

Uso de PEG4000 para evaluar la influencia de los polifenoles en la producción de gas *in vitro* con heces vacunas como inóculo

Silvio J. Martínez Sáez*, Cecilia E. González Pérez, Marlene León González, Redimio M. Pedraza Olivera y Oscar Loyola Hernández

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey, Cuba. *Correo electrónico: silvio.martinez@reduc.edu.cu

RESUMEN

En la búsqueda de técnicas analíticas que permitan obtener resultados confiables para la evaluación de materias primas y/o forrajes a ser usados en la alimentación de rumiantes, la medición de la producción de gas *in vitro* con el uso de heces vacunas puede ser un procedimiento de elección para predecir la digestibilidad, sin agresión alguna a dichos animales. Aplicando esta técnica, se estudiaron muestras de *Chamaecrista lineada*, *Desmodium barbatum*, *Desmodium incanum*, *Dichrostachys cinerea*, *Leucaena leucocephala* y *Stylosanthes viscosa*. Se evaluó la influencia de la adición de PEG4000 en la producción de gas y contrarrestó su efecto con la cantidad de polifenoles extractables presentes en las muestras. La adición del polímero mejoró ($P < 0,01$) la producción de gas (mL/200 mg MS) para *Ch. lineada* (8,5 a 12,3), *D. cinerea* (17,3 a 27,1) y *L. leucocephala* (16,8 a 20,0). En las leguminosas estudiadas, existió correlación positiva ($r^2 = 0,94$) entre la mejora producida por el PEG en la producción de gas y la concentración de polifenoles totales.

Palabras clave: gas *in vitro*, heces, PEG, polifenoles, leguminosas.

Use of PEG400 to assess the influence of polyphenols on *in vitro* gas production with bovine feces as inoculum

ABSTRACT

In the search of analytical techniques to achieve reliable results in assessing animal feed raw materials and/or forages, *in vitro* gas production using bovine feces can be a selected procedure to predict digestibility, without any aggression to the animals. Applying such technique, samples of *Chamaecrista lineada*, *Desmodium barbatum*, *Desmodium incanum*, *Dichrostachys cinerea*, *Leucaena leucocephala*, and *Stylosanthes viscosa* were evaluated. The correlation between the influence of PEG4000 on gas production and the concentration of extractable polyphenols was evaluated. The addition of PEG significantly ($P < 0.01$) improved *in vitro* gas production (mL/200 mg DM) of *Ch. lineada* (8.5 to 12.3), *D. cinerea* (17.3 to 27.1), and *L. leucocephala* (16.8 to 20.0). In the evaluated legumes, there was a positive correlation ($r^2 = 0.94$) between the improvement in gas production because of PEG and the concentration of polyphenols.

Keywords: *in vitro* gas, feces, PEG, polyphenols, legumes.

INTRODUCCIÓN

Los árboles y arbustos, junto a otras leguminosas, constituyen una importante fuente de nutrientes para los rumiantes en muchas regiones del planeta. Aun

cuando tales plantas son ricas en nutrientes, contienen además en muchos casos cantidades apreciables de metabolitos secundarios que, como es sabido, pueden influir negativa o positivamente en el desempeño de los microorganismos del rumen. Entre estos

metabolitos, los taninos son los más comúnmente encontrados. Los taninos son polifenoles capaces de formar, por condensación, un complejo estable de celulosa-proteínas-taninos, que protege las proteínas y la celulosa de la degradación ruminal, lo cual tiene una gran importancia en la nutrición de los rumiantes. Su acción positiva se relaciona también con la prevención del meteorismo en los rumiantes y con sus propiedades antioxidantes (Mlambo *et al.*, 2007). Para estudiar el efecto de los taninos sobre las proteínas y la fibra se han utilizado diferentes compuestos que ligan dichos taninos, inhibiendo su efecto. El más utilizado es el polietilenglicol (PEG) que forma enlaces de hidrógeno con los OH fenólicos de los taninos (Makkar *et al.*, 1995)

El presente trabajo fue realizado para evaluar la influencia del PEG4000 sobre la producción de gas *in vitro* con el uso de heces vacunas ya depuestas en 6 leguminosas y su correlación con el contenido de polifenoles en las muestras

MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas utilizadas fueron las arbóreas *Dichrostachys cinerea* y *Leucaena leucocephala* conjuntamente con *Chamaecrista lineata*, *Desmodium barbatu*, *Desmodium incanum* y *Stylosanthes viscosa*, todas leguminosas. Las muestras fueron tomadas de forma aleatoria de rebrotes de diferentes plantas, se secaron a 65°C en estufa con circulación forzada y se molieron hasta pasar por un tamiz de 1 mm.

