

10. REFERENCIAS

- Alonso-Díaz, M.A., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., 2010. Tannins in tanniferous tree fodders fed to small ruminants: a friendly foe? *Small Ruminant Research* 89: 164–173.
- AOAC., 1980. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Washington DC, USA.
- Arthur, F.K.N., Woode, E.T. y Larbie, C., 2011. Evaluation of acute and subchronic toxicity of *Annona Muricata* (Linn.) aqueous extract in animals. *European Journal of Experimental Biology* (4):115-124.
- Bach, A. y Calsamiglia S., 2006. La fibra en los rumiantes ¿química o física? Universidad Autónoma de Barcelona XXII Curso de especialización FEDNA
- Ball, D.M., Collins, M., Lacefield, G.D., Martin, N.P., Mertens, D.A., Olson, K.E., Putnam, D.H., Undersander, D.J., y Wolf, M.W. 2001. Understanding forage quality. American Farm Bureau Federation Publication 1-01, Park Ridge, IL. <https://www.uky.edu/Ag/Forage/ForageQuality.pdf> - Revisado 16/03/2016
- Blas, I., 2006. Working in epidemiology. Universidad de Zaragoza www.winepi.net
- Castañeda-Ramírez, 2014. Evaluación *in vitro* de los extractos metanólicos y acetónicos de *Annonas quamosa*, *A. muricata* y *A. reticulata* con uso potencial en contra de *Haemonchus contortus* Tesis maestría, Posgrado Institucional en Ciencias Agropecuarias y Manejo de Recursos Naturales Tropicales. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.
- Chartier, C. y Hoste, H., 1997. Response to challenge infection with *haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in dairy goats. Differences between high and low producers. *Veterinary Parasitology* 73:267-276.
- Di Marco., 2011. Estimación de calidad de los forrajes. *Producir* XXI 20(240):24-30
- Díaz-Gonzalo., 2010. Plantas tóxicas de importancia en salud y producción animal en Colombia. Editorial Vicerrectoría Académica- Universidad Nacional de Colombia.
- Dos Santos, E.T., Pereira, M.L., da Silva, C.F., Souza-Neta, L.C., Geris, R., Martins, D., Santana, A.E., Barbosa, L.C., Silva, H.G., Freitas, G.C., Figueiredo, M.P., de Oliveira,

- F.F., Batista, R., 2013. Antibacterial activity of the alkaloid-enriched extract from *Prosopis juliflora* pods and its influence on *in vitro* ruminal digestion. *International Journal of Molecules Science*.14(4):8496-516.
- Ferreira, L., Castro, P., Chagas, A., Franca, S., Belebani, R., 2013. *In vitro* anthelmintic activity of aqueous leaf extract of *Annona muricata* L. (Annonaceae) against *Haemonchus contortus* from sheep. *Experimental Parasitology*, 134:327-332.
- Flores, J.S., Cabrera-Cano, E.F., Hernández-Martínez, E.H., Salazar-Gómez, C., 2004. Etnoflora Yucatenense, Fascículo 21. Annonaceae de la península de Yucatán. *Taxonomía, Florística y Etnobotánica*. Ed. UADY, Mérida, Yucatán, México.
- Gajalakshmi, S., Vijayalakshmi, S., Devi-Rajeswari, V., 2011. Phytochemical and pharmacological properties of *A. muricata*: A Review, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(2):3-6.
- Groot, J.C.J., Cone J.W., Williams, B.A., Debersaques, F.M.A. y Lantinga, E.A., 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds *Animal Feed Science Technology* 64, 77-89.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S., Hoskin S., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*, 22(6): 253-261.
- Hoste, H., Martinez-Ortiz-De-Montellano, Manolarakia, F., Brunet, N. Ojeda-Roberto, J.F.J. Torres-Acosta, Sandoval-Castro, C.A., 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections *Veterinary Parasitology*, 186:18– 27.
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J, Sandoval-Castro, C.A., Mueller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvandini, H., Thamsborgg, S.M., Terrill, T.H., 2015. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology*, 212: 5–17.
- Hu, W.L., Wu, Y.M., Liu, J.X., Guo, Y.Q. y Ye, J.A., 2005. Tea saponins affect *in vitro* fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Journal of Zheijang University Science Biomedicine and Biotechnology* 6(8): 787–792.

