LA DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE LAS HOJAS DE ESPECIES ARBUSTIVAS: VARIACIONES ESTACIONALES Y RESPUESTA A LA ADICIÓN DE PEG[1]

H. Ammar, S. López, M.J. Ranilla, M.L. Tejido y J.S. González
Departamento de Producción Animal. Universidad de León. 24071 LEÓN.

INTRODUCCIÓN

Las especies arbustivas pueden llegar a ser recursos forrajeros de gran importancia para la alimentación de los rumiantes en condiciones de medio difíciles. Para un uso racional de estos recursos es preciso conocer su valor nutritivo que depende, fundamentalmente, de su contenido en lignina y de la presencia de taninos, factores que afectan de forma significativa a la digestibilidad. En cuanto a la presencia de taninos, se han descrito numerosos procedimientos para su determinación en sustratos de origen vegetal. En este sentido, se ha propuesto el estudio de la actividad biológica de los taninos como indicador del valor nutritivo de los forrajes en los que el contenido de estos compuestos secundarios es alto. Recientemente se ha descrito una técnica que consiste en analizar las variaciones la digestibilidad de un sustrato como respuesta a la adición de un compuesto capaz de neutralizar los taninos (Makkar *et al.*, 1995). El compuesto más utilizado ha sido PEG 6000, por su elevada capacidad de unión a compuestos polifenólicos a un pH próximo a la neutralidad (Makkar *et al.*, 1995). Los objetivos de este trabajo fueron estudiar las variaciones estacionales en la digestibilidad *in vitro* de las hojas de cuatro especies arbustivas, y determinar la presencia de taninos en estas especies a partir de las variaciones en su digestibilidad *in vitro* como consecuencia de la adición de polietilenglicol.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material vegetal utilizado consistió en muestras de hojas de cuatro especies arbustivas: brezo (*Erica australis*), jara (*Cistus laurifolius*), roble melojo (*Quercus pyrenaica*) y rosa silvestre (*Rosa canina*), obtenidas de matorrales de la montaña de la provincia de León. Los muestreos se realizaron en 1998, coincidiendo con el final de la primavera (10 junio), mediados del verano (10 agosto) y el final del otoño (26 noviembre), momentos en los cuales las plantas se encontraban en distintas fases de desarrollo. Las muestras de hojas se obtuvieron mediante separación manual y fueron inmediatamente liofilizadas y molidas con un molino provisto con una criba de 1 mm.

La digestibilidad *in vitro* se determinó según la técnica de Goering y Van Soest (1970), con las modificaciones propuestas en el procedimiento ANKOM-DAISY (ANKOM 1998) de forma que la muestra se introduce en bolsitas de material sintético poroso (250 mg/bolsita). Las bolsitas se incuban en vasijas de fermentación (recipientes de vidrio de 4 L de capacidad) que se disponen en un incubador a 39° C y con agitación continua. En cada serie de incubación se utilizaron dos vasijas. Al inicio de las incubaciones dentro de cada vasija se introdujeron 24 bolsitas (dos bolsitas por cada muestra) y se añadieron 2 L de líquido ruminal diluido. El líquido ruminal se obtuvo de cuatro ovejas Merinas provistas de cánula ruminal y alimentadas con heno de alfalfa. El líquido ruminal se diluyó al 20% con el medio de cultivo descrito por Goering y Van Soest (1970) sin tripticasa. La preparación del medio de cultivo, la adición de líquido ruminal y la transferencia de la mezcla a las

[1] Proyectos de la Junta de Castilla y León y del F.S.E. de la Unión Europea CSI3/99 y CSI2/01

vasijas de fermentación se realizaron en condiciones de anaerobiosis y a 39° C. La vasija control contenía únicamente las 24 bolsitas y el líquido ruminal diluido, mientras que a la vasija tratamiento se añadieron, además, 25 g de PEG. Las incubaciones se prolongaron durante 48 h. Transcurrido este tiempo, se extrajeron las bolsitas, se aclararon con agua fría y se secaron. Posteriormente, los residuos de incubación se trataron con una solución de detergente neutro (100° C, 1 h) utilizando el analizador de fibra diseñado por ANKOM (ANKOM, 1998). La digestibilidad *in vitro* de la MS (DMS) se calculó como: DMS = (MS incubada - residuo FND)/MS incubada. Las pruebas de incubación con y sin PEG se repitieron en tres semanas (6 observaciones por tratamiento). El efecto de la adición de PEG sobre la DMS de cada uno de los sustratos estudiados se cuantificó como el aumento relativo en la DMS que puede ser atribuido a la adición de PEG. El nivel de significación estadística de este efecto se determinó mediante análisis de la varianza en el que las fuentes de variación fueron la adición de PEG y la serie de incubación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se representan los coeficientes de DMS de las cuatro especies arbustivas en cada una de las fechas de muestreo. Las hojas de rosa silvestre y de jara mostraron los valores más altos de DMS, mientras que los coeficientes de DMS más bajos correspondieron a las hojas del brezo. En estas tres especies, se observaron pequeñas variaciones entre periodos de muestreo en los valores de DMS. Sin embargo, en el caso de las hojas de roble melojo, la DMS de las hojas disminuyó progresivamente desde el primer muestreo en primavera hasta el último muestreo realizado en otoño. Esta evolución en los valores de DMS debe atribuirse a un aumento en el contenido de FND que fue detectado en las hojas de roble al ser mayor su grado de madurez (Ammar *et al.*, 2000b).