Los polifenoles totales se determinaron según LABCA (1998) usando reactivo de Folin-Denis para desarrollar el color y ácido tánico como patrón. Para la determinación del gas *in vitro* se pesaron 200 mg de muestra, las cuales fueron adicionadas o no con igual cantidad de PEG4000 y se incubaron a 39°C. En todos los casos se usaron 3 replicas por tratamiento, es decir, cada planta con y sin la adición del PEG.

Como inóculo para la producción de gas se usaron heces vacunas con menos de 3 h de haber sido depuestas por vacas en ordeño. Las muestras de heces se mezclaron en proporción 1:3 con solución amortiguadora y suplementos minerales. El volumen del gas se midió en jeringas de 100 mL a las 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h (Martínez *et al.*, 2004).

Para tratar de eliminar el sesgo por cambio de inóculo entre una y otra corrida se empleó siempre

un estándar interno de *L. leucocephala* para corregir las diferencias.

Los datos se ajustaron siguiendo el criterio:

$$V = 0 \quad \text{para } t < 0 = \text{lag} \quad (1)$$

$$V = b \times (1 - \exp(-c \times t)) \quad \text{para } t > \text{lag} \quad (2)$$

Donde

lag = tiempo de demora en iniciarse la actividad fermentativa de la fracción insoluble (h)

V = volumen de gas producido (mL)

t = tiempo (h)

b y c son parámetros del modelo de Orskov-McDonald (1979),

El volumen usado en las comparaciones fue el calculado para t = 72 según (2).

Para determinar los parámetros de mejor ajuste se utilizó el programa Solver de Microsoft Excel® 2003. Los valores de r² y el error estándar fueron calculados con el uso de funciones de este mismo software. La comparación entre medias se hizo con el paquete SYSTAT® versión 7 para Windows®, según la dócima de Tukey. Los análisis de correlación se llevaron a cabo utilizando los valores determinados para 8, 16, 24, 48 y 72 h, sin considerar la fase lag que fue en todos los casos sustraída.

RESULTADOS Y DISCUSION

El Cuadro 1 muestra los resultados obtenidos para la media de producción de gas a las 72 h a partir de la fase lag sin y con la adición de PEG4000, así como la mejora obtenida en la producción de gas por la adición del acomplejante y el contenido de polifenoles presentes en la muestra. En el Cuadro 1 es notable que las dos arbustivas (*D. cirenea* y *L. leucocephala*) y *S. viscosa* posean volúmenes de producción de gas razonablemente altos, lo que señala concomitantemente su posible digestibilidad. Estas arbustivas (*D. cirenea* y *L. leucocephala*), sin embargo, mejoran (P<0,01) por la adición del polietilenglicol, lo cual es debido a su más alto contenido de polifenoles y la reacción del PEG con estos compuestos (Salem *et al.*, 2007). En el caso particular de *D. cirenea* resulta notable la mejora (más del 50%) en el volumen de producción de gas, lo que podría también ser en su digestibilidad.

En la Figura 1 se puede apreciar la buena correlación (r² = 0.94) existente entre el aumento de la cantidad de

Cuadro 1. Volumen de gas producido a las 72 h sin y con adición de PEG4000, y contenido de polifenoles extractables para las seis leguminosas estudiadas

	Sin PEG	Con PEG	Mejora	Polifenol
	mL/200 mg MS		----- % -----	
<i>Ch. lineada</i>	8,5*	12,3	44,4	8,24
<i>D. barbatum</i>	4,8	5,2	6,7	1,54
<i>D. incanum</i>	7,7	8,0	3,4	1,56
<i>D. cirenea</i>	17,3*	27,1	56,5	12,70
<i>L. leucocephala</i>	16,8*	20,0	18,7	2,35
<i>S. viscosa</i>	21,1	21,5	2,4	1,68

*Indica diferencia significativa ($P < 0,01$) entre el volumen producido sin y con la adición de PEG.