- Kamaraj, C., Rahuman, A.A., Elango, G., Bagavan A., Zahir, A.A., 2011. Anthelmintic activity of botanical extracts against sheep gastrointestinal nematodes, *Haemonchus contortus*. Parasitology Research, 109:37–45.
- Mahour, k., Kumar A., Rana, R., Dwivedi D. y Vihan, V.S., 2007. Efficacy of *Annona Squamosa* plant leaves extract against *Haemonchus contortus* infection in goats. Journal Veterinary Practitioner 8, 52-54.
- Mc Donald, P., Edward, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A., Sinclair, L.A. y Wilkinson, R.G., 2014. Animal Nutrition Editorial Pearson.
- Menke, K.H., Steingass, H., 1988. estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Animal Research 23:103-116.
- Minitab 1997. Minitab users guide 2: Data analysis and quality tolos. State Collage PA, USA.
- Moghadamtousi, S.Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Mohd-Ali,H. y Abdul-Kadir H., 2015. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities Int J Mol Sci. 16(7): 15625–15658.
- Monforte-Briceño, G.E., Carlos A. S.C., Ramirez-Aviles L. y Capetillo Leal C.M., 2005. Defaunating capacity of tropical fodder trees: Effects of polyethylene glycol and its relationship to *in vitro* gas production. Animal Feed Science and Technology 123–124:313–327.
- Oskoueian, E., Abdullah, N., y Oskoueian, A., 2013.Effects of flavonoids on rumen fermentationactivity, methane production, and microbial population.BioMedResearch International.
- Pandey, N. y Barve, D., 2011. Phytochemical and pharmacological review on *Annonas quamosa* Linn. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 2(4):1404-1412.
- Posada, S.L. y Noguera, R.R., 2005. The *in vitro* gas production technique: a tool to evaluate ruminant feeds. Livestock Research for Rural Development 17: 36.
- Price, M.L. y Butter, L.G., 1977. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. Journal Agric. Food Chem. 25:1268

- Price, M.L., Van, S. y Butter, L.G., 1978. A critical evaluation of the vanillin reactions as an assay for tannins in sorghum grain. *Journal Agric. Food Chem.* 26:1214
- Pugh y Baird *et al.*, 2012. *Sheep and goat medicine* second edition editorial ELSEVIER Inc.
- Ralphs, M.H., Stegelmeier, B.L., 2011. Locoweed toxicity, ecology, control, and management international *Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 1:47-64.
- Rodríguez, C.L., Ríos, E.E., Macció, O.A., Merlo, W.A., Lectora, J., 2005. Intoxicación por *Ipomea fistulosa* en cabras. Efectos sobre el sistema nervioso. Universidad Nacional del Noreste. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas Resumen V-015*.
- Robertson, J.B., y Van Soest, P.J., 1981. The detergent system of analysis. In: James, W.P.T., Theander, O. *The analysis of dietary fiber in food*. Marcel Dekker, New York, NY, USA, pp. 123-158.
- Rymer, C., 2000. Chapter 6. The measure of the forage in digestibility *in vivo*. In *forage evaluation in ruminant nutrition*. pp 113-134
- Sánchez, H.L., Solorio-Sánchez, F.J. y Sandoval-Castro, C.A., 2001. Evaluación agronómica de especies arbóreas para la producción de forraje en la Península de Yucatán. *Livestock Research for Rural Development* 13(6)
- Solaiman, S.G., 2010. *Goat Science and Production*. Editorial Wiley-Blackwell Ingestive behavior, diet selection and feed intake. Pp: 179-192
- Stangroom, J., 2015. *Social Science Statistics*. www.socscistatistics.com utilizado el 20 de Enero del 2016
- Vit, P., Santiago, B., Pérez-Pérez, E.M., 2014. Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana *Annona muricata* L. *Interciencia*, 39(5):350-353.
- Souza, M., Belvi, C., Morais, S. M., Costa, C., Silva, A., Braz-Filho, R., 2008. Anthelmintic acetogenin from *Annona squamosa* L. Seeds. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 80: 271-277.
- Zamora, S., García J., Bonilla G., Aguilar H. y Harvey C.A., 2001. Uso de frutos y follaje arboreo en la alimentación de vacunos en la época de secas en Boaco, Nicaragua. *Agroforestería de las Américas* 8(31).