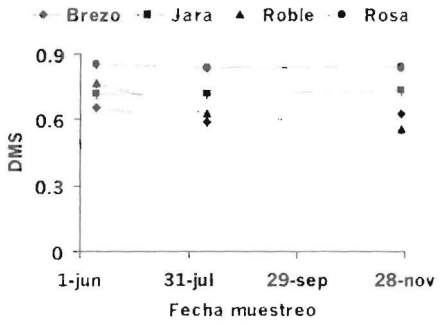


Fig.1- Variaciones estacionales en la DMS de las hojas de especies arbustivas

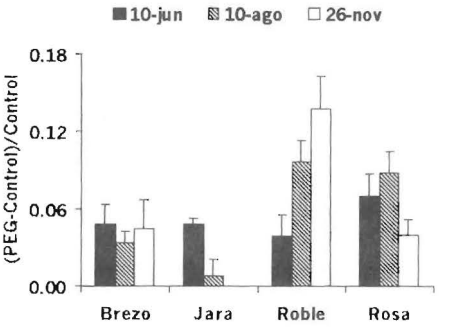


Fig. 2- Efecto de la adición de PEG sobre la DMS de las hojas de las cuatro especies arbustivas

La figura 2 ilustra el efecto de la adición de PEG sobre la DMS de las hojas de las cuatro especies arbustivas en cada fecha de muestreo. En casi todos los casos se observó un aumento numérico de la DMS como consecuencia de la adición de PEG, lo cual confirmaría que este compuesto tiene un alto poder neutralizante de los compuestos polifenólicos (Makkar *et al.*, 1995). Sin embargo, la respuesta al tratamiento con PEG fue muy variable entre las especies y los momentos de muestreo, probablemente debido a que la actividad biológica de los compuestos polifenólicos depende del tipo de los taninos y del grado de polimerización (Makkar

et al., 1995) que, a su vez, dependen de la especie arbustiva y de su gardo de madurez.

El aumento en la DMS debido a la adición de PEG fue muy pronunciado en las hojas de roble, siendo este efecto mayor cuanto mayor fue la senescencia foliar (3,9% en el caso de las hojas recogidas en junio y 13,7% para las hojas recogidas en noviembre). El aumento en la digestibilidad de las hojas de rosa fue estadísticamente significativo ($p<0,05$) en todos los casos, siendo la diferencia más amplia en verano y más reducida en otoño. La respuesta a la adición del PEG observada en las hojas de brezo fue similar en los tres muestreos con valores que oscilaron en un rango muy estrecho (de 3,4 a 4,9%), si bien la diferencia sólo fue significativa para las hojas recogidas en verano. La respuesta al tratamiento con PEG observada con las hojas de jara fue significativa en las primeras hojas recogidas tras el rebrote de primavera, mientras la adición de PEG no ocasionó un aumento en la DMS de las hojas de esta especie arbustiva recogidas en agosto y noviembre. Los resultados obtenidos sugieren que las hojas de las especies arbustivas presentan contenidos de taninos que pueden llegar a inhibir la actividad fermentativa del rumen hasta el punto de reducir considerablemente la digestibilidad de la MS. Sin embargo este efecto fue muy variable dependiendo de la especie y del grado de senescencia de las hojas. En general, el efecto de la adición de PEG sobre la DMS concuerda con la respuesta observada en la producción de gas de fermentación, aunque las diferencias en DMS entre tratamiento y control fueron de menor magnitud que las observadas en la producción de gas a las 12, 24 y 48 h de incubación *in vitro* (Ammar *et al.*, 2000a). Es preciso tener en cuenta que los complejos PEG-taninos formados precipitan y persisten en el residuo no digerido, pues son insolubles en la disolución de detergente neutro (Getachew *et al.*, 2000), enmascarando, en parte, el efecto del PEG sobre la actividad fermentativa cuando se estudia con un método gravimétrico. Aunque ambos métodos (digestibilidad *in vitro* y producción de gas) son válidos para detectar la presencia de taninos en plantas arbustivas, es preciso compararlos con otras técnicas de referencia para saber cuál de ellos permite cuantificar de una forma más aproximada la actividad biológica de estos compuestos polifenólicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ammar, H., López, S., Ranilla, M.J., Ovejero, F.J. y González, J.S. 2000a. Effects of polyethylene glycol on the ruminal fermentation of leaves collected from some Spanish browse species at different vegetative stages. *Gas production: fermentation kinetics for feed evaluation and to assess microbial activity*, pp: 74-75. Occasional Publication of BSAS, Edimburgo.

Ammar, H., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., González, J.S. y López, S. 2000b. Variations saisonnières de la composition chimique des feuilles d'arbustes de la montagne de León (Nord Ouest de l'Espagne). *Quality and Valorization of Mountain Animal Products*, pp. 9. F.A.O./CIHEAM.

ANKOM. 1998. Procedures for fiber and *in vitro* analysis. En: INTERNET www.ankom.com

Getachew, G., Makkar, H.P.S. y Becker, K. 2000. Effect of polyethylene glycol on *in vitro* degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. *British Journal of Nutrition* **84**: 73-83.

Goering, M.K. y Van Soest, P.J. 1970. *Forage Fiber Analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications)*. Agricultural Handbook No. 379, USDA, Washington.

Makkar, H.P.S., Blümmel, M. y Becker, K.. 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. *British Journal of Nutrition* **73**: 897-913.