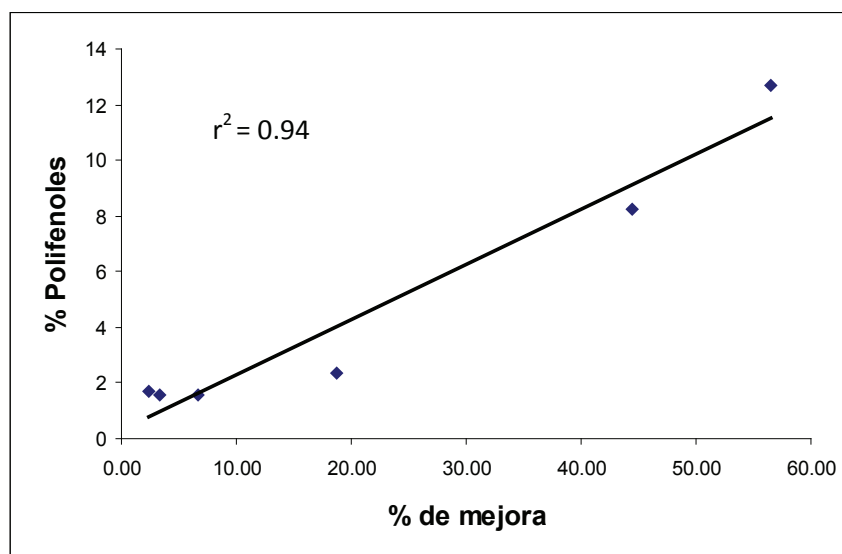


Figura 1. Correlación entre el contenido de polifenoles extractables y la mejora en la producción de gas *in vitro* por adición de PEG4000.

gas producida y el contenido de polifenoles presentes en las muestras, lo que está en perfecta concordancia con el criterio de que los taninos se unen al PEG y de esta manera permiten que incrementen la fermentación, es decir, como los taninos se unen al PEG que es más reactivo que las proteínas y la celulosa, estas quedan libres para el ataque de los microorganismos (Mlambo *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

El PEG4000 mejora la producción de gas *in vitro* de las tres leguminosas con mayor concentración de polifenoles entre las evaluadas. En las plantas

estudiadas, existe correlación positiva entre la mejora introducida por el PEG en el volumen de gas producido y la presencia de polifenoles extractables.

LITERATURA CITADA

- LABCA. 1998. Manual de Técnicas Analíticas, Laboratorio de Control Agroambiental, CEDEPA. Universidad de Camagüey, Cuba.
- Makkar H.P., M. Blümmel y K. Becker. 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. Brit. J. Nutr., 73: 897-913.
- Martínez S.J., R.M. Pedraza, G. Guevara. C.E. González, M. León y J.A. Estévez. 2004. Implementación de la técnica de producción de gas *in vitro* con heces vacunas como inóculo y su empleo para evaluar follajes de algunas leguminosas tropicales. Informe de Investigación. CEDEPA, Universidad de Camagüey, Cuba.
- Mlambo V., J.L.N. Sikosana, F.L. Mould, T. Smith, E. Owen e I. Mueller-Harvey. 2007. The effectiveness of adapted rumen fluid versus PEG to ferment tannin-containing substrates *in vitro*. Anim. Feed Sci. Tech., 136(1-2): 128-136.
- Ørskov E.R. y E.I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. J. Agric. Sci., 92: 499-503.
- Salem A.Z.M., P.H. Robinson, M.M. El-Adawya y A.A. Hassan. 2007. *In vitro* fermentation and microbial protein synthesis of some browse tree leaves with or without addition of polyethylene glycol. Anim. Feed Sci. Technol., 138(3-4): 318-330.